

Review Paper / Derleme Makalesi
**DEVELOPMENT OF POLYELECTROLYTE BASED BIOCONJUGATES
USING WITH SYNTHETIC VIRAL PEPTIDES**

Zafer Ömer ÖZDEMİR*, Zeynep AKDESTE

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Esenler-İSTANBUL

Received/Geliş: 12.10.2010 Accepted/Kabul: 12.01.2011

ABSTRACT

Bioconjugates can be synthesized by reaction of synthetic peptides and polyelectrolytes. They are biologically important molecules. Their application on biology and nanotechnology fields has great potential. There are lots of researchs related to functional biopolymer systems in last years. These researchs are about synthesis, characterization and application properties of biologically important polyelectrolytes.

This work is aimed to giving information about polyelectrolytes, bioconjugation, microwave energy, solid phase peptide synthesis

Keywords: Bioconjugation, microwave, polyelectrolyte, solid phase peptide synthesis.

PACS numbers/numaraları: Biopolymers, 82.35.Pq, 87.15.rp, Peptides, 87.14.ef.

**SENTETİK VİRAL PEPTİDLER KULLANILARAK POLİELEKTROLİT ESASLI
BİYOKONJUGATLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

ÖZET

Biyokonjugatlar sentetik peptid ve polielektrolitlerin reaksiyonu ile sentezlenebilirler. Biyokonjugatlar biyolojik olarak önem taşıyan moleküllerdir. Biyokonjugatların biyoloji ve nanoteknoloji alanlarında kullanımı büyük potansiyel taşımaktadır. Son yıllarda fonksiyonel biyopolimer sistemlerle ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar sentez, karakterizasyon ve biyolojik özelliklerinin uygulamalarıyla ilgilidir.

Bu çalışmada polielektrolitler, biyokonjugasyon, mikrodalga enerjisi ve katı fazda peptid sentezi hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Biyokonjugasyon, katı fazda peptid sentezi, mikrodalga, polielektrolit.

1. GİRİŞ

Biyokonjugat, biyolojik kaynaktan ve farklı bir kaynaktan (xenobiotic) gelen moleküllerin bir araya gelmesi ile oluşan moleküler yapıdır. Organizmada bu işlem moleküllerin suda çözünmesi ve hücrede bölümlene için uygulanır [1]. Kimyasal açıdan konjugasyon işlemi uygun fonksiyonel grupları (-COOH, -NH₂, vb.) üzerlerinde taşıyan, farklı kaynaklardan gelen moleküllerin bir araya getirilmesidir.

*Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: ozdemirz@gmail.com, tel: (212) 383 46 46

Ringsdorf'un öncü çalışmalarından bu yana [2], biyokonjugasyon reaksiyonları ilaç çalışmalarında merkezi bir konu haline gelmiştir [3]. Biyokonjugasyon sayesinde, ilaç moleküllerinin enzimatik bozulmaya karşı korunması [4-10], dolaşımdaki maddelerin düzenlenmesi, hücreye girişinde (penetrasyonunda) yeni yolların geliştirilmesi ve son derece spesifik tanısal ajanların gelişimi mümkün olmuştur [11-14]. Biyokonjugasyon için çoğunlukla protein molekülleri ile çalışılmış ve bunların benzersiz avantajlarından yararlanılarak yeni ilaçlar geliştirilmiştir [15].

Doğal ve sentetik makro moleküllerin biyokonjugatları tıp, ilaç ve mühendislikte ilaç taşınması, enzim immobilizasyonu ve hücre biyoreaktörleri gibi özel uygulama alanlarına sahiptir [16-19].

Doğanın peptidlerle dolu olması, açıkça biyoaktif özellik taşımaları ve biyobozunur yapıda olmaları sentetik peptidlerin sentezi için iyi nedenlerdir. Bununla birlikte peptidlerin in vivo şartlarda taşınması çeşitlilik göstermektedir. Enzimatik degradasyon peptidlerin yaşam süresini azaltmaktadır. Bu degradasyonu engellemenin bir yolu da peptidlerin polimerlerle konjugasyonunu yapmaktır [20].

2. POLİELEKTROLİTLER

Biyokonjugatların hazırlanmasında, taşıyıcı olarak sıklıkla polielektrolitler kullanılmaktadır. Polielektrolitler yapılarında pozitif veya negatif yüklü gruplar bulunduran makro moleküllerdir [21-28].

Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı "counter" iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır [21]. Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makro moleküller ise poliamfolitler olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda protein yapılı poliamfolit bulunmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir.

Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyonlu polimeri yüklü hale getirirler. Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen poli tuzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri, tuzlar gibi, elektriği iletir ve polimerler gibi, viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır.

Son zamanlarda sentetik polielektrolitlerin fizyolojik aktifliği ve bunların ilaç preparatları için taşıyıcı olarak kullanılması, bu tür polimerlerin sentez yöntemlerinin ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesini gerekli kılmaktadır [28, 29]. Sentetik polielektrolitler, proteinleri kovalent bağlarla modifiye etmekte, antijenik proteinlerin bağışıklık sisteminde immünojenliğinin artırılmasında (ya da azaltılmasında) [30-32] ve vücuttan atılma sürelerinin uzatılmasında (prolongation) sıkça kullanılmaktadır. Bununla birlikte, viral antijenlerin (virüslerin organizma tarafından tanınabilen kısmı) polielektrolitlerle konjugatları güçlü koruyucu özellikler göstermektedir [33] ve yeni nesil sentetik aşı bileşikleri olarak düşünülmektedir.

