

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EBOLA VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDİN POLİMER  
KONJUGATLARININ VE NANOFORMÜLASYONLARININ  
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

**Tayfun ACAR**

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Serap DERMAN

Temmuz, 2020

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EBOLA VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDİN POLİMER  
KONJUGATLARININ VE NANOFORMÜLASYONLARININ  
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

Tayfun ACAR tarafından hazırlanan tez çalışması 28.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Serap DERMAN, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ

İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOGULLARI

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY

İstanbul Üniversitesi

---

---

---

---

---

Danışmanım Doç. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Ebola Virüsüne Ait Sentetik Peptidin Polimer Konjugatlarının ve Nanoformülasyonlarının Sentezi ve Karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tayfun ACAR

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 2016-07-04-DOP04 numaralı projesi ile ve TÜBİTAK Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı (2211/C) kapsamında desteklenmiştir.

*Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA anısına*

## TEŞEKKÜR

---

“Bıçağın keskin tarafı” olarak tasvir ettiği immunoloji terimi ile aşı kavramının hedefini, etkisini ve sonuçlarını tamamen farklı bir perspektifle bizlere açıklayan, aşı çalışmalarının temelini atan, ülkemizin yeri dolmayan değerlerinden, YTÜ Biyomühendislik Bölümü Kurucu Bölüm Başkanı merhum Sn. Prof. Dr. Mamed Mustafaev Akdeste Hocam;

Üst düzey kimya ve aşı bilgisi ile gıpta ettiğimiz sayısız çalışma ve projeye imza atan, yaşam danışmanlığımızı üstlenen, cesaretlendirici, öğretici, cömert ve güçlü kişiliği ile bizlerde her daim hayranlık uyandıran, uluslararası dostluğu ve barışı bilime dönüştüren, çok kıymetli Hocam merhum Sn. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva Akdeste;

Tüm eğitim, öğretilerinizi, saygınlığınız ve güveninizle bıraktığınız bu değerli miras için saygılar ve teşekkürler..

Derman'S Lab Araştırma Grubu'nun baş araştırmacısı, Danışmanım, Sn. Doç. Dr. Serap Derman, orkestranızın en kıymetli enstrümanlarını bana emanet ettiğiniz için, tüm değerli notalar için, tek bir bestede bile sırtınızı dönmediğiniz için, bizler otururken siz ayakta kaldığınız için çok teşekkürler.. Son selama dek ses getiren nice çalışmalara..

Bu tez çalışması süresince yapmış oldukları değerlendirmeler ile doktora çalışmama verdikleri destekten ötürü doktora Tez İzleme Jüri Üyeleri Sn. Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye, Sn. Doç. Dr. Banu Mansuroğlu'na ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Fikret Büyükkaya'ya; Takdir, sevgi ve desteğini her daim hissettiğim Sn. Prof. Dr. Adil Allahverdiyev ve çalışma grubuna; Çalışma hevesi, değerli yönlendirmesi, cömert desteği ve nezaketi için kilometre taşlarımızdan Sn. Prof. Dr. Işıl Albeniz ve çalışma grubuna;

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ-BAP Koordinatörlüğü'ne ve TÜBİTAK BİDEB 2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı' na;

Lisans, yüksek lisans ve doktora.. YTÜ'de geçen yıllar.. Ekürim, değerli arkadaşım, bilim yoldaşlarımdan Sn. Dr. Pelin Pelit Arayıcı çok teşekkürler..

Mükemmel bir bilim insanı, hayat yoldaşım, eşime tüm desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tayfun ACAR



# İÇİNDEKİLER

---

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xiv</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xix</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xxii</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı .....	3
1.3 Hipotez .....	4
<b>2 GENEL BİLGİ</b>	<b>5</b>
2.1 Ebola Virüs Hastalığı.....	5
2.1.1 Virüsün Taksonomisi.....	5
2.1.2 Virüsün Epidemiyolojisi.....	6
2.1.3 Ebola Virüsünün Fiziksel ve Kimyasal Maddelere Duyarlılığı.....	7
2.1.4 Ebola Virüsünün Viryon Yapısı .....	7
2.1.5 Ebola Virüsünün Replikasyonu .....	8
2.1.6 Ebola Virüsü Hemorajik Ateşinin Klinik Değerlendirmesi ve Patojenisi .....	9
2.1.7 Ebola Virüsünün Laboratuvar Tanısı Yöntemleri .....	11
2.1.8 Ebola Virüsüne Karşı Geliştirilen Aşılar .....	12
2.1.9 Ebola Virüsü Halka Aşılama Stratejisi.....	18



2.1.10	Aşı Aracılı Bağışıklık ve Koruma Korelasyonları .....	19
2.1.11	Salgınlardan Alınan Dersler ve Gelecek Perspektifi .....	21
2.2	Mikrodalga Destekli Katı Fazda Peptid Sentezi.....	22
2.3	Biyokonjugasyon .....	25
2.4	Polimerik Nanopartiküller .....	28
<b>3</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar .....	31
3.2	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar .....	33
3.3	Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	35
3.3.1	0.01 M PBS Tamponu.....	35
3.3.2	PVA Çözeltisi .....	36
3.3.3	Borik Asit Çözeltisi .....	36
3.3.4	Potasyum İyodür Çözeltisi .....	36
3.3.5	Kromik Asit Çözeltisi .....	36
3.4	Ebola Virüs Hastalığına Ait 421-430 Peptid Dizisinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	36
3.4.1	Peptid Sentezi .....	36
3.4.2	Peptidin Karakterizasyonu .....	41
3.5	Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu .....	42
3.5.1	Peptid-Polimer Konjugatlarına Ait Hesaplamalar.....	42
3.5.2	Peptid-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonu .....	46
3.6	Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	47
3.7	Partisyon Katsayısının (lipofilisite değeri, LogD) Belirlenmesi.....	51
3.8	Sentezlenen Sistemlerin <i>In-vitro</i> Sitotoksisite Analizleri.....	52
<b>4</b>	<b>SONUÇLAR</b>	<b>53</b>

4.1	W-EBOVP Peptidinin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	53
4.1.1	W-EBOVP Peptidinin LC-ESI-MS ile Analizi .....	54
4.1.2	W-EBOVP Peptidinin Q-TOF-MS Analizi.....	59
4.1.3	W-EBOVP Peptidinin FT-IR Analizi.....	60
4.2	Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu .....	60
4.2.1	Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezinde Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi .....	60
4.2.2	Polimer Miktarı Artan, Peptid Miktarı Sabit Koşullarda Konjugasyon.....	63
4.2.3	Peptid Miktarı Artan, Polimer Miktarı Sabit İken Konjugasyon.....	74
4.3	PLGA Nanopartiküllerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	84
4.3.1	Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi.....	85
4.3.2	Reaksiyon Verimi ve Peptid Yükleme Veriminin Belirlenmesi ...	86
4.3.3	SEM Analizi.....	87
4.3.4	FT-IR Analizi .....	89
4.3.5	Raman Analizi.....	90
4.3.6	PVA İçeriğinin Belirlenmesi .....	91
4.3.7	<i>In-vitro</i> Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirmesi .....	92
4.4	Partisyon Katsayısının (lipofilisite değeri, LogD) Belirlenmesi.....	94
4.5	<i>In-Vitro</i> Sitotoksisite Analizleri.....	97
<b>5</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>100</b>
5.1	Peptid Dizisinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Saflaştırılmasına Ait Tartışma .....	100
5.2	Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Saflaştırılmasına Ait Tartışma.....	101

5.3 Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma .....	107
5.4 Lipofilisite Çalışmasına Ait Tartışma .....	108
5.5 <i>In-Vitro</i> Sitotoksisite Analizlerine Ait Tartışma.....	110
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>112</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>125</b>



## SİMGE LİSTESİ

---

Da	Dalton
°C	Derece santigrat
L	Litre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
n	Mol
M	Molarite
nm	Nanometre
$\zeta$	Zeta potansiyeli

## KISALTMA LİSTESİ

ACN	Asetonitril
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Sığır serum albumin
DIEA	Diisopropil etil amin
DCM	Diklormetan
DLS	Dinamik ışık saçılması
DMF	Dimetil formamid
DRC	Demokratik Kongo Cumhuriyeti
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDT	1,2-Etan ditiol
ELS	Elektroforetik ışık saçılması
ESI	Elektrosprey iyonlaştırma
FA	Formik asit
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi (American food and drug administration)
Fmoc	9-Florenilmetoksikarbonil
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
GP	Glikoprotein
GPC	Moleküler eleme kromatografisi (Gel permeation chromatography)
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'- tetrametilüronyum heksaflorofosfat (O-(Benzotriazol-1-yl)-N, N, N, N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
HCTU	N, N, N', N'-tetrametil-O- (6-kloro-1 H-benzotriazol-1-il) üronyum hekzaflorofosfat (N, N, N',N'-Tetramethyl-O-(6-chloro-1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate)
HLB	Hidrofilik-lipofilik denge
HOBT.H <sub>2</sub> O	1-Hidroksibenzotriazol hidrat
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (Liquid chromatography-mass spectroscopy)
LogD	Dağılım katsayısı
LogP	Partisyon katsayısı
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
NP	Nükleoprotein
PAA	Poli(akrilik asit)
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline)
pH	Hidrojenin gücü (Power of hydrogen)
PLGA	Poli(laktik asit-co-glikolik asit)
PVA	Polivinilalkol
RI	Kırılma indisi
RALS	Işık saçılması
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscopy)

UV	Ultra violet
VLP	Virüs benzeri partikül (Virus like particle)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ebola virüsünün moleküler yapısı [45] .....	8
Şekil 2.2 Katı fazda peptid sentezinin genel reaksiyon mekanizması [102] ..	25
Şekil 2.3 EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyokonjugasyon reaksiyonu şeması.....	28
Şekil 3.1 Buchi cam fırın ile peptidin vakum altında kurutulması .....	39
Şekil 3.2 Nuçe erleni ve Por 4 ile TFA kokteyline geçen peptidin rezinden ayrılması.....	39
Şekil 3.3 Kırma işlemi sonrası elde edilen jel kıvamındaki peptidin görünüşü .....	39
Şekil 4.1 Ham peptidin LC kromatogramı.....	53
Şekil 4.2 Ham peptidin ESI-MS spektrumu .....	54
Şekil 4.3 1.0 ppm peptidin LC kromatogramı .....	54
Şekil 4.4 Peptidin LC analizleriyle elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	55
Şekil 4.5 0.51 ppm peptidin LC kromatogramı .....	55
Şekil 4.6 0.5625 ppm peptidin LC kromatogramı .....	55
Şekil 4.7 0.75 ppm peptidin LC kromatogramı .....	56
Şekil 4.8 0.5025 ppm peptidin LC kromatogramı .....	57
Şekil 4.9 0.525 ppm peptidin LC kromatogramı .....	57
Şekil 4.10 0.75 ppm peptidin LC kromatogramı .....	57
Şekil 4.11 W-EBOVP peptidinin LC-MS kütle spektrumu .....	59
Şekil 4.12 W-EBOVP peptidinin Q-TOF-MS kütle spektrumu .....	59
Şekil 4.13 W-EBOVP peptidinin FT-IR spektrumu.....	60
Şekil 4.14 W-EBOVP peptidinin molekül yapısı .....	60
Şekil 4.15 PAA ve 2. yöntemle sentezlenen konjugatlara ait GPC RALS kromatogramları.....	62
Şekil 4.16 $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	63
Şekil 4.17 $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0250$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	64
Şekil 4.18 $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0334$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	64
Şekil 4.19 $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0500$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	65

<b>Şekil 4.20</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0667$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	65
<b>Şekil 4.21</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0834$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	66
<b>Şekil 4.22</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1001$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	66
<b>Şekil 4.23</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1334$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	67
<b>Şekil 4.24</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1668$ konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı .....	67
<b>Şekil 4.25</b> PAA ve $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$ ve $0.1668$ oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı GPC UV kromatogramları .....	68
<b>Şekil 4.26</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$ ve $0.1668$ oranlarındaki konjugatların serbest peptid (W-EBOVP) ile kıyaslamalı floresans spektrumu .....	69
<b>Şekil 4.27</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	70
<b>Şekil 4.28</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0250$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	70
<b>Şekil 4.29</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0334$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	71
<b>Şekil 4.30</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0500$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	71
<b>Şekil 4.31</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0667$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	72
<b>Şekil 4.32</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0834$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	72
<b>Şekil 4.33</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1001$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	73
<b>Şekil 4.34</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1334$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	73
<b>Şekil 4.35</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1334$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	74
<b>Şekil 4.36</b> $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	74
<b>Şekil 4.37</b> $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.5$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	75



<b>Şekil 4.38</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	75
<b>Şekil 4.39</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	75
<b>Şekil 4.40</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	76
<b>Şekil 4.41</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	76
<b>Şekil 4.42</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$ konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı.....	76
<b>Şekil 4.43</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ oranlarındaki konjugatların polimer ile kıyaslamalı olarak çakışık GPC a) UV ve b) RALS kromatogramları.....	77
<b>Şekil 4.44</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	77
<b>Şekil 4.45</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.5$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	78
<b>Şekil 4.46</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	78
<b>Şekil 4.47</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	79
<b>Şekil 4.48</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	79
<b>Şekil 4.49</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	80
<b>Şekil 4.50</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$ konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu .....	80
<b>Şekil 4.51</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ oranlarındaki konjugatların floresans spektrumu .....	81
<b>Şekil 4.52</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	81
<b>Şekil 4.53</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.5$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği.....	82
<b>Şekil 4.54</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği .....	82
<b>Şekil 4.55</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği .....	83

<b>Şekil 4.56</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği .....	83
<b>Şekil 4.57</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği .....	84
<b>Şekil 4.58</b> $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$ konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği .....	84
<b>Şekil 4.59</b> E3 nanopartiküllerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği.....	87
<b>Şekil 4.60</b> E5 nanopartiküllerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği.....	87
<b>Şekil 4.61</b> E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (10.000 büyütme).....	88
<b>Şekil 4.62</b> E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000 büyütme).....	88
<b>Şekil 4.63</b> E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (30.000 büyütme).....	89
<b>Şekil 4.64</b> E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (50.000 büyütme).....	89
<b>Şekil 4.65</b> E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı FT-IR spektrumu .....	90
<b>Şekil 4.66</b> E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı raman spektrumu .....	90
<b>Şekil 4.67</b> PVA'ya ait UV-VIS kalibrasyon eğrisi .....	91
<b>Şekil 4.68</b> Kolorimetrik yöntem uygulandıktan sonra E3 nanopartiküllerinin UV-VIS spektrumu .....	91
<b>Şekil 4.69</b> E3 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerden peptidin in-vitro salım profili .....	92
<b>Şekil 4.70</b> E3 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerden peptidin salım kinetiği a) Higuchi, b) First-order, c) Korsmeyer-Peppas, d) Zero-order kinetik modeli .....	93
<b>Şekil 4.71</b> $n = 9$ konjugatının pH-LogD değişim grafiği.....	94
<b>Şekil 4.72</b> a) W-EBOVP peptidine, b) peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve c) boş nanopartiküllere (E5) ait pH değerlerine karşı potansiyel değerlerindeki değişim grafiği .....	95
<b>Şekil 4.73</b> W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait pH-LogD değişim grafiği.....	96
<b>Şekil 4.74</b> W-EBOVP peptidinin fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği.....	98
<b>Şekil 4.75</b> $n = 9$ konjugatının fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği.....	98

- Şekil 4.76** E3 nanopartiküllerinin fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği.....99
- Şekil 5.1**  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların serbest peptide ve polimere kıyasla partikül boyutu değerlerinin karşılaştırılması.....102
- Şekil 5.2** Başlangıçta kullanılan, reaksiyona giren ve konjugasyon sonrası reaksiyona girmeden kalan W-EBOVP peptidinin GPC UV 23. dk pik alanları.....104
- Şekil 5.3**  $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  konjugatlarının GPC RALS ve GPC UV 11. dk pik alanları.....105
- Şekil 5.4** Konjugatların ( $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ )  $\lambda_{max}$  değerlerindeki floresans kayma .....106
- Şekil 5.5**  $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların serbest peptide ve polimere kıyasla partikül boyutu değerlerinin karşılaştırılması .....107

## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 3.1</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazlar .....	31
<b>Tablo 3.2</b> Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar .....	33
<b>Tablo 3.3</b> W-EBOVP peptidinin özellikleri [122] .....	37
<b>Tablo 3.4</b> Peptidin sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	38
<b>Tablo 3.5</b> $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834,$ $0.1001, 0.1334$ ve $0.1668$ oranlarında konjugatlar için polimer miktarları.....	44
<b>Tablo 3.6</b> $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ oranlarındaki konjugatlar için peptid miktarları.....	45
<b>Tablo 3.7</b> Nanopartikül formülasyonlarına ait bilgiler .....	48
<b>Tablo 4.1</b> Peptidin LC analizi için yöntem validasyon sonuçları.....	58
<b>Tablo 4.2</b> Üç farklı yöntemle sentezlenen konjugatların GPC RALS dedektörü kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen alanlar .....	61
<b>Tablo 4.3</b> Üretilen nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri .....	85
<b>Tablo 4.4</b> Üretilen nanopartiküllerin reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL).....	86
<b>Tablo 4.5</b> W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait hesaplanan LogD değerleri.....	96

## **Ebola Virüsüne Ait Sentetik Peptidin Polimer Konjugatlarının ve Nanoformülasyonlarının Sentezi ve Karakterizasyonu**

Tayfun ACAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Ebola virüsü, insanlarda ve insandışı primatlarda viral hemorajik ateş şeklinde ciddi hastalık formlarına yol açan bir patojendir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 4. risk grubu patojen olarak kabul edilen ebola virüs hastalığı, ülkemizde çok yaygın olarak görülmesine de son zamanlarda dünya üzerinde hastalıkların hızla yayılması ve ülkemizin bulunduğu coğrafi koşulların olumsuz etkileri nedeniyle Türkiye için de potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında konu olarak Ebola virüs hastalığı seçilmiş ve bu hastalığa karşı kovalent konjugasyon yöntemine dayalı peptid-polimer biyokonjugatları ve peptid esaslı nanomalzemelerle yeni nesil aşı sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Tez çalışmasında, Ebola virüsünün nükleoproteinine (EBOV NP) ait antijenik özellikli olan 421-430 peptid dizisinin kimyasal olarak sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Peptidin karakterizasyonu için LC-ESI-MS, preparatif HPLC ve FT-IR spektrometre sistemleri kullanılmıştır. Peptid epitopunun ticari olarak temin edilen Poli(akrilik asit) ile biyokonjugatları

sentezlenmiş ve yapıları aydınlatılmış, ticari olarak temin edilen ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı olan poli(laktik asit-co-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri ile peptid yüklü nanotaşıyıcı sistemleri üretilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Biyokonjugatların karakterizasyonu için GPC, floresans spektrofotometre ve zetasizer; nanopartiküllerin karakterizasyonu için ise zetasizer, LC-ESI-MS, floresans spektrofotometre, UV-VIS spektrometre, SEM, FT-IR spektrometre ve Raman spektrometre sistemlerinden yararlanılmıştır. Elde edilen biyokonjugatlardan ve nanopartiküllerden karakterizasyonları sonucu en uygun birer formülasyon için, lipofilisite çalışması ve L929 fare fibroblast hücre hattında MTT sitotoksosite testi yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ebola hastalığı, katı fazda peptid sentezi, biyokonjugasyon, polimerik nanopartiküller, sentetik peptid aşısı

# Synthesis and Characterization of Polymer Conjugates and Nanoformulations of the Synthetic Peptide of the Ebola Virus

Tayfun ACAR

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serap DERMAN

Ebola virus is a pathogen that can cause severe viral hemorrhagic fever in humans and non-human primates. This virus is considered as Risk Group 4 by the World Health Organization (WHO) and although it is not commonly seen in our country it is a potential threat due to the spreading of contagious diseases and the negative effects of the geographical conditions of our country. This is why the Ebola virus is chosen for the scope of this thesis and it is aimed to develop a new generation vaccine system against the virus using peptide-polymer bioconjugates formed with covalent conjugation, and peptide based nanomaterials. In the thesis study, chemical synthesis and characterization of the 421-430 peptide sequence, which is antigenic characteristic of the nucleoprotein (EBOV NP) of the Ebola virus, has been carried out. LC-ESI-MS, preparative HPLC, and FT-IR spectrometer systems have been used for the characterization of the peptide. The bioconjugates of the peptide epitope with the commercially available poly(acrylic acid) have been synthesized and characterized. The peptide-loaded nanocarrier systems have been produced and characterized by using commercially available and the American

Food and Drug Administration (FDA) approved poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer. While the bioconjugates have been characterized by using GPC, fluorescence spectrophotometer, and zetasizer systems; for the characterization of peptide-loaded nanoparticles, zetasizer, LC-ESI-MS, fluorescence spectrophotometer, UV-VIS spectrometer, SEM, FT-IR spectrometer, and Raman spectrometer systems have been utilized. Lipophilicity study and MTT cytotoxicity test on the L929 mouse fibroblast cell line were performed for the selected optimum one bioconjugate and one nanoparticle formulation.

**Keywords:** Ebola disease, solid phase peptide synthesis, bioconjugation, polymeric nanoparticles, synthetic peptide vaccine





### 1.1 Literatür Özeti

Batı Afrika'da 2014 yılında gözlenen Ebola kanamalı ateşi salgını (şimdiki adı Ebola virüsü hastalığı), 1976'da görülen ilk vakadan bu yana meydana gelen en büyük salgındır [1]. Olguların ve ölümlerin sayısı, daha önce tüm salgınlarda kaydedilen vakaların toplam sayısını oldukça aşmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun 30 Mart 2016 tarihli raporuna göre, onaylanmış veya şüpheli vakaların toplam sayısı 28.646'dır ve 11.323 ölüm bildirmiştir [2]. En çok etkilenen ülkeler Gine, Liberya ve Sierra Leone'dir [3]. Ortalama Ebola virüs hastalığı ölüm oranı yaklaşık %50'dir. Geçmişteki salgınlarda vaka ölüm oranları %25 ile %90 arasında değişmiştir. Bu oranlar hastalığın ne derecede ciddi olduğunu ortaya koymuştur [4]. Ülkemizde onaylanmış veya ölümlerle sonuçlanmış bir Ebola vakası yoktur. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, WHO'nun Ebola ile ilgili durum raporları doğrultusunda, hastalığın sık görüldüğü bölgelere seyahat edecek kişilerin dikkat etmesi gereken hususlar hakkında bilgilendirmeler ve açıklamalar yapmaktadır [5].

Batı Afrika'da Ebola ile ilgili uluslararası halk sağlığı acil durumu, 29 Mart 2016 tarihinde kaldırılmıştır. 2016-2019 yılları arasında bir çok vaka görülmüş ancak salgın boyutuna ulaşmamıştır. Bu süreçte devam eden aşı çalışmaları ilk sonuçlarını vermeye başlamıştır [6-8]. 12 Nisan 2019'da, WHO ve Kongo Demokratik Cumhuriyeti Ulusal Biyomedikal Araştırma Enstitüsü (Institut National de Recherche Biomédicale), 2014-2019 yıllarında faz çalışmaları kapsamında kullanılan rekombinant veziküler stomatit virüsü - Zaire Ebola virüsü (rVSV-ZEBOV) aşısının etkinliğine ilişkin bir ön analiz yayınlamıştır. Veriler, aşının, aşılanmamış olanlara kıyasla aşılanmış kişilerde Ebola enfeksiyonlarının önlenmesinde dikkate değer bir etkinlik gösterdiğini ileri sürmüştür. Uzmanlar aşı

olmaya uygun olanların 6 aydan büyük çocukları ve emziren kadınları kapsayacak şekilde daha da genişletilmesi çağrısında bulunmuşlardır; iki popülasyonun özellikle yüksek atak oranlarına ve yüksek vaka ölüm oranlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir [9, 10]. rVSV-ZEBOV aşısı 19.12.2019'da FDA tarafından onaylanmıştır [11].

WHO, 01.06.2020 tarihinde Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nin kuzeybatısında yeni Ebola vakalarının tespit edildiğini duyurmuştur. Kongo Demokratik Cumhuriyeti Hükümeti de, Ekvator eyaletindeki Mbandaka Wangata sağlık bölgesinde yeni bir Ebola virüsü hastalığı salgınının meydana geldiğini doğrulamıştır. Kongo'nun doğu Demokratik Cumhuriyeti'nde uzun, zor ve karmaşık bir Ebola salgını son aşamasındayken yeniden ortaya çıkmıştır. Dünyanın en büyük ikinci Ebola salgını 25 Haziran 2020'de ilan edilmiştir. WHO Genel Direktörü Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, COVID-19'un insanların karşılaştığı tek sağlık tehdidi olmadığını hatırlatarak “Dikkatimizin büyük kısmı COVID-19 pandemisinde olmasına rağmen, WHO diğer sağlık acil durumlarını izlemeye ve yanıt vermeye devam ediyor.” şeklinde açıklamalarda bulunmuştur. rVSV-ZEBOV aşılama verilerine göre, 8 Ağustos 2018 ile 20 Mayıs 2020 arasında, 305.841 kişinin aşılama için uygun olarak belirlendiğini göstermiştir ve %99.4'ü (n = 303.905) aşılanmıştır [12]. Ayrıca Kongo Demokratik Cumhuriyeti, Kuzey Kivu Karisimbi Sağlık Bölgesi, Majengo ve Kahembe sağlık alanlarında, adenovirüs vektörü Ad26-ZEBOV/MVA-BN-FILO aşısı kullanılarak aşılama çalışmaları yapılmıştır. 14 Ekim 2019 ile 10 Nisan 2020 tarihleri arasında 20.339 kişiye bu aşının ilk dozu, 9.560 kişiye ikinci dozu uygulanmıştır [12-14].

Herst ve arkadaşları, Ebola hastalığı için CD8+ T hücre bağışıklığına dayalı bir peptid aşısının kavramsal olarak sağlam ve uygulanabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmada, Ebola virüs NP'nin korunmuş bir bölgesinde bulunan 9 amino asitli peptidi (NP44-52; YQVNNLEEI), Ebola yapılan farelerde morbidite ve mortaliteye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. NP44-52 içeren bir adjuvanlanmış mikrosfer peptid aşı formülasyonu kullanılarak bir C57BL/6 faresinde tek bir aşılama, farelere bağışıklık kazandırmak için yeterli gelmiştir [15].

İnfeksiyon etkenlerinin (bakteri, virus, parazit) immunojenik olan komponentlerinin protein yapıları (peptid) (aminoasit sayısı, türü ve sıraları) belirlendikten sonra, *in-vitro* koşullarda yeterli miktarda kimyasal sentezleri (sentetik peptid) yapılır ve elde edilen peptidler aşı olarak kullanılabilir. Bu peptidler (antijenler) vücuda verilerek koruyucu antikorların meydana gelmesi sağlanır. Bu aşilar vücutta infeksiyon oluşturmaz ve üremezler. Peptidler protein ve lipopolisakkaritlere göre oldukça küçük moleküller olduklarından aşı çalışmalarında immünolojik yanıt elde etmek ya da var olan immün yanıtı çoğaltmak için bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duyarlar [16]. Poli(akrilik asit) (PAA) suda çözünebilen bir polimerdir. Lineer, dallanmış, çapraz bağlı ya da dendrimer formları veya farklı kopolimerleri aşı çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [17-20]. Ekibimizin, melanoma kanserine karşı aşı geliştirmek amacıyla Poli(N-vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit) [P(VP-co-AA)]'in adjuvant olarak kullanıldığı peptid-polimer kompleks ve konjugatlarının farelere uygulandığı bir çalışması mevcuttur. Çalışmada, P(VP-co-AA)'in peptidin immün yanıtı arttırmada etkili olduğu görülmüştür [18]. Laktik asit ve glikolik asidin farklı oranlarda kopolimerizasyonu ile elde edilen PLGA, FDA tarafından onaylı, biyoyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. PLGA kullanılarak elde edilen polimerik partiküller (mikropartikül, nanopartikül, dendrimer vb.) sistemler aşı çalışmalarında peptidlerin stabilitesini ve immün yanıtı arttırmada, kontrollü salınmasında ve hedeflendirilmesinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

## 1.2 Tezin Amacı

Tezin amacı Dünya'da epidemiyolojik salgınlara yol açan, 2013 yılında yaklaşık 11.000 insanın ölümüyle sonuçlanan Ebola hastalığına karşı aşı modelinin geliştirilmesinde, serbest peptide kıyasla daha etkin ve hedefe yönelik olacağını düşündüğümüz biyokonjugatların sentezi ve nanosistemlerin geliştirilmesi bu tezin amacıdır. Bu çalışmada ilk kez olarak; Ebola virüsüne karşı immunojen molekül olan 421-430 amino asit dizili peptid epitopunun; sentezlenmesi, taşıyıcı polimer olarak Poli(akrilik asit) (PAA) kopolimeri ile biyokonjugatlarının sentezlenmesi, Poli(laktik asit-co-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri ile

kapsüllenmesi sonucu nanoformülasyonlarının üretimi ve elde edilen biyomalzemelerin karakterize edilmesini takiben sitotoksosite testleri yapılarak aşı formülasyonlarının geliştirilmesi ve böylece Ebola'ya karşı yeni aşı aday malzemelerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

### **1.3 Hipotez**

Literatürde yer alan peptid bazlı aşı çalışmalarında peptidlerin kısa yarılanma ömrü ve düşük stabilitelerinden dolayı düşük antijenisite gösterdikleri ve bu nedenle çeşitli adjuvanların kullanımının gerektiği bildirilmiştir. Bu tez kapsamında PAA ve PLGA polimerlerinin adjuvan özelliklerinden yararlanarak Ebola virüsünün nükleoproteinine ait 421-430 peptidinin biyokonjugatları ve nanopartikülleri sentezlenerek peptidin antijenik özelliklerinin ve biyoyumluluğunun arttırılabileceği öngörülmektedir.

Böylece elde edilecek biyomalzemelerin daha ileri çalışmalarda kullanılabileceği ve buradan alınan sonuçların Ebola hastalığına karşı Dünya'da ve ülkemizde yapılmakta olan ve yapılacak aşı çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

### 2.1 Ebola Virüs Hastalığı

#### 2.1.1 Virüsün Taksonomisi

2014'de açıklanan virüs taksonomisine göre, Ebola virüsü Mononegaviraller familyasından, Filoviridae ve cinsindedir. Bundibugyo Ebola virüs (BEBOV), Reston Ebola virüs (REBOV), Sudan Ebola virüs (SEBOV), Tai Ormanı Ebola virüs (eski Fildişi Sahili Ebola virüs, ICEBOV) ve Zaire Ebola virüs (ZEBOV) olmak üzere 5 tanımlanmış türe sahiptir [3]. Ebola virüsün cinslerine ek olarak, Filoviridae familyası Cuevavirus ve Marburgvirus olmak üzere iki başka cins daha içerir [21]. Filovirüsler, Reston virüsü hariç, esasen Afrika kökenlidir ve son zamanlarda belirgin Cuevavirus cinsini temsil eden İspanyol yarasalar Lloviu virüsünde tanımlanmıştır [22]. Virüs adı, ilk hemorajik ateş vakalarının 1976'da kaydedildiği Demokratik Kongo Cumhuriyeti'ndeki (eski adıyla Zaire) Ebola Nehri'nden türemiştir. Sırasıyla iki farklı SEBOV ve ZEBOV türünün neden olduğu hastalık, Sudan'ın güneyinde ve kuzey Zaire'de eş zamanlı olarak gözlemlenmiştir [23]. Ebola virüsler arasında, ZEBOV en yüksek ölüm oranına (% 90'a kadar) sahiptir. Diğer türler ile enfeksiyon olması durumunda bu oran anlamlı derecede düşüktür (SEBOV ve BEBOV için sırasıyla yaklaşık % 53 ve % 25'dir) [24]. Bir salgın sırasındaki ana enfeksiyon kaynakları hasta insanlar veya insan cesetleri ile temastır, ancak virüsün doğal rezervuarının filovirüs izolatları çok yüksek genetik çeşitlilik ile karakterize olan asemptomatik enfekte meyve yarasaları olduğu düşünülmektedir . İnsanlardan ve yarasalardan elde edilen Marburg virüsü RNA sekanslarının filogenetik analizleri sonucunda, yarasalardan yayılan virüsün insanlarda salgın oluşturabileceği ifade edilmektedir [25]. Ek olarak, makaklar, şempanzeler, antiloplar, kemiriciler ve şimdiye dek tanımlanamayan diğer türlerin insanlar için önemli bir enfeksiyon kaynağı olduğu saptanmıştır . Güney Sudan'da ve Nzara'da insanlardan izole edilen SEBOV büyük olasılıkla bir hayvan

rezervuarına sahip değildir [25]. Bu varsayım, neredeyse 30 yıldır komşu Sudan ve Uganda'dan köken alan suşların bölgesel olarak sınırlı oluşu ve genetik stabilitesi ile doğrulanmaktadır. 1994 yılında Fildişi Sahili'nde bulunan Tai Ormanı Ebola virüsü (TAFV), otopsisini yapan bir etnolog tarafından Tai Ulusal Parkı rezervindeki bir şempanzeden izole edildi [26]. Bu virüs ölümcül olmayan tek bir insan vakasında tanımlandığı için, esas olarak şempanzelere bulaştığı varsayılmıştır [26]. Ebola-Bundibugyo virüsü (BEV) 2007'de ortaya çıkmıştır . BEV enfeksiyonu diğer ebola virüslerinden klinik semptomlarla ayırt edilemez [27, 28]. REBOV ise, Filipinler'den gelmektedir. İlk olarak Reston Ebola virüsü, ABD'de Filipinler'den ithal edilen makaklarda tespit edilmiştir ve bir karantina tesisine yerleştirilmiştir [29]. İnsan olmayan primatlarda ortaya çıkan bu tür, yüksek ölüm oranıyla sonuçlanan hemorajik ateşe neden olur. Aynı zamanda, genellikle domuz solunum ve üreme virüsü (PRRS) ile birlikte enfekte olmuş Filipin domuzlarında da ortaya çıkmıştır, ancak REBOV'un domuzlardaki mevcut patojenik potansiyeli belirsizliğini korumaktadır. İnsanlarda patojenik olmadığı bilinmektedir, ancak insanlarda spesifik antikörlerin varlığı, enfekte olmuş hayvanlardan insanlara transfer olasılığını gösterir [29-32].

### **2.1.2 Virüsün Epidemiyolojisi**

Ebola virüsü hastalığı zoonotik bir hastalıktır ve insan popülasyonundaki her salgın hastalık, bir hayvan rezervuarından giriş ile başlatılır (örneğin; avlanma, enfekte canlı veya ölü hayvanlarla doğrudan temas) [33]. Yağmur ormanlarının yakınında yaşayan kırsal kesimde ortaya çıkan sporadik vakaların yayılması, büyük kentsel kümelenmelerde ve yeni bir salgının gelişmesinden sorumludur. Hasta bir kişiyle (özellikle viral yükler en yüksek olduğunda enfeksiyonun son aşamalarında) veya hasta tarafından kullanılan kontamine olmuş nesnelere doğrudan temas öncü enfeksiyon kaynağıdır. Sağlık çalışanlarının veya hastaların bakımını yapan kişilerin, uygun kişisel koruyucu donanım kullanmadığında veya cenaze töreni sırasında enfekte olması, epidemiyolojik zincirde önemli bir unsurdur. Vücut sıvıları (özellikle kan) ve salgıları (tükürük, idrar, kusma, dışkı, meni) bulaşıcıdır [33]. Filovirüsler konakçıya derideki mukozal yüzeyler, çatlama ve sıyrıklar veya kazayla enjeksiyon yoluyla girer [34]. Hastane

ortamında, aerosoller yoluyla enfeksiyon da mümkündür (örneğin; entübasyon ve bronkoskopi sırasında), ancak insandan insana hava yoluyla yayılmanın meydana geldiğinin açık bir kanıtı yoktur [34]. Bir hayvan modelinde, iğne batması yaralanması durumunda, enfeksiyon ve hastalık yayılma riskinin, aerosol ile benzer bir dozun uygulanmasından çok daha büyük olduğu doğrulanmıştır. Batı Afrika'daki Mart 2014'te ilan edilen salgın, Aralık 2013'de Ormanlık Gine de kaydedilen kazalardan kaynaklanmıştır. Sebep olan ajanın, Zaire Ebola virüsünün uzak ve genel bir türü olduğu belirtilmiştir [35]. Halen görülmekte olan epidemik hastalığın mortalite oranının karakteristikleri, önceki salgınlarda gözlenenenden çok daha zayıftır [12, 14, 36, 37].

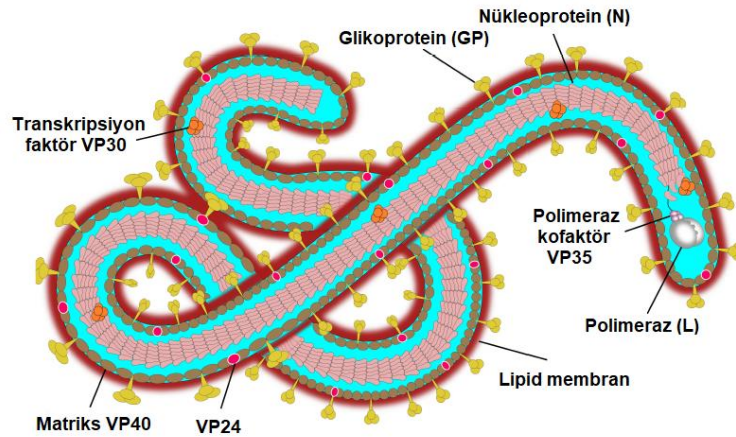
### **2.1.3 Ebola Virüsünün Fiziksel ve Kimyasal Maddelere Duyarlılığı**

Ebola virüsleri hem biyogüvenlik seviyesi 4 hem de A kategori listesindeki patojenler olarak sınıflandırılır [38]. Filovirüslerin enfektivitesi oda sıcaklığında oldukça stabildir, ancak 60 °C'de 30 dakikalık bir inkübasyonla büyük ölçüde inaktive edilirler [38, 39]. Filovirüsleri inaktive eden mevcut yöntemler yüksek dozlarda ultraviyole ışık, gama ışınımı, formalin tedavisi, lipid çözücüler, b-propiolakton, foto-indüklenen alkilleme probu 1,5-iyodofililazid, ticari hipoklorit ve fenolik dezenfektanlarla sınırlıdır [40, 41].

### **2.1.4 Ebola Virüsünün Viryon Yapısı**

Viryon, yaklaşık 80 nm'lik homojen bir çapa ve 970 ila 1200 nm arasında uzunluğa sahiptir. Hücre kültürlerinde çoğaltıldığında, belirgin pleomorfizma ile karakterize edilir ve uzunluğu 14.000 nm'ye kadar yükselebilir. Viryon çekirdeği, doğrusal, bölümlere ayrılmamış, tek iplikçikli, negatif-anlamı bir RNA molekülüne sahiptir. RNA heliksel şekilde sarılır ve NP, VP35, VP30 ve L proteinleri ile kompleksleştirilmiştir [42]. Sarmal nükleokapsit, yaklaşık 10 nm uzunluğunda, bağlanmış spesifik glikoprotein (GP) çivileri bulunan bir dış zarf ile çevrilidir. Bu glikoproteinler, virüs girişindeki rolü ve immünojenikliğinden dolayı patogeneizde kilit bir rol oynar [42]. Glikoproteinler immün hücrelerin hedefidir ve bu nedenle aşuların geliştirilmesinde ilgi çekicidir. Viral matriks proteinleri, VP40 ve VP24, nükleokapsit ile dış zarf arasına yerleşmiştir. Yaklaşık 19 kb

uzunluğunda olan viral genom, Mononegaviraller arasında en uzun olanıdır. Sıralı olarak düzenlenmiş genler, sırasıyla 3'-nükleoprotein (NP), polimeraz kofaktör (VP35), matris proteini (VP40), glikoprotein (GP), protein VP30, matris protein (VP24), RNA-bağımlı RNA polimeraz (L) içeren yedi yapısal proteini ve fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılmayan ve yapısal olmayan küçük glikoprotein sGP'yi kodlar [43]. Bu küçük glikoprotein virionun bir parçası değildir, ancak enfekte hücreden büyük miktarlarda atılır. Viral proteinler olan VP24 ve VP35 de önemli virülans faktörleridir, çünkü bunlar tip I interferon (IFN) antagonisti olarak işlev görürler [43]. Viral genomun 3' ucu poliadenile edilmez ve 5' ucu kapatılmaz. 3' ve 5' uçlarındaki öncü ve treyler kopyalanamayan bölgelerdir, ancak transkripsiyon, replikasyon ve yeni kapsidlerdeki viral genomların paketlenmesini kontrol etmek için önemli sinyaller taşırlar. Viral yapısal proteinleri kodlayan diziler, açık okuma çerçeveleri içerir ve translasyon gerçekleşmemiş interjenik bölgeler tarafından korunur (Şekil 2.1) [42, 44].



Şekil 2.1 Ebola virüsünün moleküler yapısı [45]

### 2.1.5 Ebola Virüsünün Replikasyonu

Viral replikasyondaki ilk basamak, konak hücre zarına bir bağlanma ve hücreye nüfuz etmedir. Bu basamak tam olarak anlaşılmamıştır, ancak viryonların spike glikoproteinlerinin (GP) spikelerinin viryonların konakçı hücre girişine katıldığı ve makropinositoza benzer mekanizmalarda kullanıldığı bilinmektedir. Önerilen diğer hücre giriş mekanizmaları arasında: klatrin aracılı endositoz veya glikoproteinle kolaylaştırılmış reseptör bağlanması bulunmaktadır. Glikoprotein,



posttranskripsiyonel olarak GP1 ve GP2 proteinlerine dahil olur. GP1, virüs partikülünün hücre zarına bağlanmasında görev alırken, GP2 hücre zarı ile viral füzyona katılır. Viral membran, nükleokapsidin sitoplazmaya salınmasını sağlamak için hücre vezikül membranı ile birleşir. Diğer replikasyon basamaklarının, sitoplazmada, paramiksovirüslere ve rabdovirüslere benzer şekilde meydana geldiğine inanılmaktadır [46]. Pozitif-anlamı tam uzunlukta bir genom çoğaltıldığında, yeni sentezlenmiş NP molekülleri tarafından birlikte kapsülendir. Diğer yapısal nükleokapsid proteinleri (polimeraz kofaktör - VP35 ve viral RNA polimeraz L), viral genomun sentezine katılır. VP24 matrisinin NP ve VP35 ile birlikte varlığı, viral nükleokapsitlerin montajı için gereklidir ve VP24 ekspresyonunun susturulması virüslerin salınmasını önler [3]. VP24 eksikliği olan viral partiküllerde VP30 transkripsiyonu ve translasyonu azalır. Ayrıca, en yoğun eksprese edilen matris proteini VP40, yeni virüs partiküllerinin oluşumunda önemli bir rol oynar ve hücrede endozomal yol ve virüs tomurcuklanması ile ilişkilidir. Bu işlemin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır, ancak VP40'ı kodlayan dizilerdeki mutasyonların, enfekte olmuş hücreden virüs salımının engellenmesine yol açtığı bilinmektedir [3, 46-48].