Polimerler içerisinde, yapısında (+) ve (-) yük bulunduran makro moleküller gerek suda çözünmeleri gerekse biyomakromoleküllerle etkileşimleri açısından özel bir yer teşkil etmektedirler. Canlı organizmada var olan biyomakromoleküllerin (proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler vb.) veya organellerin (hücre membran yüzeyi, doku yüzeyleri vb.) (-) yüklerinden dolayı biyomakromoleküllerin, (-) yüklü polielektrolitlerle etkileşiminin incelenmesi çok etkin olarak yapılmaktadır [34-36].

Polielektrolitin organizmada kullanılabilmesi için biyobozunur özelliğe sahip olması gerekir. Bu özellik sayesinde polimerin organizmadan atılması daha kolay olmaktadır [37-40].

3. MİKRODALGA ENERJİSİ

Mikrodalga radyasyonu görece düşük manyetik spektrumda bir enerji formudur. Bu tip ışınım X-ray, UV, görünür ve infrared enerji spektrumlarının aşağısında ve 300 ile 300,000 megahertz (MHz) frekans aralığındadır. Bu frekans aralığındaki enerjiden moleküler dönme hareketi etkilenir, moleküler yapı etkilenmez. Yani mikrodalga ışıması X-rays, UV ve infredden bile düşük frekansta olduğundan kimyasal bağları kıramaz, sadece döndürebilir.

3.1. Mikrodalga Enerjisinin Tarihçesi

Mikrodalga teknolojisinin gelişimi II. Dünya Savaşı sırasında RADAR cihazlarının sabit frekansta mikrodalga üretmesi için magnetron tasarımı çalışmaları ile başlamıştır Raytheon şirketinden Percy LeBaron Spencer mikrodalga enerjisinin yiyecekleri ısıtabildiğini radar dalgaları ile deney yaparken cebindeki çikolatanın erimesi ile kazara keşfetmiştir. Daha sonraki çalışmalar mikrodalga fırınların, geleneksel fırınlara göre yiyeceklerin iç sıcaklığını daha çabuk arttırdığını göstermiştir. Bu gelişmelerden sonra, 1954 yılında ilk ticari mikrodalga fırın evlerde kullanılmaya başlamıştır [41, 42].

20. yy. sonlarına doğru modifiye edilmiş evsel mikrodalga fırınlar ile laboratuvar da deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Mikrodalga radyasyonunun organik sentezlere etkisi 1980'lerin ortasına kadar incelenmemiştir. Mikrodalga destekli organik kimya alanında ilk iki makale 1986'da yayınlanmıştır [43, 44]. Bundan sonra pek çok organik kimyacı mikrodalga enerjisi kullanımının sentetik reaksiyonları üzerine olan yararlı etkilerini kullanmıştır. Mikrodalga destekli organik sentez alanında (MAOS) 3000'den fazla makale yayınlanmıştır ve bu alandaki çalışmalar artarak devam etmektedir [45]. Mikrodalga enerjisi kullanılarak gerçekleştirilen organik reaksiyonlarla ilgili pek çok makale ve kitap yayınlanmıştır [46-48].

1980'lerde laboratuvarlarda kullanılmak üzere özel tasarlanmış endüstriyel mikrodalga fırınların üretimi başlamıştır. Bu çoklu mod (multi-mode) sistemler sıcaklık ve basınç sensörlü, otomatik güvenlik kontrolüyle donatılmış, sıkılaştırılmış kapı ile kapatılmış korozyona dayanıklı çelik bir kutu şeklindeydi. Bu sistemler büyük ölçekli laboratuvar çalışmaları için idealdi fakat küçük ölçekli sentetik kimya işlemlerinde bazı temel sınırlamaları vardı. Son zamanlarda, tek mod (single-mode) teknoloji ile daha bir örnek (uniform) ve yoğunlaştırılmış mikrodalga gücü üretmek mümkün hale gelmiştir. Bu yeni sistemler mikrodalga sentezde yeni kapasiteler sağlayan bilimde çığır açabilecek kilit faktörde özelliklere sahiptir [49, 50].

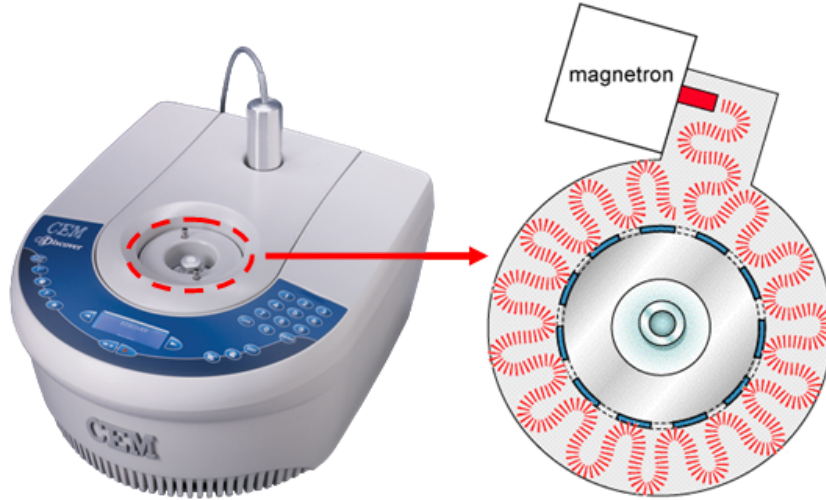
3.2. Mikrodalga Cihazları

Tekli mod ve çoklu mod olmak üzere 2 çeşit mikrodalga cihazı bulunmaktadır.

3.2.1. Tekli Mod Mikrodalga Cihazları

Tekli mod cihazının en ayırt edici özelliği, alanların karışımı ile sabit dalga örnekleri oluşturma kabiliyetidir. Bu alanlar aynı genişlikte fakat farklı salınım yönlerine sahiptirler. Bu ara yüz mikrodalga enerjisinin şiddetinin sıfır olduğu noktalarda düğüm (node) düzenleri oluştururken, mikrodalga enerjisinin büyüklüğünün en yüksek olduğu noktalarda antidüğüm (antinode) düzenleri oluşturur.

Bir tekli mod cihazının tasarımını yöneten faktör magnetronun numunenin uzaklığıdır. Bu uzaklıkla sabit elektromanyetik dalga örneğinin antidüğümünde (antinode) numunenin yerleştirilmiş olmasını kesinleştirmelidir. Şekil 1'de CEM firmasının Discovery tekli mod mikrodalga cihazı ve magnetronda üretilen mikrodalga'nın merkeze yönelmesi görülmektedir.



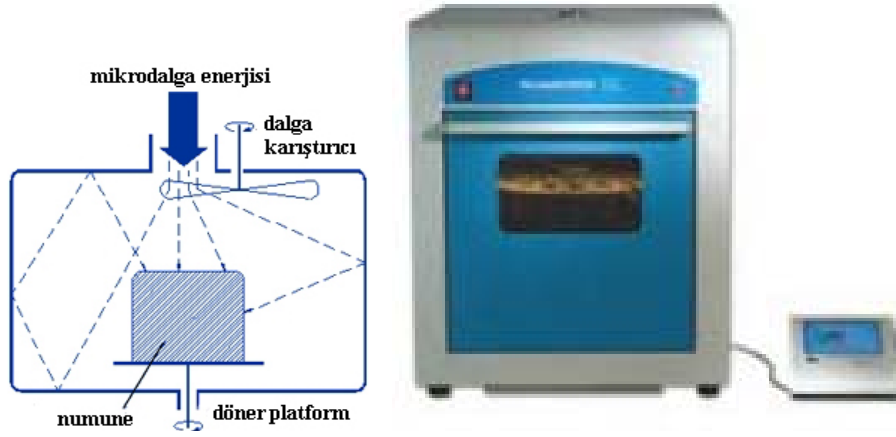
Şekil 1. Tekli mod mikrodalga cihazı [49] (Discovery, CEM).

Tekli mod cihazlarının avantajı yüksek ısıtma oranıdır. Bunun nedeni numunenin mikrodalga radyasyon yoğunluğunun en yüksek olduğu noktaya yerleştirilmesidir. Tekli mod cihazın dezavantajlarından biri her seferinde sadece bir numune kabı için uygulama gerçekleştirilmesidir. Bu cihazlar hacmi 0,2–50 ml olan kapalı kap koşulları (250 °C, 20 bar) ve 150 ml ye kadar ki açık kap koşulları için uygundur [47].

Bu cihazlarda reaksiyon karışımının soğutulması basınçlı hava veya özel bir düzenekle sıvı azot kullanılarak yapılabilir. Bu soğutma sistemi cihazın önemli bir özelliğidir. Sonuç olarak cihaz daha kullanışlı olmaktadır. Tekli mod mikrodalga ısıtma donanımları yaygın olarak küçük miktarlardaki ilaç sentezi, otomasyon ve kombinatoriyal kimya uygulamaları için kullanılmaktadır.

3.2.2. Çoklu Mod Cihazları

Çoklu mod cihazların en temel özelliği numuneye sabit dalga örneği gönderme uygulamasından kaçınılmasıdır. Şekil 2’de çoklu mod mikrodalga cihazının içindeki düzenek ve Milestone firmasının MicroSYNTH çoklu mod mikrodalga cihazı ve kumanda paneli gösterilmektedir.



Şekil 2. Çoklu mod mikrodalga cihazı (MicroSYNTH, Milestone).

Amaç cihazın içinde olabildiğince mikrodalga radyasyonunu dağıtabilmektir. Mikrodalga radyasyonu ne kadar dağıtılabilirse o derece yayılır ve cihazda ısıtma daha etkili gerçekleşir.

Sonuç olarak bir tekli mod mikrodalga cihazında sadece bir reaksiyon kabı bulunabilmesinin aksine bir çoklu mod mikrodalga cihazı, iç hacminin geniş olmasından dolayı çok sayıda reaksiyon kabını aynı anda bulundurabilir. Bu özellik sayesinde çoklu mod mikrodalga cihazı hacimli ısıtma ve kimyasal analiz yöntemleri için kullanılabilir. Çoklu mod cihazlarının birçoğunda, birkaç litrelik reaksiyon karışımlarının ısıtılması sağlanabildiği gibi bu reaksiyonlar açık ya da kapalı kap koşullarından her hangi birisine de sahip olabilir. Günümüzdeki araştırmalar ile tekli ve çoklu mod cihazlarında kilolarca madde hazırlanmasına imkân sağlayacak koşulların geliştirilmesi için önemli sonuçlar alınmıştır.

Çoklu mod cihazının en önemli dezavantajı dağıtılan radyasyonla ısıtılan numunelerin verimli şekilde kontrol edilememesidir. Bu nedenle de art arda ısıtılan benzer ya da aynı tip numuneler için eşit ısıtılma koşulları sağlanmayabilir.

4. PEPTİD SENTEZİ

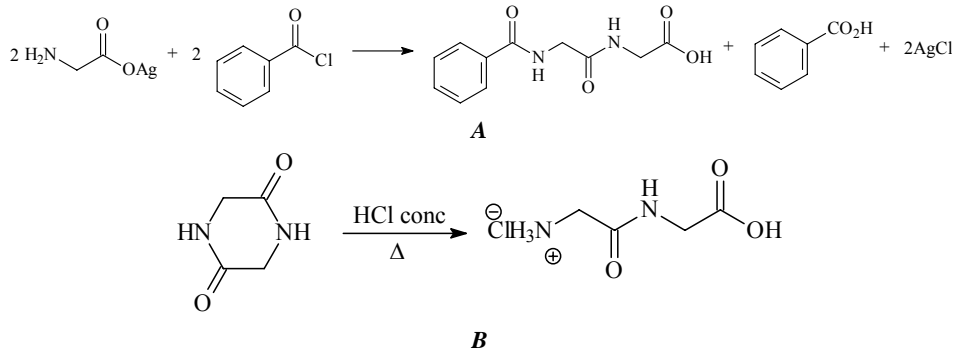
Peptid bir kimyasal yapı olarak, amino asit monomerlerinden oluşmuştur. 100'den fazla amino asitten oluşan yapılara protein adı verilmektedir. Peptidler yapılarında bulunan amino asitlerin fonksiyonel gruplarına ve dizilişine göre farklı özellikler gösterebilirler [51].