#### **2.1.6 Ebola Virüsü Hemorajik Ateşinin Klinik Değerlendirmesi ve Patojenisi**

İnsan filovirüs enfeksiyonlarının tümü, şiddet derecesi ve ölüm oranı virüs türleri ile enfekte olmasına bağlı olan benzer bir hastalık ile karakterize edilir. Ebola virüs enfeksiyonu patomekanizması karmaşıktır. Mekanizma doğuştan ve adaptif immün tepkinin baskılanmasının yanısıra fagositik hücreler, salınan proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri, endotel hücre disfonksiyonu ve koagülopatinin tetiklenmesi, viral replikasyon ile hücrelerin doğrudan zarar görmesini içerir [49]. Hastalığın semptomları inkübasyon süresinin 4-10 gününden sonra ortaya çıkar (enfektif doza bağlı olarak 2-21 gün). Tipik grip benzeri semptomların ani başlangıcı, kusma ve ishaldir. Hastanın durumu hızla kötüleşir ve hastalığın bir sonraki evresi dış ve iç kanama komplikasyonlarına, hipotansiyon ve pıhtılaşma bozukluklarına ve sıklıkla fulminan şok ve ardından çoklu organ yetmezliğine yol açar [49]. Tamamen semptomatik olan hastalar genellikle semptomların başlamasından 6-16 gün sonra

ölürler. İyileşme durumlarında, hastanın durumu, spesifik antikorların ortaya çıkması ile düzelir. Bununla birlikte, enfeksiyonun uzun vadeli sonuçları tekrarlayan hepatit, omurilik hasarı, üveit, psikoz veya saç dökülmesi şeklinde devam edebilir [49]. Hastalıkta yer alan patolojik mekanizma hakkındaki mevcut veriler, insan salgınları sırasında toplanan klinik ve laboratuvar gözlemlerinin yanı sıra, insan olmayan primatların ve kemirgenlerin deneysel enfeksiyonu ile elde edilmiştir [49]. Virüs vücuda parenteral olarak cilt ve mukoza zarlarından girer. Farklı hücreler için geniş bir tropizm sergiler. Bu belirgin hedef özgülüğü eksikliği, büyük olasılıkla, viral yüzey GP'lerinin bağlanmasında rol alan hücre yüzeyi lektinlerinin geniş dağılımından kaynaklanmaktadır [50]. Makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler viral enfeksiyonun erken dönem hedefleridir. Yüksek göç aktiviteleri nedeniyle, bu hücreler virüsün ilk enfeksiyon bölgesinden bölgesel lenf bezlerine, karaciğer, dalak ve adrenal bezlere yayılmasında anahtar rol oynar. Virüs, algılanmaktan kaçınmak ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini önlemek için birçok mekanizma kullanır [51]. Bahsedilen yapısal proteinler VP24 ve VP35, doğuştan gelen bağışıklığı önlemek ve tip I interferon tepkilerini baskılamak için çok önemlidir [51]. SGP proteini lökositlerin göçünü engeller. Viral enfeksiyona, enflamasyon ve pıhtılaşmayı teşvik eden proinflamatuvar mediatörlerin ve vazoaktif maddelerin muazzam bir şekilde salınması eşlik eder, ancak aynı zamanda virüsün sistemik yayılımını etkili bir şekilde önleyemeyen bağışıklık sistemini oluşturur. Endotel hücrelerinde Ebola virüs enfeksiyonunun hemorajik etkileri, muhtemelen immün aracılı mekanizmalar tarafından tetiklenir. Ebola virus VP40, GP1 ve GP2'nin endotel hücreleri aktive edebildiği ve bariyer fonksiyonunu önemli ölçüde bozduğu varsayılmıştır. Koagülopatinin multifaktöriyel olduğu ve aşağıdaki gibi birkaç faktörün aktivasyonunun bir kombinasyonundan kaynaklandığı görülmektedir: mononükleer fagositik sistem, trombosit agregasyonu ve tüketimi, pıhtılaşma kademesinin aktivasyonu, eksikliği karaciğer hasarı ve endotel hasarı nedeniyle pıhtılaşma faktörlerinin incelenmesi. Bu nedenle, ölüm nedeni sıklıkla çoklu organ yetmezliği ile kanama veya kan pıhtılaşması olmaktadır [50, 52, 53].

### 2.1.7 Ebola Virüsünün Laboratuvar Tanısı Yöntemleri

Ebola virüsü, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından yüksek morbidite ve mortaliteye sahip hastalıkların nedeni olan en tehlikeli patojenleri içeren A kategorisinde bir patojen olarak sınıflandırıldığından, viral tanı sadece en yüksek biyogüvenlik seviyesine sahip özel laboratuvarlarda, yani BSL-4'de yapılmalıdır. Tanı tekniği, hızlı, hassas, spesifik olmalı ve kullanılan metodoloji, çalışmaya katılan kişinin laboratuvar enfeksiyonu riskine maruz kalma olasılığını büyük ölçüde sınırlamalıdır. Tanı tekniği uygunsa, test öncesi klinik materyalin kimyasal veya radyasyon inaktivasyonu yapılmalıdır. Tanı tekniğinin seçimi, epidemik salgınların görüldüğü bölgede bulunsa bile, farklı koşullar altında çalışanların yeteneklerine bağlıdır. Günümüzde, gerçek zamanlı RT-PCR, numunedeki viral türlerin sayısının tespitini sağlayan en hassas yöntem olarak kabul edilmektedir [39, 54]. Farklı virüs tanılama yöntemleri de olmasına rağmen, viral RNA'nın varlığı, başlangıçtan 48 saat sonra bile polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla ters transkripsiyon (RT-PCR) ile tespit edilebilir [54]. Ne yazık ki, sürekli virüs mutasyonları nedeniyle RT-PCR yönteminin güvenilir olabileceği ve sonuçların diğer testlerle doğrulanması gerektiği vurgulanmalıdır. Ayrıca ZEBOV ve SEBOV'ın tanımlanması için tek tüp-gerçek zamanlı RT-PCR testi de geliştirilmiştir [54]. Bu test ile ebola virüs türlerini ve amplifiye edilmiş genomik RNA'nın dizilimini gösteren suşlar arasında ayırım yapmak için de kullanılabilir. Enzime bağlı immünosorbent ölçümü (ELISA) ise, virüse özgü antijenlerin yanı sıra her iki antikor tespit etmek için kullanılabilir. Antikorların tespiti için yapılan ölçümler daha az kullanışlıdır, çünkü hasta sıklıkla spesifik bir antikorun oluşumundan önce ölür [54]. Bu nedenle, antikor ölçümleri bu korkunç hastalıktan kurtulan hastalar için epidemiyolojik amaçla gerçekleştirilir. ELISA ile elde edilen pozitif sonuçlar Western blot ile doğrulanabilir. Bazen hasta örneğinde sadece IgM antikorları saptanabilir. Antikorlar belirtilerin başlamasından 2 gün sonra ortaya çıkarlar ve 30-168 gün sürebilir [54]. Buna karşılık, IgG antikorları genellikle hastalığın başlamasından 6. ve 18. günlerde tespit edilir ve yıllarca devam eder. Ölümcül hastalığı olan hastaların serum antikor profili, sağ kalanlara göre önemli ölçüde

farklıdır. Bu fark, hasta yönetimi için prognostik bir belirteç olarak görev yapabilir. Ölen hastaların hayatta kalanlara kıyasla çok daha düşük düzeyde hatta hiç antikor yanıtı vermediği gösterilmiştir [54]. Salgınlar sırasında, spesifik viral antijenlerin tespiti için ELISA yöntemleri oldukça kullanışlıdır ve sıklıkla uygulanır. Hastalığın erken evrelerinde hasta kanı ve dokularında filovirüs partiküllerinin yüksek titreleri bulunması nedeniyle, akut bir enfeksiyonu teşhis etmek için çeşitli ELISA sistemleri geliştirilmiştir [55]. Hali hazırda uygulanan deneylerde, VP40 gibi farklı virüs proteinlerine karşı monoklonal antikorlar kullanılır. Bu sistemler sayesinde, komplike ekipmana gereksinim duyulmadan 30 dakika içinde sonuç elde edilebilir. Hücre kültürlerinde virüs izolasyonu en hassas yöntemlerden biridir. Ebola virüsü sayısız hücre hattında çoğaltılabilir ve virüs büyümesi sitopatik etki ile tespit edilebilir. Vero veya Vero E6 hücreleri bu amaç için yaygın olarak kullanılmıştır [56]. Ek olarak, enfekte olmuş hücrelerde antijenlerin doğrulanması için floresan işaretli spesifik bir antikor kullanılabilir. Elektron mikroskobu da, viral enfeksiyonların tanımlanmasında ve saptanmasında faydalı ve kullanışlı olmuştur. Virüs partiküllerinin karakteristik şekillerinden dolayı bu yöntem spesifik ve hızlıdır, ancak çok sayıda virüs partikülü içeren numune, spesifik ve pahalı ekipman ve eğitimli personel gerektirir. Otopsi malzemelerinden özellikle karaciğer ve dalaktan gelen parafin blokları, antijenlerin ve viral partiküllerin kümelenmesi nedeniyle, spesifik poliklonal veya monoklonal antikorların kullanıldığı immünohistokimyasal analizlerde kullanışlıdır. Formalinle sabitlenmiş bloklar bulaşıcı değildir ve özel önlemler veya soğutma olmadan transfer edilebilir [55, 57].

### **2.1.8 Ebola Virüsüne Karşı Geliştirilen Aşılar**

26 Aralık 2013'te, Gine, Meliandou'da 18 aylık bir çocukta, ateş, siyah dışkılama ve kusma ile karakterize ölümcül bir hastalık geliştiğinde, küresel bilim topluluğu bu belirtilerin öneminin maalesef farkında değildi. Ölümünden sorumlu patojen Ebola virüsünün Zaire türü olarak tanımlandı ve WHO, 23 Mart 2014'te 49 vaka ve 29 ölümün resmi olarak rapor edildiği bir kamu ilanı verdi [58]. Sonraki yıllarda, tüm önceki salgınlardan daha fazla vaka ve ölümlerle sonuçlanan Ebola virüsü hastalığı (EVD) ile en büyük ve en yıkıcı salgın meydana geldi. İlk kez 1976

yılında Sudan ve Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde (DRC) meydana gelen salgınlarda ortaya çıkan ve adını DRC'deki Ebola Nehri'nden alan Ebola virüsü, tek bir glikoprotein (GP) içeren, viral proteinleri kodlayan segment olmayan 7 genden oluşan, büyük, negatif iplikli bir RNA virüsüdür. Virüs yüzeyinde trimerik sivri uçlar gibi görünen iki alt birimden oluşan ve hücre bağlanma, füzyon ve hücre girişinde önemli bir rol oynayan GP'ler EVD'ye karşı aşılarda geliştirilmesi için ana antijenik hedef haline gelmiştir [59].

#### **2.1.8.1 2014 Batı Afrika Salgını Öncesinde Ebola Aşısı Gelişimi**

Virüsün tanımlanmasından hemen sonra başlanan, aşı geliştirmeye yönelik ilk girişimlerde aktif olmayan virüsler kullanılmıştır [60, 61]. Bu aşının potansiyel güvenlik kaygıları nedeniyle klinik denemeleri yapılamamış, gine domuzlarında daha erken bir etkinlik göstermesine rağmen, daha fazla ön bilgi sağlayan insan olmayan primat (NHP) modelinde etkinlik gösterememiştir [62]. 1990'lı yıllarda DNA ve viral vektörlü aşılarda potansiyelinin farkedilmesi, Ebola virüsünün GP veya nükleokapsit proteini (NP) genlerini eksprese eden vektörlerin ilk klinik öncesi çalışmaları ile sonuçlanmıştır [62]. Öldürücü mücadeleye karşı aşı etkinliği, sinomolgus makaklarının “altın standart” modelinde, vektörlerin tek başlarına veya birleşik primer güçlendirme rejimleriyle uygulandığında gösterilmiştir . 2003 yılında bir Ebola aşısı uygulanan ilk insan klinik denemesinde, Zaire ve Sudan türlerinden transmembran-silinmiş (DTM) GP'yi şifreleyen üç plazmid DNA aşısı kullanıldı ve bu da 3 doz programının güvenli ve immünojenik olduğunu göstermiştir. İkinci klinik deneme ise, bir gen mutasyonu (PM) GP genlerini kodlayan, replikasyon hatalı, rekombinant bir insan adenovirüs serotip 5 aşısı (rAd5) idi. Bu aşı başarılı bir şekilde T hücrelerini indükledi. Bu aşının NHP çalışmaları, DTM GP ve PM GP antijenlerinin, aşı geliştirmenin odağı haline gelen vahşi tipte (WT) GP'ye karşı daha düşük koruma sağladığını göstermiştir [63]. Bir DNA Ebola aşısının ikinci klinik çalışmasında, Ebola virüsü Zaire (EBOV) ve Sudan (SUDV) türlerinden ve Marburgvirus Angola suşundan WT GP'yi kodlayan yapıların güvenlik ve immünojenikliğini değerlendirilmiştir. Bu denemeler kabul edilebilir güvenlik profilleri göstermesine rağmen, çoklu dozlar gerekli görüldü ve 32 haftada bir homolog destek dozu verilmeden bağışıklık tepkileri zayıfladı, ve

benzer bulgular Uganda'daki bir Faz Ib çalışmasında da göstermiştir [61]. Ad5'e karşı önceden varolan bağışıklığı engelleme stratejileri, insanlarda nadiren dolaşan serotiplerin (örneğin, Ad26 ve Ad35) ve insan seroprevalansı düşük olan şempanze adenovirüslerin kullanımının araştırılmasına yol açmıştır [64]. NHP modellerinde umut vaat eden etkinlik verileri, rAd26-GP'nin 1012 viral partikül (vp) dozunda tek doz (single-shot) halinde verildiğinde, EBOV tehdidine karşı %75 etkinlik verdiğini göstermiştir [61]. Aynı çalışmada, makaklara 4 haftalık post immünizasyon rejimi (post-boost) ile bağışıklık kazandırıldığında, rAd26-GP/rAd35-GP ile 4 haftalık bir heterolog ilk uygulama arttırma rejimi ile %100 etkinlik sağlanmıştır [61]. Hem rekombinant şempanze adenovirüsü serotip 3 (ChAd3), hem de Ad5'e benzer özelliklere sahip bir alt grup C adenovirüs ve serotip 63 (ChAd63) vektörleri, yeni bir Ebola virüsü aşısının geliştirilmesi için araştırılmıştır . Diğer bulaşıcı hastalıklar için aday aşılarda değerlendirildiği insan çalışmalarında, her iki vektörün de güvenli olduğu gösterilmiştir . EBOV ve SUDV GP'lerini ifade eden hem monovalent hem de bivalent preparatlarda ChAd3'ün NHP'ler üzerindeki bir etkinlik çalışması, saptanamayan bir viral enfeksiyon olmadan EBOV tehdidine karşı %100 etkinlik göstermiştir [61]. Ayrıca, her iki GP'yi eksprese eden replikasyon hatalı modifiye edilmiş Ankara (MVA) aşısının heterolog immünizasyon (heterolog-boost) aşılması hAd3 ilk uygulamasından (prime) 8 hafta sonra uygulandığında, aşılardan 10 ay sonra EBOV tehdidine karşı dayanıklı koruma gözlemlendi. Bu etki, sınırlı bir immünojeniklik ve koruyucu etkinlik sergileyen aynı vektör veya ChAd63 ile güçlendirildiğinde görülmemiştir. Bu nedenle, ChAd3 vektörünün, insan klinik denemelerinde aşı olarak uygulanmak üzere araştırılması tercih edildi. MVA aşılarının, bazı bulaşıcı hastalıklarda mükemmel bir immünizasyon etkisi ve NHP çalışmalarında gözlemlenen kalıcı etkinlik sağlama konusundaki iyi bilinen üstünlükleri, insan klinik çalışmalarında bir MVA takviye aşısının dahil edilmesi gerekliliğine dair kanıt sağlamıştır [65]. Yukarıdaki replikasyon hatalı viral vektörlere ek olarak, EBOV GP'yi şifreleyen rekombinant, replikasyon yetkin veziküler stomatit virüsü (rVSV) esaslı aşı, NHP primatlarında etkinlik verilerini önemli kılan prelinik

çalışmalar yoluyla da ilerlemiştir. Aynı zamanda, bir iğne-ucu yaralanması ile enfekte olan bir hastaya başarıyla uygulanmıştır [61].

### **2.1.8.2 2014 Salgınından Bu Yana Ebola Aşısının Gelişimi**

2014 Batı Afrika salgınından önce, virüsün keşfedilmesini takip eden 38 yıl içinde yalnızca dördüncü aşama klinik aşı denemeleri tamamlanmıştır [66]. Salgının, Gine'den komşu ülkeler Sierra Leone ve Liberya'ya daha önce görülmemiş sayıda vaka ve ölümle birlikte hızla yayılması nedeniyle, WHO, 8 Ağustos 2014'te 900'den fazla insanın hastalığa yenik düştüğünü vurgulayan Uluslararası Halk Sağlığı Acil Durumunu (PHEIC) ilan etmiştir [67]. Üç kıtadaki merkezlerde Faz I klinik çalışmalarına giren iki aşı adayının her ikisi de Ebola virüsünden GP'yi şifreleyen monovalent ve bivalent ChAd3 vektörlü aşı ve rVSV vektörlü aşılarıydı. Son olarak 2019 yılında, Zaire ebola virüs ile öldürücü bir mücadeleden sonra tedavi edilen al yanaklı makaklarda mortaliteyi önleyen, Ebola virüsü glikoproteininin reseptör bağlama bölgesini hedefleyen tek bir monoklonal antikor olan mAb114'ün güvenliğini, tolere edilebilirliğini, farmakokinetiğini ve immünojenitesini değerlendiren bir faz I çalışması olan VRC608'den hızlandırılmış veriler sunulmuştur [68].

### **2.1.8.3 Şempanze Adenovirüs 3 Vektörlü Aşı**

Hem monovalent hem de bivalent formlarda Ebola glikoproteini eksprese eden ChAd3 vektörlü aşılar, klinik çalışma dalgasının bir parçası olarak, İngiltere, Avrupa ve ABD'de ve daha sonra Mali'de insanlara uygulanacak ilk aşılardır. Bu denemeler, İtalya'daki Okairos biyoteknoloji şirketi ile ortak olan NIH'deki Sullivan grubu tarafından insan olmayan primatlarda yapılan erken pozitif klinik öncesi çalışmalara dayandırılmıştır ve ardından GSK tarafından edinilmiştir. Klinik güvenliğin ve immünojenikliğin teşvik edilmesi, Liberya'da yapılan büyük bir III. Aşama çalışmasına başlanması için temel oluşturdu ve sonunda EVD ClinicalTrials.gov NCT02344407'deki yeni vakalardaki düşüş nedeniyle II. Aşama tasarımına dönüştürülmüştür. Nijerya, Mali ve Senegal'de 1-17 yaş arası çocuklarda bu aşının değerlendirilmesi için klinik çalışmalar tamamlanmıştır (ClinicalTrials.gov NCT02548078). Tek doz aşı değerlendirmesine ek olarak, MVA

ve Ad26 vektörleri (ClinicalTrials.gov NCT02495246) kullanılarak birincil immünizasyon denenmiştir [69].

#### **2.1.8.4 Vesiküler Stomatit Virüsü Vektörlü Aşı**

Faz I klinik deneyler, bu replike edici vektör aşı ile ChAd3 denemelerinin başlatılmasından kısa bir süre sonra Avrupa ve Afrika'da başlamıştır [70]. Sağlıklı gönüllülerin %10-%20'sinde ciddi yan etkilerin bildirilmesi nedeniyle ilk güvenlik endişeleri gündeme gelmiştir. Spesifik olarak, Cenevre'deki bir denemede bazen endişe verici derecede sinovyal sıvıda VSV ile ilişkili artralji ve artritleri bildirilmiştir. Ateş, gönüllülerin % 25-30'unda bildirilmiştir [70]. Gine'deki iki ardışık Faz III denemelerini içeren deneyler, yenilikçi bir halka aşılama stratejisini içermektedir. ChAd3 ve rVSV'nin paralel olarak denenmesi o dönemde vaka azlığı nedeniyle tamamlanamamıştır. Fakat bu dönüm noktası denemesi, son derece etkili olan bir Ebola aşısının ilk kanıtını sağlamıştır [9].

ABD Gıda ve İlaç Daresi (FDA) 19.12.2019'da, 18 yaşında ve daha büyük bireylerde Zaire ebola virüsünün neden olduğu Ebola virüsü hastalığının (EVD) önlenmesi için ilk FDA onaylı aşı olan Ervebo'nun onayını duyurmuştur [71]. Ebola Zaire aşısı olarak da bilinen ve Ervebo markası altında satılan ve rekombinant veziküler stomatit virüsü - Zaire Ebola virüsü (rVSV-ZEBOV), yetişkinlerde kullanılabilen ve Zaire ebola virüsünün neden olduğu Ebola'yı önleyen bir aşıdır. ABD'de EVD vakaları çok nadirdir ve bunlar, daha sonra ABD'ye seyahat eden diğer ülkelerdeki bireylerin veya EVD hastalarını tedavi ettikten sonra hastalanan sağlık çalışanlarının neden olduğu enfeksiyonların sonucudur. Ervebo'nun onayı, 18-20 yaş ve üstü bireylerde 2014-2016 yıllarında salgın sırasında Gine'de yapılan bir çalışma ile desteklenmiştir. Ervebo, tek dozluk bir enjeksiyon olarak uygulanan ve Zaire ebola virüsünden bir protein içerecek şekilde genetik olarak tasarlanmış canlı, zayıflatılmış bir aşıdır [71-74].

#### **2.1.8.5 Modifiye Vaksinya Ankara Vektörlü Aşı**

Hem BOV hem de SUDV'den GP'leri şifreleyen dört değerli bir aşı olan MVA-BN-Filo ve ayrıca Marburg virüsünden GP ve Ebola virüsünün Tai orman suşundan NP; klinik deneylerde denenmiş ilk poxvirüs aşılardır. Bu denemeler nötralize



edici antikorlar içeren hücresel ve humoral immün yanıtları kat kat arttırma yeteneğini göstermiştir [75].

#### **2.1.8.6 İnsan Adenovirüs Vektörlü Aşılar**

Bir insan adenovirüs vektörü (Ad26) ilk olarak MVA-BN-Filo'lu rejimlerde 2, 4 ve 8 haftalık aralıklarla hem prime hem de arttırma aşılama ile denenmiştir. 8 ayda kalıcı hücresel ve humoral immün yanıtlar gözlenen bu çalışmada gözlenen güvenlik profilleri kabul edilebilirdi. MVA prime, Ad26 prime'a göre başlangıç immün yanıtı indüklememiş olsa da, MVA-Ad26 grubunda enjeksiyondan 21 gün sonra gözlenen IgG yanıtları, Ad26-MVA grubuna kıyasla biraz daha yüksek olarak tespit edilmiştir [76]. Ad26 ayrıca ChAd3 vektörlü aşı ile heterolog bir prime arttırma rejiminde test edilmiştir (ClinicalTrials.gov NCT02495246) [77]. Ad26-MVA rejimlerinin dayanıklılığını içeren güvenlik ve immünojenikliğin değerlendirilmesi çalışmalarının 2023 yılında tamamlanması beklenmektedir (ClinicalTrials.gov NCT02661464) ve Sierra Leone'de (ClinicalTrials.gov NCT02509494) Ad26-MVA aşısı faz 3 denemesi devam etmektedir [78, 79]. Batı Afrika salgını sırasında Ebola virüsünün Sudan suşu için klinik aşı gelişimi üzerine çok fazla ilgi gösterilmiştir, ancak yakın zamanda MVA-BN-Filo ile heterolog bir prime arttırma rejiminde multivalentli bir Ad26 vektörünün faz I aşaması 2018 yılında tamamlanmıştır (ClinicalTrials.gov NCT02860650) [61]. Son yıllarda 2014 GP'sini şifreleyen bir rAd5 vektörlü aşının, salgın suşunun Çin ve Sierra Leone'deki sağlıklı yetişkinlerde güvenli ve yüksek derecede immünojenik olduğu gösterildi, ancak rAd5'e karşı varolan bağışıklığın üstesinden gelmek için  $1,6 \times 10^{11}$  vp'den daha yüksek dozlar gerekliydi. Bu denemede 4 hafta sonraki yanıtlarda azalma görülmesine rağmen, 6 ay sonraki homolog arttırma birkaç kat daha yüksek antikor yanıtı alınmasını sağlamıştır [61, 76, 80].

#### **2.1.8.7 Diğer Aşılar**

Ebola virüs hastalığı vakaları ve salgın etkisi günümüzde hala devam etmektedir [10, 12] ve Ebola aşısı gelişimi için klinik öncesi veya klinik çalışmaları süren çok sayıda aşı adayı mevcuttur [7-9, 11, 81]. Venezüella at ensefalit virüsü (VEEV) benzeri replikon partikül aşısı, insan parainfluenza tip 3 (HPIV3) esaslı aşı,

rekombinant sitomegalovirüs bazlı aşı ve rekombinant kuduz virüsü bazlı aşığı içeren viral vektörlü ve virüs benzeri madde bazlı aşılar, incelenmekte olan baskın aşı türleridir [82]. Bunlardan yalnızca HPIV3 esaslı aşı, ABD' de insan klinik denemelerine girmiştir ve intranazal yoldan uygulanmaktadır (ClinicalTrials.gov NCT02564575). Virüs benzeri partikül (VLP) protein bazlı aşılar geliştirilen diğer aşı türlerindedir ve bu aday aşılarından biri EBOV GP VLP, iki doz rejimi ile uygulandığında ilk sonuçların güvenilirliği ve immünojenikliği nedeniyle Faz I klinik deneyinde (ClinicalTrials.gov NCT02370589) test edilmiştir. 2019 yılında yürütülen bir çalışmada, EBOV'a karşı F(ab')<sub>2</sub> poliklonal IgG fragmanları ürettiği kanıtlanmış bir teknoloji platformu araştırılmıştır [83]. EBOV-Zaire/Makona'nın yüzey glikoprotein trimerlerini barındıran nanopartiküller ile aşılanan atlar, yüksek nötralizasyon aktivitesine sahip anti-Ebola IgG poliklonal antikoları üretmiştir [84]. Yüksek oranda saflaştırılmış at anti-Ebola F(ab')<sub>2</sub>, 2 Zaire EBOV suşunun ve *in-vivo* 3 veya 5 günlük F(ab')<sub>2</sub> intraperitoneal enjeksiyonunun, güçlü çapraz nötralizasyonu öldürücü EBOV tehdidine karşı BALB/c farelerinde %100 koruma sağlamıştır [85]. Saflaştırılmış at anti-Ebola F(ab')<sub>2</sub>'nin hızlı hazırlanması, insanlarda EBOV hastalığına karşı potansiyel olarak etkili bir tedavi yaklaşımı sunar [83]. Yine 2019 yılında Gaudinski ve arkadaşları tarafından yürütülen faz I çalışmasına göre; Ebola virüsü glikoproteininin reseptör bağlama bölgesini hedefleyen tek bir monoklonal antikor olan mAb114 (VRC 608 çalışması) ile, infüzyon reaksiyonları olmadan hızlı bir şekilde (yaklaşık 30 dakikadan fazla) iletilmiş ve çoklu ve uzun infüzyon süreleri gerektiren rejimlere kıyasla Ebola tedavi ünitelerinde kullanım kolaylığı sağlanmıştır [59]. 2019 yılında Zhenghui Xu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada peptid içeren adjuvan-antijen füzyon aşıları üretmek üzere teknikler (rekombinant, sentetik ve yarı sentetik) geliştirilmiştir. Çalışmanın neticesinde, protein ve peptid bazlı antijen-TLR ligand konjugat aşılarının yakın gelecekte yoğun olarak araştırılacağı vurgulanmıştır [86].

### **2.1.9 Ebola Virüsü Halka Aşılama Stratejisi**

Halka aşılması kavramı 1960'ların sonunda geliştirilmiştir ve çiçek hastalığı ile mücadele kampanyasında yeni bir stratejinin parçası olmuştur. Gelişmekte olan

ülkelerde kitlesel aşılama stratejilerinin yetersiz olduğu kanıtlandığı için, hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik hedefin gerçekleştirilmesinde izleme ve önlemeye odaklanma başarıda elzemdir. O zamandan bu yana, temas eden ve risk altındaki kişilerin aşılınması, küçük salgınları ve Varicella, Kızamık, Kabakulak ve Kızamıkçık salgınlarını içeren, ikinci ve üçüncü enfeksiyon dalgalarını önleyen bir kontrol stratejisi olarak kullanılmıştır [61]. Ebola ça Suffit! (yeter) denemesine dek, insanlarda bu stratejinin kanıtları yalnızca 1970'lerde çiçek hastalığı yok etme kampanyasından elde edilen, Nijerya'daki bir menenjit aşısının hane halkı ile temasa geçme denemesini ve matematiksel modelleme yaklaşımlarını içeren raporlar ile sınırlıydı. Ebola ça Suffit! faz 3 aşısı deneme sonuçları, zorlu salgın hastalıklar altında etkinlik denemelerinin yapılmasının uygun olduğunu ve benzer yöntemlerin hastalığın epidemiyolojik özelliklerini ve sürveyans altyapısını göz önünde bulundurarak diğer bulaşıcı hastalık salgınlarına potansiyel olarak uygulanabileceğini göstermiştir [81]. Halka aşılama stratejilerinin etkinliği, tek bir dozdan hemen sonra etkili bir aşısı, iletim modellerine (örneğin yakın insan teması) nispeten düşük bir R0'ya (temel üreme numarası veya bir kişi tarafından virüs bulaştırılan ortalama kişi sayısı), kuluçka dönemine ve en önemlisi, bulaşıcı vakaların hızlı bir şekilde teşhis edildiği, izole edildiği ve temaslarının derhal aşılandığı iyi yapılandırılmış bir gözetim sistemine bağlıdır [61]. Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde devam etmekte olan bir Ebola Zaire salgınında, 70.000'den fazla kişiyi kapsayan yoğun bir Ebola halka aşılama stratejisinin uygulanmasına rağmen, 2019 Ocak ayının sonuna kadar 433'ü ölümlü olmak üzere toplam 699 infekte vaka ile salgın büyümeye devam etmektedir [83].

#### **2.1.10 Aşı Aracılı Bağışıklık ve Koruma Korelasyonları**

Potansiyel bir aşının etkinliği için bağışıklık korelasyonu, korumayı öngören aşı kaynaklı bağışıklık belirteci olarak kabul edilebilir. Böyle bir belirtecin ortaya çıkışı, FDA hayvan yönetimi kapsamında hızlandırılmış lisanslamayı teorik olarak destekleyebileceğinden EVD aşısı geliştiricileri tarafından üzerinde çok yoğun çalışılmıştır. PHEIC'i takip eden klinik çalışmaların hızlanmasına ve korumayı destekleyebilecek immün mekanizmaların araştırılmasına rağmen, böyle bir korelasyonun kesin bir şekilde tanımlanması en ayrıntılı şekilde incelenen GP'ye

spesifik antikor titreleri ile bile oldukça zor olmuştur [61]. Humoral immünojenisite sonuçlarını gösteren çoklu faz I denemeleri, rVSV vektörlü aşının etkili bir şekilde GP'ye özgü antikorları indüklediğini göstermiştir [61]. Regules ve arkadaşları ABD'deki sağlıklı gönüllüler arasında, hem Zaire-Mayinga hem de Zaire-Kikwit suş GP'lerine karşı doza bağımlı aşı kaynaklı titreleri gösterdi. Benzer şekilde, tek doz ChAd3 vektörlü aşılarda tatbik eden klinik deneyler, nötürleştirme aktivitesi dahil olmak üzere karşılaştırılabilir anti-GP IgG'yi göstermiştir [61]. Aşı aracılı EVD'ye karşı humoral korumanın kanıtı, NHP etkinlik çalışmaları ile öne sürülmüştür. Bu çalışma Sullivan ve arkadaşları tarafından aşılanmış makaklardan elde edilen serumdaki antikor seviyelerinin analizini içerir; bu analiz teorik olarak eşik titreyi tanımlayabilmektedir. RSV vektörlü aşı ile yapılan bir çalışma, aşılama sırasında CD4+ T hücrelerinin tükenmesinin, körleşmiş antikor tepkisi ve müteakiben koruyucu etkinlik kaybı ile ilişkili olduğunu da göstermiştir. 1996 yılı salgınındaki enfekte bireylerin değerlendirilmesi ile sağ kalanlar arasında erken ve artan IgG seviyeleri ortaya çıkarılmış ve sağlam erken faz antikor yanıtları son salgının sağ kalanlarında da gösterilmiştir. Nötralizasyon kapasitesi (PsVNA) ve antikora bağlı hücrel sitotoksisite (ADCC) gibi antikorları kalitatif olarak değerlendirmek için yapılan deneyler sıklıkla klinik çalışmalara dahil edilir ancak korunma ile açık bir bağlantı NHP çalışmalarında henüz sunulmamıştır. NHP çalışmalarında rAd5 aşısı ile aşılama sonrası CD8+ T hücresi deplesyon verileri, CD8+ T hücrelerinin korunmaya açıkça katkıda bulunduğunu göstermiştir. Son salgın hastalarından alınan periferik kanın transkriptomik analizi, hayatta kalanlarda ölümcül sonucu olanlara kıyasla CD8+ bellek T hücre sinyalinde önemli bir artış göstermiştir. Spesifik immün yanıtlarla sağkalım arasındaki ilişkinin kuvvetinin ölçülmesi ve bunun araştırılması için makul bir ortam sunan salgın halka aşılama çalışması gibi büyük etkinlik denemeleri gelecekteki EVD aşısının gelişmesi için karşılaşılan zorluklar arasında sayılabilir. Gelecekteki salgınların kontrolü için, farklı Ebola virüsü türlerine ve suşlarına karşı dayanıklı ve çapraz reaktif olan koruma ile ilgili markörlerin tanımlanmasına dikkat edilmelidir [61].

### 2.1.11 Salgınlardan Alınan Dersler ve Gelecek Perspektifi

Batı Afrika'da Ebola ile ilgili PHEIC, 29 Mart 2016 tarihinde kaldırılmıştır. Gine, Liberya ve Sierra Leone'de, 11.310 ölümlle toplam 28.616 onaylanmış, muhtemel ve şüpheli vaka bildirilmiştir. Hayatta kalanlar arasında, semen ve anne sütü gibi bazı vücut sıvılarında virüsün uzun süreli kalması ve “immün açıdan imtiyazlı” alanlardaki sürekliliğe bağlı olarak tekrarlama olasılığı belgelenmiştir. WHO, 01.06.2020 tarihinde Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nin kuzeybatısında yeni Ebola salgını tespit edildiğini duyurmuştur. Kongo Demokratik Cumhuriyeti Hükümeti de, Ekvator eyaletindeki Mbandaka Wangata sağlık bölgesinde yeni bir Ebola virüsü hastalığı salgınının meydana geldiğini doğrulamıştır. Kongo'nun doğu Demokratik Cumhuriyeti'nde uzun, zor ve karmaşık bir Ebola salgını son aşamasındayken yeniden ortaya çıkmıştır. Ülke aynı zamanda COVID-19 ve dünyanın en büyük kızamık salgını ile de mücadele etmektedir. Kongo Demokratik Cumhuriyet Sağlık Bakanlığı tarafından verilen ilk bilgi “bu son salgında Wangata' da şu ana kadar dört kişinin öldüğü ve ikisinin hayatta ve yoğun bakımda olduğu altı Ebola vakasının tespit edildiği” şeklindedir. Bu altı vakanın üçü laboratuvar testi ile doğrulanmıştır. Sürveys faaliyetleri arttıkça daha fazla hastalıklı insanın teşhis edilmesinden endişe edilmektedir. WHO Genel Direktörü Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, COVID-19'un insanların karşılaştığı tek sağlık tehdidi olmadığını hatırlatarak “Dikkatimizin büyük kısmı COVID-19 pandemisinde olmasına rağmen, WHO diğer sağlık acil durumlarını izlemeye ve yanıt vermeye devam ediyor.” şeklinde açıklamalarda bulunmuştur [87].

İnsandan insana geçiş olmasa bile gelecekte farklı türde EVD salgınları görmemiz yüksek ihtimaldir. Afrika'da bunun nerede olacağını ve hangi türlerin sorumlu olacağını henüz bilemiyoruz. Gelecekteki salgınların böyle bir ölçeğe ulaşmamasını sağlamak için yakın zamanda tanık olduğumuz bu büyük salgınlardan edinilen dersler temelinde çalışılması şarttır. Bazı paydaşları ve kurumları içeren, küresel çaba sayesinde koordineli ve işbirliğine dayalı ortaya çıkan bir dizi aşı adayının hızlandırılmış gelişimi dikkat çekicidir. Hem Kafkas hem de Afrika popülasyonlarında bir dizi aşuya ilişkin çok sayıda Faz I ve Faz II verisi mevcuttur. Güvenliğin gerçek zamanlı olarak izlenmesi, paylaşılması ve daha az

ölçüde immünojeniklik verileri, Batı Afrika'da Faz III çalışmalarının insanlara ilk kez uygulandıktan sonraki aylarda başlamasını dolayısıyla hızlı ilerlemeyi sağladı. Bir halka aşılama stratejisinin ve Gine'de kullanılan yenilikçi deneme tasarımının kullanılması, salgın ortamında son derece etkili olan ilk aşığı sağladı. Bununla birlikte, replikasyon yeteneği olan rVSV vektörlü aşının ve bu aşının yakın gelecekte lisanslanıp lisanslanmayacağı konusunda bir takım güvenlik endişeleri vardır. Bir salgın ortamında üretilebilecek, stoklanabilecek ve hızla uygulanabilecek bir aşığı lisans verilmesi, karşılanamayan bir amaç olarak kalmaktadır [61].

## 2.2 Mikrodalga Destekli Katı Fazda Peptid Sentezi

Peptid, amino asit monomerlerinden oluşmuş kimyasal bir yapıdır. Peptidler genel olarak üç şekilde elde edilebilirler. Bunlar dokudan saflaştırma ile, genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanımı ile ve kimyasal sentez yoluyla. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda çok önemli roller üstlenmeleri onların birer potansiyel ilaç adayı olmalarına arttırıcı etki göstermektedir [88, 89].

Peptid sentezi için klasik çözelti ve katı faz olmak üzere iki yöntem vardır. Klasik çözelti yöntemi ile kısa peptidlerin sentezi ilaç sektöründe devamlılığını korusa da, özellikle uzun peptid dizilerinde katı fazda peptid sentezi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı faz tekniğinin çözeltiyle yapılan sentezlere göre birçok avantajı vardır. Katı faz tekniğinde, çözünmeyen rezine bağlı peptid, rezinin yıkanması veya filtrasyonu sırasında önemli bir kayba neden olmadan ayrılmaktadır. Tüm reaksiyonların tek bir haznede gerçekleştirilmesi ile, kap değiştirme ve aktarma gibi işlemler sırasında olası kayıplar engellenmiş olur [90].

Bilinen ilk peptid türevi sentezini (benzoilglisilglisin) 1882 yılında Theodor Curtius gerçekleştirmiştir. Emil Fischer ise 1901 yılında serbest dipeptid olarak glikoglisin'i, glisinin diketopiperazininin hidrolizi ile sentezlemiştir [91].

1962 yılına kadar birçok organik kimyacının üzerinde çalıştığı peptid sentezi, çözelti ortamında yapılmaktaydı. 1962 yılında, Bruce Merrifield, polipeptidlerin çözünmeyen katı bir polimer destek (rezin) üzerine bağlanarak kimyasal olarak

sentezlenmesini araştırmış ve geliştirdiği metodla ilgili olarak 1984 yılında Nobel ödölünü kazanmıştır [92, 93]. İlk yarı otomatik peptid sentez cihazı da Merrifield tarafından geliştirilmiştir. Katı faz peptid sentezi tekniği ile ilgili önemli gelişmeler, 1968'de Arnold, 1966'da Ferriere, 1973'de Gaozza, 1968'de Izdebski ve Draberek, 1970'de Losse ve Neuburt, 1971'de Marshall, 1973'de Meinhoffer, 1968'de Okuda, 1973'de Shappard ve 1968'de Shimonishi, 1967'de Suziki ve Ando, 1968'de Vesa, 1970'de Waki ve Izumiye, 1971'de Jojima tarafından yapılmıştır [94, 95].

Katı fazda peptid sentezinin prensibi oldukça basittir. Peptid zinciri, 100-200 mesh (150-75  $\mu\text{m}$ ) boyutlarındaki kararlı ve katı bir parçacık (katı faz, reçine, rezin) üzerine tutturulur. Peptid dizisi sentez süresi boyunca bu rezin üzerinde bağlı kalır. Sentez sırasında diğer çözünebilen kimyasallar filtrasyon ve yıkama ile ayrıştırılır. En son aşamada istenilen ürün katı fazdan ayrılır. Saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri ile istenen ürün elde edilir [95].

Sentezde kullanılan amino asitlerin yan zincirlerinin (R) ve amino asitlerin N uçlarının koruma grupları ile korunmasıyla yan zincirlerin birbirleri ile reaksiyonu engellenir ve dizinin doğru olması (yani her amino asit eklenmesinde dizinin sadece 1 amino asit uzaması) sağlanmış olur. İlk geliştirilen ve bugün bile yaygın olarak kullanılan koruma grubu Benziloksikarbonil (Cbz)'dir. Merrifield'in geliştirdiği yöntemde her amino asit eklenmesinde N- ucundaki ( $\text{N}\alpha$ ) koruma grubu olan Boc'i, kaldırmak için TFA kullanılmaktaydı. TFA çok güçlü bir kimyasaldır ve havadaki buharları, sağlık için tehlikeli bir kimyasal olan HF'i oluşturur. Bu zorluklar daha kolay uzaklaştırılabilen bir  $\text{N}\alpha$  koruma grubu olan Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) koruma grubunun peptid sentezinde kullanılması ile bir ölçüde giderilmiştir [92, 93, 95-97].

Katı fazda peptid sentezi için kullanılan iki yöntem mevcuttur. Bunlardan ilki t-Boc ikincisi ise Fmoc ile korunan  $\alpha$  amino gruplarının kullanılmasıyla farklı kimyasalların kullanıldığı ancak aynı temel işleyiş üzerinde yürüyen sentezlerdir. İki yöntemde de her bir aminoasit peptidin karboksil ucundan başlayarak zincire eklenir ve iki yöntemde de benzer kimyasal yollar üzerinden peptid bağı

oluşmaktadır. En önemli farklılıklar yan zincirlerde  $\alpha$  amino koruyucu gruplarda, katı desteğe bağlanma metodundadır. Bundan dolayı kırma işlemi ve koruyucu grupların ayrılması işlemi farklıdır. t-Boc kimyasından farklı olarak Fmoc yönteminde son koruyucu grubun ayrılması ve katı destekten peptidin kırılması işleminde HF'e göre daha yumuşak olan TFA prosedürü uygulanmaktadır [96].

Katı faz, kimyasal olarak inert, mekanik olarak sağlam, kolayca filtre edilebilir ve solventlerde (DCM, DMF, vb.) 5-6 kata kadar şişme özelliğine sahip olmalıdır. Rezine ilk amino asidin bağlanabilmesi için kimyasal fonksiyonel grup içeren linker adı verilen kimyasal yapılar bağlanır [96, 98].

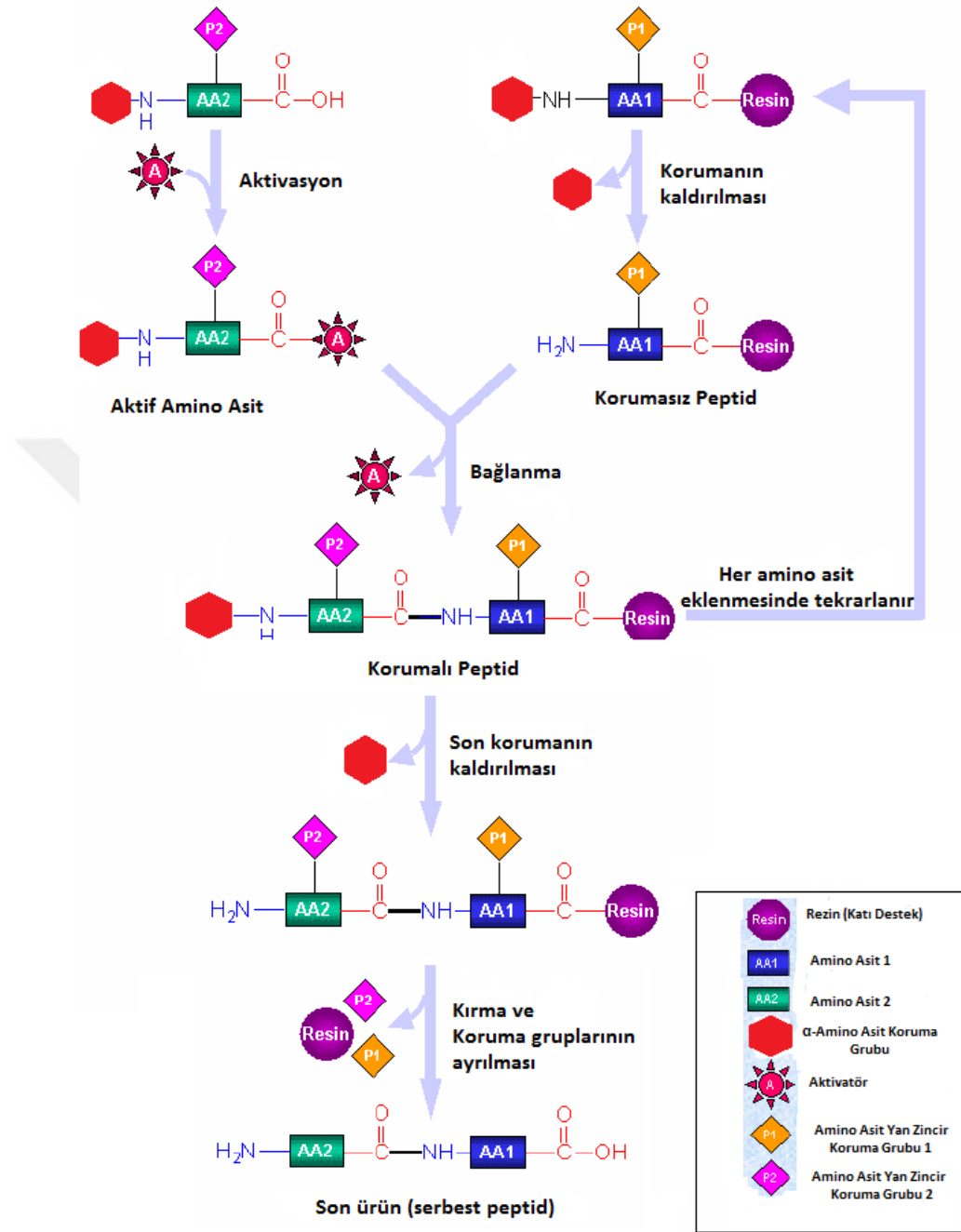
Rezine ilk aminoasidin eklenmesi prosedürü katı faz peptid sentezinde gerçekleştirilemez ve oldukça zor bir prosedürü vardır. Rezin üzerine ilk amino asidin eklenmesi için özel prosedürler uygulanmaktadır. Yüklü rezinler az yüklü ve çok yüklü olmak üzere iki türdür. Yüklemeden kaynaklanan bu özellik sentez için çok önemlidir. Çünkü çok yüklü rezin kullanıldığında rezin üzerinde büyüyen peptid dizilerinin agregasyonu (özellikle uzun ve hidrofobik etkileşime yatkın) artacak ve bu istenmeyen bir durum olan eksik amino asit eklenmesine (deletion) yol açacaktır. Bu nedenle genellikle az yüklü rezinler tercih edilir [98].

Katı halde peptid sentezi 3 aşamadan oluşur (Şekil 2.2). Koruma grubunun kaldırılması, aktivasyon ve bağlanmadır. Bu işlemler istenilen dizi elde edilene kadar bir döngü halinde devam eder. En son, eklenmiş aminoasidin koruma grubu kaldırılarak (final deprotection) N- ucu serbest bırakılabilir. Bu işlem yapılmazsa peptid dizisinin N- ucu koruma grubu kaldırılana kadar inaktif olarak kalır. Son işlem olarak asetilasyon (Capping) da yapılabilir. Asetilasyonla peptidin N- ucu asetillenmiş ve korunmuş olur [98].

Peptid sentezinde mikrodalga kullanımı 1992 yılında yapılan bir çalışmayla gerçekleştirilmiştir. Ev tipi bir mikrodalga fırın kimyasal sentez yapabilir hale getirilmiştir. Peptid sentezinde mikrodalga enerjisi sadece reaksiyon sırasında belirlenen sürelerde veya belirlenen sıcaklığa ulaşılan kadar uygulanmaktadır. Mikrodalga'nın dipol etkileşimlerden kaynaklanan titreştirme özelliği peptid sentezinde önemli etkinliğe sahiptir. Mikrodalga'nın titreştirme özelliği sayesinde



rezin üzerinde büyüyen peptid zincirinde meydana gelebilecek bir problem olan zincirlerin girişimi “agregasyon” engellenmiş olur [98-101].



Şekil 2.2 Katı fazda peptid sentezinin genel reaksiyon mekanizması [102]

### 2.3 Biyokonjugasyon

İki ya da daha fazla molekülün bir kovalent bağ yoluyla kimyasal olarak bağlanma prosesine çapraz bağlanma denir. Bu teknikle protein ve diğer biyomoleküllerin

bağlanması biyokonjugasyon olarak adlandırılır. Biyokonjugasyon reaksiyonlarında, spesifik fonksiyonel gruplara (primer aminler, sülfidriller gibi) kimyasal olarak bağlanabilen ve iki ya da daha fazla reaktif uç içeren çapraz bağlayıcı reaktifler kullanılmaktadır. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre homobifonksiyonel heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar olarak sınıflandırılırlar [103, 104].

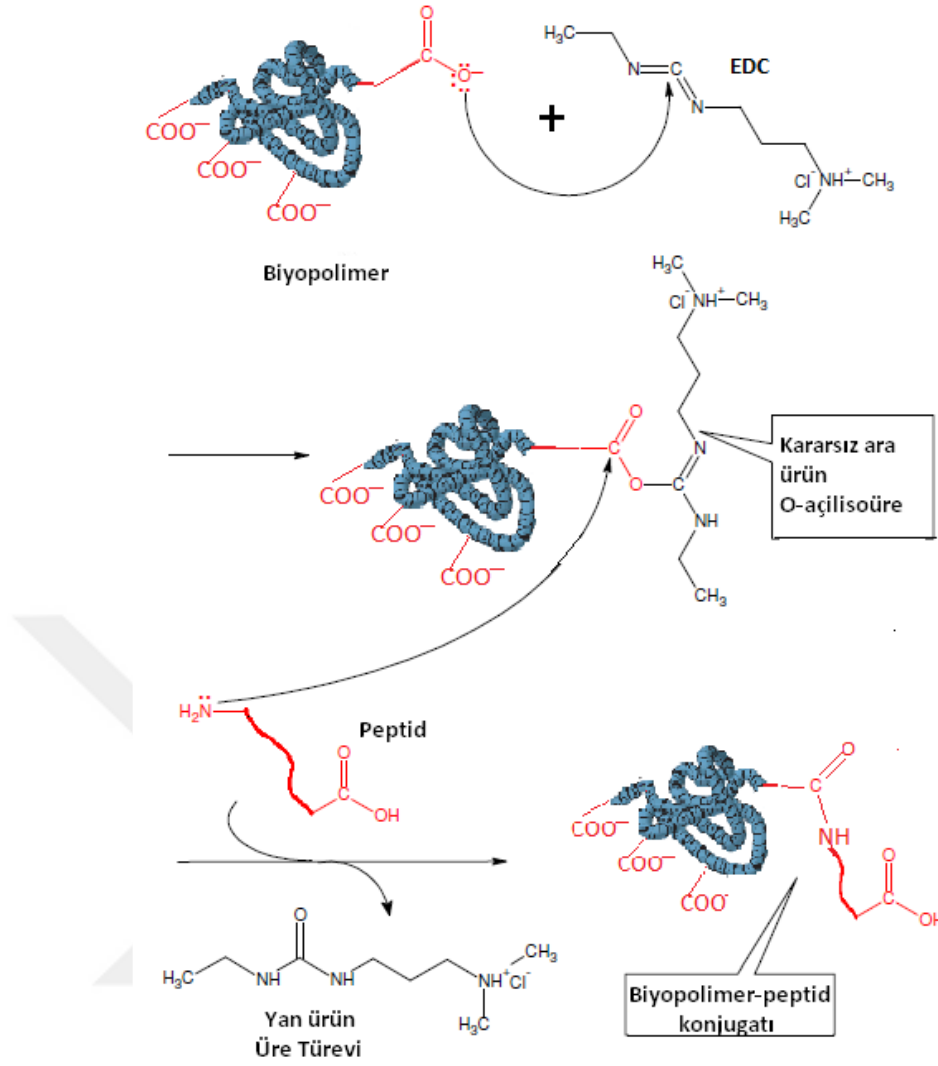
EDC ya da EDAC adı ile bilinen; (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid) primer amin ve karboksil grupları ihtiva eden birçok molekülün konjugasyonu için en çok tercih edilen karbodiimidtir. EDC suda çözünebilir özelliktedir. Bu özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamına daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri de suda çözünebilir özellikte olduklarından jel filtrasyon ya da diyaliz yöntemleri kullanılarak ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve oluşturulan konjugatlar saflaştırılabilmektedir [105].

PAA iyonlaşma derecesi, pH ve sulu çözeltinin iyonik gücüne bağlı olan zayıf bir polielektrolittir. PAA, düşük pH'da hemen hemen disosiyasyon olmamasına karşın pH 7'de tamamen yüklü bir zincire sahiptir. PAA, proton alabilen iyonik olmayan çeşitli polimerler, onların türevleri ve katyonik polielektrolitlerle sulu yada organik çözelti ortamında interpolimer kompleks oluşturur. Çeşitli immünolojik çalışmalarda, ilaç sistemlerinde ve enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır [105].

PAA, primer ve sekonder bağışıklık yanıtı için güçlü bir adjuvant özelliğe sahiptir. Birçok çalışmada sentetik polielektrolitlerin immun sistemi uyarıcı (immunostimulant) mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve araştırılması için örnek polimer olarak geniş ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. PAA birçok model sistemde adjuvant etkisi sergilemektedir ve aşılama öncesinde verildiğinde virüslere karşı koruma sağlamaktadır. Boyut fraksiyonlarına ayrılmış PAA analiz edildiğinde molekül kütlesi bazı 'kritik' değerlere sahip gruplarından dolayı

adjuvant aktivite gösterdiği görülmüştür. PAA'nın aynı zamanda interferon salgısını teşvik ettiği gösterilmiştir [105].

Biyokonjugasyon, ek işlevselliğin doğrudan antijene dahil edilmesi yoluyla iyi tanımlanmış moleküler aşılarda üretmek için güçlü bir yaklaşım haline gelmiştir. Bir aşı bileşeninin bir proteine, peptide, lipide, oligonükleotide, polimere, nanopartiküle veya küçük moleküle kovalent bağlanması yoluyla çeşitli aşı biyokonjugatları sentezlenebilmektedir [106]. Aşı biyokonjugatları, kimyasal ve moleküler yapılarına bağlı olarak, bir antijenin veya adjuvanın bir liganda konjugasyonu yoluyla doku veya hücreye özgü hedeflemeyi mümkün kılma, aşılarda konjugasyonu yoluyla çok değerlik veya kontrollü salım gibi yeni özellikler oluşturma gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla aşı etkinliğini artırabilir [107]. Belirli bir hastalığa karşı özel bağışıklık tepkileri üretebilen biyokonjugatlar tasarlamak için gelecekteki stratejiler, bağışıklık sisteminin nasıl modüle edileceğine dair mevcut anlayışımızı genişletecektir. Ek olarak, biyokonjugatlar, mevcut aşılardaki iyileştirilmesi ve zorlu patojenlere ve hastalıklara karşı yeni aşılarda geliştirilmesi için akılcı tasarımda önemli roller oynamaya devam edecek [108].



**Şekil 2.3** EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyokonjugasyon reaksiyonu şeması

## 2.4 Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller ilk defa yaklaşık olarak 40 yıl önce aşılardan ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir. Polimerik nanopartiküller; doğal ya da sentetik yapıdaki polimerler ile hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen katı koloidal partiküllerdir. Etken madde partikül içinde çözündürülebilmektedir, hapsedilebilmektedir, yüzeye adsorbe edilebilmektedir ya da bağlanabilmektedir. Nanopartikül aynı zamanda etkin maddenin bir polimerik membranla çevrili olduğu nanokapsül ve etkin maddenin matris sistem içinde homojen olarak dağıldığı nanokürenin genel ismidir [109, 110].

Nanopartiküllerin diğer taşıyıcı sistemlere göre tercih edilmesinin sebepleri aşağıda sıralanmıştır [111, 112]:

-Yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahiptirler.

-Polimerik partiküler yapı katı matriks içine hapsedilmiş etkin maddeyi degradesyondan koruyarak etkin maddenin hedef dokuya ulaşma ihtimali artar.

-Nanopartiküllerin polimerik yapıları etkin maddenin hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü ve sürdürülmesini temin ederler.

-Hedeflenen bölgede uygulamayı takiben günler hatta haftalar süren bir etkin madde salımına imkan verirler.

-Polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda yüksek stabiliteye sahiptirler.

-Nanopartiküller kolaylıkla sterilize edilebilen koloidal partiküllerdir.

-10-1000 nm'lik küçük partikül boyutları polimerik nanopartiküllerin tümöral hücre içine girişine imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen etkin madde salımı sağlanmış olur.

-Taşıdıkları etkin maddenin hedef bölgede salımına imkan sağladıkları için etkin maddenin sistemik toksisitesini azaltırlar.

-Etkin maddenin vücuttaki dağılımını düzenlerler.

-Üretim teknikleri genel olarak kolay ve basittir.

Polimerik nanopartiküllerin üretiminde kullanılan polimerlerin seçiminde; polimerin biyoparçalanabilirlik, biyouyumluluk ve toksisite dereceleri dikkate alınır. Ayrıca hazırlanmak istenen nanopartiküllerin boyutu ve yüzey özellikleri de polimer seçimini etkiler [113]. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler doğal polimerler (proteinler (albumin, jelatin), polisakkaritler (aljinat, kitosan, dekstran)) ve sentetik polimerler [önceden sentezlenenler [polianhidrit, polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poli(laktik asit-co-glikolik asit) (PLGA)]; nanopartiküllerin hazırlanması sırasında sentezlenenler [polisiano-akrilat (PACA), polibütil-siyano-akrilat (PBCA)]] olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır [114].

PLGA, nanopartikül sistemlerinde en yaygın kullanılan polimerlerdendir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nce (FDA) onaylanan bir sentetik polimer olan PLGA, vücutta şeker metabolizması sırasında bir ara ürün olarak bulunan laktik aside dönüşmesi sebebiyle toksik etkisi olmayan ve ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılan ticari bir üründür. PLGA, toksisitesi ve güvenilirliği hayvan testleri ile onaylanmış sentetik bir polimerdir [105].

PLGA biyobozunur polimerlerin altın standardı olarak kabul edilir ve kullanılır. PLGA nanopartikülleri; protein ve peptidlerin nanotıp uygulamalarında, nano-aşıllarda, kullanılmaktadır. PLGA nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu, ilaç enkapsülasyon yöntemi, partikül büyüklüğü, formülasyon sırasında kullanılan katkı maddeleri, ilacın molekül ağırlığı, polimerdeki laktik asit/glikolik asit oranı gibi özellikler üretilen nanotıp ürünlerindeki salım ve etkinlik performansını etkileyen önemli parametrelerdir [105].

PLGA ekibimizin çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Visceral Leishmaniasis'a karşı aşı geliştirmek amacıyla farklı Leishmania antijenleri üretilmiş ve PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmiştir. Kapsamlı *in-vitro* çalışmaların ardından Balb/c farelere immünizasyon ile antikor titreleri elde edilmiştir [115].

İnaktive edilmiş kuş gribi antijenlerinin PLGA nanopartiküllerine yüklendiği bir çalışmada elde edilen formülasyonlar tavuklara deri altından uygulanmıştır. Kontrol gruplarına göre daha yüksek miktarda hemaglutinasyon inhibe edici antikorlar üretildiği bildirilmiştir [116].

Diğer bir çalışmada sentetik heteroklitik BCMA72-80 (YLMFLLRKI) peptidi yüklü PLGA nanopartikülleri üretilerek multipil myeloma hastalığına karşı kanser aşı adayı olarak sunulmuştur [117].

Beta-laktoglobulin kaynaklı peptid yüklü PLGA nanopartiküllerinin inek sütü alerjisine etkisi incelenmiştir. Nanopartiküllerin kemik iliği dendritik hücrelerini aktive etme kapasitesi incelenerek inek sütü alerjisine karşı etkinliği üç haftalık dişi C3H/HeOuJ farelerinde, ağızdan verilerek değerlendirilmiştir [118].

### 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar kullanım amaçlarıyla birlikte Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz/Ekipman	Kullanım Amacı
Mikrodalga destekli katı faz peptid sentez platformu (CEM/Liberty)	Peptid dizisinin sentezi
Cam fırın (Buchi Glass Oven B-585)	Peptidin ısı uygulamadan vakumda kurutulması
Çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010)	Peptid sentezi sonrası kırma (cleavage) işleminde
Döner buharlaştırıcı (Heidolph Laborota4010)	Peptid sentezinde kırma işleminden sonra TFA kokteylinin uzaklaştırılması
LC-ESI-MS (Shimadzu)	Sentezlenen peptidin karakterize edilmesi
Q-TOF-MS (Agilent 6530)	Sentezlenen peptidin karakterize edilmesi
Azot jeneratörü (PEAK Scientific)	LC-MS cihazının taşıyıcı gaz olarak kullandığı saf azot gazının üretilmesi

**Tablo 3.1** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar (Devamı)

Preparatif HPLC (Shimadzu)	Peptidin saflaştırılması
SEC (Viscotek/TDA 302)	Polimer-peptid konjugatlarının yapı analizleri
Zetasizer NanoZS Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Spektrometresi (Malvern/Zen3600)	Polimer-peptid konjugatlarının ve nanopartiküllerin yapı analizleri (boyut ve zeta potansiyel ölçümleri)
ATR Aparatlı FT-IR Spektrofotometresi (Shimadzu, Prestige 2100)	Sentezlenen peptidin ve nanopartiküllerin fonksiyonel grup analizi
UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu UV-1700)	Konjugat ve nanopartiküllerin analizleri
Prob sonikatör (Bandelin Sonoplus)	Nanopartiküllerin üretilmesi
Soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen (universal 32 R))	Nanopartiküllerin üretilmesi
SEM (Zeisc EVO LS10)	Nanopartiküllerin analizi
Raman spektrometresi	Nanopartiküllerin analizi
Ultrasonik su banyosu (Bandelin sonorex)	Örneklerin karıştırılması ve çözülmesi
Vortex (Heidolph)	Örneklerin karıştırılması ve çözülmesi
İnkübatör (Biosan ES20)	Nanopartiküllerin salım çalışması



**Tablo 3.1** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar (Devamı)

Çoklu manyetik karıştırıcı (IKA)	Konjugatların ve nanopartiküllerin üretilmesi
Manyetik karıştırıcı (Variomag)	Konjugatların ve nanopartiküllerin üretilmesi
Liyofilizatör	Örneklerin dondurularak kurutulması
Milipore-Q gradient ultra saf su cihazı	Çalışmalarda kullanılacak ultra saf suyun temini
Vakum etüvü	Vakum altında kurutma

### 3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar firma ve katalog numaralarıyla birlikte Tablo 3.2'de listelenmiştir.

**Tablo 3.2** Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasalın adı	Alındığı firma	Katalog no
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma-Aldrich	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haën	04361
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376

**Tablo 3.2** Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (Devamı)

Sodyum hidrojen fosfat, ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Fluka	71647
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, ( $\text{NaN}_3$ )	Applichem	A1430
Asetonitril	Sigma-Aldrich	34851
2-propanol	Riedel-de Häen	34965
Piperidin	Merck	8.22299.2500
N-Hidroksibenzotriazol (HOBt. $\text{H}_2\text{O}$ )	Fluka	54804
N,N-Diisopropilethilamine (DIEA)	Sigma-Aldrich	D125806
N-Metil-2-pirrolidon (NMP)	Sigma-Aldrich	M6762
Diklorometan (DCM)	Riedel-de Haen	24233
Dimetilformamid (DMF)	Fluka	40255
Thioanisol	Fluka	88470
Trifluoroasetikasit (TFA)	Fluka	91700
1,2-Etan ditiol (EDT)	Sigma-Aldrich	398020
Dietileter	Riedel-de Haen	24005

**Tablo 3.2** Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (Devamı)

O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronyum-hekzafluoro-fosfat (HBTU)	Fluka	12804
Polivinilalkol (PVA)	Sigma-Aldrich	363073
Poli (laktik asit-co-glikolik asit) (PLGA)	Sigma-Aldrich	719900
Poli(akrilik asit) (PAA)	Sigma-Aldrich	52392-5
Fmoc-Ser(tBu)-Wang-LL	Sigma-Aldrich	856116
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Sigma-Aldrich	47618
Fmoc-Ile-OH	Sigma-Aldrich	47628
Fmoc-Phe-OH	Sigma-Aldrich	8.52016
Fmoc-Pro-OH	Sigma-Aldrich	47636
Fmoc-Trp-OH	Sigma-Aldrich	47637

### 3.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.1 0.01 M PBS Tamponu

2.6807 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w=268.07$  g/mol) tartılarak 1 L'lik balon joje içerisindeki 450 mL ultra saf suda çözülmüştür. Aynı zamanda 1.56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w=156.01$  g/mol) tartılarak ultra saf suda çözülmüştür. Hazırlanan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi balon jodedeki  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinin üzerine eklenip karıştırılmıştır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenip tekrar karıştırılmıştır.

Karışımın pH'ı 1 M NaOH ile 7.2'ye ayarlanmıştır. Son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

### 3.3.2 PVA Çözeltisi

Tez çalışmasında %3'lük ve %0.1'lik olmak üzere iki ayrı derişimde PVA çözeltisi kullanılmıştır. %3'lük PVA çözeltisi için 3 g, %0.1'lik için 100 mg PVA tartılarak üzerlerine 100'er mL ultra saf eklenip 85 °C'ye ısıtılmıştır. Sıcaklık kontrol edilerek 90 °C üzerine çıkmamasına dikkat edilmiştir.

### 3.3.3 Borik Asit Çözeltisi

0.65 M borik asit çözeltisi hazırlamak için 2.01 g borik asit 50 mL'lik bir balon jojede suda çözünmüştür ve son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.3.4 Potasyum İyodür Çözeltisi

Potasyum iyodür çözeltisi 0.05 M I<sub>2</sub> ve 0.15 M KI karıştırılarak hazırlanmıştır. Aynı ayrı kaplara tartılan 253.8 mg I<sub>2</sub> ve 498.03 mg KI üzerine 20'şer mL saf su eklenmiştir. Suda direkt çözünmeyen I<sub>2</sub> üzerine KI eklenip berrak bir çözelti elde edilene kadar karıştırılmıştır.

### 3.3.5 Kromik Asit Çözeltisi

5 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 5 mL saf suda çözülmüştür. Üzerine yavaşça 100 mL derişik sülfirik asit eklenmiştir. 70-80 °C'ye ulaşan sıcaklık kontrollü bir şekilde 40 °C'ye soğutulmuştur. Amber şişe içerisinde depo edilmiştir.

## 3.4 Ebola Virüs Hastalığına Ait 421-430 Peptid Dizisinin Sentezi ve Karakterizasyonu

### 3.4.1 Peptid Sentezi

Bu tez çalışmasında kullanılan ve Tablo 3.3'de fizikokimyasal özellikleri verilen, Ebola virüs nükleoproteinine ait 421-430 peptid dizisi [119] (W-EBOVP) CEM, Liberty mikrodalga destekli katı fazda peptid sentezi sistemiyle kimyasal olarak sentezlenmiştir [120, 121]. Peptidin sentezi için gerekli olan 167 mg Fmoc-Ser(tBu)-Wang-LL rezine, senteze başlamadan bir gün önceden 20 mL DMF

eklenmiştir ve rezinin DMF içerisinde şişmesi için bir gece çalkalayıcıda bekletilmiştir.

**Tablo 3.3** W-EBOVP peptidinin özellikleri [122]

Peptid dizisi (tek harfli kod)	H <sub>2</sub> N-WYDDDDDDIPFPS-COOH
Peptid dizisi (üç harfli kod)	H <sub>2</sub> N-Trp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe-Pro-Ser-COOH
Amino asit sayısı	12
Molekül ağırlığı	1484.55 Da
İzoelektrik noktası	0.44
pH 7' deki net yükü	-5
Suda çözünürlük	İyi

Sentez için Tablo 3.4'de belirtilen miktarlarda amino asitler tartılmıştır ve belirtilen miktarlardaki DMF ile çözülmüştür. Aktifleştirici ve aktifleştirici baz Tablo 3.4'de belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler sentez cihazındaki yerlerine yerleştirilip gerekli kontroller yapıldıktan sonra sentez başlatılmıştır ve yaklaşık 15 saat sonra rezin bağlı peptid elde edilmiştir. Sentez sonrası rezin bağlı peptid sırasıyla üçer kere DMF ve DCM ile yıkanıp vakum kabında (Buchi cam fırın, Şekil 3.1) kurutulmuştur. Resin bağlı peptid tartılarak reaksiyon verimi hesaplanmıştır. Son olarak, elde edilen resin bağlı peptid rezinden ayrılmıştır. Bunun için Tablo 3.4'deki kırma kokteyli hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kokteyle resin bağlı peptid eklenip 3 saat boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu süre sonunda peptid rezinden ayrılarak TFA kokteyline geçmiştir. Nuçe erleni ve Por 4 (Şekil 3.2) yardımıyla resin ve peptidin içerisinde olduğu kokteyl birbirinde ayrılmıştır. Porda toplanan resin üç kez TFA ile yıkanmıştır. Sonrasında TFA kokteyli döner buharlaştırıcı ile uçurularak jel

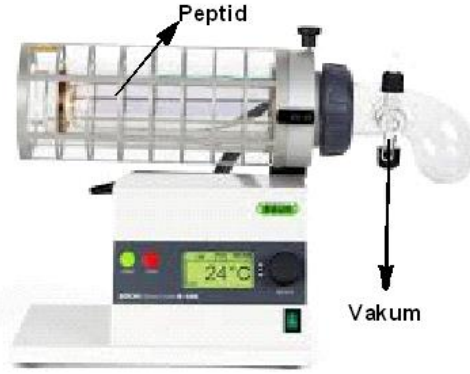
kıvamındaki peptid (Şekil 3.3) elde edilmiştir. Jel kıvamındaki bu peptide miktarının yaklaşık 10 katı kadar -20 °C dietil eter ilave edilip -18 °C'de santrifüj edilerek ham peptid beyaz toz olarak toplanmıştır. Ham peptid vakum kabında (Buchi cam fırın, Şekil 3.1) kurutulmuştur [92, 120, 123, 124].

**Tablo 3.4** Peptidin sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları

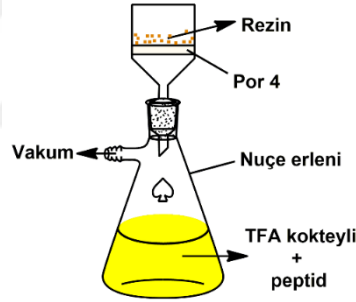
Kimyasalın cinsi	Kullanılan kimyasalın adı	Miktar (mg)	Çözücü miktarı (mL)
Rezin (Katı faz)	Fmoc-Ser(tBu)-Wang-LL	167 mg	20 mL
Amino asitler	Fmoc-Asp(tBu)-OH	1230 mg	15 mL
	Fmoc-Ile-OH	350 mg	5 mL
	Fmoc-Phe-OH	390 mg	5 mL
	Fmoc-Pro-OH	340 mg	5 mL
	Fmoc-Trp-OH	530 mg	5 mL
Çözücü	DMF	1831 mL	
	DCM	83 mL	
Aktifleştirici (Activator)	HOBt.H <sub>2</sub> O + HCTU	1532 mg +4137 mg	20 mL
Aktifleştirici baz (Activator base)	DIEA + NMP	5.2 mL + 9.8 mL	
Koruma grubunun kaldırılması (Deprotection)	Piperidin + DMF	45 mL + 175 mL	

**Tablo 3.4** Peptidin sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları  
(Devamı)

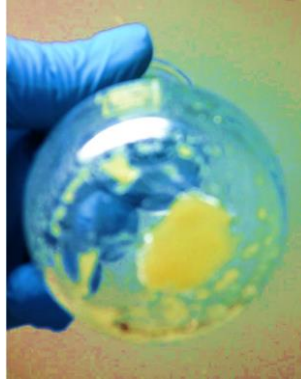
Kırma kokteyli (Cleavage cocktail)	75 mL (% 87.5 TFA, % 5 H <sub>2</sub> O, % 5 Tiyoanisol, % 2.5 EDT)
---------------------------------------	--



**Şekil 3.1** Buchi cam fırın ile peptidin vakum altında kurutulması



**Şekil 3.2** Nuçe erleni ve Por 4 ile TFA kokteyline geçen peptidin rezinden ayrılması



**Şekil 3.3** Kırma işlemi sonrası elde edilen jel kıvamındaki peptidin görünüşü

### 3.4.2 Peptidin Karakterizasyonu

#### 3.4.2.1 Kromatografik Yöntemlerin Validasyonu

Peptidin karakterizasyonu için yoğun olarak kullanılan LC-ESI-MS sisteminin kromatografik yöntemi doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) açısından valide edilmiştir [120].

- **Doğrusallık**

Doğrusallık, çalışılan aralıkta örneğin derişimi ile doğru orantılı olarak analiz sonucu sağlayabilme kabiliyetidir. Doğrusallığın en az beş derişimde olması istenmektedir. 6 mg saf peptid 6 mL çözücüde (5 mL saf su + 1 mL ACN) çözümlenerek 1 mg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Stoktan; 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 ppm ve 50, 37.5, 25, 18.75, 12.5, 6.25, 5, 2.5, 1.25 ppb konsantrasyonlarında 15 standart hazırlanıp LC-MS ile analiz edilmiştir. Tüm ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır. Her bir konsantrasyonun pik alanına karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

- **Doğruluk**

Gerçek değer ile elde edilen değer arasındaki fark olarak tanımlanmaktadır. Doğruluk değeri % bağıl hata ile verilmiştir.

- **Kesinlik**

Bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin bir ölçümüdür ve yüzde bağıl standart sapma ile ifade edilmektedir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları için 2.5, 25 ve 250 ppm derişimindeki çözeltilerden elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değerinin hesaplanmasıyla verilmiştir.

- **Geri kazanım**

Ölçüm sonucunun teorik değere oranının yüzdesi % geri kazanım değerini ifade etmektedir (%R).



- **Gözlenebilme sınırı (LOD)**

Bir örnek içerisinde tayin edilebilen ancak nicelendirilmesinin gerekli olmadığı en düşük konsantrasyondur. Sinyal/gürültü oranı 3 olduğunda belirlenebilen maddenin en düşük konsantrasyonu olarak sunulmuştur.

- **Alt tayin sınırı (LOQ)**

Bir örnek içerisindeki bir analitin nicel olarak uygun kesinlik ve doğrulukta analizinin yapılabildiği en düşük konsantrasyondur. Sinyal/gürültü oranı 10 olduğunda saptanan maddenin en düşük konsantrasyonu olarak bulunmuştur.

### **3.4.2.2 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Analizi**

Bu tez çalışmasında elektrosprey iyonizasyon (ESI) problu LC-MS sistemi (Shimadzu LC-MS 2010 EV) kullanılmıştır. 25 cm uzunluk ve 6 mm giriş çapı boyutlarındaki Shimadzu Shim-Pack MRC-ODS-C18 HPLC kolonuna 75 µL örnek enjekte edilmiştir. PDA detektörünün dalga boyu 210 ve 280 nm'ye ayarlanmıştır. RP-HPLC analizi 25 ° C'de gerçekleştirilmiştir. 0.6 mL/dk akış hızında eluent A' dan (su, % 0.1 (v/v) FA) eluent B'ye (ACN, % 0.1 (v/v) FA) gradiyent uygulanmıştır. Elüsyon programı aşağıdaki gibidir: 0-3 dakika, % 25 B; 3-10 dakika, % 25-85 B; 10-20 dakika, % 85 B; 20-25 dakika, % 85-25 B; 25-30 dakika, % 25 B. ESI, 200-2000 m/z aralığında pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Kapiler sıcaklığı 250 °C'de tutulmuştur. Nebulizatör gazı (N<sub>2</sub>) akış hızı 1.5 L/dakika olarak ayarlanmıştır [120, 125].

### **3.4.2.3 Peptidin Preparatif HPLC ile Saflaştırılması**

Saflaştırma işlemi, preparatif HPLC'de (RP-HPLC, SPD-M20A, FRC-10A, LC-8A, CBM-20A, Shimadzu, Tokyo, Japan) Shim-pack PRC ODS HPLC kolonu (20 mm × 25 cm) ve 210 ve 280 nm'de UV-PDA detektörü kullanılarak yapılmıştır. 14 mL/dk akış hızındaki eluent A (su, % 0.1 (v/v) FA) ve eluent B (asetonitril, % 0.1 (v/v) FA) gradient elüsyonu aşağıdaki gibi programlanmıştır [120, 125]: 0-5 dakika, % 20 B; 5-15 dakika, % 20-40 B; 15-30 dakika, % 40-80 B; 30-35 dakika, % 80-20 B. Elde edilen saf peptid liyofilize edilip -20 ° C'de saklanmıştır.

#### 3.4.2.4 Q-TOF-MS Analizi

Analizler pozitif iyon modunda 20-2000 m/z tarama aralığında 0.400 mL/dk akış hızında ACN/H<sub>2</sub>O (%0.1 FA) mobil fazı ile gerçekleştirilmiştir. Nebulizatör gaz sıcaklığı, akış hızı ve basıncı sırasıyla 325 °C, 10 L/dk ve 40 psig olarak ayarlanmıştır. Sisteme 25 µL örnek yüklenerek analiz gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.2.5 FT-IR Analizi

Peptidin fonksiyonel gruplarını tespit etmek için fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ölçümleri yapılmıştır. FT-IR spektrumları, ATR modunda Perkin Elmer 1600 spektrofotometre kullanılarak alınmıştır. 600 cm<sup>-1</sup> ile 4000 cm<sup>-1</sup> arasında değişen FT-IR spektrumları 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükle elde edilmiş ve her ölçümde 32 tarama yapılmıştır [126].

### 3.5 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

#### 3.5.1 Peptid-Polimer Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Bu tez çalışmasında polimer ile peptid arasındaki reaksiyonu konjugasyonunu gerçekleştirmek için üç farklı yöntem kıyaslanmıştır. GPC sonuçlarına göre en iyi yöntem belirlenmiş ve peptidin artan-azalan oranları ile konjugasyon için bu yöntem kullanılmıştır [126].

- **1. yöntem**

1 mg/mL PAA'nın PBS (pH 5.2)'deki çözeltisine 4 mg EDC eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak polimerin karboksilik asit gruplarının aktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra ortama 1 mg/6mL peptid ilave edilmiştir ve pH 5'e ayarlanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra bir gece +4 °C'de reaksiyona devam edilmiştir. 1., 2., 4. ve 24. saat sonunda reaksiyon ortamından örnek alınıp karakterize edilmiştir. Her alınan örnekte, ortamda kalan EDC'nin aktivasyonunu engellemek ve reaksiyonu sonlandırmak üzere pH 7.2'ye ayarlanmıştır [126].

- **2. yöntem**

1 mg/mL PAA çözeltisine 1 mg/6 mL peptid eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. pH 5'e ayarlandıktan sonra ortama 4 mg EDC eklenip polimerin karboksilik asit grupları aktive edilerek konjugasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Reaksiyon 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra bir gece +4 °C'de devam ettirilmiştir. 1., 2., 4. ve 24. saat sonunda reaksiyon ortamından örnek alınıp karakterize edilmiştir. Her alınan örnekte, ortamda kalan EDC'nin aktivasyonunu engellemek ve reaksiyonu sonlandırmak üzere pH 7.2'ye ayarlanmıştır [126].

- **3. yöntem**

1 mg/mL PAA'in PBS (pH 5.2)'deki çözeltisine 4 mg EDC eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak polimerin karboksilik asit gruplarının aktivasyonu sağlanmıştır. Ortamda kalan EDC'yi uzaklaştırmak üzere membranlı santrifüj tüpüyle saflaştırma yapılmıştır. Daha sonra ortama 1 mg/6 mL peptid ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra bir gece +4 °C'de reaksiyona devam edilmiştir. 1., 2., 4. ve 24. saat sonunda reaksiyon ortamından örnek alınıp karakterize edilmiştir. Her alınan örnekte reaksiyonu sonlandırmak üzere pH 7.2'ye ayarlanmıştır [126].

### 3.5.1.1 Polimer Miktarı Artan, Peptid Miktarı Sabit Koşullarda Konjugasyon

$n_{PAA}/n_{peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarında konjugatlar 2. yöntem kullanılarak sentezlenmiştir ( $M_{PAA} = 100.000$  Da,  $M_{peptid} = 1484.51$  Da).

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu  $0.178$  mg/mL olarak çalışılmıştır. Her bir oran için eşitlik 3.1 kullanılarak polimer miktarları belirlenmiş ve Tablo 3.5'de verilmiştir. Polimer stok çözeltisi hazırlanmıştır.

$$\frac{n_{PAA}}{n_{peptid}} = \frac{c_{PAA} \times M_{peptid}}{c_{peptid} \times M_{PAA}} \quad (3.1)$$

n: konjugasyon oranı; c: konsantrasyon; M: molekül ağırlığı

**Tablo 3.5**  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarında konjugatlar için polimer miktarları

Oran	Polimer Miktarı (mg)	Reaksiyon Hacmi (mL)
0.0125	0.9	6
0.0250	1.8	6
0.0334	2.4	6
0.0500	3.6	6
0.0667	4.8	6
0.0834	6	6
0.1001	7.2	6
0.1334	9.6	6
0.1668	12	6

Her bir konjugat için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisine değişen konsantrasyondaki polimer çözeltisinden ilave edilerek karışımların pH değerleri 5'e ayarlanmıştır. Çözeltiler oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldıktan sonra aktivasyon için her bir çözeltiliye polimer ve peptid miktarının iki katına denk gelecek miktarda EDC eklenmiştir. Bir gece 4 °C'de karışması sağlanmıştır. Daha sonra çözeltilerin pH değerleri 7.2'ye ayarlanmıştır. Örnekler 1 saat karıştırıldıktan sonra membranlı santrifüj tüpü kullanılarak saflaştırılmıştır. Konjugatlar GPC [127], Floresans Spektrometre [120] ve Zetasizer [126] cihazları ile karakterize edilmiştir.

### 3.5.1.2 Peptid Miktarı Artan, Polimer Miktarı Sabit Koşullarda Konjugasyon

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatlar 2. yöntem kullanılarak sentezlenmiştir ( $M_{\text{PAA}} = 100.000 \text{ Da}$ ;  $M_{\text{peptid}} = 1484.51 \text{ Da}$ ).

Polimerin çözelti içerisindeki konsantrasyonu  $1 \text{ mg/mL}$  olarak çalışılmıştır. Her bir oran için eşitlik 3.1 kullanılarak peptid miktarları belirlenmiş ve Tablo 3.6'da verilmiştir. Peptid stok çözeltisi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.6**  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatlar için peptid miktarları

Oran	Peptid Miktarı (mg)	Reaksiyon Hacmi (mL)
0.1	0.009	6
0.5	0.045	6
1	0.09	6
3	0.27	6
5	0.45	6
7	0.63	6
9	0.81	6

Yukarıda belirtilen her bir konjugat oranı için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki peptid çözeltisinden ilave edilip karışımların pH değerleri 5'e ayarlanmıştır. Çözeltiler  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 saat karıştırılarak aktivasyon için her bir çözeltiliye polimer ve peptid miktarının iki katına denk gelecek miktarda EDC eklenmiştir. Bir gece  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de karıştırıldıktan sonra çözeltilerin pH değerleri 7.2'ye ayarlanmıştır. Örnekler 1 saat karıştırıldıktan sonra membranlı santrifüj tüpü kullanılarak saflaştırılmıştır. Konjugatlar GPC

[127], Floresans Spektrometre [120] ve Zetasizer [126] cihazları ile karakterize edilmiştir.