Peptid ve proteinlerin yer aldığı biyolojik işlemlerin ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olmak, bu işlemlerin kontrolü ve sonuçları bakımından büyük önem taşımaktadır. Peptidler hücre-hücre haberleşmesi, metabolizma, immün cevap ve üreme gibi pek çok biyokimyasal işlemde yer almaktadırlar [52, 53]. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerdeki çok büyük rolü onların potansiyel ilaç adayı olmalarını artırıcı etkiye yol açmıştır [48]. Son 10 yılda peptid araştırmalarında büyük artış olmuştur. Peptid araştırmaları alanında yılda ortalama 20.000 makale yayınlanmaktadır [51].

4.1. Peptid Sentezi Tarihçesi

Peptid sentezinin tarihçesi 1881 yılında Theodor Curtius'un doktora tezi sırasında ilk N- ucu korunmuş dipeptid olan benzoilglycylglycine'i glisininin gümüş tuzunu benzoil klorid ile

reaksiyona sokarak elde etmesi ile başlar [54]. Yine aynı tarihlerde Emil Fischer'inde [55] peptid sentezi çalışmaları vardır [56–58].



Şekil 3. **A** Theodor Curtius'un çalışması, **B** Emil Fischer in çalışması.

Sonraki yıllarda özellikle organik kimyacıların peptid sentezine ilgisi devam etmiştir. 1932 yılında $N\alpha$ koruma grubu olan Carboxybenzyl (Z, Cbz) geliştirilmiştir [59]. 1953 yılında du Vigneaud halkalı bir peptid olan Oxytocin hormonunu sentezlemiştir [60]. Bu çalışması ile du Vigneaud 1955 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür.

1962 yılına kadar peptid sentezi çözelti fazında gerçekleştirilmekteydi. 1962 yılında Bruce Merrifield, yeni bir çığır açan katı fazda peptid sentezi (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) metodunu geliştirmiş ve 1963 yılında yayınlamıştır [61]. Bu çalışmasıyla 1984 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür [62]. Merrifield aynı zamanda ilk yarı otomatik peptid sentez cihazını da geliştiren kişidir [51].

Peptid sentezi geleneksel olarak iki kategoride toplanır. Bunlardan biri klasik çözelti yöntemi, diğeri ise, katı faz yöntemleridir. Klasik metotlar, 20. yy. başından bu yana kullanılmakta olan bir yöntemdir. Son yıllarda çözelti yöntemi ile kısa peptid dizilerinin sentezi ilaç sektöründeki önemini korusa bile SPPS yöntemi ile peptid sentezi (özellikle uzun peptid dizilerinde) yaygınlaşmıştır [51].

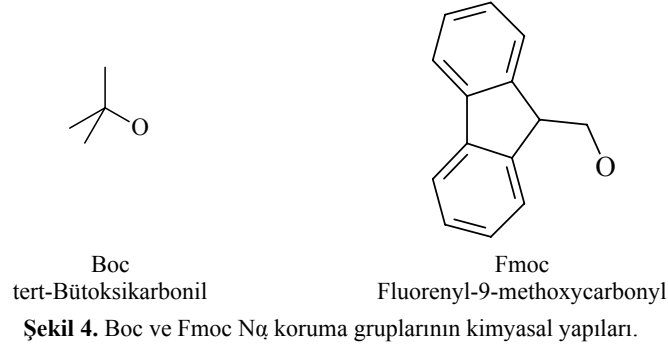
SPPS'nin prensibi oldukça basittir. Büyüyen zincir (peptid veya başka tür bir oligomer olabilir) stabil ve katı bir parçacık (katı faz, reçine) üzerine tutturulur. Ve sentez süresi boyunca bu reçine üzerinde bağlı kalır. Sentez sırasında diğer çözünebilir kimyasallar filtrasyon ve yıkama ile uzaklaştırılırlar. En son aşamada istenilen ürün katı fazdan ayrılır. Saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri istenilen ürünün serbest çözeltisi içinde devam ettirilir [63].

SPPS'de katı faz olarak genellikle yaklaşık 100-200 mesh (150-75 μm) boyutlarında polistiren reçine kullanılmakta ve peptid zinciri bu reçine üzerinde amino asitlerin birbirlerine eklenmesi ile uzamaktadır. Yine bu metotta amino asit yan zincirleri (R) ve amino asitlerin N- uçları koruma grupları ile korunmaktadır. Koruma grupları ile hem amino asidin yan zincirleri birbirleri ile reaksiyondan korunur hemde dizinin doğru olması (yani her amino asit eklenmesinde dizinin sadece 1 amino asit uzaması sağlanır).

Koruma gruplarının peptid sentezinde kullanılması büyük bir gelişmeye neden olmuştur. İlk geliştirilen ve bugün bile yaygın olarak kullanılan koruma grubu Benziloksikarbonil (veya Cbz)'dir [59]. Cbz, geliştiricisi olan Leonidas Zervas'ın adına ithafen Z olarak da adlandırılır.

Merrifield'in geliştirdiği metotta her amino asit eklenmesinde N- ucundaki ($N\alpha$) koruma grubu olan Boc'i, kaldırmak için TFA kullanmak gerekmektedir [64]. TFA çok güçlü bir kimyasaldır ve havadaki buharları, sağlık için tehlikeli bir kimyasal olan HF'i oluşturur [65].