### **3.5.2 Peptid-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonu**

#### **3.5.2.1 GPC Analizi**

GPC analizleri, ultraviyole, kırılma indisi ve dik açılı ışık saçılım dedektörleri ile donatılmış Viscotek TDA302 GPC sistemi ile yapılmıştır. Analiz, Shim-pack Diol-300 (500 mm x 7.9 mm) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dakika ve mobil faz olarak %0.05 NaN<sub>3</sub> içeren pH 7.2 fosfat tamponu kullanılmıştır. Mobil faz analizden önce degaze edilmiştir. Detektörler sığır serum albümini (BSA) monomer piki (Mn = 66 kDa) çözeltisi ile kalibre edilmiştir. Tüm numuneler, 0.45 µm'lik enjektör filtresi ile filtre edilerek cihaza yüklenmiştir. Hem veri toplama hem de analizler OmniSEC 4.6.0 (Malvern Panalytical Ltd., UK) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalitatif analiz için peptidin bir kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır [126].

#### **3.5.2.2 Floresans Spektrometre Analizi**

Floresans spektrometre ölçümleri QM-4/2003 Quanta Master Steady State Spektrofluorometre (Photon Technology International, Kanada) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz, uyarma ve emisyon monokromatörleri için 5 nm'lik bir yarı aralığı ile kuant sayma modunda yapılmıştır. 270 nm'de uyarma uygulanmış ve 280 ile 400 nm arasında emisyon alınmıştır. Tüm ölçümler 1:10 seyreltme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kalitatif analiz için 1.25-250 µg/mL konsantrasyon aralığında 11 standart kullanılarak peptidin bir kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır [126].

#### **3.5.2.3 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi**

Üretilen peptid-polimer konjugatlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı ile yapılmıştır. Konjugatların boyut analizleri; 4.0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle 25 °C' de ± 0.1 °C hassasiyeti ile otomatik modda ve 3 tekrarlı yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler

küvetlerde elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25 °C'de  $\pm 0.1$  °C hassasiyeti ile üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler 1:10 seyreltme yapılarak alınmıştır [126, 128].

### **3.6 Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu**

#### **3.6.1 Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi**

Tez çalışması kapsamında Tablo 3.7'de ayrıntıları verilen 5 farklı formülasyonda nanopartikül üretilmiştir. Kullanılan peptid suda çözünür özellikte olduğu için nanopartiküllerin üretimi için ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü uçurma yöntemi kullanılmıştır [129]. Tablo 3.7'de verilen miktardaki peptid ve PLGA verilen hacimlerdeki çözücülerde çözülmüştür. Peptid çözeltisi polimer çözeltisi içerisine damla damla eklenirken %80 güçte 90 sn sonikasyon uygulanmıştır. Bu şekilde birinci emülsiyon (w/o) elde edilmiştir. Elde edilen bu emülsiyon ikinci su fazı olan 10 mL %3'lük PVA çözeltisi içerisine damla damla eklenirken %80 güçte 90 sn boyunca sonikasyon uygulanmıştır. Son durumda ikili emülsiyon oluşturulmuştur. Meydana gelen peptid yüklü PLGA nanopartiküllerinin homojen şekilde dağılımını sağlamak ve stabilizasyonunu arttırmak amacıyla ikili emülsiyon 35 mL %0.1'lik PVA çözeltisi içerisine şırınga ile damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen emülsiyeye haldeki karışım polimerin çözülmesinde kullanılan organik çözücüyü (DCM) uzaklaştırmak üzere 350 rpm'de oda sıcaklığında 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller 10000 rpm'de 40 dk boyunca santrifüj yapılarak çöktürüldükten sonra 10000 rpm'de 30 dk boyunca 3 kere santrifüj yapılarak saf su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Burada nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olan peptid ve PVA moleküllerinin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Çöktürme ve yıkama işlemlerinden sonra yükleme veriminin bulunması için tüm üst fazlar toplanmıştır. Santrifüj sonrası çöken nanopartiküller yaklaşık 10 mL saf su içerisinde disperse edilip dondurulduktan sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur. Beyaz toz halde elde edilen nanopartiküller karakterizasyon ve uygulama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir [130, 131].

**Tablo 3.7** Nanopartikül formülasyonlarına ait bilgiler

Formülasyonlar	Peptid Miktarı (mg)	Çözücü (1 mL)	PLGA (mg)	%3 PVA (mL)	%0.1 PVA (mL)
E1	5	Su	100	10	35
E2	10	Su	100	10	35
E3	20	PBS	100	10	35
E4	30	PBS	100	10	35
E5	-	PBS	100	10	35

### 3.6.2 Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

#### 3.6.2.1 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi

Üretilen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin boyut zeta potansiyel analizleri; Başlık 3.5.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller üretilip organik faz uçurulduktan sonra her bir formülasyondan alınan örnek 1:30 seyreltilerek ölçüm alınmıştır [130, 131].

#### 3.6.2.2 Reaksiyon Verimi ve Peptid Yükleme Veriminin Belirlenmesi

- Reaksiyon verimi (RY%)

Reaksiyon verimi eşitlik 3.2 yardımıyla belirlenmiştir.

$$RY(\%) = \frac{\text{Elde edilen liyofilize nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta kullanılan peptid+polimer miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

- % Enkapsülasyon etkinliği (EE%)



Nanopartikül içerisine yüklenen peptid yüzdesi indirekt yöntem ile saptanmıştır. Nanopartiküller üretilirken ayrılan üst fazdan 10 mL alınıp içerisinde bulunan polimer kalıntıları (PVA ve PLGA) 5000K membranlı santrifüj tüp kullanılarak 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldıktan sonra LC-MS ile analiz edilmiştir. Kromatografik pik alanları hesaplanarak daha önce oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve eşitlik 3.3 yardımıyla enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır [131].

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içerisindeki peptid miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta kullanılan peptid miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

- Yükleme kapasitesi (DL%)

Nanopartikül içerisine yüklenen peptid miktarı indirekt yöntem ile saptanmıştır. Nanopartiküllerin üretimi aşamasında gerçekleştirilen santrifüj ve yıkama işlemi sonrası elde edilen üst fazdan 10 mL alınıp içerisinde bulunan polimer kalıntıları (PVA ve PLGA) 5000K membranlı santrifüj tüp kullanılarak 6000 rpmde 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldıktan sonra LC-MS ile analiz edilmiştir. Kromatografik pik alanları hesaplanarak daha önce oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve eşitlik 3.4 yardımıyla yüklenme verimi hesaplanmıştır [130, 131].

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içerisindeki peptid miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen liyofilize nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.6.2.3 SEM Analizi

Nanopartiküllerin şekil ve büyüklük yönünden morfolojik incelemeleri SEM cihazında gerçekleştirilmiştir. Liyofilize nanopartiküller, vakum altında altınla kaplanmış ve sonrasında metal yüzey üzerine fikse edilerek incelenmiştir [131].

### 3.6.2.4 FT-IR Analizi

Nanopartiküllerin FT-IR spektrumları, ATR modunda Perkin Elmer 1600 spektrofotometre kullanılarak alınmıştır. 600 cm<sup>-1</sup> ile 4000 cm<sup>-1</sup> arasında değişen FT-IR spektrumları 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükle elde edilmiş ve her ölçümde 32 tarama yapılmıştır [130, 131].

### 3.6.2.5 Raman Analizi

Nanopartiküllerin Raman spektrumları Perkin Elmer Raman Station 400F spektrometresi ile alınmıştır. 250-3000  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta çalışılmıştır.

### 3.6.2.6 PVA İçeriğinin Belirlenmesi

PVA içeriği, PVA'nın iki bitişik hidroksil grubu ile bir iyot molekülü arasında renkli bir kompleks oluşumuna dayanan kolorimetrik yöntemle tespit edilmiştir [132]. Liyofilize edilen nanopartikülün 2 mg'ı 2 mL 0.5 M NaOH içerisinde çözülüp 15 dakika 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Nötralizasyon amacıyla içerisine 900  $\mu\text{L}$  1 N HCl ilave edilip son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra ortama 3 mL 0.65 M borik asit, 0.5 mL  $\text{I}_2/\text{KI}$  ve 1.5 mL saf su eklenerek iyice karışması sağlanmıştır. 690 nm'de UV-VIS spektrometrede absorbans alınarak UV-VIS spektrometre ölçümleri ile önceden hazırlanan PVA'ya ait kalibrasyon eğrisi yardımıyla PVA miktarı belirlenmiştir [133, 134].

### 3.6.2.7 *In-vitro* Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirmesi

Peptid yüklü nanopartiküllerin 5 mg'ı, 2 mL pH 7.4 PBS tamponunda süspansiyon edilerek 37 °C'de yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Örnek periyodik olarak santrifüj edilerek üst faz alınıp, pellet aynı tamponda tekrar süspansiyon edilmiştir. Bu işlem nanopartikülden salınan peptid miktarı kantitatif olarak tespit edilemeyinceye kadar tekrarlanmıştır. Toplanan üst fazlar floresans spektrometre ile analiz edilip, elde edilen spektrumlardan emisyon şiddetleri belirlenerek daha önceden floresans spektrometre analizleriyle hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla farklı zamanlarda (1., 2., 3. ve 4. saat; 1., 7., 15., 30., 60., 75., 100. ve 150. gün) salınan peptid miktarı hesaplanmıştır [129, 131, 135].

Peptid yüklü nanopartiküllerin salım mekanizmasını analiz etmek için çeşitli kinetik modeller kullanılmıştır. Peptid salım verileri, sıfırıncı mertebeden kinetiğe (eşitlik 3.5, salım hızının peptid konsantrasyonuna bağlı olmadığı sistemlerden salımı açıklar), birinci mertebeden kinetik (eşitlik 3.6, salımın konsantrasyona bağlılığını esas alır), Higuchi kinetiği (eşitlik 3.7, Fickian difüzyonuna dayanan

çözünmeyen matrinden salımı tanımlar) ve Korsmeyer-Peppas kinetiği (eşitlik 3.8, polimerik sistemden salımı açıklar) [136-139].

$$Q_t = k_0 \times t \quad (3.5)$$

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 \times t \quad (3.6)$$

$$Q_t = k_h \times \sqrt{t} \quad (3.7)$$

$$M_t/M_\infty = k_p \times t^n \quad (3.8)$$

### 3.7 Partisyon Katsayısının (lipofilisite değeri, LogD) Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen peptid, konjugat ve peptid yüklü polimerik nanopartikülleri için lipofilisite değerleri ‘çalkalama şişesi yöntemi’ ve ‘potansiyometrik yöntem’ kullanılarak belirlenmiştir.

Konjugatın çalkalama şişesi yöntemi ile lipofilisite çalışması için, sistemin sulu fazı PBS tamponu (pH 7.2) ile oluşturulmuştur. Sistemin polar olmayan organik fazı içinse n-oktanol kullanılmıştır. Önceden doyurulmuş n-oktanol/PBS sistemi, inkübatörde n-oktanol ve PBS tamponunun 37 °C'de 24 saat 120 rpm'de çalkalanması suretiyle hazırlanmıştır. Standart konjugat çözeltisi daha sonra önceden doyurulmuş n-oktanol (1:1, v/v) ilave edilmiştir. Karışım, 37 ° C'de bir inkübatörde 30 dakika boyunca yatay pozisyonda çalkalanmıştır. Oktanolde değişen konsantrasyonlar, sulu fazdaki bileşiğin başlangıç konsantrasyonlarındaki değişikliğe göre POW ( $C_{\text{octanol}}/C_{\text{su}}$ ) olarak hesaplanmıştır [140-142].

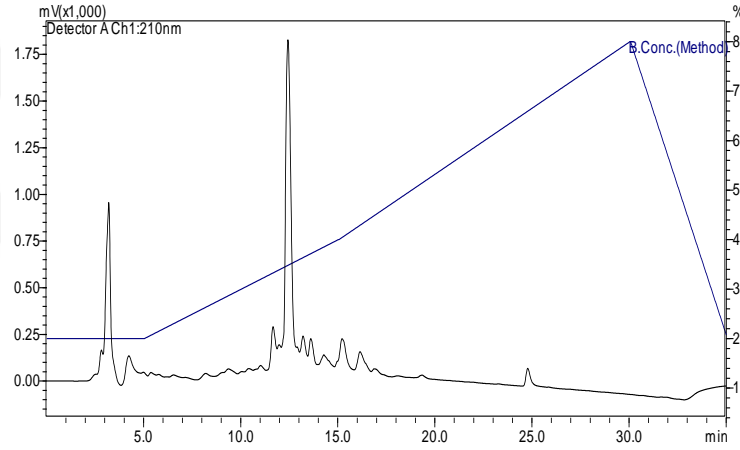
Peptid, PLGA nanopartikülleri (E5) ve peptid yüklü PLGA nanopartiküllerinin (E3) potansiyometrik yöntemle lipofilisite çalışması için standart çözeltiler (2 mg/mL PBS) hazırlanmıştır. Her standart şişe, manyetik bir karıştırıcı, ısıtıcı ve pH metreden oluşan bir cihaza yerleştirilmiştir. pH 2-12 aralığında fazlar arasındaki molekül değişimi incelenmiştir [143]. Her bir şişeye HCl (10N) ilave edilerek pH 2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra her bir sistemin pH'ı 12 olana kadar KOH ilave edilmiştir. Standart konsantrasyonların ayrışması veya birleştirilmesinden dolayı değişen pH değerlerine karşı denge konsantrasyonlarındaki değişiklikler LogD olarak hesaplanmıştır [142].

### 3.8 Sentezlenen Sistemlerin *In-vitro* Sitotoksosite Analizleri

Tez kapsamında sentezlenen peptid, konjugat ve peptid yüklü polimerik nanopartiküller için *in-vitro* sitotoksosite analizleri, MTT yöntemi kullanılarak L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kısaca,  $5 \times 10^3$  hücre/mL mikropalakalara ekilerek gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, pH 7.4 PBS içinde çözülmüş 0.5 mg/mL ile 10 mg/mL arasında değişen farklı peptid, peptid-polimer konjugatı ve peptid yüklü nanopartikül konsantrasyonları hücrelere ilave edilmiştir. 37 °C'de 24 saat ve 48 saat inkübasyonun ardından, hücrelerin peptid polimer konjugatlarına ve nanopartiküllere karşı duyarlılığını değerlendirmek için her bir mikropalaka kuyucuğuna 10  $\mu$ L MTT (10 mg/mL) eklenmiştir. Hücre canlılığının işareti olan formazan kristalleri tespit edildiğinde, bu kristaller DMSO ile çözülmüştür. Daha sonra mikropalakalardaki kolorimetrik yoğunluk 570 nm'de bir mikropalaka okuyucu kullanılarak okunmuştur [131, 144].

### 4.1 W-EBOVP Peptidinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Ebola virüs hastalığına ait NP 421-430 peptid epitopu katı fazda peptid sentezi yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen ham peptide ait LC kromatogramı Şekil 4.1'de ve ESI-MS spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir. Sentezlenen peptid dizisi preparatif HPLC ile saflaştırıldıktan sonra LC-ESI-MS, Q-TOF-MS ve FT-IR analizleri ile karakterize edilmiştir.

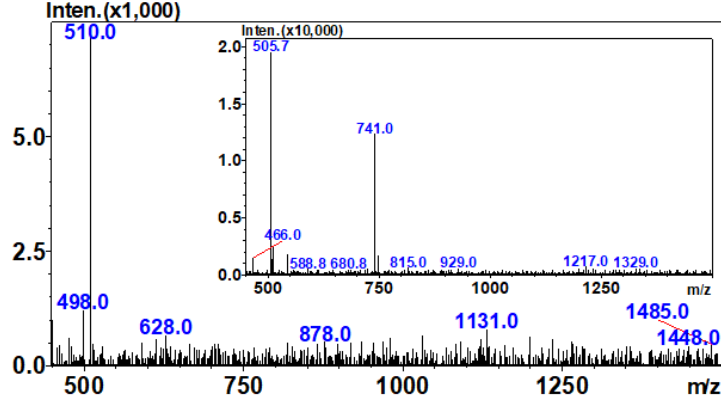


Şekil 4.1 Ham peptidin LC kromatogramı

$$[M+H]^+ = 1485 \quad [M] = 1484 \text{ Da}; [M+2H]^{2+} = 741 \quad [M] = 1480 \text{ Da}$$

$$[M+H+2Na]^{3+} = 510 \quad [M] = 1483 \text{ Da}; [M+2H+Na]^{3+} = 505 \quad [M] = 1490 \text{ Da}$$

$$[M_{\text{elde edilen}}] = 1484.25 \text{ Da} \quad [M_{\text{teorik}}] = 1484.49 \text{ Da}$$



Şekil 4.2 Ham peptidin ESI-MS spektrumu

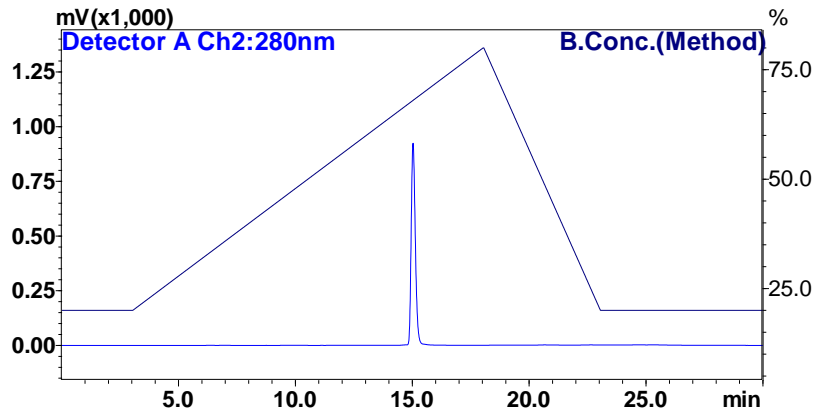
#### 4.1.1 W-EBOVP Peptidinin LC-ESI-MS ile Analizi

##### 4.1.1.1 Kromatografik Yöntemin Validasyonu

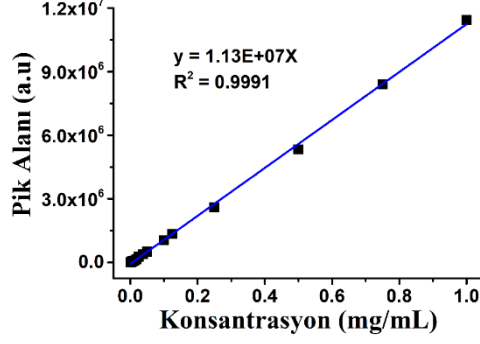
Yöntem validasyonu için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ ve geri kazanım parametreleri incelenmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. LC yönteminin validasyon sonuçları Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

- **Doğrusallık**

Doğrusallık aralığını saptamak için hazırlanan artan derişimlerdeki (1.25-1000 ppb) standart peptid çözeltileri LC-MS ile analiz edilmiştir. Şekil 4.3'de 1 ppm konsantrasyondaki peptidin kromatogramı örnek olarak verilmiştir. Tüm standartların pik alanları peptid derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Buradan elde edilen peptide ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'de verilmiştir.



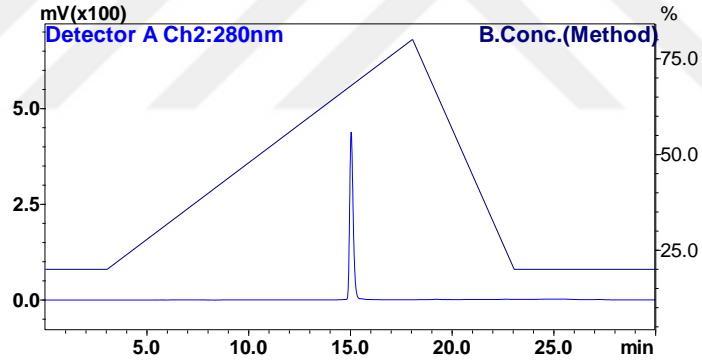
Şekil 4.3 1.0 ppm peptidin LC kromatogramı



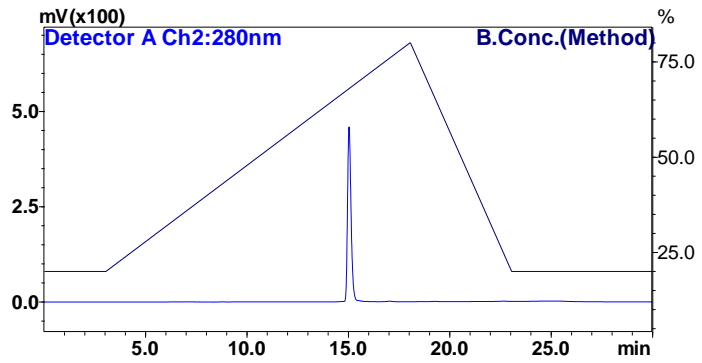
Şekil 4.4 Peptidin LC analizleriyle elde edilen kalibrasyon eğrisi

- Doğruluk

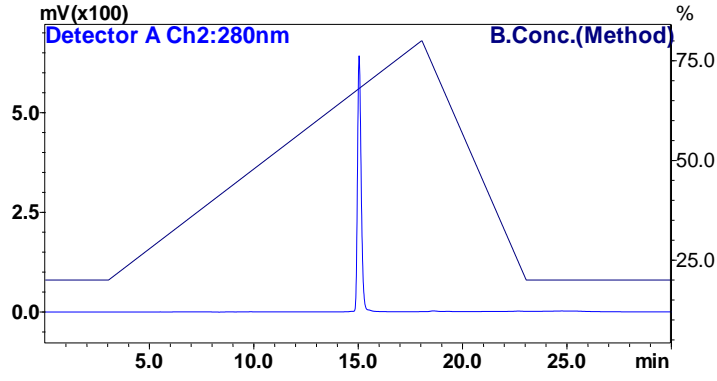
Analiz sonrasında elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığını gösteren doğruluk 0.51, 0.5625 ve 0.75 ppm olmak üzere 3 farklı derişimde çalışılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır. Şekil 4.5-4.7'de verilen piklerin alanlarının ortalamaları hesaplanmıştır. Geliştirilen kromatografik yöntemde peptidin analizi için doğruluk  $90.2 \pm 2.77$  olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5 0.51 ppm peptidin LC kromatogramı



Şekil 4.6 0.5625 ppm peptidin LC kromatogramı



Şekil 4.7 0.75 ppm peptidin LC kromatogramı

- **Kesinlik**

Analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını gösteren kesinlik değerleri gün içi ve günler arası olarak bağıl standart sapma (RSD) ile verilmiştir (Tablo 4.1).

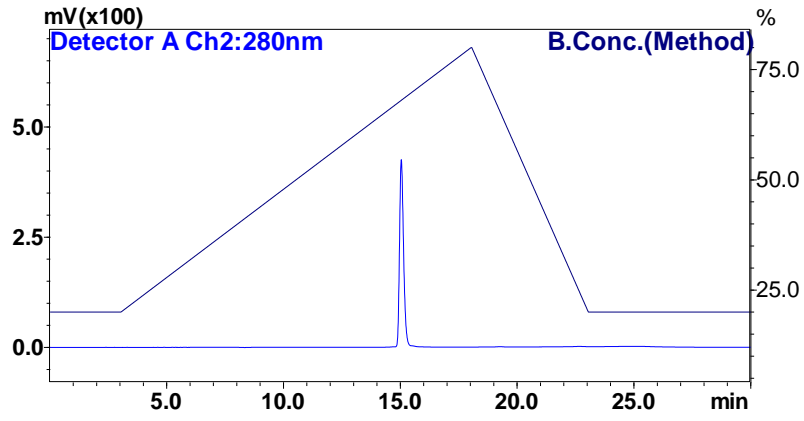
- **Gözlenebilirlik Sınırı ve Alt Tayin Sınırı**

Analiz yönteminin duyarlılığının kanıtlanması amacıyla geliştirilen yöntemin gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) saptanmıştır. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük peptid derişimi olarak alınmıştır. Alt tayin sınırı (LOQ), tayin edilebilen en düşük derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Hesaplanan LOD ve LOQ sırasıyla 2.65 ve 7.95  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bulunmuştur.

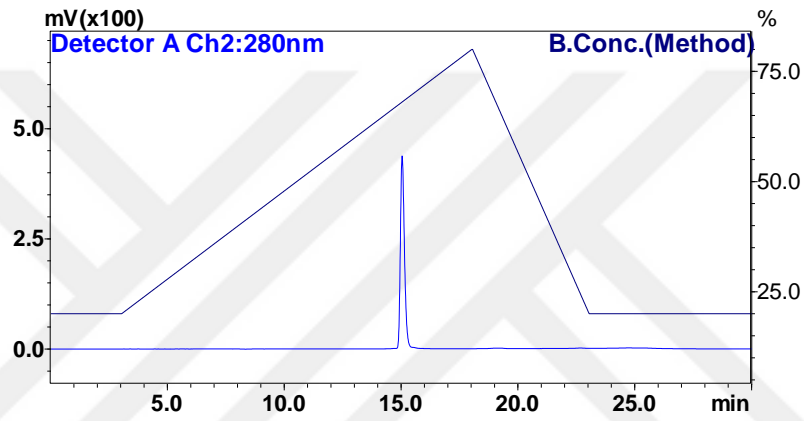
- **Geri Kazanım**

Deneysel kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak için yapılır. Üç ayrı derişimde üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. 0.5025, 0.525 ve 0.75 ppm standart çözeltileri 1 ppm stok çözeltiden 250  $\mu\text{L}$  spike yapılarak hazırlanmıştır ve analiz edilmiştir (Şekil 4.8-4.10). Geri kazanım değeri  $90.30 \pm 1.81$  olarak hesaplanmıştır.

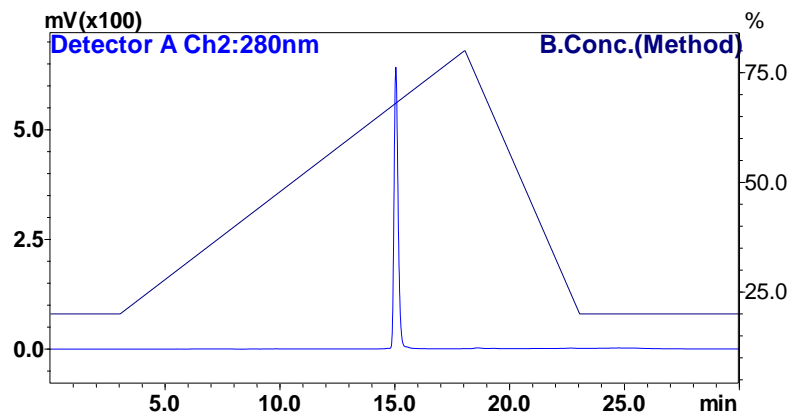




Şekil 4.8 0.5025 ppm peptidin LC kromatogramı



Şekil 4.9 0.525 ppm peptidin LC kromatogramı



Şekil 4.10 0.75 ppm peptidin LC kromatogramı

**Tablo 4.1** Peptidin LC analizi için yöntem validasyon sonuçları

Validasyon parametreleri					
Kalibrasyon aralığı	1000 - 1.25 ppb				
Eğim ± SD	(1.13 ± 0.01) x10 <sup>7</sup>				
Doğrusallık (N=15)	R <sup>2</sup>	0.9991			
	Pearson's r	0.9996			
Doğruluk (N=3)	90.2 % ± 2.77				
Geri kazanım (N=3)	90.3 % ± 1.81				
Kesinlik	Gün içi (N=5), RSD%	250 ppm	25 ppm	2.5 ppm	
		1.21 % (n=3)	0.89 % (n=3)	2.64 % (n=3)	
		0.54 % (n=3)	0.84 % (n=3)	1.58 % (n=3)	
		0.68 % (n=3)	0.27 % (n=3)	1.66 % (n=3)	
		1.20 % (n=3)	0.54 % (n=3)	1.80 % (n=3)	
		1.76 % (n=3)	1.85 % (n=3)	4.47 % (n=3)	
		1.08 ± 0.49 %	0.88 ± 0.59 %	2.43 ± 1.22 %	
		Günler arası RSD%	250 ppm	25 ppm	2.5 ppm
		1. gün (N=3)	0.68 % (n=3)	0.27 % (n=3)	1.80 % (n=3)
		2. gün (N=3)	1.76 % (n=3)	0.54 % (n=3)	4.47 % (n=3)
3. gün (N=3)	1.20 % (n=3)	1.85 % (n=3)	1.66 % (n=3)		
	1.21 % ± 0.54	0.89 % ± 0.84	2.64 % ± 1.58		
LOD (µg/kg)	2.65				
LOQ (µg/kg)	7.95				

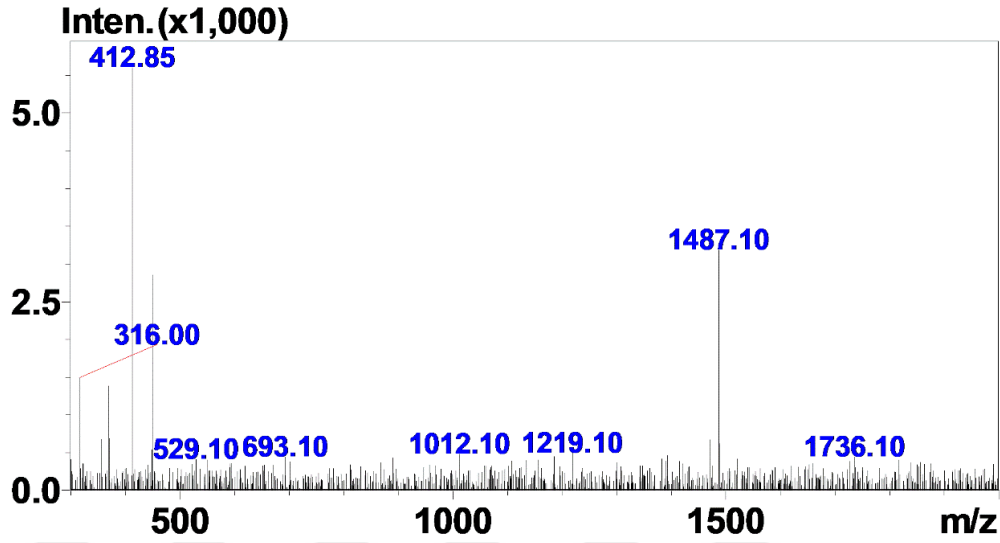
SD: standart sapma, RSD: bağıl standart sapma, N ve n: tekrar sayısı

#### 4.1.1.2 W-EBOVP Peptidinin ESI-MS Analizi

Peptidin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla ESI-MS analizi yapılmıştır. Elde edilen kütle spektrumu Şekil 4.11'de verilmiştir. Molekül ağırlığı 1484.08 Da bulunmuştur.

$$m/z = [M + 3H] = 1487.10 \text{ Da} \Rightarrow M_{\text{deneysel}} = 1484.08 \text{ Da}; M_{\text{teorik}} = 1484.47 \text{ Da}$$

$$m/z = [M + 4ACN + 4H]^{4+} = 413 \text{ Da} \Rightarrow M_{\text{deneysel}} = 1484 \text{ Da}; M_{\text{teorik}} = 1484.47 \text{ Da}$$



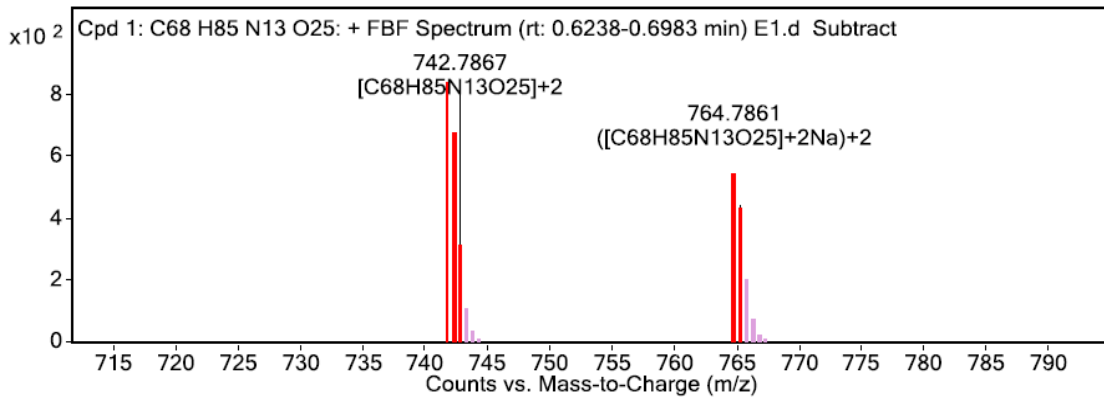
Şekil 4.11 W-EBOVP peptidinin LC-MS kütle spektrumu

#### 4.1.2 W-EBOVP Peptidinin Q-TOF-MS Analizi

Sentezlenen peptidin molekül ağırlığını doğrulamak ve LC-ESI-MS analizini desteklemek amacıyla Q-TOF-MS analizi yapılmıştır. Şekil 4.12'de verilen analiz sonuçları LC-ESI-MS analizlerinden elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

$$m/z = [M + 2H]^{2+} = 742.79 \text{ Da} \Rightarrow M_{\text{deneysel}} = 1483.50 \text{ Da}; M_{\text{teorik}} = 1484.47 \text{ Da}$$

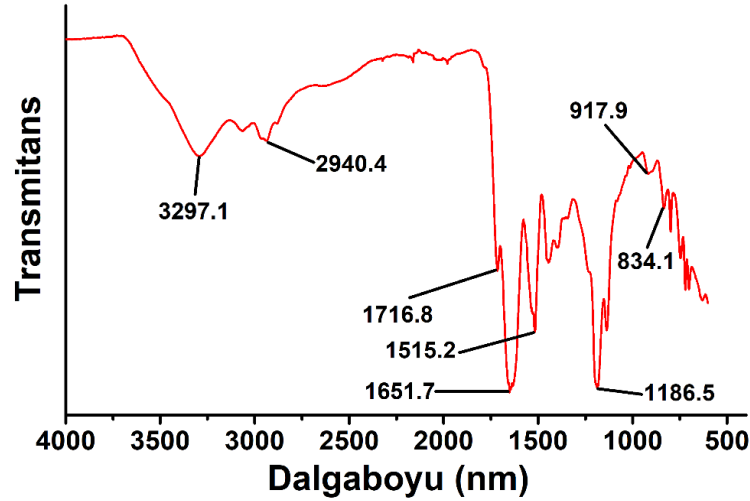
$$m/z = [M + 2Na]^{2+} = 764.79 \text{ Da} \Rightarrow M_{\text{deneysel}} = 1483.62 \text{ Da}; M_{\text{teorik}} = 1484.47 \text{ Da}$$



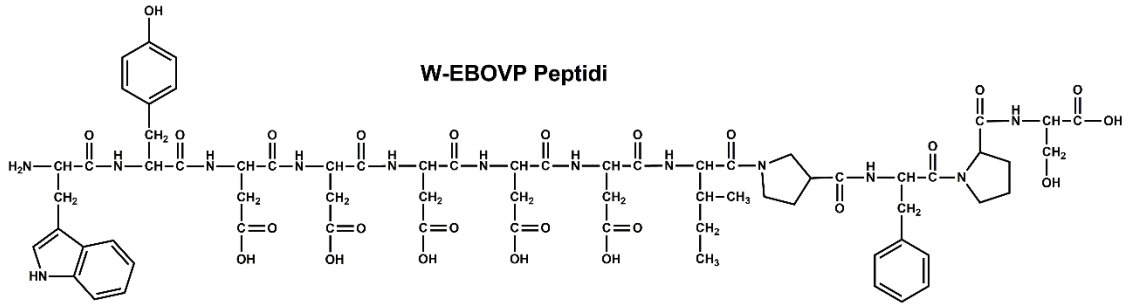
Şekil 4.12 W-EBOVP peptidinin Q-TOF-MS kütle spektrumu

### 4.1.3 W-EBOVP Peptidinin FT-IR Analizi

Peptidin FT-IR spektrumu Şekil 4.13'de verilmiştir.  $1716.8\text{ cm}^{-1}$  HO-C=O grubunu,  $1186.5\text{ cm}^{-1}$  C-C(OH)=O grubunu,  $3297.1\text{ cm}^{-1}$ ,  $1651.7\text{ cm}^{-1}$  ve  $1515.2\text{ cm}^{-1}$  amid bağlarını,  $2940.4\text{ cm}^{-1}$  ve  $914.9\text{ cm}^{-1}$  -OH grubuna ait piklerdir. Elde edilen bilgiler Şekil 4.14'de açık yapısı verilen peptidin fonksiyonel gruplarını doğrulamıştır.



Şekil 4.13 W-EBOVP peptidinin FT-IR spektrumu



Şekil 4.14 W-EBOVP peptidinin molekül yapısı

## 4.2 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

### 4.2.1 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezinde Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi

Peptid-polimer konjugatlarının sentezinde kullanılacak yöntemin belirlenmesi amacıyla üç farklı yöntemle sentez yapılmıştır ve 1., 2. ve 24. saat reaksiyon

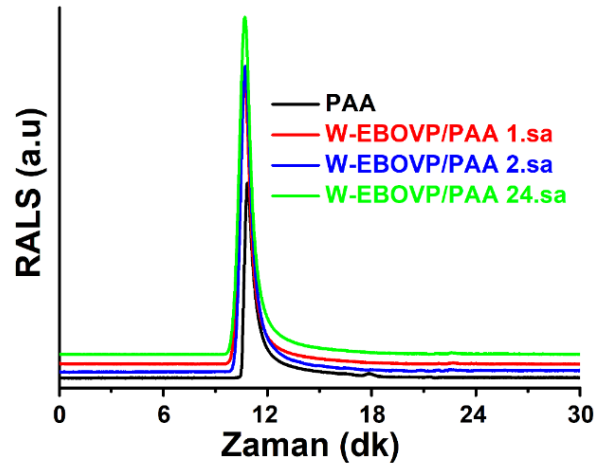
ortamından örnek alınıp GPC analizleri yapılarak en verimli yöntem belirlenmiştir. Polimer ve peptid ile yapılan konjugasyon reaksiyonlarında polimer miktarı sabit peptid miktarı arttırıldığında pik alanlarında artma beklenmektedir. Aynı şekilde, tek bir konjugasyon oranında yapılan reaksiyonlarda saate bağlı olarak daha fazla peptid molekülü polimere bağlanacağı için alanlarda artış olmalıdır. Tek başına peptid ve polimer, üç farklı yöntemle sentezlenen konjugatların 1., 2. ve 24. saat GPC RALS pik alanları Tablo 4.2'de verilmiştir. 2. yöntem sonuçlarında başlangıçta kullanılan konsantrasayondaki PAA' in pik alanına göre 1., 2. ve 24. saat ölçümlerinin pik alanlarında net ve düzenli bir artış görülmüştür. Alanları hesaplanan piklere ait kromatogramlar Şekil 4.15'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. 1. ve 3. yöntem için pik alanları değerlendirildiğinde ise saate bağlı olarak elde edilen sonuçlarda pik alanları bir miktar artış göstermiştir. Ancak pik alanlarının 2. yöntemin pik alanlarına göre düşük kalması, 1. ve 3. yöntemin düşük verimle gerçekleştiğini 2. yöntem kullanılarak daha yüksek verimle konjugat sentezlenebildiğini göstermiştir.

**Tablo 4.2** Üç farklı yöntemle sentezlenen konjugatların GPC RALS dedektörü kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen alanlar

	Örnek kodu	RALS pik alanı
	PAA	61.87
	W-EBOVP	2.27
<b>1. yöntem</b>	W-EBOVP/PAA 1.sa	75.92
	W-EBOVP/PAA 2.sa	84.84
	W-EBOVP/PAA 24.sa	88.75

**Tablo 4.2** Üç farklı yöntemle sentezlenen konjugatların GPC RALS dedektörü kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen alanlar (Devamı)

<b>2. yöntem</b>	W-EBOVP/PAA 1.sa	97.41
	W-EBOVP/PAA 2.sa	104.10
	W-EBOVP/PAA 24.sa	122.33
<b>3. yöntem</b>	W-EBOVP/PAA 1.sa	82.61
	W-EBOVP/PAA 2.sa	84.14
	W-EBOVP/PAA 24.sa	86.23



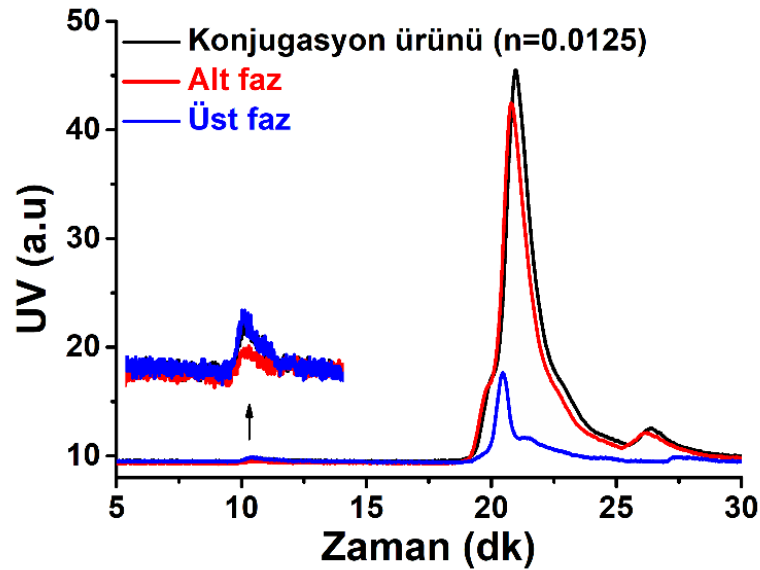
**Şekil 4.15** PAA ve 2. yöntemle sentezlenen konjugatlara ait GPC RALS kromatogramları

#### 4.2.2 Polimer Miktarı Artan, Peptid Miktarı Sabit Koşullarda Konjugasyon

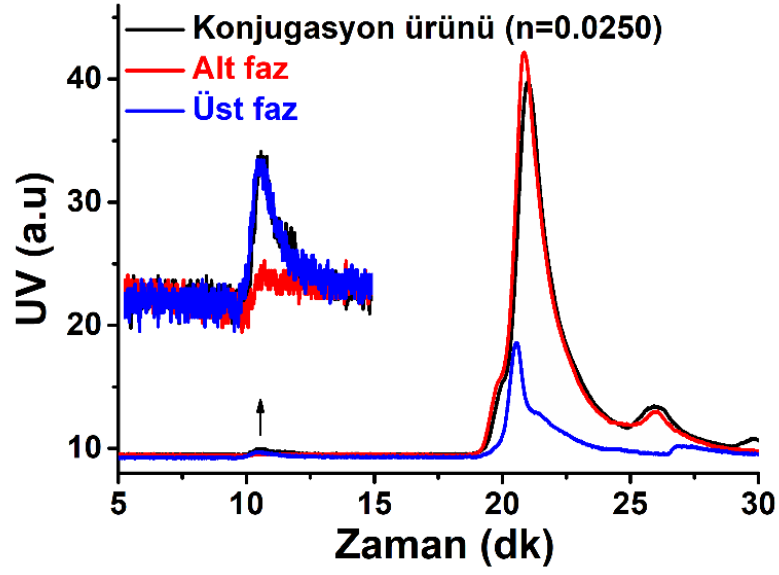
$n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarında konjugatlar 2. yöntem kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugatlar GPC, floresans spektrofotometre ve Zetasizer ile analiz edilmiştir.

##### 4.2.2.1 GPC Analizi

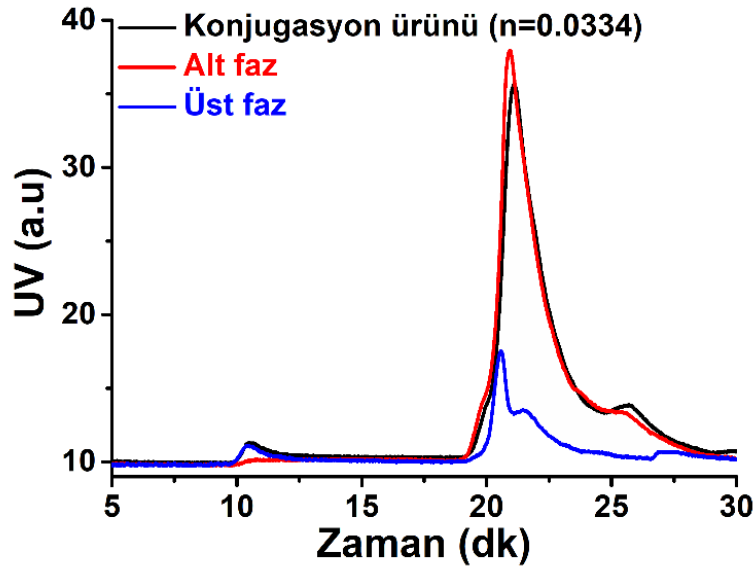
$n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarında sentezlenen konjugatlar için reaksiyon sonrası konjugasyon ürünü, membranlı santrifüj tüpü ile saflaştırma sonrası alt faz (reaksiyona girmeden kalan peptid ve aktivatör) ve üst faz (saf konjugat) olarak GPC ile analiz edilmiştir. Bu analizlere ait GPC UV kromatogramları Şekil 4.16-4.24'de verilmiştir. Şekil 4.25'de de tüm oranlardan elde edilen üst fazlara yani saf konjugatlara ait GPC UV kromatogramları çakışık olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.16  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı

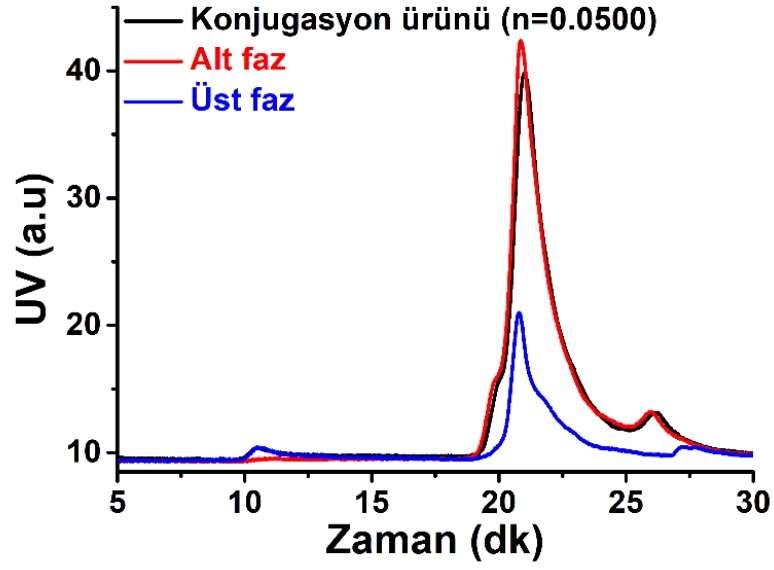


Şekil 4.17  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0250$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı

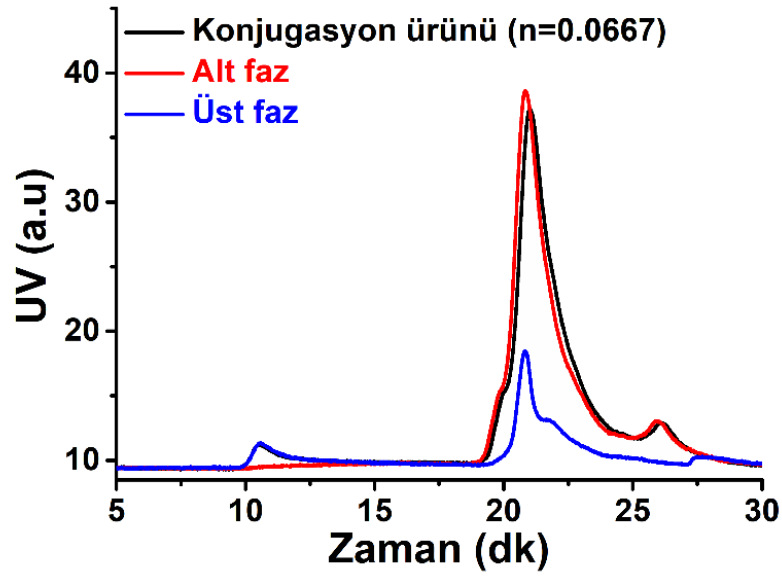


Şekil 4.18  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0334$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı

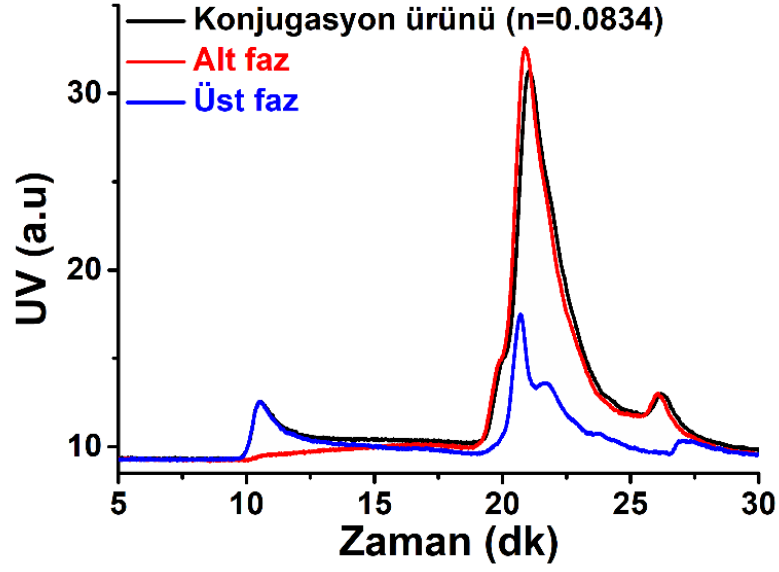




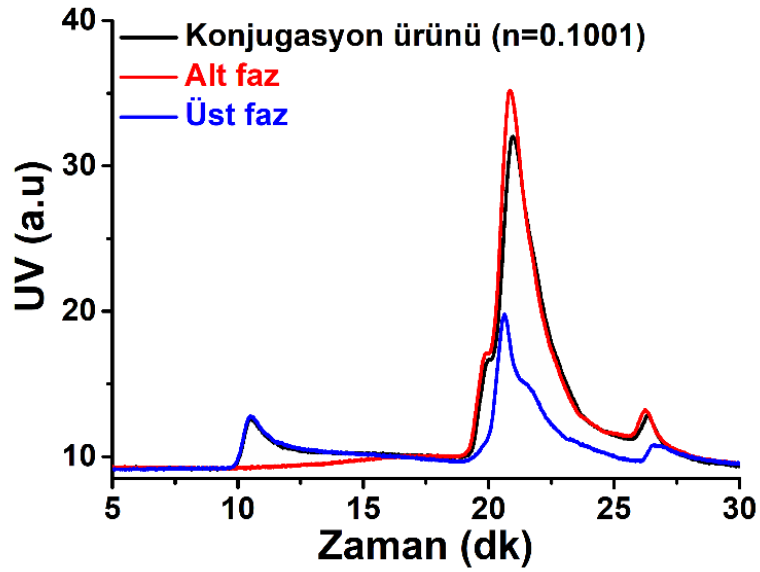
Şekil 4.19  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0500$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



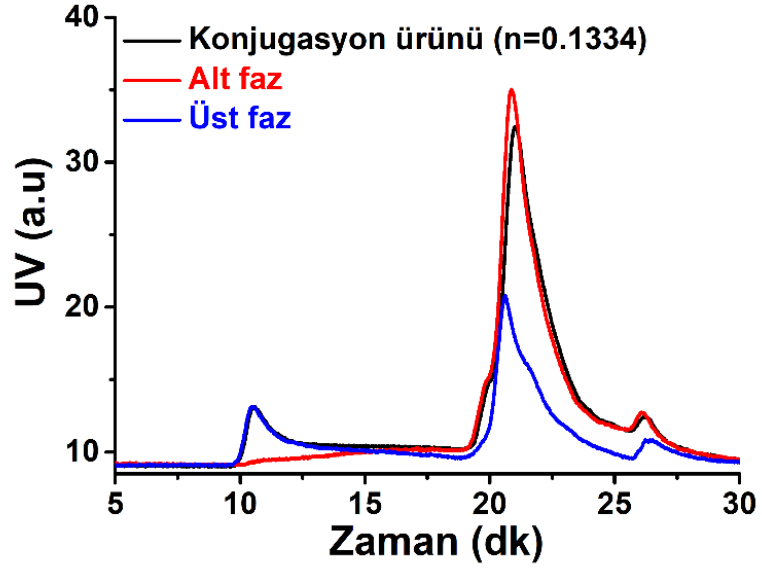
Şekil 4.20  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0667$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



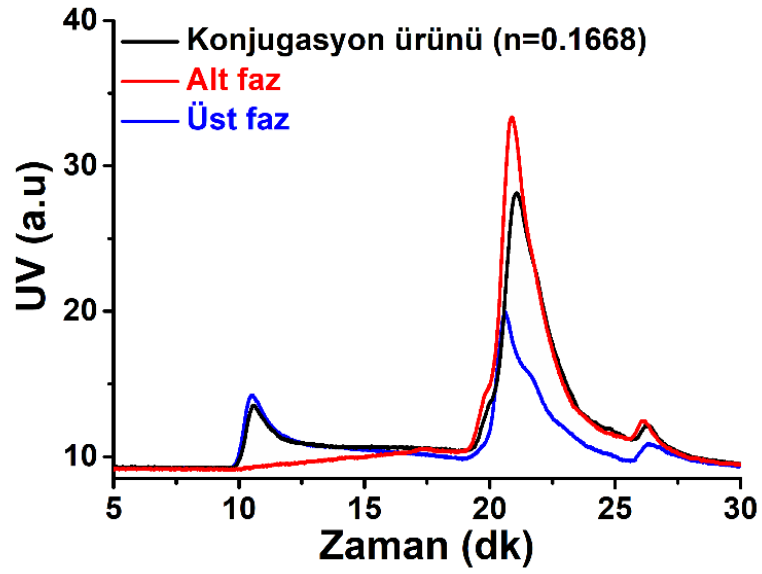
Şekil 4.21  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0834$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



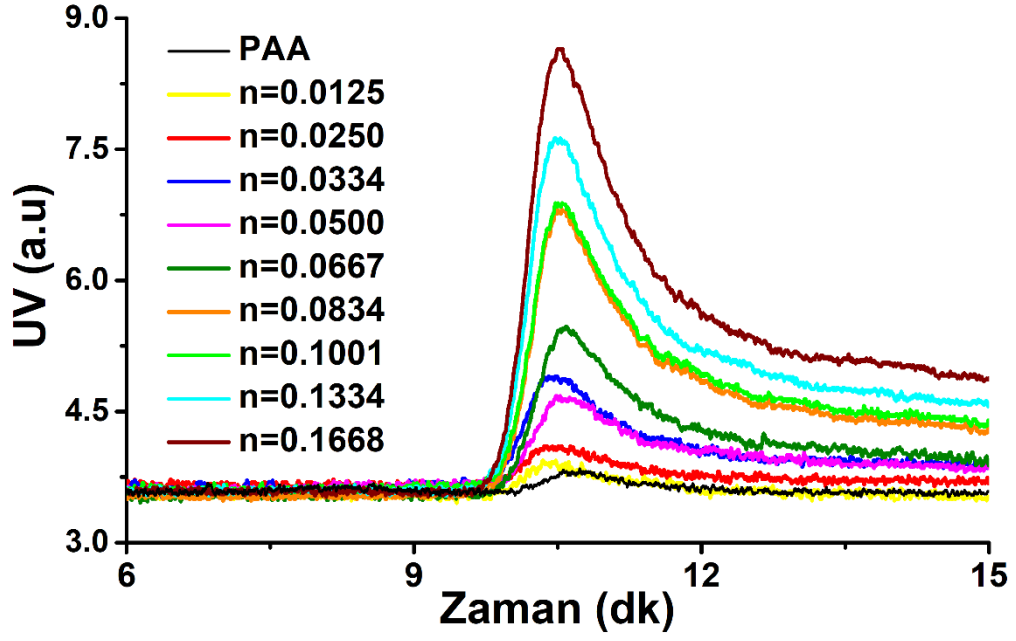
Şekil 4.22  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.1001$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



Şekil 4.23  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.1334$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



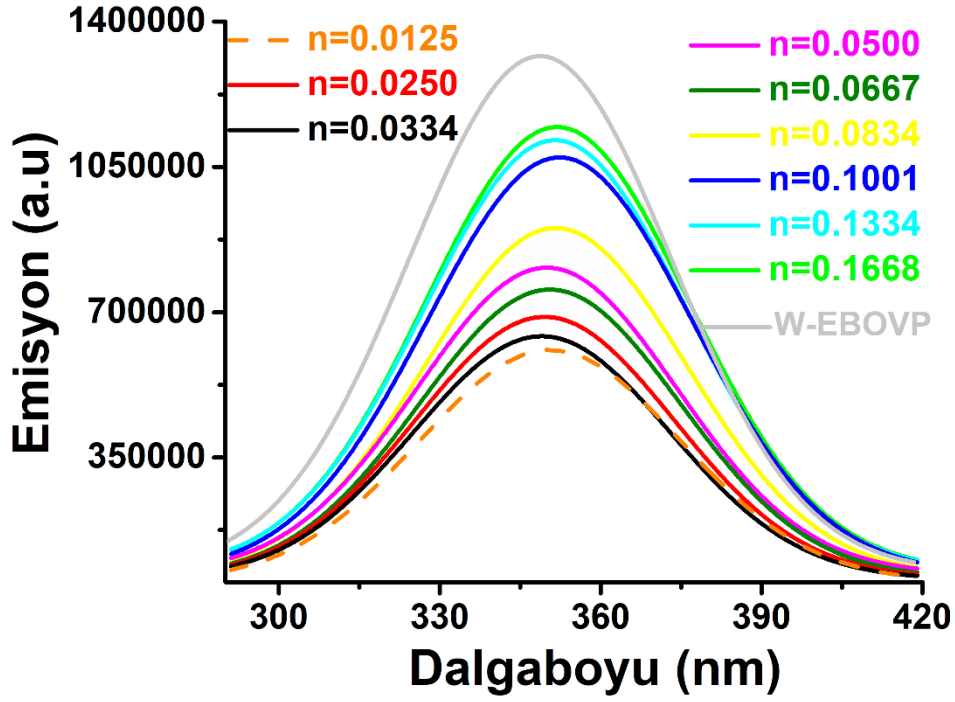
Şekil 4.24  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.1668$  konjugatının alt faz ve üst faz ile karşılaştırmalı GPC UV kromatogramı



Şekil 4.25 PAA ve  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı GPC UV kromatogramları

#### 4.2.2.2 Floresans Spektrofotometre Analizi

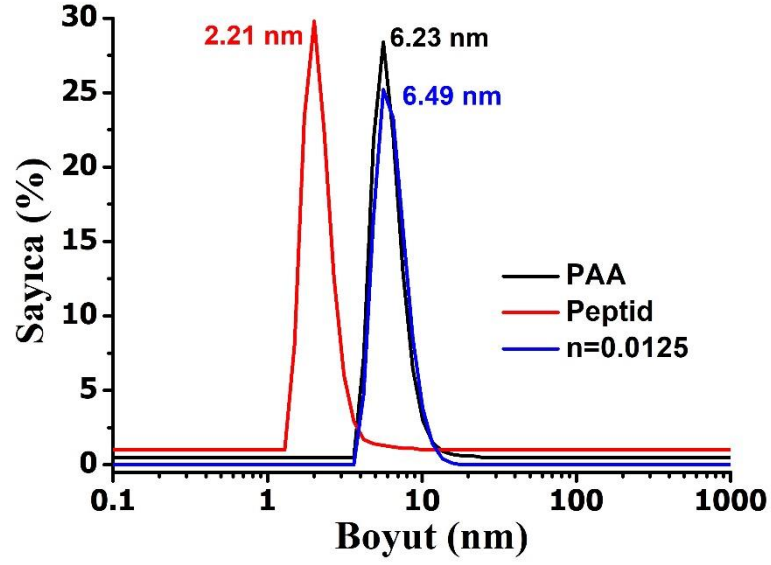
$n_{\text{PAA}}/n_{\text{peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz) floresans spektrumları serbest peptid (W-EBOVP) ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.26'da verilmiştir.



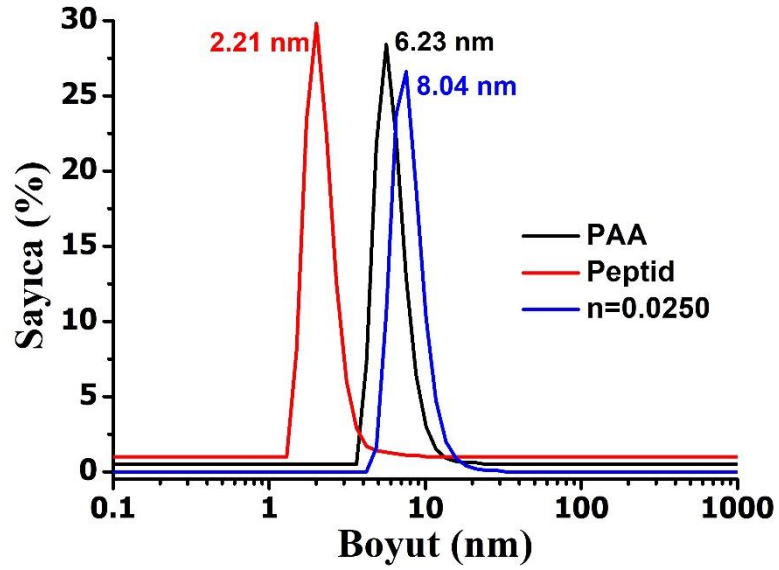
Şekil 4.26  $n_{pAA}/n_{peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların serbest peptid (W-EBOVP) ile kıyaslamalı floresans spektrumu

#### 4.2.2.3 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi

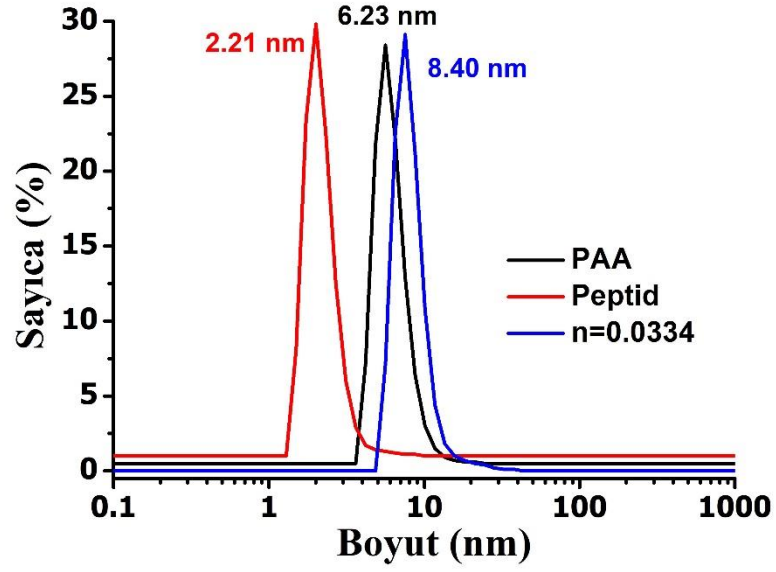
$n_{pAA}/n_{peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz) sayıca boyut dağılım grafikleri serbest peptid ve polimer ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.27-4.35'de verilmiştir.



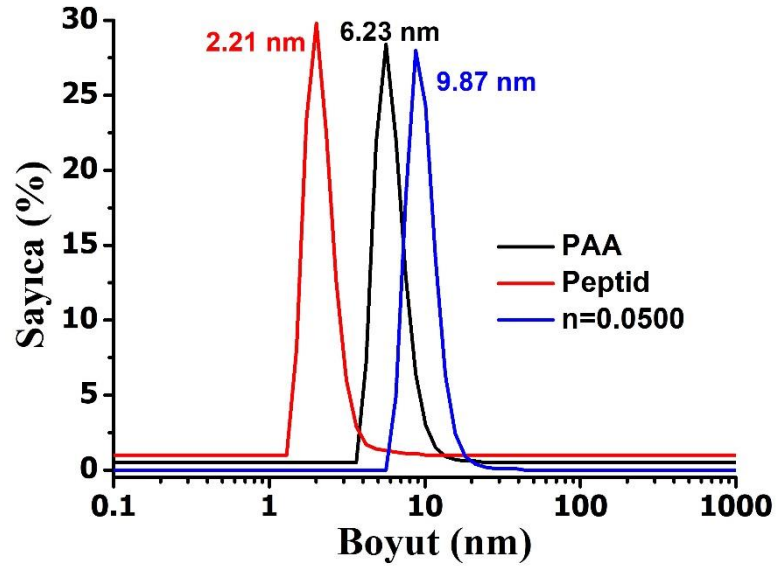
Şekil 4.27  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



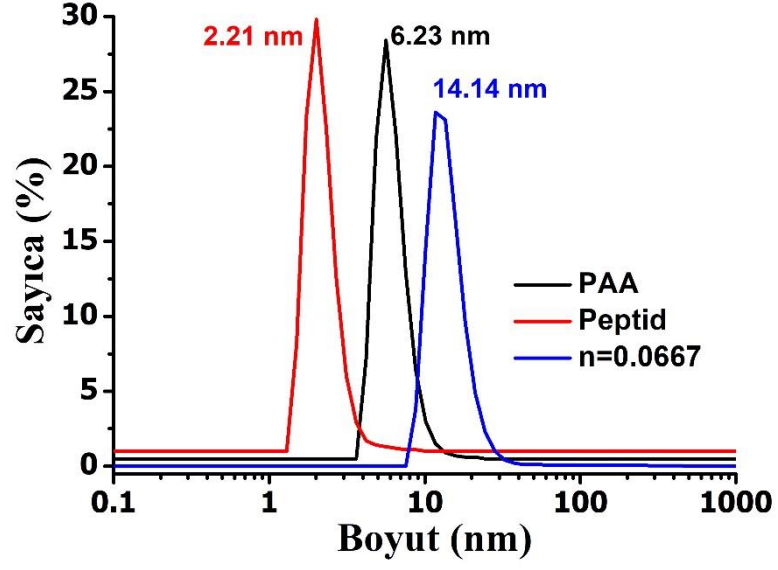
Şekil 4.28  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0250$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



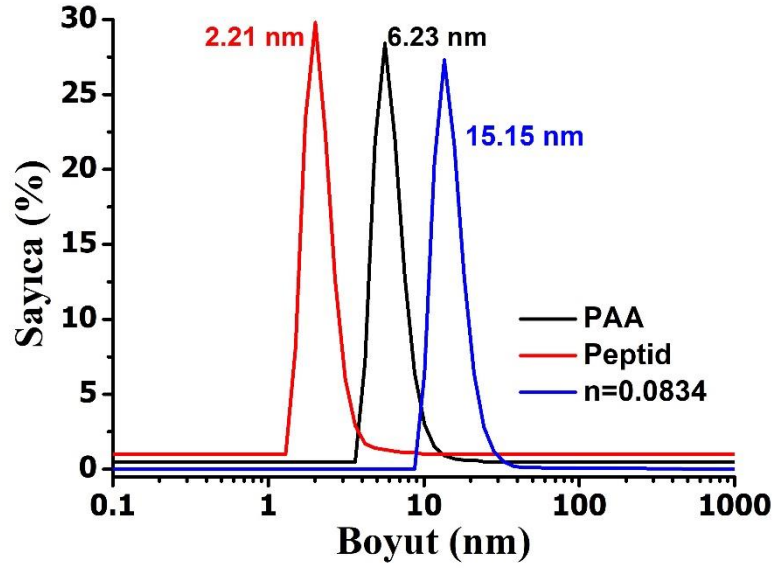
Şekil 4.29  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0334$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



Şekil 4.30  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0500$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği

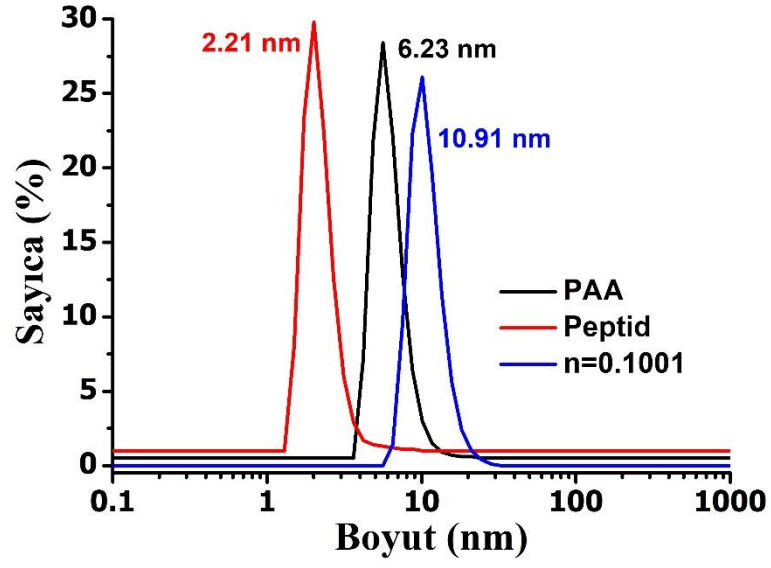


Şekil 4.31  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0667$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği

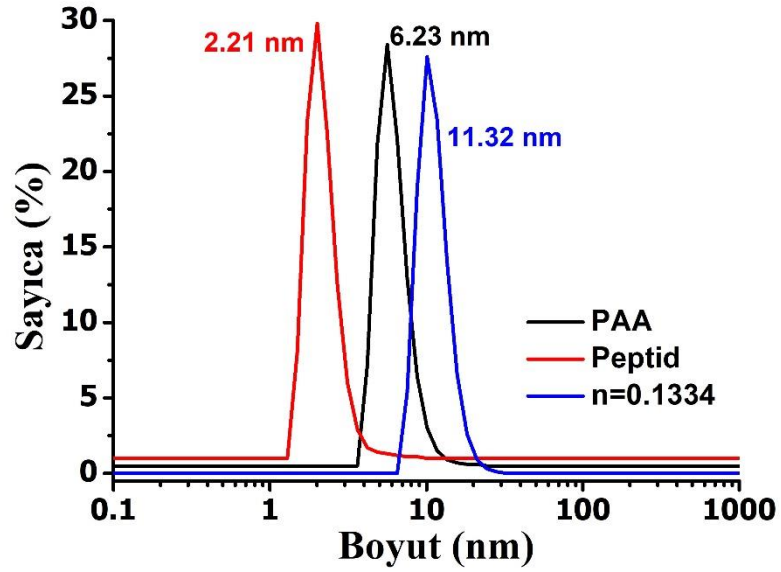


Şekil 4.32  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0834$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği

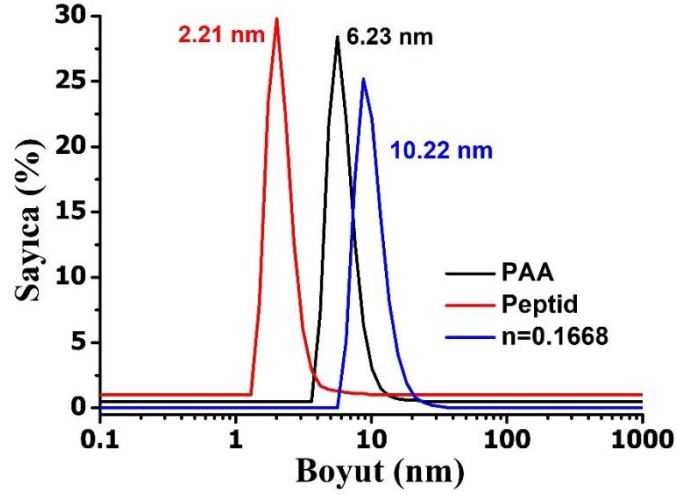




Şekil 4.33  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1001$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



Şekil 4.34  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1334$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



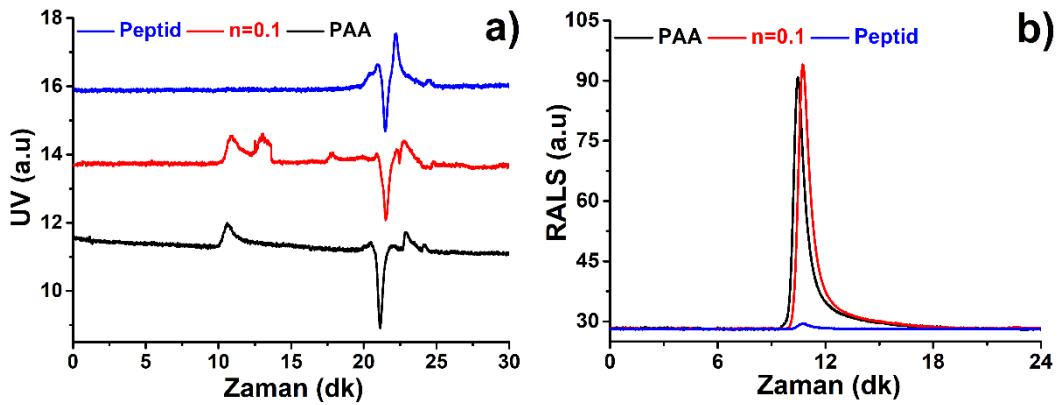
Şekil 4.35  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.1334$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği

#### 4.2.3 Peptid Miktarı Artan, Polimer Miktarı Sabit İken Konjugasyon

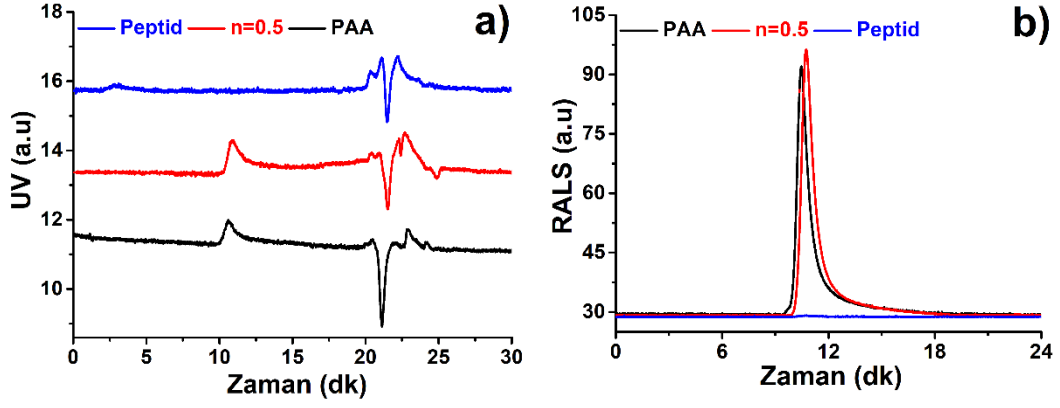
$n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatlar 2. yöntem kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugatlar GPC, floresans spektrofotometre ve Zetasizer ile analiz edilmiştir.

##### 4.2.3.1 GPC Analizi

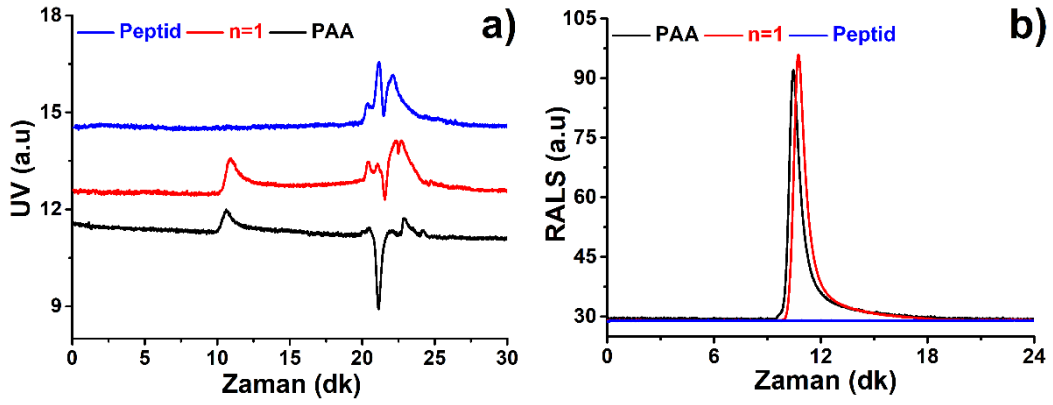
$n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların GPC UV ve RALS kromatogramları başlangıçta kullanılan eş konsantrasyondaki peptid ve polimer ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.36-4.43'de verilmiştir.



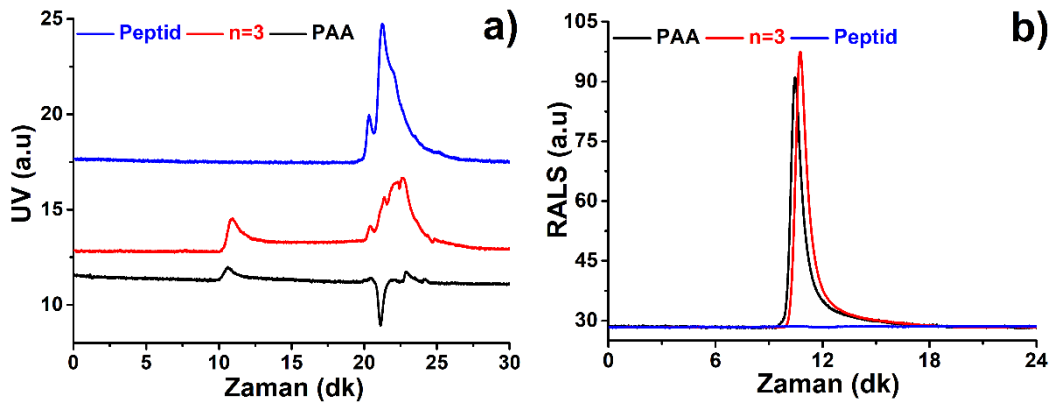
Şekil 4.36  $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC a) UV ve b) RALS kromatogramı



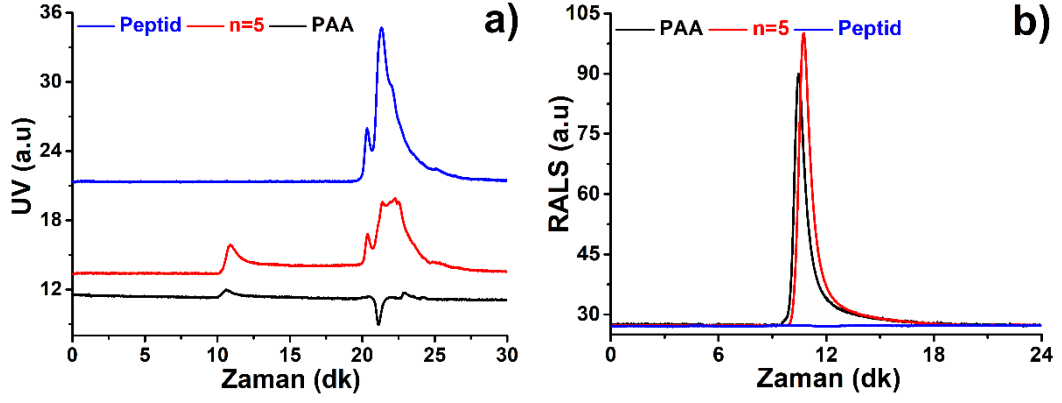
Şekil 4.37  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.5$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



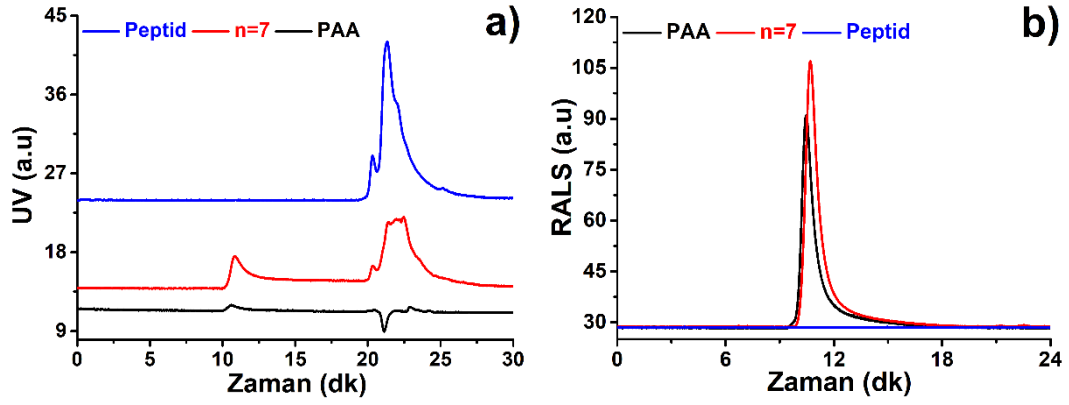
Şekil 4.38  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



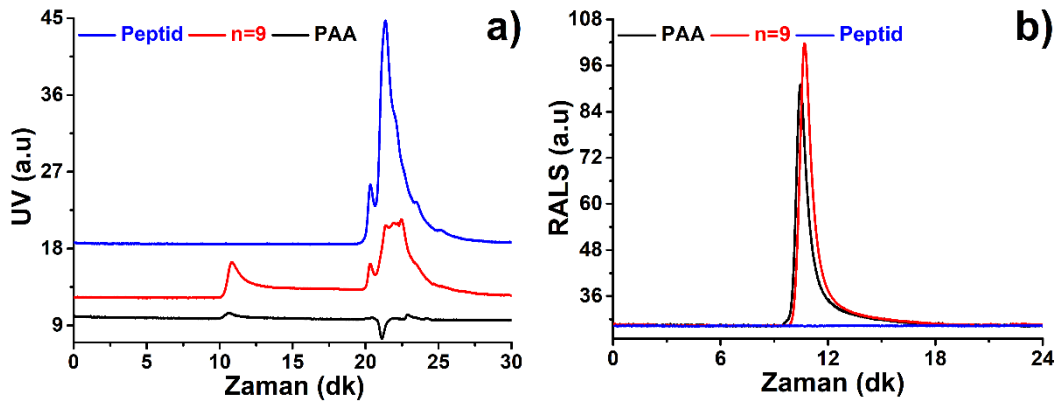
Şekil 4.39  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



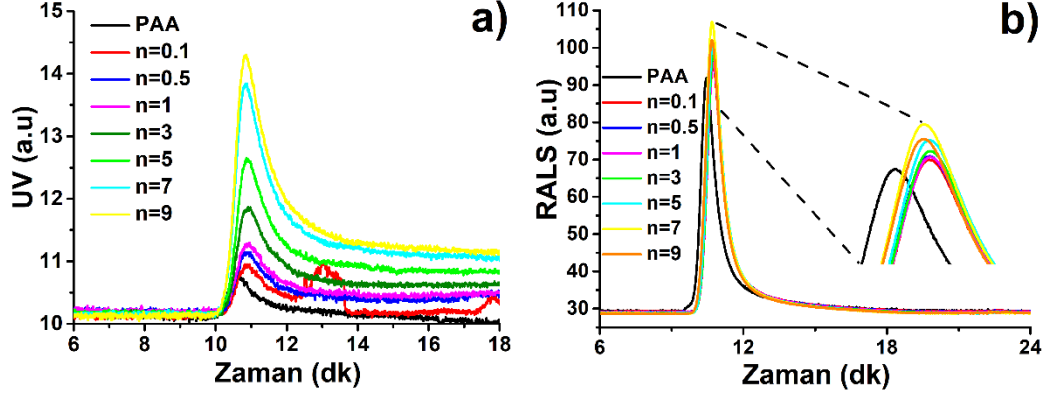
Şekil 4.40  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



Şekil 4.41  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



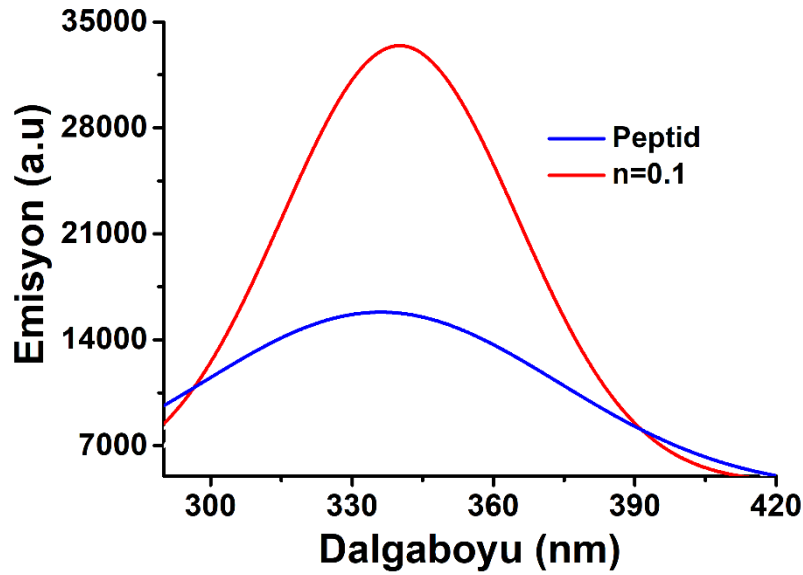
Şekil 4.42  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$  konjugatının peptid ve polimer ile karşılaştırmalı GPC  
a) UV ve b) RALS kromatogramı



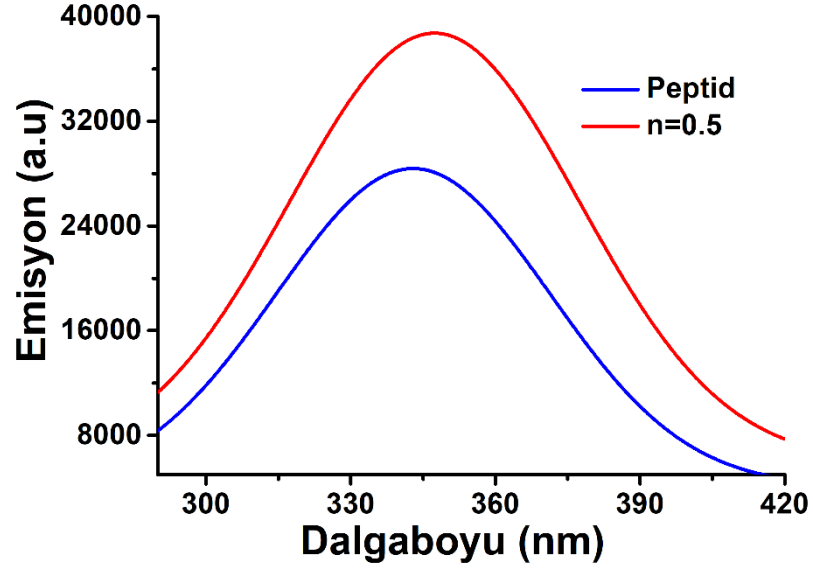
Şekil 4.43  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların polimer ile kıyaslamalı olarak çakışık GPC a) UV ve b) RALS kromatogramları

#### 4.2.3.2 Floresans Spektrofotometre Analizi

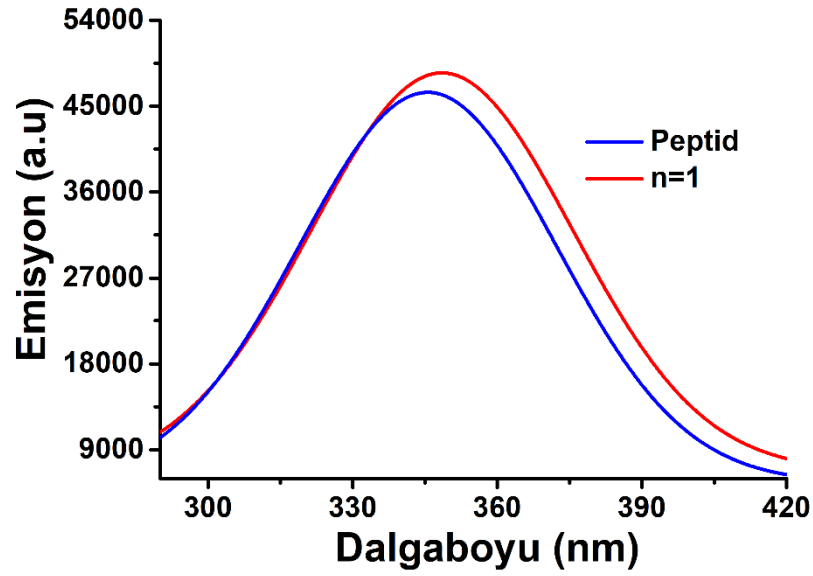
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz) floresans spektrumları, her oranda başlangıçta kullanılan konsantrasyondaki peptid ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.44-4.50'de verilmiştir. Tüm oranlara ait konjugatların floresans spektrumları da karşılaştırılarak Şekil 4.51'de verilmiştir.