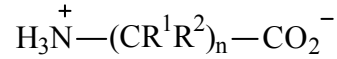
Bu zorluklar daha kolay uzaklaştırılabilen bir N α koruma grubu olan Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) koruma grubunun peptid sentezinde kullanılması ile bir ölçüde giderilmiştir [66]. Fmoc koruma grubu bazlara karşı duyarlı olduğundan piperidin, piperazin gibi bazlarla kolayca uzaklaştırılabilir.



4.2. Amino Asitlerin Adlandırılması

Peptidler amino asitlerin kondenzasyonla birleşmesi ile oluştuğundan, amino asitlerin adlandırılması ve özelliklerinin bilinmesi peptidler hakkında bilgi sahibi olmak açısından önemlidir.

“Amino asit” terimi genellikle *aminoalkanoik asit* ifadesi yerine kullanılır ve Şekil 5’teki gibi gösterilir. Bu gösterimde n=1 için α -amino asitler ve n=2 için β -amino asitler elde edilir. Şekil 5’te R¹ ve R², amino asit yapısında bulunabilen yan grupları temsil etmektedir.



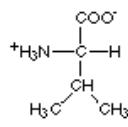
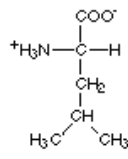
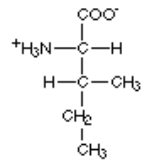
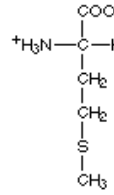
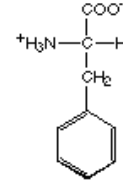
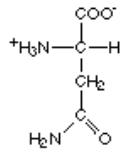
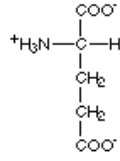
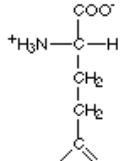
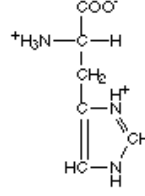
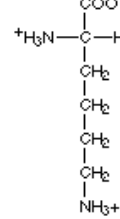
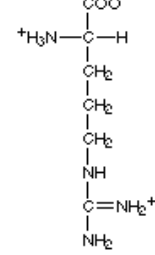
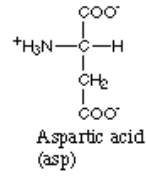
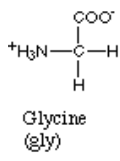
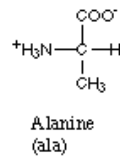
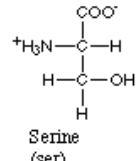
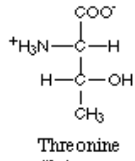
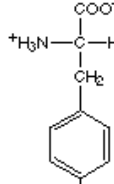
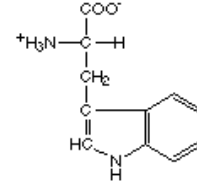
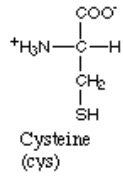
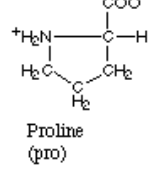
Şekil 5. Amino asitlerin genel formül gösterimi.

Amino asitlerin ve peptidlerin adlandırılması 1983’te Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından kabul edilen adlandırma ve semboller kuralları çerçevesinde yapılır [67]. Genelde amino asitler yaygın isimleri ile adlandırılırlar.

Doğada 700’den fazla amino asit tanımlanmış olup bunların çoğu α -amino asittir. Bunların tamamına yakını serbest halde ya da büyük moleküllere bağlı olarak (peptid veya proteinlerin bir bileşeni olarak ya da başka türlü yapıların parçası şeklinde), bakteri, fungi ve alglerden sağlanır.

20 amino asit (gerçekte, 19 α -amino asit ve 1 ω -amino asit) genlerin kontrolünde protein sentezi için canlı hücrelerde kullanılır. Bu 20 amino asit bütün yaşam formlarında peptid ve proteinlerin en temel yapı elemanları oldukları için çok özel bir yere sahiptirler.

“Kodlanmış amino asit” terimi, bu 20 amino asit için “protein amino asidi” yada “birincil protein amino asidi” terimlerinden daha iyi bir tanımdır ve çoğunlukla bu terim kullanılır.

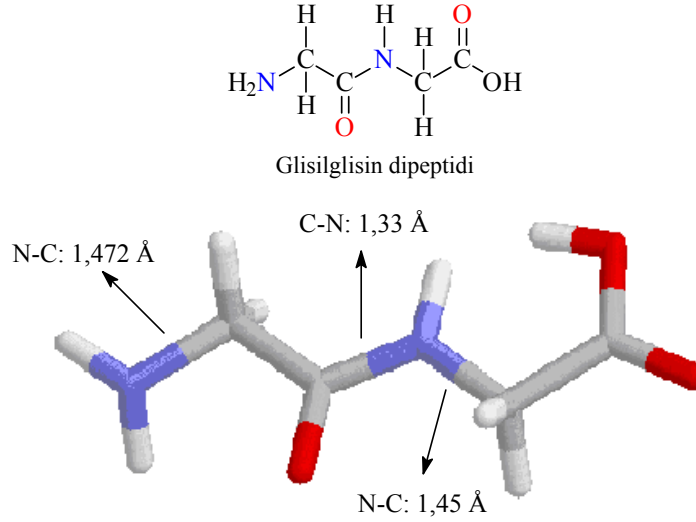
Yan grubu hidrofobik amino asitlerValine
(val)Leucine
(leu)Isoleucine
(ile)Methionine
(met)Phenylalanine
(phe)**Yan grubu hidrofilik amino asitler**Asparagine
(asn)Glutamic acid
(glu)Glutamine
(gln)Histidine
(his)Lysine
(lys)Arginine
(arg)Aspartic acid
(asp)**Diğer amino asitler**Glycine
(gly)Alanine
(ala)Serine
(ser)Threonine
(thr)Tyrosine
(tyr)Tryptophan
(trp)Cysteine
(cys)Proline
(pro)

Şekil 6. Amino asitlerin toplu halde şematik gösterimi.