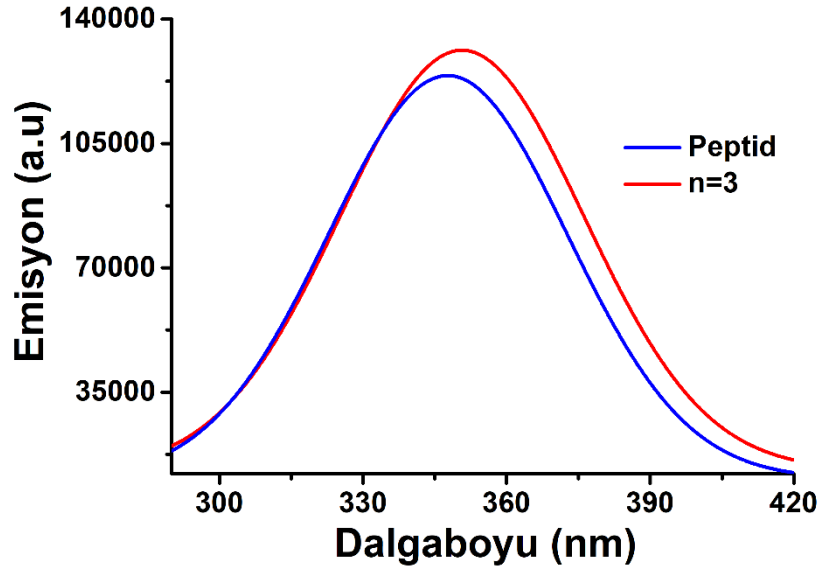
Şekil 4.44  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu



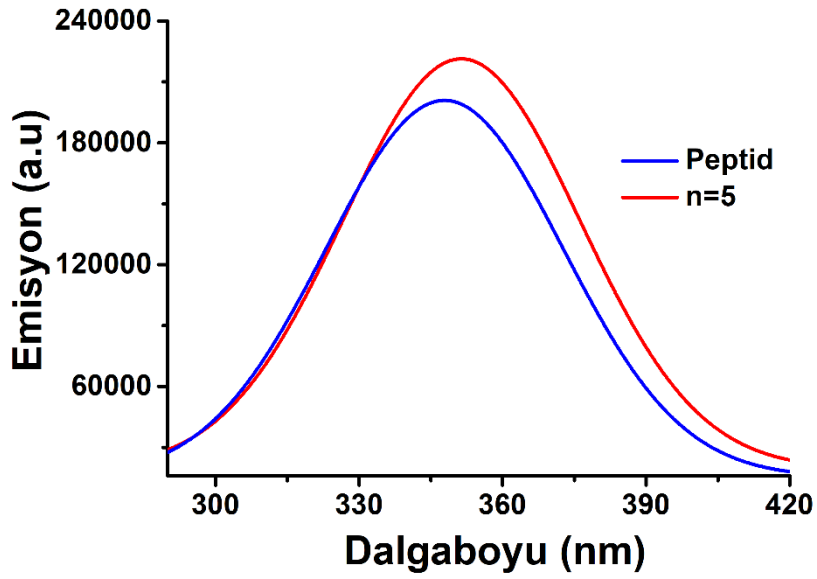
Şekil 4.45  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.5$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu



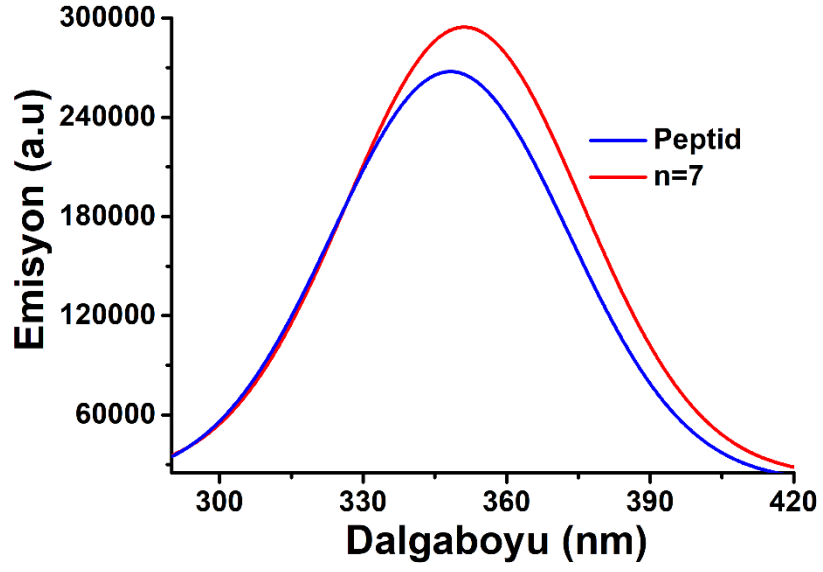
Şekil 4.46  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu



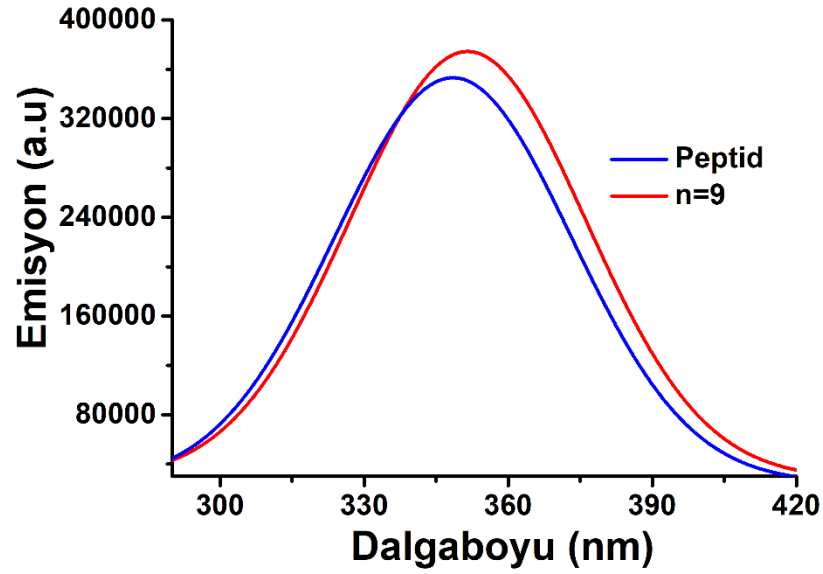
Şekil 4.47  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu



Şekil 4.48  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu

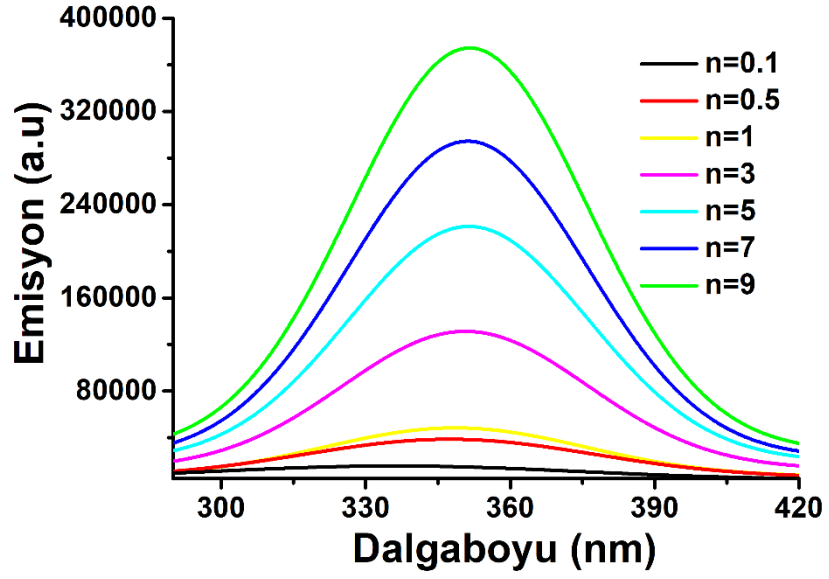


Şekil 4.49  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu



Şekil 4.50  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$  konjugatının serbest peptid ile karşılaştırmalı floresans spektrumu

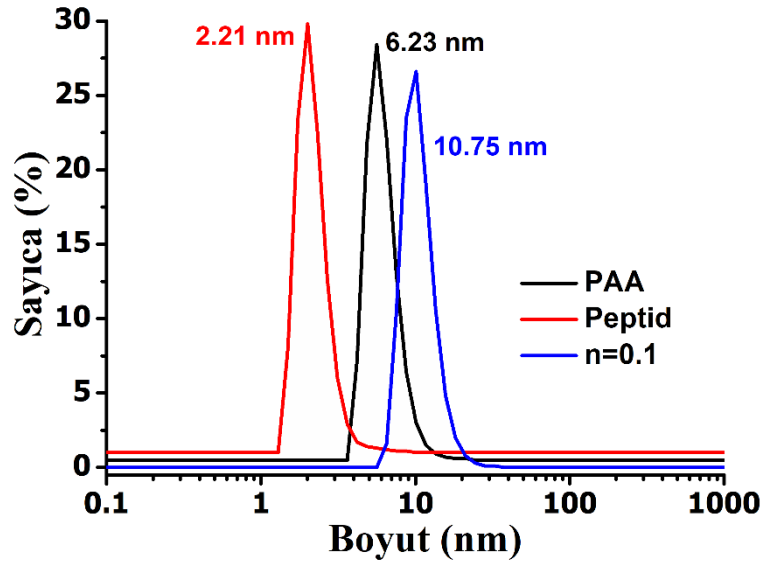




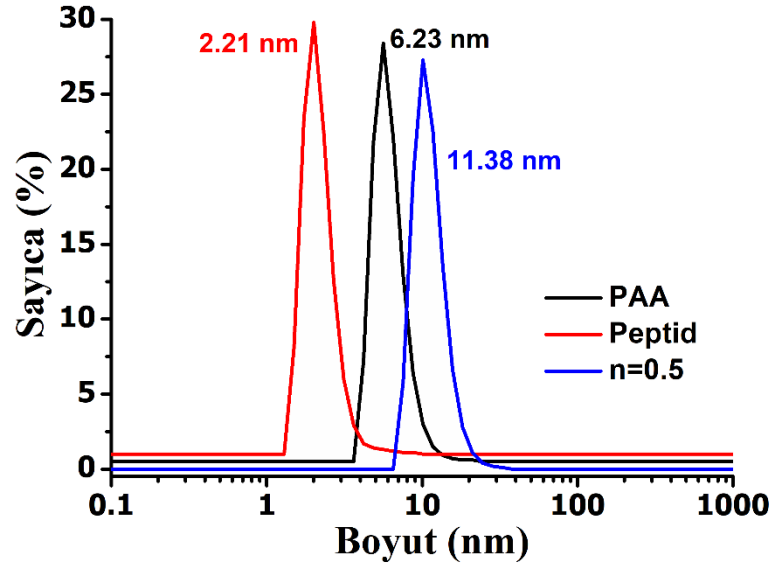
Şekil 4.51  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların floresans spektrumu

#### 4.2.3.3 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi

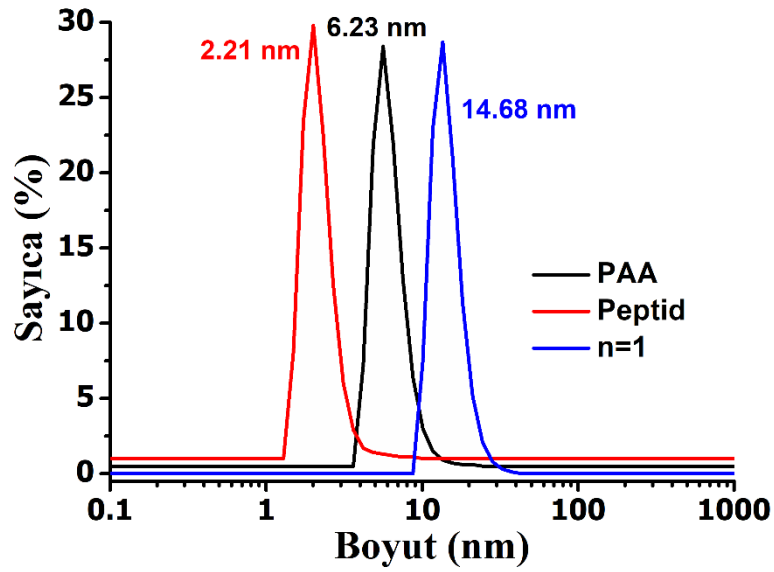
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz) sayıca boyut dağılım grafikleri serbest peptid ve polimer ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.52-4.58'de verilmiştir.



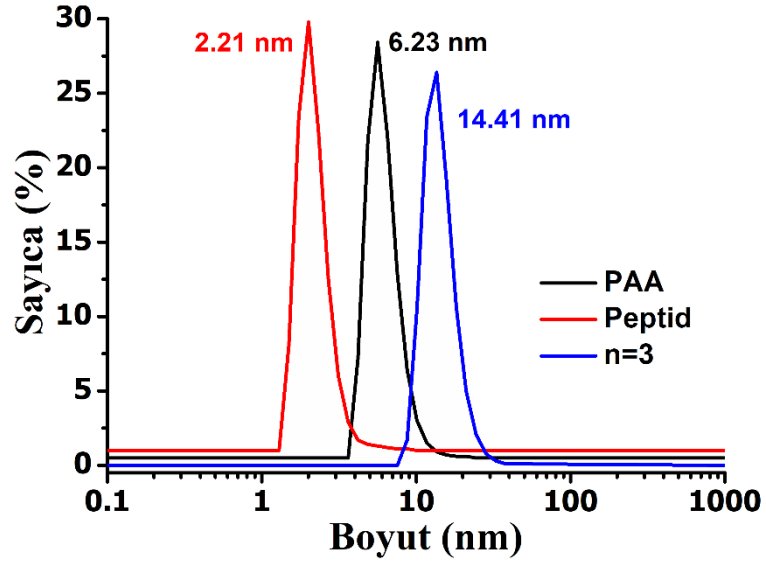
Şekil 4.52  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



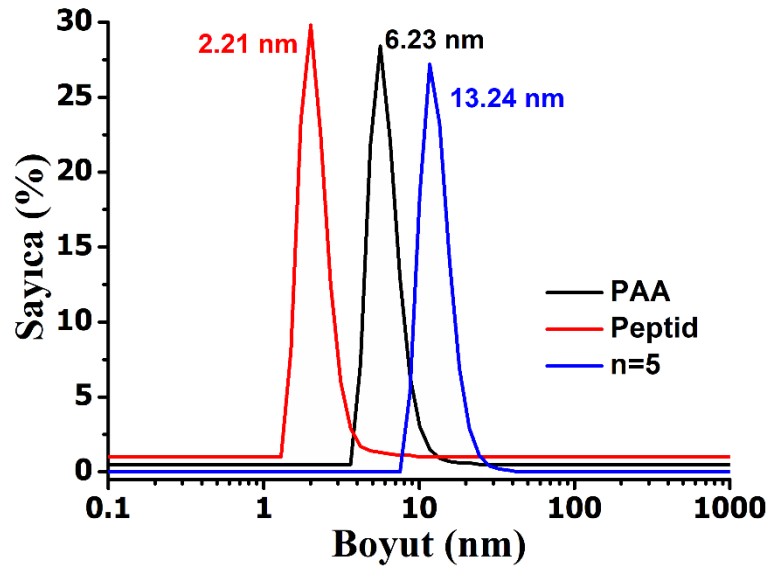
Şekil 4.53  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.5$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



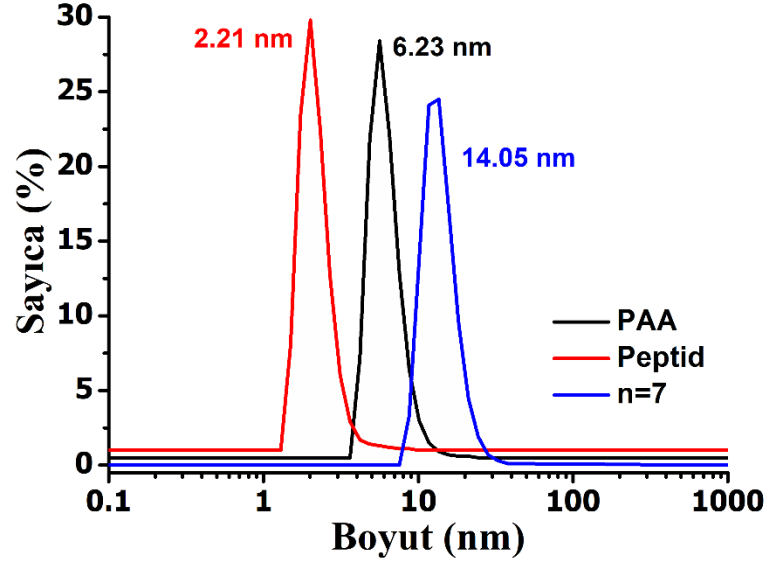
Şekil 4.54  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



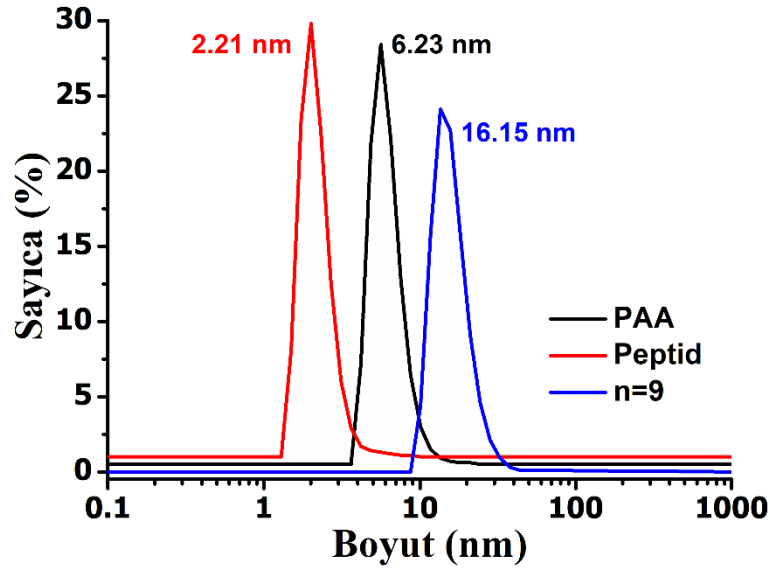
Şekil 4.55  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



Şekil 4.56  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 5$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



Şekil 4.57  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 7$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği



Şekil 4. 58  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$  konjugatının peptid ve polimerle kıyaslamalı sayıca boyut grafiği

### 4.3 PLGA Nanopartiküllerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilen E1-E5 formülasyonlarının dinamik ve elektroforetik ışık saçılması analizleri ile boyut,

zeta potansiyel ve PDI değerleri, gravimetrik analiz ile reaksiyon verimi, LC-MS analizleri ile enkapsülasyon verimi ve peptid yükleme kapasitesi belirlenerek en iyi formülasyon seçilip en iyi formülasyonla üretilen nanopartiküllerin morfolojik özellikleri SEM analizi ile, fonksiyonel grup özellikleri FT-IR ve Raman analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca yine en iyi formülasyon için nanopartiküllerin üretiminde stabilizatör olarak kullanılan ve saflaştırma sonrası nanopartiküllerin yüzeyinde tutulu kalan PVA içeriği bulunmuştur. *In-vitro* salım çalışması yapılarak nanopartiküllerin içerisine yüklenen peptid moleküllerinin salım kinetiği değerlendirilmiştir.

#### 4.3.1 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Analizi

Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması analizi ile peptid yüklü PLGA nanopartiküllerinin (E1-E5) boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri bulunmuştur (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3** Üretilen nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri

Örnek	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel	PDI
E1	270.4 ± 9.6	-15.5 ± 1.5	0.40 ± 0.02
E2	278.2 ± 9.6	-26.7 ± 1.4	0.39 ± 0.01
E3	219.8 ± 3.6	-36.9 ± 2.0	0.27 ± 0.03
E4	232.6 ± 2.4	-16.1 ± 1.2	0.26 ± 0.01
E5	210.2 ± 0.4	-16.8 ± 1.3	0.21 ± 0.01

#### 4.3.2 Reaksiyon Verimi ve Peptid Yükleme Veriminin Belirlenmesi

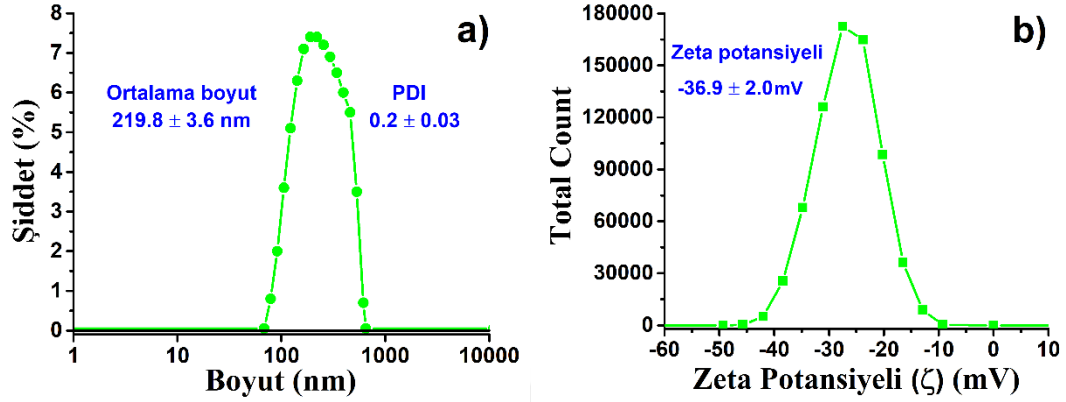
Peptid yüklü PLGA nanopartiküllerinin (E1-E5) reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) Tablo 4.4'de verilmiştir.

**Tablo 4.4** Üretilen nanopartiküllerin reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL)

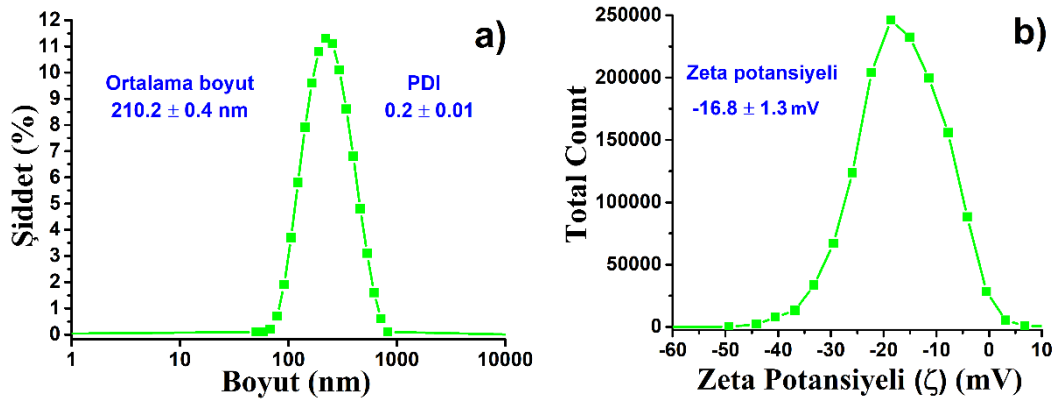
Örnek	RY (%)	EE (%)	DL (%)
E1	54.3	80.5	7.1
E2	61.8	91.0	13.4
E3	45.5	80.5	16.1
E4	36.9	90.5	56.6
E5	34.0	-	-

Tablo 4.3 ve 4.4'deki veriler değerlendirildiğinde peptid miktarının artmasıyla birlikte beklendiği gibi ilaç yükleme kapasitesinin arttığı görülmüştür. E1 ve E2 formülasyonu diğerlerine göre boyut olarak daha büyük bulunmuştur. Bu formülasyonlarda enkapsüle edilecek peptidi çözerken saf su kullanılması ve buna bağlı olarak da peptid çözeltisinde pH değişimiyle çökmenin meydana gelmesi boyut değerlerini arttırmıştır. Peptid miktarındaki artışla birlikte E4 formülasyonunda zeta potansiyelinin sıfıra yaklaştığı belirlenmiştir. Buradan çıkarılan sonuç ise saflaştırma aşamasında yıkama işlemi ile nanopartiküllerin yüzeyinden uzaklaştırılmayan peptid moleküllerinin varlığıdır. E3 ve E4 için PDI değerleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. En yüksek DL'e sahip E4 formülasyonuna kıyasla E3 formülasyonu gerek boyut gerekse de zeta potansiyel değerleri açısından daha uygun bulunmuştur. Boş nanopartikül olan E5 formülasyonu da E3 formülasyonuna uygun olarak (benzer boyut, zeta potansiyel

ve PDI değerleri) ayrıntılı analizlerde ve hücre çalışmalarında kullanmak amacıyla üretilmiştir. E3 ve E5 formülasyonunun boyut ve zeta potansiyel grafikleri Şekil 4.59 ve 4.60'da verilmiştir. SEM, Raman vb. ayrıntılı analizler sadece E3 formülasyonu için gerçekleştirilmiştir.



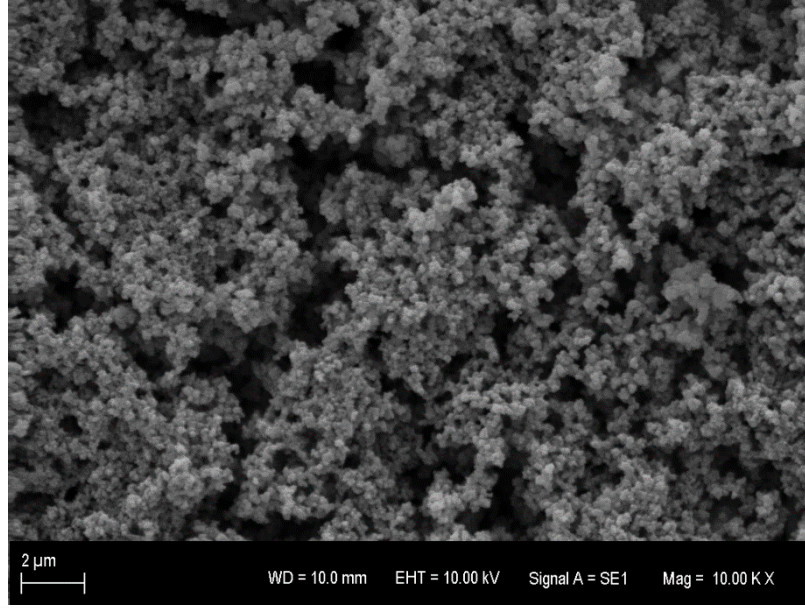
Şekil 4.59 E3 nanopartiküllerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği



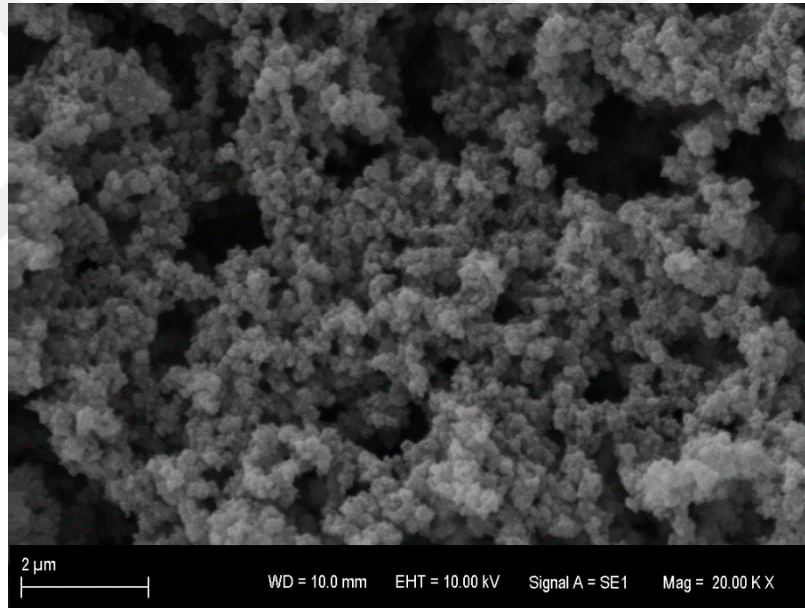
Şekil 4.60 E5 nanopartiküllerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

### 4.3.3 SEM Analizi

E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüleri Şekil 4.61-4.64'de sunulmuştur. Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri incelenmiştir.

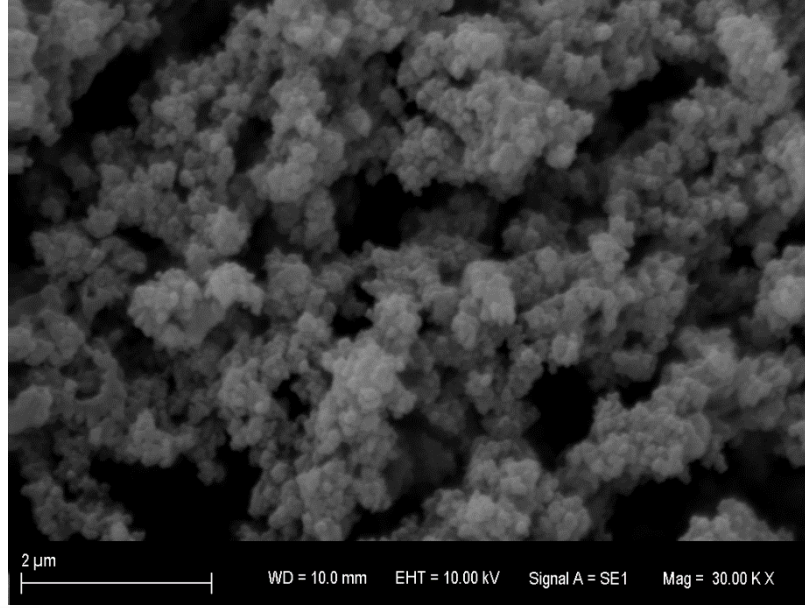


**Şekil 4.61** E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (10.000 büyütme)

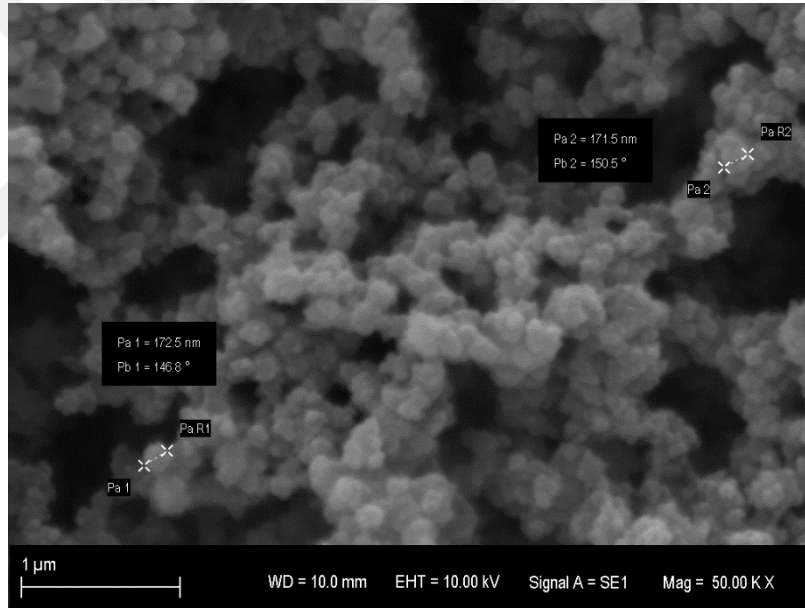


**Şekil 4.62** E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000 büyütme)





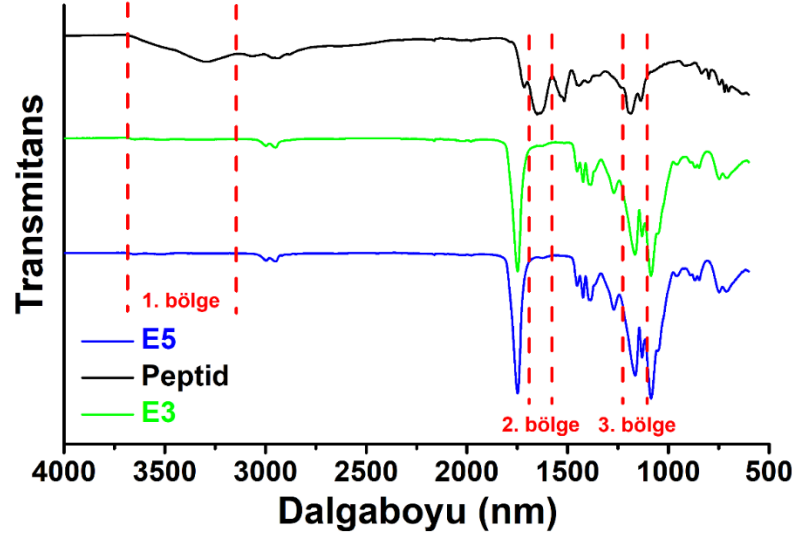
Şekil 4.63 E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (30.000 büyütme)



Şekil 4.64 E3 nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (50.000 büyütme)

#### 4.3.4 FT-IR Analizi

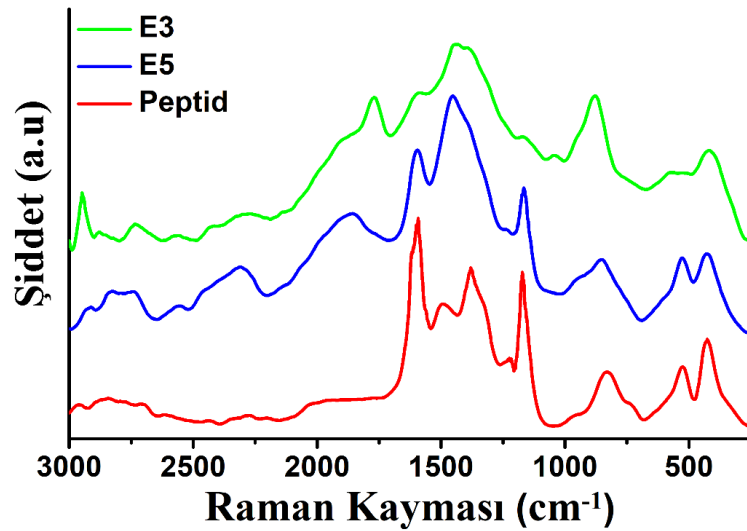
Nanopartiküllerin fonksiyonel grup özelliklerini belirlemek amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı FT-IR spektrumu Şekil 4.65'de verilmiştir.



Şekil 4.65 E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

#### 4.3.5 Raman Analizi

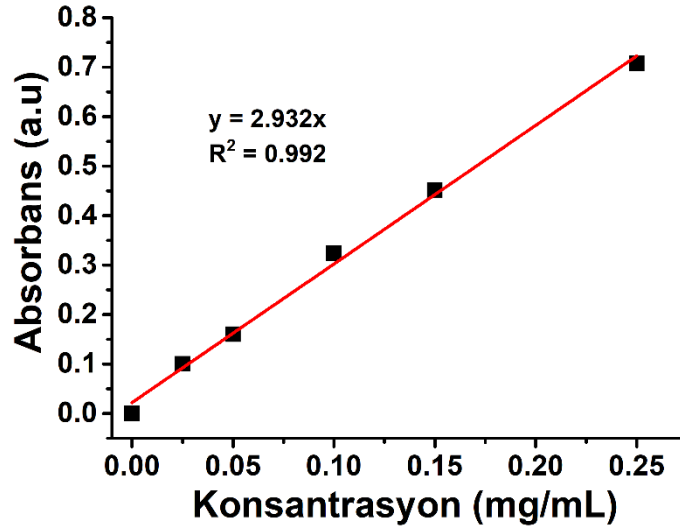
Nanopartiküllerin fonksiyonel grup özelliklerini belirlemek amacıyla FT-IR analizine ek olarak Raman analizi yapılmıştır. E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı Raman spektrumu Şekil 4.66'da verilmiştir.



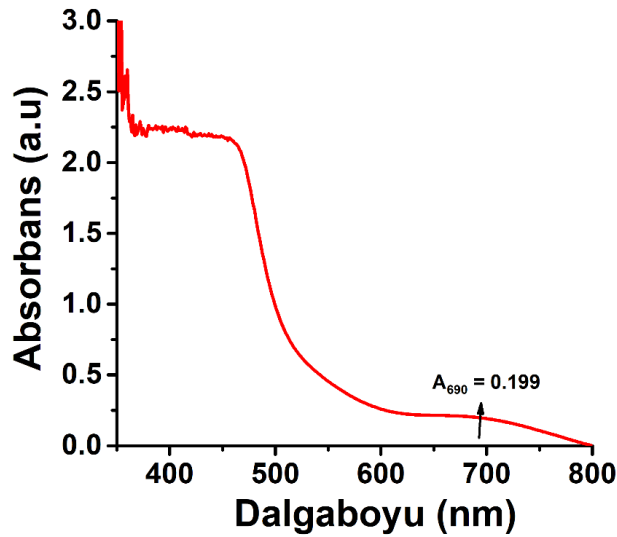
Şekil 4.66 E3 nanopartiküllerinin serbest peptid ve boş nanopartiküller (E5) ile karşılaştırmalı raman spektrumu

#### 4.3.6 PVA İçeriğinin Belirlenmesi

E3 nanopartiküllerinin PVA içeriği, kolorimetrik yöntem kullanılarak ve Şekil 4.67' de verilen PVA'ya ait UV-VIS kalibrasyon eğrisi yardımıyla belirlenmiştir. Kolorimetrik yöntem uygulandıktan sonra nanopartiküllerin Şekil 4.68'de verilen UV-VIS spektrumunda 690 nm'deki absorbans okunarak PVA içeriği  $4.29 \pm 0.02\%$  bulunmuştur.