4.3. Peptid Tanımı ve Adlandırılması

Peptidlerin adlandırılmasında da bazı temel kurallar vardır. Amino asitlerin peptid bağı ile bir araya gelmesi ile peptidler oluşur. İki aminoasidin (aa) bir araya gelmesi ile dipeptid, üç aa'in

biraya gelmesi ile tripeptid yapıları oluşur. Şekil 7'de bir di peptid olan glisilglisin ve 3 boyutlu yapısı gösterilmektedir.



Şekil 7. Peptid bağının ve bağ uzunluklarının Glisilglisin di peptidi üzerinde gösterimi.

Peptid bağı rezonanstan dolayı çift bağ karakteri taşır ve bağ uzunluğu (C-N 1.33 Å), sp^3 hibritleşmiş karbonla azotun yaptığı bağdan (1,45 Å) daha kısadır. Peptid bağının çift bağ karakterinden dolayı bu bağa katılan atomlar aynı düzlemedirler.

Oluşan bu peptidlerin adlandırılması da standart hale getirilmelidir. Bu standarda göre peptid dizisi yazılırken dizinin amino ucu (N- ucu) SOLDA ve karboksil ucu (C- ucu) SAĞDA olacak şekilde yazılır.



Şekil 8. Bir peptid dizisinde N- ve C- uçlarının gösterimi.

4.4. Amino Asitlerin ve Peptidlerin Fizikokimyasal Özellikleri

Amino asitlerin fizikokimyasal özellikleri aşağıda sıralanan maddelere göre belirlenir.

- 0-14 pH aralığında bulunan gruplara (amino, karboksil, tiol, fenolik hidroksi, guanidino ve amidazole),
- hidrofobik grupların (alkil, aril ve indol) varlığı veya yokluğuna,
- nötral hidrofilik grupların (alifatik hidroksi ve yan zincirdeki amid grupları) varlığı veya yokluğuna bağlıdır.

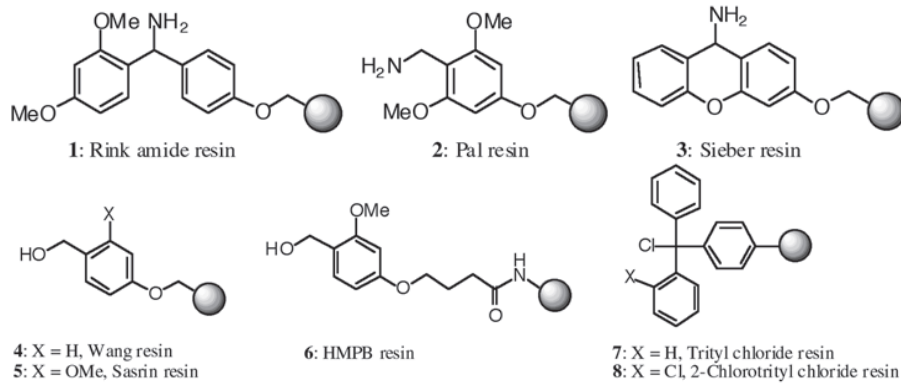
Peptidlerin özellikleri de aynı faktörlere bağlıdır. Fakat hatırlanmalıdır ki n amino asit içeren bir düz (linear) peptid zincirinde 1 adet amino ucu ve 1 adet karboksil ucu bulunmaktadır.

4.5. Peptid Sentezinin Mekanizması

Katı halde peptid sentezini (SPPS) gerçekleştirebilmek için katı hal olan reçineye ihtiyaç vardır. Reçine, üzerinde ilk amino asidin bağlanabileceği aktif gruplar taşıyan küresel formda bir polimer yumağıdır. Genelde bu kürenin çapı 100-200 mesh (150-75 µm) ölçüsü civarındadır. Reçine üzerindeki aktif grupların sayısı (substitution) sentezlenecek peptidin teorik verimini hesaplamada ve bu sentez için gerekli kimyasalların (korumanın kaldırılması, aktivasyon, bağlanma) miktarını belirlemede önemlidir.

SPPS de kullanılan katı faz, kimyasal olarak inert, mekanik olarak sağlam, kullanılan solventlerde hiçbir şekilde çözünmeyen ve kolayca filtre edilebilir olmalıdır. Kuru resin tanecikleri peptid sentezinde kullanılan solventlerle (DCM, DMF, vb.) 5-6 kat büyüklüklerine kadar şişme özelliğine sahip olmalıdırlar.

Reçine materyaline ilk amino asidin bağlanabilmesi için kimyasal fonksiyonel grup içeren linker adı verilen kimyasal yapılar bağlanır.

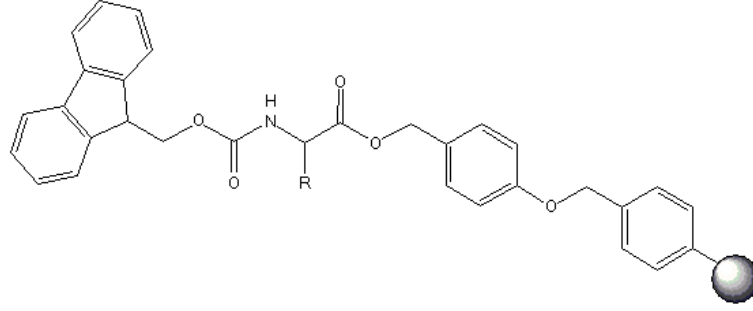


Şekil 9. Peptid sentezinde kullanılan reçine türleri.