Şekil 4.67 PVA'ya ait UV-VIS kalibrasyon eğrisi

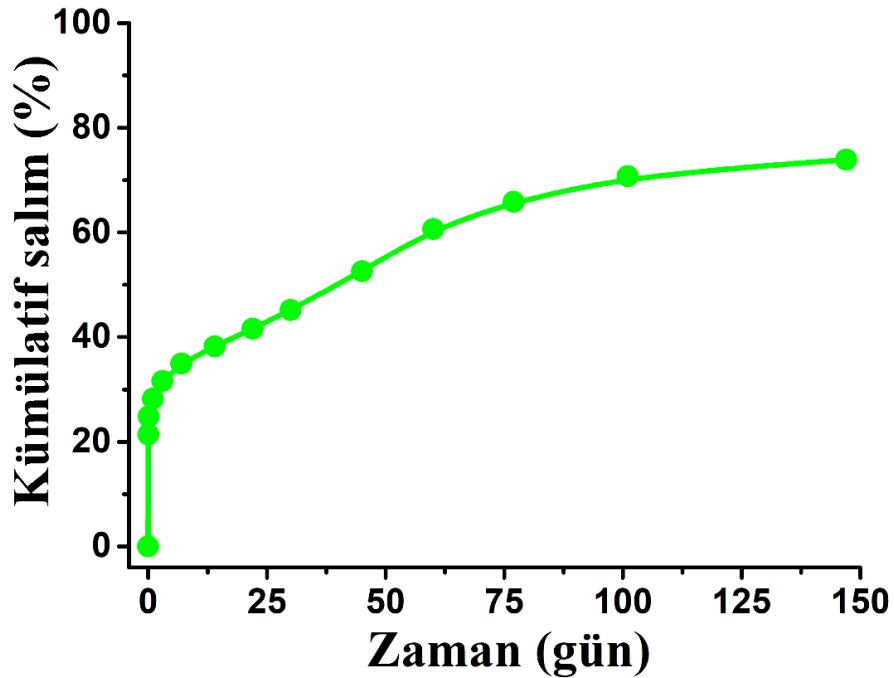


Şekil 4.68 Kolorimetrik yöntem uygulandıktan sonra E3 nanopartiküllerinin UV-VIS spektrumu

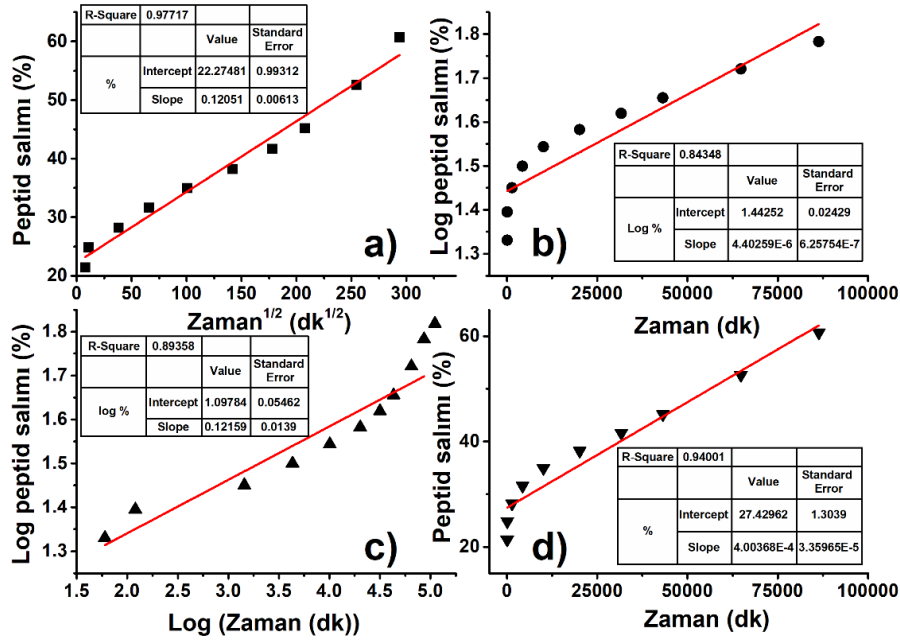
#### 4.3.7 *In-vitro* Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirmesi

Üretilen nanoparçacıklardan peptidin salım profilinin belirlenmesi için salım ortamından 150 gün boyunca belirli zaman aralıklarında (1., 2., 3. ve 4. saat; 1., 7., 15., 25., 30., 50., 60., 75., 100. ve 150. gün) numune alınıp salınan peptid miktarı kümülatif olarak belirlenmiştir. Şekil 4.69'da verilen salım grafiği elde edilmiştir.

Aynı zamanda, peptidin nanosistemden salımını incelemek amacıyla dört farklı kinetik model kullanılmıştır. Zero-order, first-order, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine ait grafikler Şekil 4.70'de verilmiştir.



Şekil 4.69 E3 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerden peptidin *in-vitro* salım profili



**Şekil 4.70** E3 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerden peptidin salım kinetiği a) Higuchi, b) First-order, c) Korsmeyer-Peppas, d) Zero-order kinetik modeli

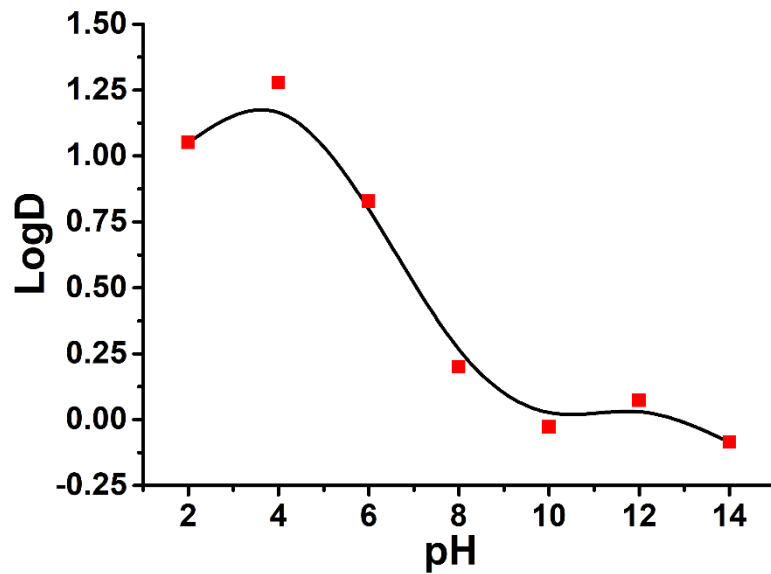
Tez çalışması kapsamında peptidin sabit polimerin değişken olduğu 9 oranda ( $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$ ) ve peptidin değişken polimerin sabit olduğu 7 oranda ( $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ ) konjugatlar EDC kimyası kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen tüm konjugatlar GPC, floresans spektrofotometre ve Zetasizer ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre polimer başına peptid oranı, konjugatların boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri ve agregasyon durumları göz önünde bulundurulduğunda  $n = 9$  konjugatı en optimum oran seçilmiştir ve lipofilisite çalışması ve hücre deneyleri bu konjugat oranıyla yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında farklı miktarlarda peptid kullanılarak 5 farklı formülasyonda (E1-E5) PLGA nanopartikülleri üretilmiştir. E3 formülasyonu gerek boyut ve zeta potansiyel değerleri gerekse de ilaç yükleme kapasitesi açısından daha optimum bulunmuştur ve lipofilisite çalışması ve hücre deneyleri bu nanoformülasyonla yapılmıştır.

#### 4.4 Partisyon Katsayısının (lipofilisite değeri, LogD) Belirlenmesi

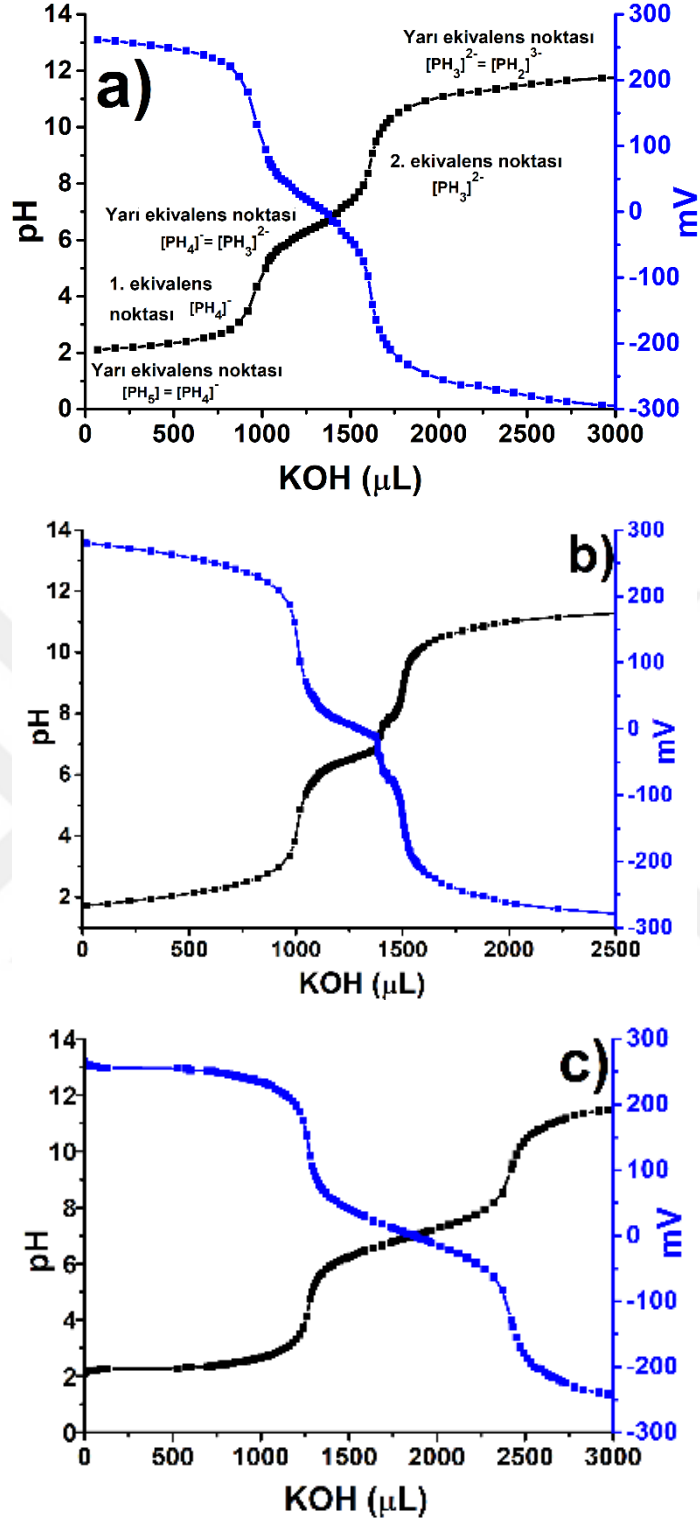
Tek başına peptid (W-EBOVP),  $n = 9$  konjugatı ve E3 nanoformülasyonunun lipofilisitesini belirlemek amacıyla çalkalama şişesi yöntemi ve potansiyometrik yöntem kullanılmıştır.

$n = 9$  konjugatının lipofilikliğı, önceden doyurulmuş n-oktanol/PBS fazı karışımı içinde n-oktanole olan affiniteye dayanan konsantrasyonlardaki değışimler oranlanarak hesaplanmıştır. Konjugatın pH'a bağılı LogD değışim grafiğı Şekil 4.71'de verilmiştir.

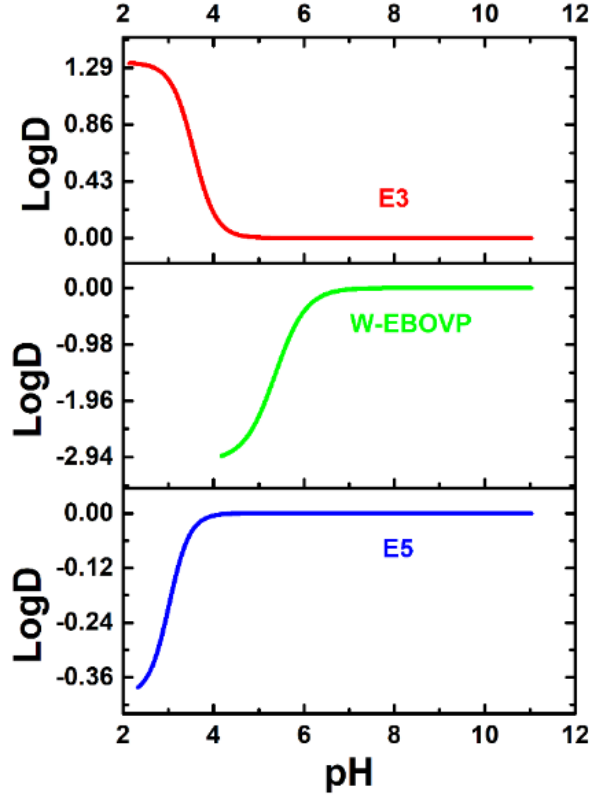


Şekil 4.71  $n = 9$  konjugatının pH-LogD değışim grafiğı

W-EBOVP peptidinin ve W-EBOVP peptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin (E3) lipofilikliğı ise, potansiyometrik yöntem ile pH 2-12 aralığında hesaplanmıştır. W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait pH değerlerine karşı potansiyel değerlerini gösteren grafik Şekil 4.72'de gösterilmiştir. Potansiyel değerlerinden elde edilen LogD değerlerinin pH'a karşı değışimi de Şekil 4.73'de verilmiştir. Ayrıca, W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait hesaplanan lipofilisite değerleri Tablo 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.72 a) W-EBOVP peptidine, b) peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve c) boş nanopartiküllere (E5) ait pH değerlerine karşı potansiyel değerlerindeki değişim grafiği



Şekil 4.73 W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait pH-LogD değişim grafiği

Tablo 4.5 W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait hesaplanan LogD değerleri

Peptid Formları	pH	LogD Değeri
<b>W-EBOVP peptidi</b>		
$[\text{PH}_5], [\text{PH}_4]^-$	2.42	-1.08158
$[\text{PH}_4]^-$	4.18	-3.00666
$[\text{PH}_4]^- , [\text{PH}_3]^{2-}$	6.54	-2.14887E-5
$[\text{PH}_3]^{2-}$	8.60	-1.5926E-7
$[\text{PH}_3]^{2-}, [\text{PH}_2]^{3-}$	11.03	-4.6387E-10



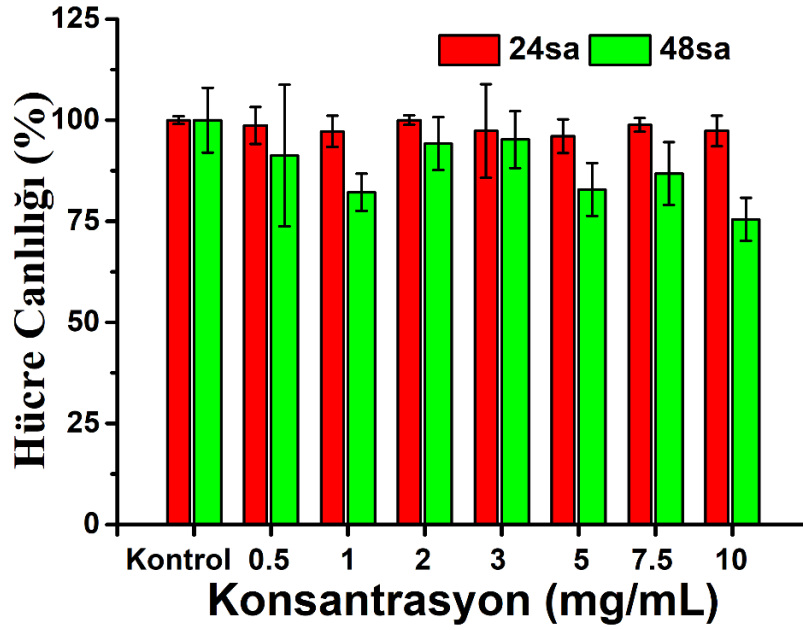
**Tablo 4.6** W-EBOVP peptidine, peptid yüklü nanopartiküllere (E3) ve boş nanopartiküllere (E5) ait hesaplanan LogD değerleri (Devamı)

E5		
	2.33	-0.38168
	4.14	-0.00281
	7.19	-8.51888E-7
	8.52	-6.84564E-8
	11.03	-1.92331E-10
E3		
	2.14	1.32558
	3.81	0.35264
	6.49	-1.89587E-5
	8.46	-1.7388E-7
	11.03	-3.60137E-10

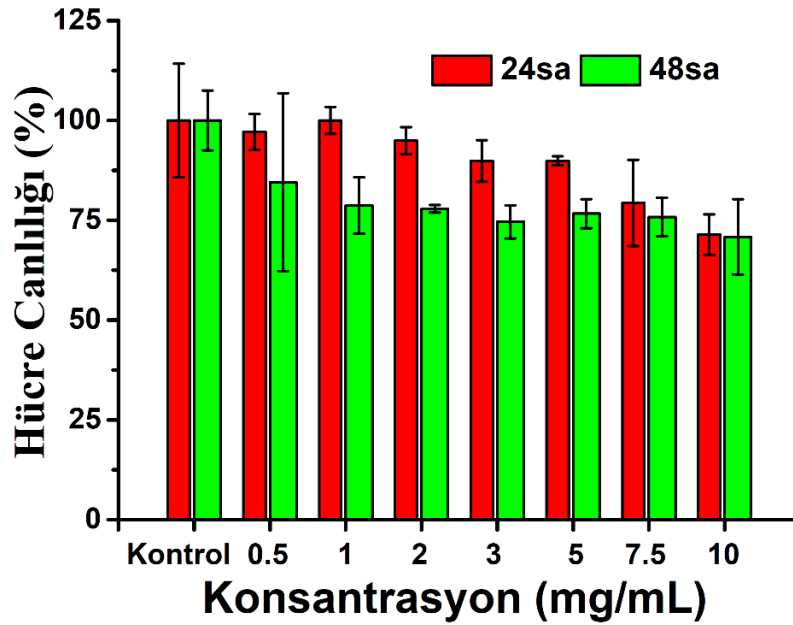
#### 4.5 *In-vitro* Sitotoksosite Analizleri

Tek başına peptid, n = 9 konjugatı ve E3 nanoformülasyonunun sitotoksik etkilerini incelemek üzere L929 fare fibroblast hücre hattında MTT yöntemiyle çalışılmıştır. Her kuyucukta ortalama 5000 hücre olacak şekilde hücre ekimleri yapılmıştır. Örnekler 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanıp seyreltme işlemleri ile hücrelere 3.8 başlığı altındaki adımlar uygulandıktan sonra 24. ve 48. saat ölçümleri alınarak malzemelerin sitotoksitesisi değerlendirilmiştir. Hücrelere uygulanan malzemelerin 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL; 0.4 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL olmak üzere 8 farklı konsantrasyonunda çalışılmıştır. Her bir kuyucuğa 10 µL malzeme ekilmiştir. Tek

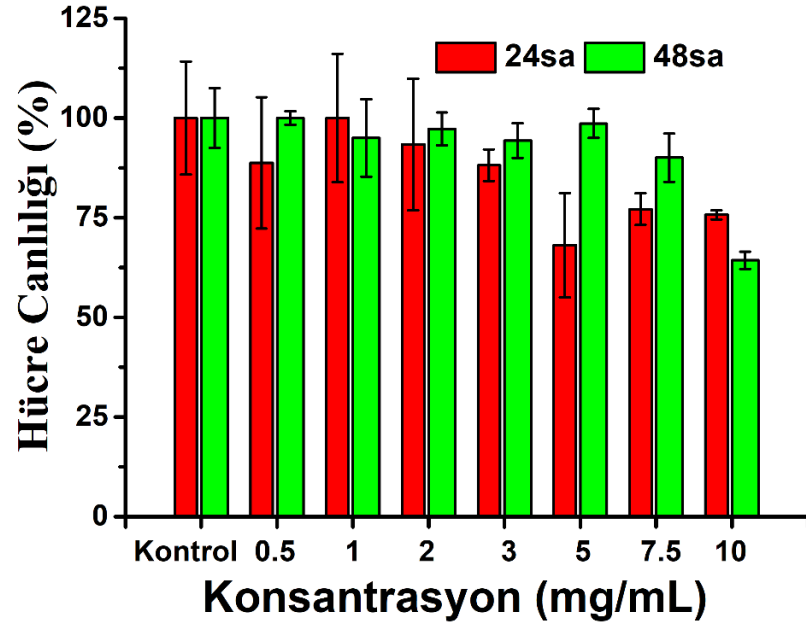
başına peptide, n = 9 konjugatına ve E3 formülasyonuna ait 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları Şekil 4.74-4.76'da verilmiştir.



Şekil 4.74 W-EBOVP peptidinin fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği



Şekil 4.75 n = 9 konjugatının fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği



Şekil 4.76 E3 nanopartiküllerinin fare fibroblast hücreleri (L929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı grafiği

Bu tez çalışması kapsamında Ebola virüsü nükleoproteininin 421-430 nolu antijenik peptid dizisinin sentezi, karakterizasyonu ve saflaştırılması; peptidin PAA ile farklı oranlarda (polimer miktarı artan 9 oranda:  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$ ; peptid miktarı artan 7 oranda:  $n_{Peptid}/n_{PAA} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ ) konjugasyonu, karakterizasyonu ve saflaştırılması; peptidin PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu ve bu nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konjugatların karakterizasyonu sonucunda  $n = 9$  formülasyonu optimum konjugat seçilmiştir. Benzer şekilde karakterizasyonlar sonucunda nanoformülasyonlar içerisinde E3 nanopartikülleri en uygun formülasyon olarak belirlenmiştir. Lipofilite çalışmaları ve hücre kültürü deneyleri  $n = 9$  konjugatı ve E3 nanopartikülleri için gerçekleştirilmiştir.

## 5.1 Peptid Dizisinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Saflaştırılmasına

### Ait Tartışma

Ebola virüs nükleoproteinine ait 421-430 peptid dizisinin (W-EBOVP) sentezi mikrodalga destekli katı fazda peptid sentezi sistemiyle gerçekleştirilmiştir. LC-ESI-MS analizlerine göre %80 saflıkta (Şekil 4.1) 250 mg ham peptid sentezlenmiştir. Ham peptidin molekül ağırlığı LC-ESI-MS ile doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Preparatif HPLC sistemi ile saflaştırma işlemi sonrası %97 saflıkta 120 mg liyofilize peptid elde edilmiştir. Sentezlenen peptid için LC yöntemi valide edilmiş ve Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Saf peptidin molekül ağırlığı LC-ESI-MS (Şekil 4.11) ve Q-TOF-MS (Şekil 4.12) ile, fonksiyonel grupları da FT-IR analizi (Şekil 4.13) ile doğrulanmıştır.

## 5.2 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Saflaştırılmasına Ait Tartışma

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen W-EBOVP peptidi ile PAA-peptid konjugatlarının sentezi için üç farklı yöntem ile çalışılmıştır. Sentezlenen konjugatların GPC analiz sonuçlarına göre 2. yöntem en uygun bulunmuş ve peptid artan polimer sabit ( $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ ), peptid sabit polimer artan ( $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$ ) oranlarda konjugatlar bu metod ile sentezlemiştir.

### 5.2.1 $n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$ ve $0.1668$ oranlarındaki konjugatların sentezi, karakterizasyonu ve saflaştırılmasına ait tartışma

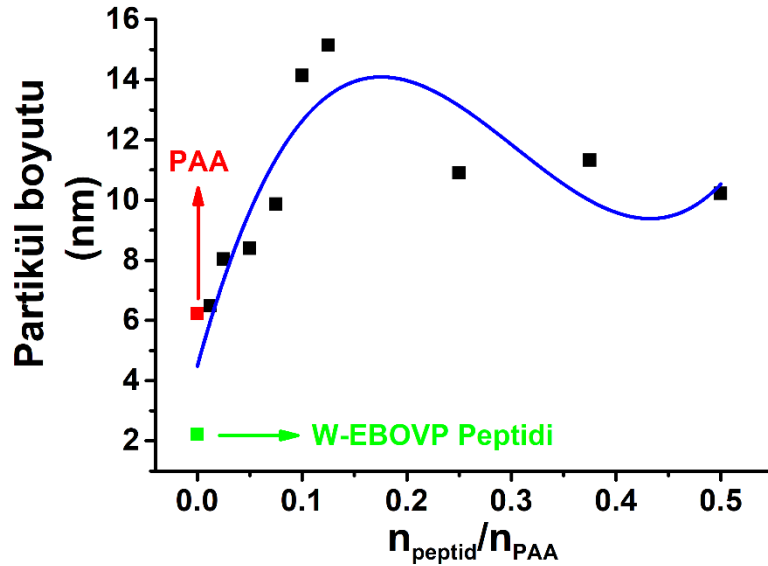
$n_{\text{PAA}}/n_{\text{Peptid}} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatlar GPC, floresans spektrometre ve zetasizer ile analiz edilmiştir.

GPC analizlerine göre konjugasyon oranının artışıyla daha fazla miktarda peptid reaksiyona girerek polimere bağlanmış ve her oran için 11. dakika civarındaki pik şiddetleri artış göstermiştir. Kromatogramlarda 23. dakika civarındaki serbest peptide ait bölgede saflaştırma sonrası belirgin bir azalma olmuş ancak bir miktar serbest peptid ( $\%10 <$ ) safsızlık olarak konjugatta kalmıştır. Şekil 4.25'de verilen toplu kromatogram da polimer miktarı arttıkça pik şiddetinin arttığını kanıtlamıştır [126, 127].

Floresans spektrometre analizlerine göre hem dalga boyunda hem de floresans şiddetindeki değişim kimyasal reaksiyonu kanıtlamıştır. Peptidler, içerdikleri triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitleri sayesinde floresans özelliğine sahiptir [120]. Bu çalışmada kullanılan W-EBOVP peptid sekansı, yapısında bir triptofan, bir fenilalanin ve bir tirozin amino asit içerir. W-EBOVP peptidinin tek başına yüksek derecede floresans özelliği göstermesinin nedeni budur. Peptidin polimere konjugasyonu, genellikle floresans yoğunluğunda bir azalmaya ve/veya peptidin maksimum emisyon dalga boyunda bir kaymaya neden olur [120, 145,

146]. Polimer moleküllerinin peptid moleküllerini çevrelemesine izin veren peptid-polimer konjugasyonu sonucunda serbest peptid ile karşılaştırıldığında tüm konjugasyon oranlarında floresans yoğunluğunda önemli bir azalma gözlenmiştir. Elde edilen tüm konjugatların floresans spektrumları birbirleriyle karşılaştırılırsa, konjugasyon oranları arttıkça floresans yoğunluğunun arttığı ve böylece polimer ile reaksiyona giren ve bağlanan peptid miktarının arttığı iddia edilebilir.

2.207 nm boyuta sahip olan peptidin 6.23 nm boyuttaki PAA ile biyokonjugasyonu sonucunda oluşan biyokonjugatların boyutlarının değişimini gösteren grafik Şekil 5.1'de verilmiştir.  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların zetasizer analizlerine göre tek başına peptid ve polimere kıyasla konjugatların boyutlarında belli bir orana kadar artış olmuş, daha sonrasında konjugasyon oranının artmasıyla partikül boyutu serbest peptid ve polimere göre artmasına rağmen  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834$  ve  $0.1001$  konjugatlarına göre düşüş göstermiştir [147, 148].



Şekil 5.1  $n_{PAA}/n_{Peptid} = 0.0125, 0.0250, 0.0334, 0.0500, 0.0667, 0.0834, 0.1001, 0.1334$  ve  $0.1668$  oranlarındaki konjugatların serbest peptide ve polimere kıyasla partikül boyutu değerlerinin karşılaştırılması

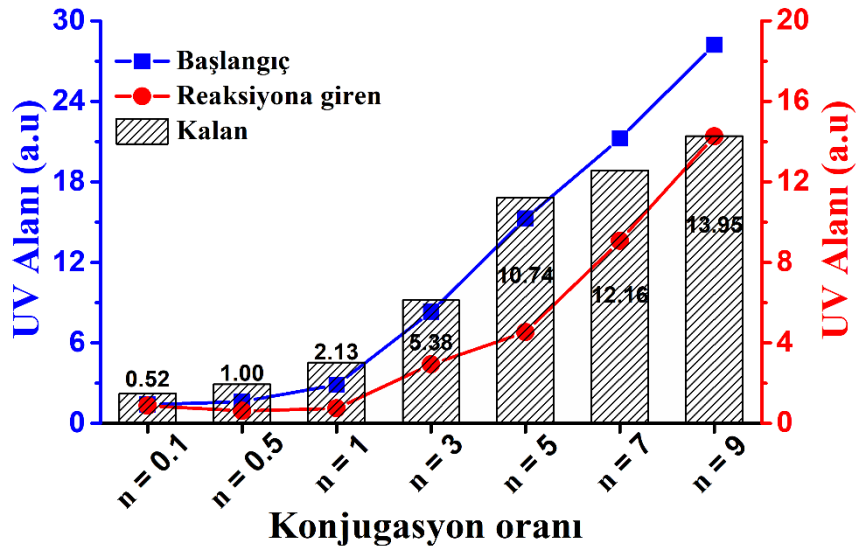
## 5.2.2 $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ oranlarındaki konjugatların sentezi, karakterizasyonu ve saflaştırılmasına ait tartışma

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların GPC-UV ve GPC-RALS analiz sonuçları PAA, W-EBOVP peptidi ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.36-4.43'te verilmiştir. PAA'nın düşük UV absorpsiyon özelliği nedeniyle, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda 11. dakikada gözlemlenen zayıf bir tepe noktası vardır (grafiklerde siyah çizgi ile ifade edilen). Ticari olarak temin edilebilen PAA polimerinin yüksek polidispersitesi nedeniyle PAA kromatogramlarında bir kuyruk olduğunu da belirtmek önemlidir. W-EBOVP peptidi triptofan ve tirozin amino asitleri içerdiğinden, peptid UV ışığını absorblamış ve bu, peptidin UV kromatogramlarında keskin bir tepe noktası sağlamıştır. Serbest peptidin kromatogramları incelendiğinde (grafiklerde mavi çizgi ile ifade edilen), peptidin kolon sisteminden (23. dakikada), polimerden (11. dakikada) daha sonra ayrıldığı görülmüştür. Şekil 4.36a-4.42a'da verilen  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  konjugat oranlarının UV kromatogramları incelendiğinde, 10. dakikada pik alanlarında önemli bir artış tespit edilmiştir (grafiklerde kırmızı çizgi ile ifade edilen). Ayrıca, PAA düşük UV emilimine sahip olduğundan, konjugatların UV pik alanlarındaki artış, sadece konjugasyon reaksiyonlarının bir sonucu olarak PAA yapısına eklenen peptid molekülleri ile açıklanabilmiştir. Bu sonuçlar, ortamda reaksiyona girmemiş peptid olmasına rağmen konjugasyon reaksiyonlarının meydana geldiğini kanıtlamıştır [144]. Dahası, peptid konsantrasyonu  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranında arttıkça konjugasyona katılan peptid miktarındaki artış, Şekil 4.43a' da verilen grafikten anlaşılmıştır. Daha yüksek konjugasyon oranları ( $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} > 9$ ) incelendiğinde ve bu nedenle daha fazla peptid reaksiyona girdiğinde, peptid molekülleri arasındaki etkileşimlerle (peptid-peptid etkileşimleri) suda çözünmeyen kompleks ve/veya konjugatların oluştuğu deneyimlenmiştir. Bu şekilde suda az çözünen veya çözünmeyen moleküller kromatografik olarak analiz edilemediğinden, yüksek reaksiyon oranlarına ilişkin veriler tez kapsamı dışında tutulmuştur.

RALS, moleküler ağırlığa cevap verdiği için, polimerin UV kromatogramından farklı olarak RALS kromatogramlarında (Şekil 4.36b-4.42b) PAA için 11. dakikada

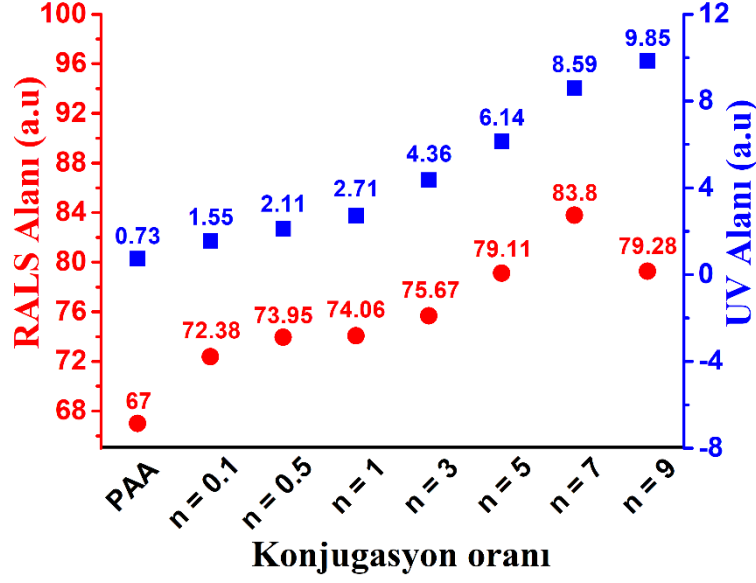
belirgin bir pik görülmüştür.  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  konjugatlarının RALS kromatogramlarından, konjugatların, serbest PAA ile aynı alıkonma süresinde pik verdiği ve bu pik alanlarının  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$  oranının artışı ile orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Konjugatların piklerinin PAA gibi polidispers bir yapıya sahip olduğuna dikkat etmek de önemlidir. Peptidler küçük moleküller olduğundan ve ışık saçılma özellikleri çok düşük olduğundan, GPC RALS kromatogramlarında konjugat piklerinden başka bir pik görülmemiştir.

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  konjugatları için başlangıçta kullanılan peptidin ve reaksiyona girmemiş peptidin GPC UV pik alanları hesaplanmış ve her bir oran için reaksiyona giren W-EBOVP peptidinin yüzdesi belirlenmiştir (Şekil 5.2).  $n = 9$  oranında reaksiyon verimi, en yüksek değere ulaşmış ve verimi %50.5 olarak hesaplanmıştır. Şekil 5.3'de verilen pik alanları grafiği incelendiğinde,  $n = 9$  oranı GPC RALS alanı haricinde konjugatların hem UV hem de RALS alanlarının konjugasyon oranındaki artışla arttığı tespit edilmiştir.



**Şekil 5.2** Başlangıçta kullanılan, reaksiyona giren ve konjugasyon sonrası reaksiyona girmeden kalan W-EBOVP peptidinin GPC UV 23. dk pik alanları

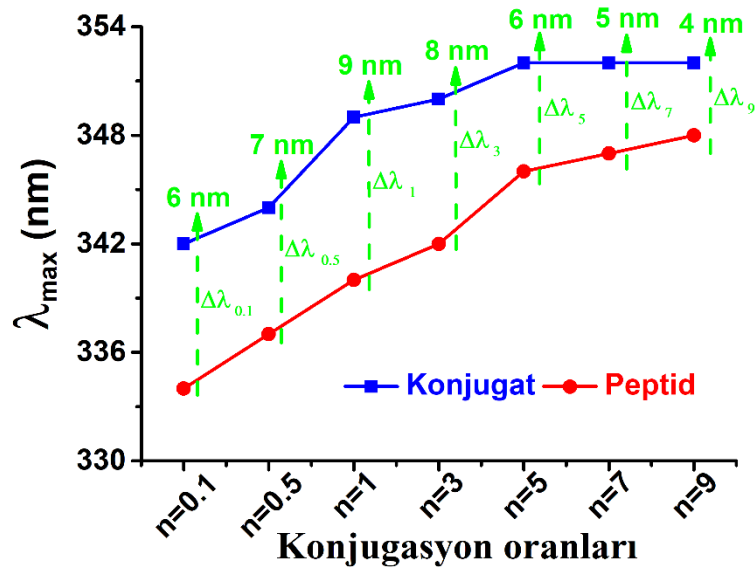




**Şekil 5.3**  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  konjugatlarının GPC RALS ve GPC UV 11. dk pik alanları

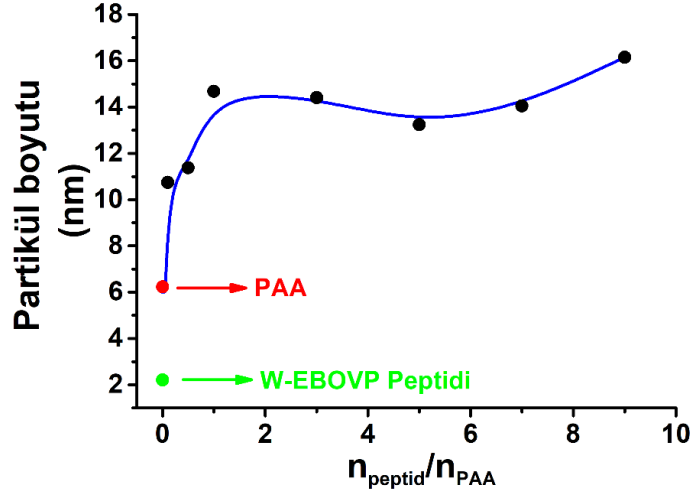
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların floresans spektrometre analizleri incelendiğinde konjugasyon oranının artmasıyla daha fazla miktarda peptid konjugasyona katıldığından elde edilen konjugatların floresans şiddeti arttırmıştır. Şekil 5.4'de, konjugatların maksimum emisyon yaydığı dalga boylarındaki kaymalar, serbest peptidinki ile karşılaştırılarak sunulmuştur. Tüm oranlarda meydana gelen ve 4 nm ile 9 nm arasında değişen maksimum emisyon dalga boyundaki kırmızı kayma, konjugasyon reaksiyonlarının başarıyla oluştuğunun başka bir kanıtıdır. Detaylandırılırsa, maksimum emisyon dalga boyu, artan peptid konsantrasyonlarında artmıştır. Bu, dalga boyundaki artışın bir sonucu olarak enerjideki azalma ile peptid moleküllerinin daha düşük bir enerji formuna ve çözelti içinde daha kararlı bir yapıya girdiğini kanıtlamıştır. Benzer şekilde, her bir konjugatın maksimum emisyon dalga boyu, peptidine kıyasla kırmızıya kaymıştır. Başka bir deyişle, daha düşük enerji formları ve daha kararlı yapılar oluşmuştur. Bu bize konjugasyon reaksiyonlarından sonra peptidin polimere başarılı bir şekilde bağlandığını ve daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. Ghisaidoobe ve arkadaşlarının kapsamlı çalışması ile desteklenen floresans sonuçlarımızda, konjugatların maksimum

emiyon dalga boylarındaki kırmızı kaymanın, peptid sekansındaki triptofan kalıntısının mikroçevresel değişimiyle sağlanabileceği gsterilmiştir [149]. Triptofanın floresans özelliği, amino asidin yapısal heterojenliği nedeniyle bulunduğu mikroçevrenin polaritesinden güçlü bir şekilde etkilenir. Polar bir mikro ortamda, yüksek enerji seviyesine indüklenen triptofanın dipol momenti, hidrojen bağına karşı çok yüksek hassasiyet gösterir ve daha düşük enerjiye geçişle sonuçlanır [149].



**Şekil 5.4** Konjugatların ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$ )  $\lambda_{\text{max}}$  değerlerindeki floresans kayma

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların zetasizer analizlerine göre elde edilen boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında; 2.207 nm boyuta sahip olan peptidin, 6.23 nm boyuttaki PAA ile biyokonjugasyonu sonucunda biyokonjugatların boyutlarının peptid ve polimerden daha büyük olduğu gürölmüştür. Bu değer artan konjugasyon oranına bağlı olarak  $n = 9$  oranı için 16.15 nm'ye ulaşmıştır (Şekil 5.5). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda moleköl boyutunun arttığını gstermiştir [147, 148].



Şekil 5.5  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$  oranlarındaki konjugatların serbest peptide ve polimere kıyasla partikül boyutu değerlerinin karşılaştırılması

### 5.3 Peptid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma

Bu tez çalışmasında W-EBOVP peptidinin PLGA nanopartiküllerine yüklendiği dört farklı formülasyonda (E1-E4) nanopartiküller üretilmiştir. E5 nanopartikülü de karşılaştırma amacıyla boş olarak üretilmiştir. E1-E5 nanopartiküllerinin reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, zetasizer ile boyut ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Polimerik nanopartikül başına yüklenen peptid miktarı, elde edilen nanopartikül miktarları ve boyut değerleri kıyaslandığında E3 nanopartikülleri en optimum formülasyon olarak seçilmiş ve E3 nanopartikülleri FT-IR, Raman ve SEM ile analiz edilmiştir.

Şekil 4.61-64'de E3 nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında çekilen SEM görüntüleri verilmiştir. Nanopartiküllerin morfolojik olarak düzgün ve pürüzsüz bir morfolojiye sahip olduğu, homojen bir boyut dağılımı sergilediği ve boyut değerlerinin zetasizer ölçümleriyle tutarlı olduğu belirlenmiştir [135, 150].

Nanopartiküllerin üretiminde, aktif bileşen nanosisteme yüklenirken, bir miktar aktif bileşen, nanopartiküllerin yüzeyine istenmeyen bir şekilde adsorbe olabilir. Nanopartiküller için FT-IR analizinin amacı, aktif maddenin nanopartiküllerin

yüzeyine adsorbe olup olmadığını belirlemektir. Şekil 4.65'de verilen FT-IR spektrumunun özellikle 1., 2. ve 3. bölgeleri incelendiğinde, peptid yüklü nanoparçacıkların (E3) ve boş nanopartiküllerin (E5) spektrumlarının aynı karaktere sahip olduğu ve nanopartiküllerin spektrumunda peptid molekülünden gelen spesifik bir pik olmadığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, peptid nanopartiküllere yüzeye adsorbe olmadan başarıyla enkapsüle edilmiştir [135].

Nanopartiküllerin Raman spektrumlarının karakteristik yapısının peptidinkinden farklı olduğu belirlenmiştir. Boş ve peptid yüklü nanopartiküllerin benzer bir spektrumu, peptid moleküllerinin nanoparçacıkların yüzeyine adsorbe olmadan partiküllere kapsülendiğini bir kez daha göstermiştir (Şekil 4.66). Bu sonuç FT-IR analiz sonuçlarını desteklemiştir.

Polimerik nanopartiküllerin üretimi sırasında nanopartiküllerin stabilizasyonunu sağlayan ve emülsifiye edici ajan olarak kullanılan PVA, yıkama ve saflaştırma işlemleri ile %100 uzaklaştırılmaz ve liyofilize nanopartiküllerin yüzeyinde bağlı kalır. E3 formülasyonu yüzeyinden tutulu kalan PVA içeriği kolorimetrik yöntemle  $4.29 \pm 0.02\%$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.67-4.68) [134].

E3 nanopartiküllerinden peptidin *in-vitro* koşullarda salımı incelenmiştir. İlk 24 saatte patlama salımının (burst release) ardından 150 gün boyunca kontrollü salım gerçekleşerek kapsüllenmiş peptidin %80'inin salındığı değerlendirilmiştir (Şekil 4.69). Aynı zamanda, peptidin nanosistemden salımını incelemek amacıyla dört farklı kinetik model kullanılmıştır. Zero-order, first-order, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine ait grafikler Şekil 4.70'de verilmiştir. Lineerlik ve  $R^2$  değerleri göz önünde bulundurulduğunda peptidin salım modeli Higuchi kinetik yani 'Fickian difüzyonuna dayanan çözünmeyen matristen ilaç salımı' olarak belirlenmiştir [136, 137].