Şekil 9'da 1, 2, 3 numaralı reçineler amid türü sentezde, 4 [68], 5, 6, 7, 8 numaralı reçineler ise asit türü sentezde kullanılan reçinelerdir [69]. Amid türü sentezde kırma (cleavage) işleminden sonra C- ucunda -NH₂ grubu bulunur. Asit türü sentezde ise kırma (cleavage) işleminden sonra C- ucunda -COOH grubu bulunur.

Bu reçineler ticari olarak temin edilebilmektedir. Sentezde kullanılan reçineler yüklenmiş (pre-loaded) ve yüklenmemiş (unloaded) olabilirler. Yükleme tabiri reçine üzerine ilk amino asidin bağlanması için kullanılır.

Reçine üzerine ilk amino asidin eklenmesi için özel prosedürler uygulanmaktadır. Ayrıca SPPS metodu ile ilk amino asidi reçineye tutturmak güçtür. Bu nedenle yüklenmiş reçine kullanmak daha avantajlıdır. Çünkü yüklenmiş reçinelerde dizinin ilk amino asidi reçine üzerinde önceden eklenmiş olarak bulunmaktadır [63].

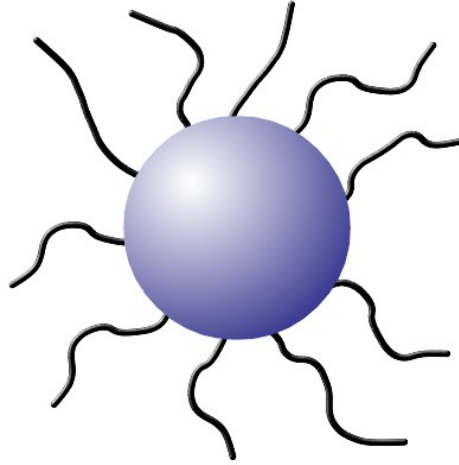


Şekil 10. Fmoc korumalı Ala amino asidi yüklenmiş Wang Reçinesi.

Yüklü reçinelerde kendi aralarında farklılık gösterirler.

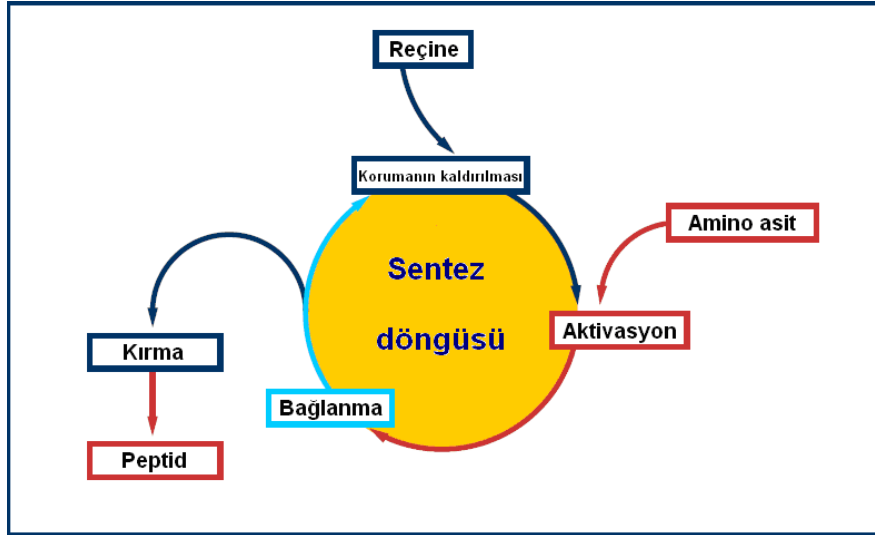
- Az yüklü (Lower loaded)
- Çok yüklü (Higher loaded)

Yüklemeden kaynaklanan bu özellik sentez için çok önemlidir. Çünkü çok yüklü reçine kullanıldığında reçine 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 reçineler tercih edilirler.



Şekil 11. Sentez sırasında reçine üzerinde peptid zincirinin durumu.

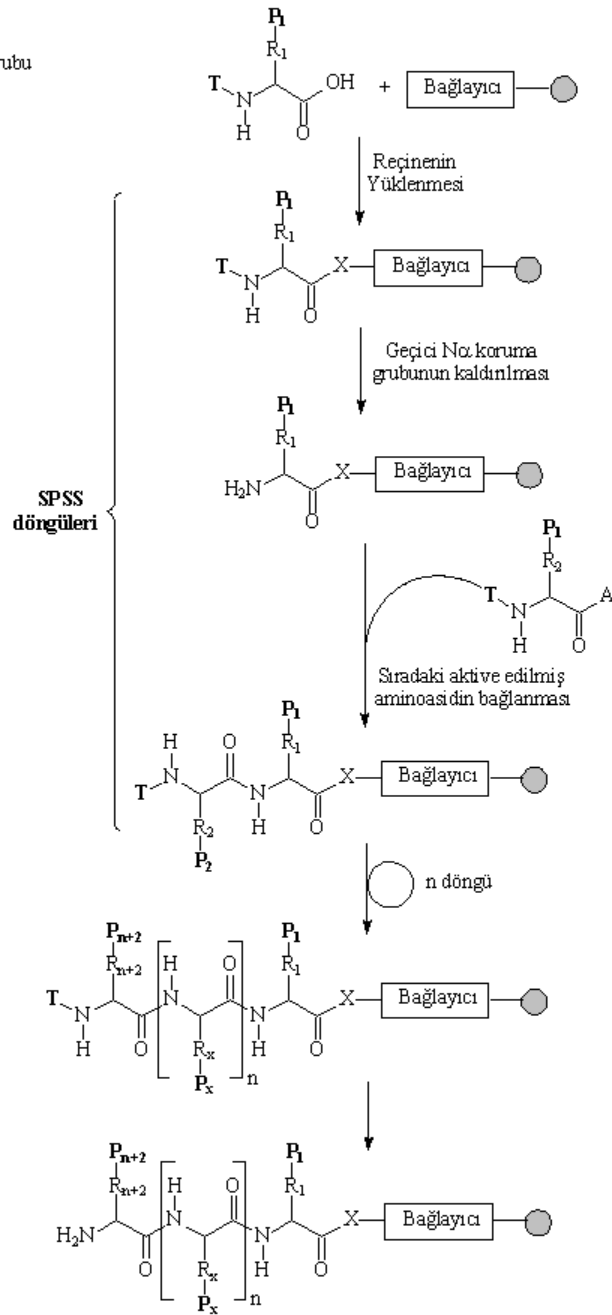
Katı halde peptid sentezi temelde 3 aşamadan oluşur. Korumanın kaldırılması (Deprotection), karboksil grubunun aktive edilmesi (Activation), peptid bağının oluşması (Coupling). Bu işlemler bir döngü halinde istenilen dizi elde edilene kadar devam eder. Son adımda, en son eklenmiş aminoasidin koruma grubu 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.