#### **5.4 Lipofilisite Çalışmasına Ait Tartışma**

Pasif difüzyon yoluyla membranlardan emilim bir ilacın en bilinen iletim şeklidir. İlaç hücresel enerji tüketimine ihtiyaç duymadan yeni bir ortama geçiş eğilimi ile harekete eder. Bu nedenle, ilaç adayları, membranların lipid tabakasına nüfuz edecek kadar lipofilik olmalı ancak orada kalacakları kadar lipofilik olmamalıdır.

Bir molekülün lipofilikliğinin geleneksel ölçüsü olan LogP ya da LogD değerini veren "Çalkalama şişesi" yönteminde, analitin iki faz arasında termodinamik bir denge kurmasına izin verilir ve her fazdaki analit konsantrasyonu belirlenir. Ayrıca, dengede bulunan türlerin kütle dengelerine ve çözeltinin elektronötralliklerine dayanan potansiyometrik yöntem ile dengedeki analit konsantrasyonuna dayanan LogD değerleri hesaplanır.

$n = 9$  konjugatının lipofilikliği, önceden doyurulmuş n-oktanol/PBS fazı karışımı içinde n-oktanolde olan affiniteye dayanan konsantrasyonlardaki değişimler oranlanarak incelenmiştir. Fizyolojik olarak ilgili pH aralığında (pH 1-8) peptid ve polimer için LogD'nin ( $-1.08$  ile  $-1.59 \times 10^{-7}$ ) negatif değerleri, bu bileşiğin, daha yüksek sulu çözünürlük ve vücutta daha düşük lipofilikliğe daha duyarlı olacağı sonucuna varmamızı sağlamıştır. Sonuç olarak, membran geçirgenliğinin zayıf olması beklenmektedir (Şekil 4.71).

W-EBOVP peptidinin ve W-EBOVP peptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin (E3) ve boş PLGA nanopartiküllerinin (E5) lipofilikliği ise, potansiyometrik yöntem ile pH 2-12 aralığında hesaplanmıştır. Her üç sisteme ait potansiyometrik titrasyon eğrilerinde birinci eşdeğerlik noktası, ikinci eşdeğerlik noktası olmak üzere 2 eşdeğerlik noktası, 3 yarı-eşdeğerlik noktası ve 2 tampon bölgesi tespit edilmiştir. W-EBOVP peptidi için izokratik elüsyon koşulları altında artan pH değerine karşı elde edilen LogD değerleri peptid için yaklaşık fizyolojik pH değerine kadar doğrusal olarak artarken, boş nanopartiküller (E5) için pH 4 değerine kadar doğrusal olarak artmıştır. Peptid yüklü nanopartiküller (E3) için ise izokratik elüsyon koşulları altında artan pH değerine karşı elde edilen LogD değerleri W-EBOVP peptidi ve E5'in tam aksine pH 4 değerine kadar doğrusal olarak azalmıştır. HLB skalasına göre, W-EBOVP ve E5'e ait çalışılan tüm pH değerlerinde termodinamik açıdan elverişli, suda çözünme eğilimi gösteren dolayısıyla negatif hidrofilisite değerlerine sahip formlar oluşmaktadır. pH yükseldikçe peptid ve polimerin çözünürlük kapasitesi dolayısıyla hidrofilisitesi logaritmik olarak azalmasına rağmen çalışılan tüm pH değerlerinde geçirgenlik göstermemektedir. E3 için pH 4.5'a kadar lipofilisite kayda değer bir azalma göstermektedir. W-EBOVP ve E5'in aksine bir oranda değişim eğrisi sunan E3'e

ait çarpıcı sonucun, literatürde halen tam olarak yanıtı bulunamayan bir sorunun bilimsel yanıtı olabileceği kanısındayız. İki asidik pH noktası 2.14 ve 3.81'e karşı E3'ün potansiyometrik yanıtındaki bu değişim ancak yeni bir molekülün yani W-EBOVP peptidi ve PLGA arasındaki bir etkileşimin, dolayısıyla polimerik nanopartikül yüzeyinde kimyasal olarak bağlı olan peptid moleküllerinin varlığının neticesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca E3 için pH 4 değerine kadar hesaplanan LogD değerlerindeki pozitiflik, nanopartikül sisteminin bu pH değerlerine kadar geçirgenliğe neden olacağı söylenebilse de pH 4 üzerindeki değerlerde özellikle aşı amaçlı üretilen ve fizyolojik pH'larda uygulanması tasarlanan peptid yüklü bu nanopartikül sistemi için negatif LogD değerleri nedeniyle geçirgenlikten bahsetmek mümkün görünmemektedir. Sonuç olarak; her üç tür için elde edilen pH-LogD değişim grafiğine ve tablosuna göre, fizyolojik ve üzeri pH değerlerinde düşük ve negatif lipofilisite değerleri ile peptid yüklü nanopartikülün BOS geçişinin mümkün olmadığını, aşılama sonucunda gerek peptid yüklü nanopartikülün kendisinin gerekse salım ürününün beyin ve omurilik sisteminde herhangi bir tutulumun olmayacağını söylemek mümkündür (Şekil 4.72-4.73, Tablo 4.5).

Aşı amaçlı üretilen ve fizyolojik pH'larda uygulanması tasarlanan peptid-polimer konjugatı (W-EBOVP/PAA, n = 9) ve peptid yüklü nanopartikül sistemi (E3) için geçirgenlikten bahsetmek mümkün görünmemektedir.

## **5.5 *In-Vitro* Sitotoksisite Analizlerine Ait Tartışma**

Sitotoksisite deneyleri, maddelerin çeşitli dokulardaki toksisitesini tahmin etmek için kullanılan ilk *in-vitro* biyo-deney yöntemlerinden birisidir. *In-vitro* sitotoksisite testi, güvenlik değerlendirmesi ve taraması ve bileşiklerin sıralanması için önemli bir araç sağlamaktadır. Belirli bir sitotoksisite analiz yönteminin seçimi spesifik araştırma hedeflerinden etkilenebilir. Bu haliyle, potansiyel toksiklerle muameleden sonra kültürlenmiş hücrelerin tepkisini izlemek için dört ana tahlil sınıfı kullanılmaktadır. Bunlar hücre canlılığını, hücre zarı bütünlüğünü, hücre çoğalmasını ve metabolik aktiviteyi ölçer. Hücre canlılığı, morfolojik değişikliklerle ve membran geçirgenliğindeki değişiklikler veya belirli boyaların

hücre dışında kalması (hariç tutulması) veya hücreye alınması ve tutulmasından kaynaklanan fizyolojik durum ile değerlendirilebilir. Metabolik aktiviteyi ölçen deneyler, proliferasyon, canlılık ve sitotoksiteyi analiz etmek için uygundur. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür tetrazolium (MTT), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülffeniil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid (XTT) ve suda çözünür tetrazolium tuzlarının (WST1) renkli formazan bileşiklerine indirgenmesi sadece metabolik olarak aktif hücrelerde gerçekleşir. MTT, yapışık memeli hücreleri için çok oyuklu canlılık redüktaz bazlı analizlerde kullanılan bir tetrazolium tuzunun ilk örneği olarak kabul edilmektedir. Canlı hücreler, MTT reaktifini suda çözünmeyen, hücrelere çöken ve organik çözücülerle ekstrakte edilmesi gereken renkli bir formazan ürününe indirger. Formazan ürününün DMSO gibi bir organik solventle çözülmesiyle elde edilen renkli çözeltinin, referans kullanarak bir mikro-plaka okuyucusunda 550 nm civarında absorbansı ölçülerek hücre canlılığı belirlenir [151]. Yapılan sitotoksite deneylerinde her üç malzemede de (tek başına peptid (W-EBOVP), n = 9 konjugatı ve E3 NPs) sağlıklı L929 fare fibroblast hücre hattına belirgin bir sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.74-4.76). Bu durum üretilen malzemelerin çalışılan konsantrasyon aralığında biyoyumlu olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışması kapsamında Ebola virüs nükleoproteininin 421-430 nolu antijenik peptid epitopu sentezlenip PAA ile biyokonjugatları oluşturularak ve PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyon yoluyla iki farklı taşıyıcı sistem kullanılarak aşı formülasyonları üretilmiştir. Elde edilen biyokonjugatların ve nanopartiküllerin karakterizasyonları sonucu belirlenen bir konjugat ve bir nanopartikül formülasyonu için L929 fare fibroblast hücre hattında sitotoksite çalışması yapılmış ve biyoyumlu oldukları gösterilmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen bilgiler Ebola hastalığına karşı spesifik antikörlerin elde edilmesi ve sentetik aşılarda geliştirilmesi yönünde yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

- [1] WHO, "Ebola Response Roadmap. Situation Report Update. 21 November 2014. Geneva, 2014.
- [2] WHO, "Ebola Situation Report, Geneva Switz, 2016.
- [3] B. Zawilińska and M. Kosz-Vnenchak, "General introduction into the Ebola virus biology and disease," *Folia Medica Cracoviensia*, vol. 54, no. 3, pp. 57-65, 2014.
- [4] A. Kadanali and G. Karagoz, "An overview of Ebola virus disease," *Northern clinics of Istanbul*, vol. 2, no. 1, p. 81-86, 2015.
- [5] T.C S. Bakanlığı (2017). "Ebola Virüsü Vaka Yönetim Rehberi ," 13.08.2020; <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-haberler/ebola-virusu-vaka-yonetim-rehberi-yayinlandi.html>
- [6] A. Aruna, P. Mbala, L. Minikulu, D. Mukadi, D. Bulemfu, F. Edidi, et al., "Ebola Virus Disease Outbreak-Democratic Republic of the Congo, August 2018-November 2019," *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 68, no. 50, p. 1162-1165, 2019.
- [7] WHO, "Ebola Virus Disease Democratic Republic of Congo: External Situation Report 19," 2018.
- [8] H. M. De Nys, P. M. Kingebeni, A. K. Keita, C. Butel, G. Thaurignac, C.-J. Villabona-Arenas, et al., "Survey of Ebola viruses in frugivorous and insectivorous bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017," *Emerging infectious diseases*, vol. 24, no. 12, p. 2228-2240, 2018.
- [9] WHO, "Preliminary results on the efficacy of rVSV-ZEBOV-GP Ebola vaccine using the ring vaccination strategy in the control of an Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo: an example of integration of research into epidemic response," Geneva, 2019.
- [10] WHO, "Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, April 2019–conclusions and recommendations," *Weekly Epidemiological Record*, vol. 94, no. 22/23, pp. 261-279, 2019.
- [11] FDA, "First FDA-approved vaccine for the prevention of Ebola virus disease, marking a critical milestone in public health preparedness and response," Press Announc, 2019.
- [12] WHO. (2019). Ebola situation reports: Democratic Republic of the Congo. 13.08.2020; <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332654>
- [13] M. A. Capelle, L. Babich, J. E. van Deventer-Troost, D. Salerno, K. Krijgsman, U. Dirmeier, et al., "Stability and suitability for storage and



distribution of Ad26. ZEBOV/MVA-BN®-Filo heterologous prime-boost Ebola vaccine," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 129, pp. 215-221, 2018.

- [14] WHO. (2020). WHO adapts Ebola vaccination strategy in the Democratic Republic of the Congo to account for insecurity and community feedback. 13.08.2020; <https://www.who.int/news-room/detail/07-05-2019-who-adapts-ebola-vaccination-strategy-in-the-democratic-republic-of-the-congo-to-account-for-insecurity-and-community-feedback>
- [15] C. V. Herst, S. Burkholz, J. Sidney, A. Sette, P. E. Harris, S. Massey, et al., "An effective CTL peptide vaccine for ebola zaire based on survivors' CD8+ targeting of a particular nucleocapsid protein epitope with potential implications for COVID-19 vaccine design," *Vaccine*, vol. 38, no. 28, pp. 4464-4475, 2020.
- [16] A. A. Moisa and E. F. Kolesanova, "Synthetic peptide vaccines," *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, vol. 4, pp. 321-332, 2010.
- [17] M. Garinot, F. Piras-Douce, P. Probeck, V. Chambon, K. Varghese, Y. Liu, et al., "A potent novel vaccine adjuvant based on straight polyacrylate," *International Journal of Pharmaceutics: X*, vol. 2, 2020,100054.
- [18] K. Kızılbey, B. Mansuroğlu, S. Derman, and Z. Mustafaeva Akdeste, "An In vivo study: Adjuvant activity of poly-n-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid on immune responses against Melanoma synthetic peptide," *Bioengineered*, vol. 9, no. 1, pp. 134-143, 2018.
- [19] L. T. Hilgers, I. Nicolas, G. Lejeune, E. Dewil, M. Strebelle, and B. Boon, "Alkyl-esters of polyacrylic acid as vaccine adjuvants," *Vaccine*, vol. 16, no. 16, pp. 1575-1581, 1998.
- [20] G. Rigaut, A. G. A. L. Parisot, K. De Luca, C. M. P. Andreoni, L. Remolue, M. Garinot, et al., "Novel immunogenic formulations comprising linear or branched polyacrylic acid polymer adjuvants," *Google Patents*, WO2017218819A1, 2017.
- [21] J. H. Kuhn, S. Becker, H. Ebihara, T. W. Geisbert, K. M. Johnson, Y. Kawaoka, et al., "Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations," *Archives of virology*, vol. 155, no. 12, pp. 2083-2103, 2010.
- [22] S. A. Carroll, J. S. Towner, T. K. Sealy, L. K. McMullan, M. L. Khristova, F. J. Burt, et al., "Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences," *Journal of virology*, vol. 87, no. 5, pp. 2608-2616, 2013.
- [23] J. G. Breman, D. L. Heymann, G. Lloyd, J. B. McCormick, M. Miatudila, F. A. Murphy, et al., "Discovery and description of Ebola Zaire virus in 1976 and relevance to the West African epidemic during 2013-2016," *The Journal of infectious diseases*, vol. 214, no. 3, pp. S93-S101, 2016.

- [24] A. Rivera and I. Messaoudi, "Molecular mechanisms of Ebola pathogenesis," *Journal of leukocyte biology*, vol. 100, no. 5, pp. 889-904, 2016.
- [25] R. Swanepoel, S. B. Smit, P. E. Rollin, P. Formenty, P. A. Leman, A. Kemp, et al., "Studies of reservoir hosts for Marburg virus," *Emerging infectious diseases*, vol. 13, no. 12, pp. 1847-1851, 2007.
- [26] B. Le Guenno, P. Formenty, M. Wyers, P. Gounon, F. Walker, and C. Boesch, "Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus," *The Lancet*, vol. 345, no. 8960, pp. 1271-1274, 1995.
- [27] J. S. Towner, T. K. Sealy, M. L. Khristova, C. G. Albariño, S. Conlan, S. A. Reeder, et al., "Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda," *PLoS Pathog*, vol. 4, no. 11, e1000212, 2008.
- [28] A. MacNeil, E. C. Farnon, J. Wamala, S. Okware, D. L. Cannon, Z. Reed, et al., "Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda," *Emerging infectious diseases*, vol. 16, no. 12, pp. 1969-1972, 2010.
- [29] M. Miranda, T. Ksiazek, T. Retuya, A. S. Khan, A. Sanchez, C. F. Fulhorst, et al., "Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996," *The Journal of infectious diseases*, vol. 179, no. 1, pp. S115-S119, 1999.
- [30] P. Ascenzi, A. Bocedi, J. Heptonstall, M. R. Capobianchi, A. Di Caro, E. Mastrangelo, et al., "Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family," *Molecular aspects of medicine*, vol. 29, no. 3, pp. 151-185, 2008.
- [31] A. Sanchez, T. Geisbert, and H. Feldmann, "Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Fields Virology*," ed: Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, vol. 1, 2007.
- [32] J. S. Towner, B. R. Amman, T. K. Sealy, S. A. R. Carroll, J. A. Comer, A. Kemp, et al., "Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats," *PLoS pathogens*, vol. 5, no. 7, e1000536, 2009.
- [33] K. K. Aurelie, M. M. Guy, N. F. Bona, K. M. Charles, A. P. Mawupemor, and L. Shixue, "A Historical Review of Ebola Outbreaks," in *Advances in Ebola Control*, IntechOpen, 2017.
- [34] S. Hasan, S. A. Ahmad, R. Masood, and S. Saeed, "Ebola virus: A global public health menace: A narrative review," *Journal of family medicine and primary care*, vol. 8, no. 7, pp. 2189-2201, 2019.
- [35] C. E. Coltart, B. Lindsey, I. Ghinai, A. M. Johnson, and D. L. Heymann, "The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, no. 1721, 20160297, 2017.
- [36] T. W. Geisbert, K. M. Daddario-DiCaprio, J. B. Geisbert, D. S. Reed, F. Feldmann, A. Grolla, et al., "Vesicular stomatitis virus-based vaccines

- protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses," *Vaccine*, vol. 26, no. 52, pp. 6894-6900, 2008.
- [37] D. Gatherer, "The 2014 Ebola virus disease outbreak in West Africa," *Journal of General Virology*, vol. 95, no. 8, pp. 1619-1624, 2014.
- [38] M. L. Bayot and K. C. King, "Biohazard Levels," StatPearls Publishing, 2019.
- [39] E. M. Burd, "Ebola virus: a clear and present danger," *Journal of clinical microbiology*, vol. 53, no. 1, pp. 4-8, 2015.
- [40] S. W. Mitchell and J. B. McCormick, "Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 20, no. 3, pp. 486-489, 1984.
- [41] K. L. Warfield, D. L. Swenson, G. G. Olinger, W. V. Kalina, M. Viard, M. Aitichou, et al., "Ebola virus inactivation with preservation of antigenic and structural integrity by a photoinducible alkylating agent," *The Journal of infectious diseases*, vol. 196, no. 2, pp. S276-S283, 2007.
- [42] T. Geisbert and P. Jahrling, "Differentiation of filoviruses by electron microscopy," *Virus research*, vol. 39, no. 2-3, pp. 129-150, 1995.
- [43] E. Mühlberger, "Filovirus replication and transcription," vol. 2, no. 2, pp. 205-215, 2007.
- [44] M. Mateo, C. Carbonnelle, M. J. Martinez, O. Reynard, A. Page, V. A. Volchkova, et al., "Knockdown of Ebola virus VP24 impairs viral nucleocapsid assembly and prevents virus replication," *The Journal of infectious diseases*, vol. 204, no. 3, pp. S892-S896, 2011.
- [45] V. K. Nguyen, S. C. Binder, A. Boianelli, M. Meyer-Hermann, and E. A. Hernandez-Vargas, "Ebola virus infection modeling and identifiability problems," *Frontiers in microbiology*, vol. 6, 257, 2015.
- [46] P. Aleksandrowicz, A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, et al., "Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis," *The Journal of infectious diseases*, vol. 204, no. 3, pp. S957-S967, 2011.
- [47] N. Biedenkopf, B. Hartlieb, T. Hoenen, and S. Becker, "Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex impact on viral transcription and replication," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 16, pp. 11165-11174, 2013.
- [48] R. V. Stahelin, "Membrane binding and bending in Ebola VP40 assembly and egress," *Frontiers in microbiology*, vol. 5, 300, 2014.
- [49] I. Messaoudi, G. K. Amarasinghe, and C. F. Basler, "Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 11, pp. 663-676, 2015.
- [50] D. Bente, J. Gren, J. E. Strong, and H. Feldmann, "Disease modeling for Ebola and Marburg viruses," *Disease models & mechanisms*, vol. 2, no. 1-2, pp. 12-17, 2009.

- [51] H. Feldmann and T. W. Geisbert, "Ebola haemorrhagic fever," *The Lancet*, vol. 377, no. 9768, pp. 849-862, 2011.
- [52] S. Mahanty and M. Bray, "Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers," *The Lancet infectious diseases*, vol. 4, no. 8, pp. 487-498, 2004.
- [53] M. Goeijenbier, J. Van Kampen, C. Reusken, M. Koopmans, and E. Van Gorp, "Ebola virus disease: a review on epidemiology, symptoms, treatment and pathogenesis," *Neth J Med*, vol. 72, no. 9, pp. 442-448, 2014.
- [54] World Health Organization., "Laboratory Biosafety Manual, 3<sup>rd</sup> ed," WHO: Geneva, Switzerland, 2004.
- [55] R. B. Martines, D. L. Ng, P. W. Greer, P. E. Rollin, and S. R. Zaki, "Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses," *The Journal of pathology*, vol. 235, no. 2, pp. 153-174, 2015.
- [56] M. J. Broadhurst, T. J. Brooks, and N. R. Pollock, "Diagnosis of Ebola virus disease: past, present, and future," *Clinical microbiology reviews*, vol. 29, no. 4, pp. 773-793, 2016.
- [57] Y. Wang, X. Zhang, and H. Wei, "Laboratory detection and diagnosis of filoviruses," *Virologica Sinica*, vol. 26, no. 2, pp. 73-80, 2011.
- [58] World Health Organization., "Origins of the 2014 Ebola epidemic," WHO Global Alert and Response, Geneva, Switzerland, 2015.
- [59] M. R. Gaudinski, E. E. Coates, L. Novik, A. Widge, K. V. Houser, E. Burch, et al., "Safety, tolerability, pharmacokinetics, and immunogenicity of the therapeutic monoclonal antibody mAb114 targeting Ebola virus glycoprotein (VRC 608): an open-label phase 1 study," *The Lancet*, vol. 393, no. 10174, pp. 889-898, 2019.
- [60] H. Lupton, R. Lambert, D. Bumgardner, J. Moe, and G. Eddy, "Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model," *Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model.*, vol. 2, no. 8207, pp. 1294-1295, 1980.
- [61] N. Venkatraman, D. Silman, P. M. Folegatti, and A. V. Hill, "Vaccines against Ebola virus," *Vaccine*, vol. 36, no. 36, pp. 5454-5459, 2018.
- [62] R. W. Cross, K. A. Fenton, J. B. Geisbert, C. E. Mire, and T. W. Geisbert, "Modeling the disease course of Zaire ebolavirus infection in the outbred guinea pig," *The Journal of infectious diseases*, vol. 212, no. 2, pp. S305-S315, 2015.
- [63] J. E. Martin, N. J. Sullivan, M. E. Enama, I. J. Gordon, M. Roederer, R. A. Koup, et al., "A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial," *Clinical and vaccine immunology*, vol. 13, no. 11, pp. 1267-1277, 2006.
- [64] J. H. Choi, S. C. Schafer, L. Zhang, T. Juelich, A. N. Freiberg, and M. A. Croyle, "Modeling pre-existing immunity to adenovirus in rodents: immunological requirements for successful development of a recombinant

- adenovirus serotype 5-based ebola vaccine," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 10, no. 9, pp. 3342-3355, 2013.
- [65] B. Callendret, J. Vellinga, K. Wunderlich, A. Rodriguez, R. Steigerwald, U. Dirmeier, et al., "A prophylactic multivalent vaccine against different filovirus species is immunogenic and provides protection from lethal infections with Ebolavirus and Marburgvirus species in non-human primates," *PloS One*, vol. 13, no. 2, e0192312, 2018.
- [66] E.R. Busta, M. Mancher, P.A. Cuff, K. McAdam, and G. Keusch, *Integrating clinical research into epidemic response: the Ebola experience*, National Academies Press, 2017.
- [67] World Health Organization., "Statement on the 1st meeting of the IHR Emergency Committee on the 2014 Ebola outbreak in West Africa," WHO: Geneva, Switzerland, 2014.
- [68] World Health Organization. "Ebola Virus Disease-Democratic Republic of the Congo-External Situation Report 85," WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
- [69] M. D. Tapia, S. O. Sow, K. E. Lyke, F. C. Haidara, F. Diallo, M. Doumbia, et al., "Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *The Lancet infectious diseases*, vol. 16, no. 1, pp. 31-42, 2016.
- [70] T. Lambe, G. Bowyer, and K. J. Ewer, "A review of phase I trials of Ebola virus vaccines: what can we learn from the race to develop novel vaccines?," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, no. 1721, 20160295, 2017.
- [71] T. P. Monath, P. E. Fast, K. Modjarrad, D. K. Clarke, B. K. Martin, J. Fusco, et al., "rVSVΔG-ZEBOV-GP (also designated V920) recombinant vesicular stomatitis virus pseudotyped with Ebola Zaire Glycoprotein: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment," *Vaccine: X*, vol. 1, 100009, 2019.
- [72] V. Pavot, "Ebola virus vaccines: Where do we stand?," *Clinical immunology*, vol. 173, pp. 44-49, 2016.
- [73] D. Medaglini and C.-A. Siegrist, "Immunomonitoring of human responses to the rVSV-ZEBOV Ebola vaccine," *Current opinion in virology*, vol. 23, pp. 88-94, 2017.
- [74] M.-A. Trad, W. Naughton, A. Yeung, L. Mazlin, M. O'sullivan, N. Gilroy, et al., "Ebola virus disease: an update on current prevention and management strategies," *Journal of Clinical Virology*, vol. 86, pp. 5-13, 2017.
- [75] S. Sebastian, A. Flaxman, K. M. Cha, M. Ulaszewska, C. Gilbride, H. Sharpe, et al., "A Multi-Filovirus Vaccine Candidate: Co-Expression of Ebola, Sudan,

- and Marburg Antigens in a Single Vector," *Vaccines*, vol. 8, no. 2, pp. 241-258, 2020.
- [76] Y. Wang, J. Li, Y. Hu, Q. Liang, M. Wei, and F. Zhu, "Ebola vaccines in clinical trial: the promising candidates," *Human vaccines & immunotherapeutics*, vol. 13, no. 1, pp. 153-168, 2017.
- [77] Z. Anywaine, H. Whitworth, P. Kaleebu, G. Praygod, G. Shukarev, D. Manno, et al., "Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccination regimen with Ad26. ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines: 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Uganda and Tanzania," *The Journal of infectious diseases*, vol. 220, no.1, pp. 46-56, 2019.
- [78] U. S. National Library of Medicine, "Stage Phase 3 Study to Assess the Safety and Immunogenicity of Ebola Candidate Vaccines Ad26. ZEBOV and MVA-BN-Filo During Implementation of Stages 1 and 2," *clinicaltrials.gov*, NCT02509494, 2015.
- [79] G. Mutua, O. Anzala, K. Luhn, C. Robinson, V. Bockstal, D. Anumendem, et al., "Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccine regimen with Ad26. ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines: 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Nairobi, Kenya," *The Journal of infectious diseases*, vol. 220, no. 1, pp. 57-67, 2019.
- [80] S. Sridhar, "Clinical development of Ebola vaccines," *Therapeutic advances in vaccines*, vol. 3, no. 5-6, pp. 125-138, 2015.
- [81] A. M. Henao-Restrepo, A. Camacho, I. M. Longini, C. H. Watson, W. J. Edmunds, M. Egger, et al., "Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!)," *The Lancet*, vol. 389, no. 10068, pp. 505-518, 2017.
- [82] A. Marzi and H. Feldmann, "Ebola virus vaccines: an overview of current approaches," *Expert review of vaccines*, vol. 13, no. 4, pp. 521-531, 2014.
- [83] T. Racine, M. Denizot, D. Pannetier, L. Nguyen, A. Pasquier, H. Raoul, et al., "In Vitro Characterization and In Vivo Effectiveness of Ebola Virus Specific Equine Polyclonal F (ab')<sub>2</sub>," *The Journal of infectious diseases*, vol. 220, no. 1, pp. 41-45, 2019.
- [84] J. Luczkowiak, J. R. Arribas, S. Gómez, V. Jiménez-Yuste, F. de la Calle, A. Viejo, et al., "Specific neutralizing response in plasma from convalescent patients of Ebola virus disease against the West Africa Makona variant of Ebola virus," *Virus research*, vol. 213, pp. 224-229, 2016.
- [85] X. Zheng, G. Wong, Y. Zhao, H. Wang, S. He, Y. Bi, et al., "Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection," *Scientific reports*, vol. 6, 24179, 2016.

- [86] Z. Xu and P. M. Moyle, "Bioconjugation approaches to producing subunit vaccines composed of protein or peptide antigens and covalently attached toll-like receptor ligands," *Bioconjugate chemistry*, vol. 29, no. 3, pp. 572-586, 2017.
- [87] World Health Organization. "New Ebola outbreak detected in northwest Democratic Republic of the Congo; WHO surge team supporting the response," WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
- [88] H. Un, S. Eskiizmirliler, N. Unal, C. M. Freuling, N. Johnson, A. R. Fooks, et al., "Oral vaccination of foxes against rabies in Turkey between 2008 and 2010," *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, vol. 125, no. 5-6, pp. 203-208, 2012.
- [89] R. Macfarlan, B. Dietzschold, T. Wiktor, M. Kiel, R. Houghten, R. Lerner, et al., "T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides," *The Journal of Immunology*, vol. 133, no. 5, pp. 2748-2752, 1984.
- [90] A. Salman Dilgimen, "Hepatit B Yüzey Antijenleri Polipeptidlerinin Kimyasal Yolla Sentezi ve Karakterizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 1998.
- [91] Z. Ö. Özdemir, "Sentetik Viral Peptidler Kullanılarak Polielektrolit Esaslı Biyokonjugatların Geliştirilmesi," Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2008.
- [92] R. B. Merrifield, "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 85, no. 14, pp. 2149-2154, 1963.
- [93] B. Merrifield, "The role of the support in solid phase peptide synthesis," *British polymer journal*, vol. 16, no. 4, pp. 173-178, 1984.
- [94] T. Kimmerlin and D. Seebach, "'100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to  $\beta$ -peptide assemblies\*," *The Journal of peptide research*, vol. 65, no. 2, pp. 229-260, 2008.
- [95] E. Atherton and R. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach," IRL Press, Oxford, 1989.
- [96] J. Howl, "Peptide synthesis and applications," Springer Science & Business Media, vol. 298, 2005.
- [97] A. Mitchell, B. Erickson, M. Ryabtsev, R. Hodges, and R. Merrifield, "tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 98, no. 23, pp. 7357-7362, 1976.
- [98] B. Ucar, T. Acar, P. P. Arayici, M. Sen, S. Derman, and Z. Mustafaeva, "Synthesis and Applications of Synthetic Peptides," in *Peptide Synthesis*, ed: J. T. Varkey, IntechOpen, 2019.

- [99] S. A. Palasek, Z. J. Cox, and J. M. Collins, "Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced fmoc solid phase peptide synthesis," *Journal of Peptide Science*, vol. 13, no. 3, pp. 143-148, 2007.
- [100] J. M. K. Collins, J. J. Lambert, and M. J. Collins, "Microwave-assisted peptide synthesis," *Google Patents*, US20090221792A1, 2009.
- [101] J. M. Collins and M. J. Collins, *Microwaves in organic synthesis*, Second Completely Revised and Enlarged edition. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, vol. 1, 2006.
- [102] S. Cantone, "A new conception of polymeric supports for the solid phase peptide synthesis: rigidity and porosity as determinant factors for the success in industrial applications," 2008.
- [103] G. T. Hermanson, "Bioconjugate techniques," Academic press, 2013.
- [104] T. Acar, "Veteriner hekimliğinde Brucella abortus hastalığına karşı immunojen olarak kullanılabilen sentetik peptid-polimer konjugatlarının sentezlenmesi ve yapılarının incelenmesi " Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [105] P. Arayıcı Pelit, "Koruyucu Yeni Nesil Peptid Aşı Modelleri: Viral Kuduz Hastalığı Peptidlerinin Çeşitli Adjuvantlarla Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2015.
- [106] E. Kay, J. Cuccui, and B. W. Wren, "Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines," *npj Vaccines*, vol. 4, 16, 2019.
- [107] M. F. Feldman, A. E. M. Bridwell, N. E. Scott, E. Vinogradov, S. R. McKee, S. M. Chavez, et al., "A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 37, pp. 18655-18663, 2019.
- [108] C. S. Hwang, L. C. Smith, Y. Natori, B. Ellis, B. Zhou, and K. D. Janda, "Efficacious vaccine against heroin contaminated with fentanyl," *ACS chemical neuroscience*, vol. 9, no. 6, pp. 1269-1275, 2018.
- [109] S. Derman, K. Kızılbey, and Z. Akdetse, "Polymeric nanoparticles," *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences* vol. 31, pp. 109-22, 2013.
- [110] A. Gürsoy, "Kontrollü salım sistemleri," 2002.
- [111] C. T. Şengel-Türk, C. Hasçıçek, and N. Gönül, "Beyne ilaç hedeflendirilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler," *Journal of Neurological Sciences*, vol. 24, no. 3, pp. 254-263, 2007.
- [112] S. Durak, T. Arasoglu, S. C. Ates, S. "Derman, Enhanced antibacterial and antiparasitic activity of multifunctional polymeric nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 31, no. 17, 175705, 2020.
- [113] İ. Özcan, "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, 2008.

- [114] A. Gültekin, "Sentetik reseptörlere dayalı nano algılama sistemleri," 2009.
- [115] E. S. Abamor, A. Allahverdiyev, O. A. Tosyali, M. Bagirova, T. Acar, Z. Mustafaeva, et al., "Evaluation of in vitro and in vivo immunostimulatory activities of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with soluble and autoclaved *Leishmania infantum* antigens: A novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 12, no. 8, pp. 353-364, 2019.
- [116] T. N. Alkie, A. Yitbarek, K. Taha-Abdelaziz, J. Astill, and S. Sharif, "Characterization of immunogenicity of avian influenza antigens encapsulated in PLGA nanoparticles following mucosal and subcutaneous delivery in chickens," *PloS one*, vol. 13, no. 11, e0206324, 2018.
- [117] J. Bae, N. Parayath, W. Ma, M. Amiji, N. Munshi, and K. C. Anderson, "BCMA peptide-engineered nanoparticles enhance induction and function of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma: clinical applications," *Leukemia*, vol. 34, pp. 210-223, 2020.
- [118] A. I. Kostadinova, J. Middelburg, M. Ciulla, J. Garssen, W. E. Hennink, L. M. Knippels, et al., "PLGA nanoparticles loaded with beta-lactoglobulin-derived peptides modulate mucosal immunity and may facilitate cow's milk allergy prevention," *European Journal of Pharmacology*, vol. 818, no. 5, pp. 211-220, 2018.
- [119] K. Changula, R. Yoshida, O. Noyori, A. Marzi, H. Miyamoto, M. Ishijima, et al., "Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein," *Virus research*, vol. 176, no. 1-2, pp. 83-90, 2013.
- [120] T. Acar, P. P. Arayıcı, B. Ucar, M. Karahan, and Z. Mustafaeva, "Synthesis, Characterization and Lipophilicity Study of *Brucella abortus*' Immunogenic Peptide Sequence That Can Be Used in the Future Vaccination Studies," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 25, no. 3, pp. 911-918, 2019.
- [121] CEM, "Manual Microwave Enhanced Peptide Synthesis," 2012.
- [122] Peptide property calculator. <https://pepcalc.com/>
- [123] C. Van Wandelen, R. Zeikus, and D. Tsou, "Cleavage, deprotection, and isolation of peptides after Fmoc synthesis," *Chemistry Update*, Milligen/Biosearch, Division of Millipore, pp. 1-17, 1989.
- [124] Novabiochem®, "Fmoc resin cleavage protocols," 2014.
- [125] Z. O. Ozdemir, M. Topuzogullari, E. Karabulut, and Z. Mustafaeva, "LC-ESI-MS characterization and prep-RP-HPLC purification of FMDV synthetic viral peptides," *Journal of Peptide Science*, vol. 14, no. 2, pp. 41-44, 2008.

- [126] P. P. Arayici, T. Acar, B. Ucar, M. Karahan, B. A. Arslan, and Z. Mustafaeva, "Rabies Virus 31D Peptide-[P (VP-co-AA)] Conjugates: Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation," *Chemistry Select*, vol. 4, no. 32, pp. 9483-9487, 2019.
- [127] P. P. Arayici, T. Acar, A. M. Maharramov, M. Karahan, and Z. A. Mustafaeva, "Synthesis and Characterization of Bioconjugates of Antigenic Rabies Virus Peptide Epitope With Polyacrylic Acid," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, no. 4, pp. 2752-2758, 2017.
- [128] S. Derman and Z. M. Akdeste, "Particle size and zeta potential investigation of synthetic peptide-protein conjugates," *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 40, no. 4, pp. 282-289, 2015.
- [129] S. Derman, Z. M. Akdeste, S. C. Ates, B. Mansuroglu, K. Kizilbey, M. Bagirova, et al., "The study of syntetic peptide loaded PLGA nanoparticles cytotoxicity in vitro," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, no. 2a, pp. 1646-1653, 2017.
- [130] S. Derman, A. Katmis, S. Fide, and S. Karaismailoglu, "Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles," *Characterization and Application of Nanomaterials*, vol. 1, no. 4, 2018.
- [131] S. Acar Derman "Canine parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin sentezi ve biyokonjugatlarının geliştirilmesi," *Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul*, 2012.
- [132] S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, and V. Labhasetwar, "Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake," *Journal of controlled release*, vol. 82, no. 1, pp. 105-114, 2002.
- [133] D. Joshi, Y. Lan-Chun-Fung, and J. Pritchard, "Determination of poly (vinyl alcohol) via its complex with boric acid and iodine," *Analytica Chimica Acta*, vol. 104, no. 1, pp. 153-160, 1979.
- [134] T. Arasoglu and S. Derman, "Assessment of the Antigenotoxic Activity of Poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles Loaded with Caffeic Acid Phenethyl Ester Using the Ames Salmonella/Microsome Assay," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 66, no. 24, pp. 6196-6204, 2018.
- [135] T. Arasoglu, B. Mansuroglu, S. Derman, B. Gumus, B. Kocyigit, T. Acar, et al., "Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1, 4-naphthoquinone) Using a Poly (d, l-lactic-co-glycolic acid)(PLGA) Nanoparticle System," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 64, no. 38, pp. 7087-7094, 2016.
- [136] T. Arasoglu, S. Derman, B. Mansuroglu, G. Yelkenci, B. Kocyigit, B. Gumus, et al., "Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles," *Journal of applied microbiology*, vol. 123, no. 6, pp. 1407-1419, 2017.

- [137] T. Higuchi and K. A. Connors, "Phase Solubility Techniques," *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*, vol. 4, pp. 117-212, 1965.
- [138] R. W. Kormsmeier, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. A. Peppas, "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers," *International journal of pharmaceutics*, vol. 15, no. 1, pp. 25-35, 1983.
- [139] V. Chourasiya, S. Bohrey, and A. Pandey, "Hydrochlorothiazide containing PLGA nanoparticles: Design, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study," *Polymer Science Series B*, vol. 57, no. 6, pp. 645-653, 2015.
- [140] O. E. Rodríguez-Luis, R. Hernández-Delgadillo, N. Pineda-Aguilar, J. Vargas-Villarreal, F. González-Salazar, J. N. Garza-González, et al., "Effect of Bismuth Lipophilic Nanoparticles (BisBAL NPs) on *Trichomonas vaginalis* Growth," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 17, no. 7, pp. 4618-4622, 2017.
- [141] G. Katsikogianni and K. Avgoustakis, "Poly (lactide-co-glycolide)-methoxy-poly (ethylene glycol) nanoparticles: drug loading and release properties," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 6, no. 9-10, pp. 3080-3086, 2006.
- [142] T. C. Johnstone and S. J. Lippard, "The effect of ligand lipophilicity on the nanoparticle encapsulation of Pt (IV) prodrugs," *Inorganic chemistry*, vol. 52, no. 17, pp. 9915-9920, 2013.
- [143] X. Subirats, E. Fuguet, M. Rosés, E. Bosch, and C. Ràfols, "Methods for pKa Determination (I): Potentiometry, Spectrophotometry, and Capillary Electrophoresis," *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, vol. 10, pp. 1-10, 2015.
- [144] M. Topuzogullari, R. C. Koc, S. D. Isoglu, M. Bagirova, Z. Akdeste, S. Elcicek, et al., "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis," *Journal of Biomedical Science*, vol. 20, no. 1, pp. 35, 2013.
- [145] B. Mansuroglu, S. A. Derman, Y. B. Battal, K. Kizilbey, and Z. Mustafaeva, "The fluorescence study of covalent conjugation of peptide epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) with anionic polyelectrolytes and bovine serum albumin," *Febs Journal*, vol. 275, pp. 159, 2008.
- [146] A. Filenko, M. Demchenko, Z. Mustafaeva, Y. Osada, and M. Mustafaev, "Fluorescence study of Cu<sup>2+</sup>-induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes," *Biomacromolecules*, vol. 2, no. 1, pp. 270-277, 2001.
- [147] T. Acar, B. Ucar, P. Pelit Arayici, S. Derman, Z. Mustafaeva, "Covalent Conjugation and Characterization of the Ebola Nucleoprotein 421-430 Peptide with Polyacrylic Acid", *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 29, no. 7, pp. 5214-5219, 2020.

- [148] S. Derman, E. Dalgakiran, and Z. Mustafaeva, "Size and zeta potential analysis of synthetic peptide-carrier protein conjugates depend on the time," *Journal of Peptide Science*, vol. 14, pp. 162, 2008.
- [149] A. B. Ghisaidoobe and S. J. Chung, "Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, no. 12, pp. 22518-22538, 2014.
- [150] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 2, 025103, 2015.
- [151] L. Tolosa, M. T. Donato, and M. J. Gómez-Lechón, "General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay," in *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, ed: Springer, vol. 1250, pp. 333-348, 2015.



# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

İletişim Bilgisi: [acrtafun@gmail.com](mailto:acrtafun@gmail.com)

## Makaleler

1. T. Acar, B. Ucar, P. Pelit Arayıcı, S. Derman, Z. Mustafaeva, "Covalent Conjugation and Characterization of the Ebola Nucleoprotein 421-430 Peptide with Polyacrylic Acid", Fresenius Environmental Bulletin, vol. 29, no. 7, 5214-5219, 2020.

## Konferans Bildirileri

1. Acar, T., Arayıcı Pelit P., Uçar, B., Derman S., Mustafaeva Z. Ebola virüsü hastalığına ait antijenik peptid yüklü polimerik nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu, 31. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, 2019 (Sözlü sunum).

## Projeler

1. Ebola virüsüne ait sentetik peptid-polimer konjugatlarının ve nanoformülasyonlarının sentezi ve karakterizasyonu, YTÜ BAPK, DOP, 2016-07-04-DOP04, 2016-2020.

## Ödüller

1. TÜBİTAK BİDEB 2224-B-Yurt içi bilimsel etkinliklere katılım desteği (2019).
2. TÜBİTAK BİDEB 2211-C Öncelikli alanlara yönelik doktora bursu (2017).