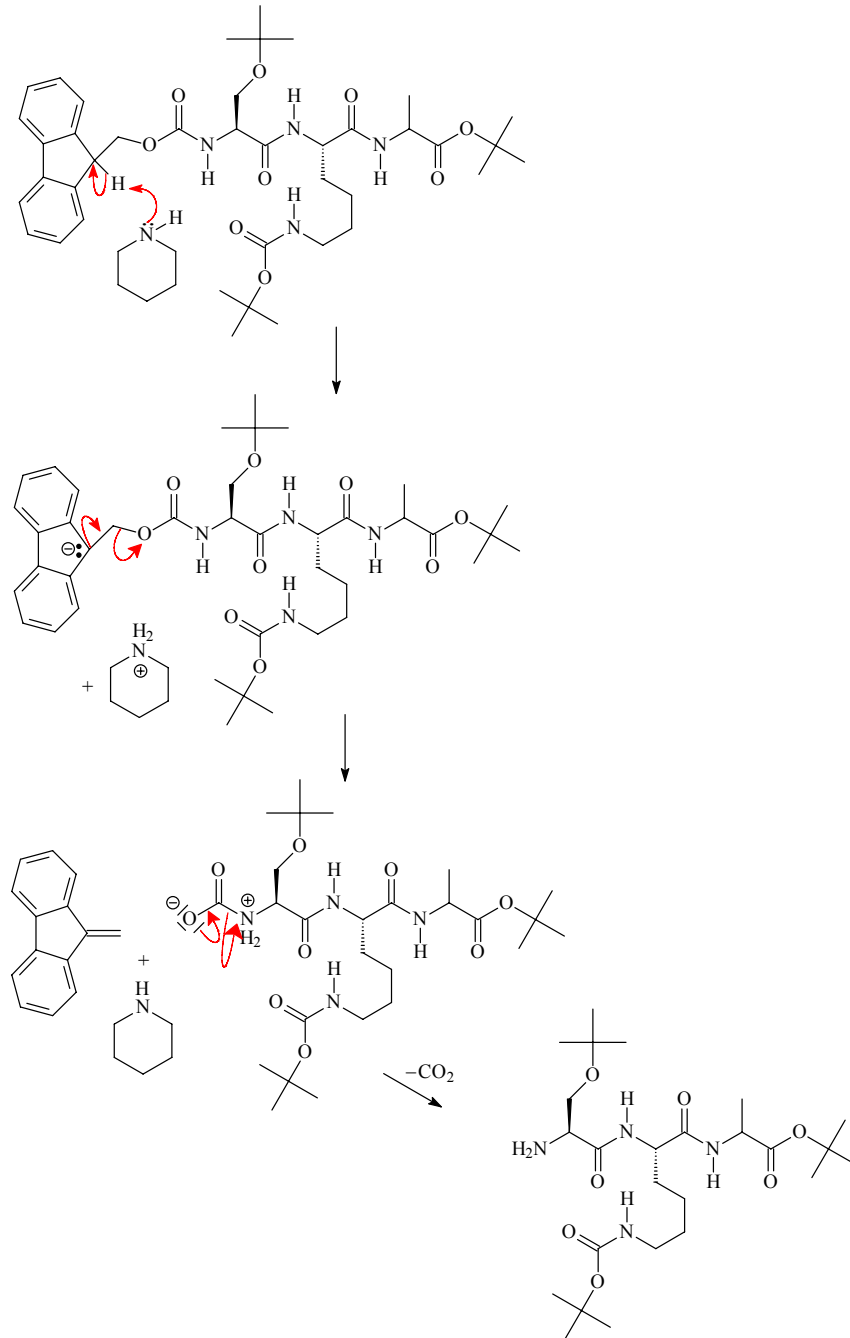
Şekil 12. Peptid sentezi döngüsü [49].

Dizideki peptidler sırasıyla (Fmoc grubundan itibaren); serin (ter-bütil eter korumalı), lizin (ϵ -O-ter-bütil carbamate korumalı), glisin (ter-bütil eter korumalı)'dir. Fmoc grubunun, yan zincir korumalı bir üçlü peptidin N- ucundan, E1_{cb} reaksiyonuna göre eliminasyonu Şekil 14'te gösterildiği gibidir. E1_{cb} reaksiyonu 2 aşamalıdır ve ara ürünü bir karbanyondur [71].

- P; Kalıcı yan-zincir koruma grubu
- T; Geçici No. koruma grubu
- ; Reçine
- A; Aktivasyon grubu
- X; NH veya O

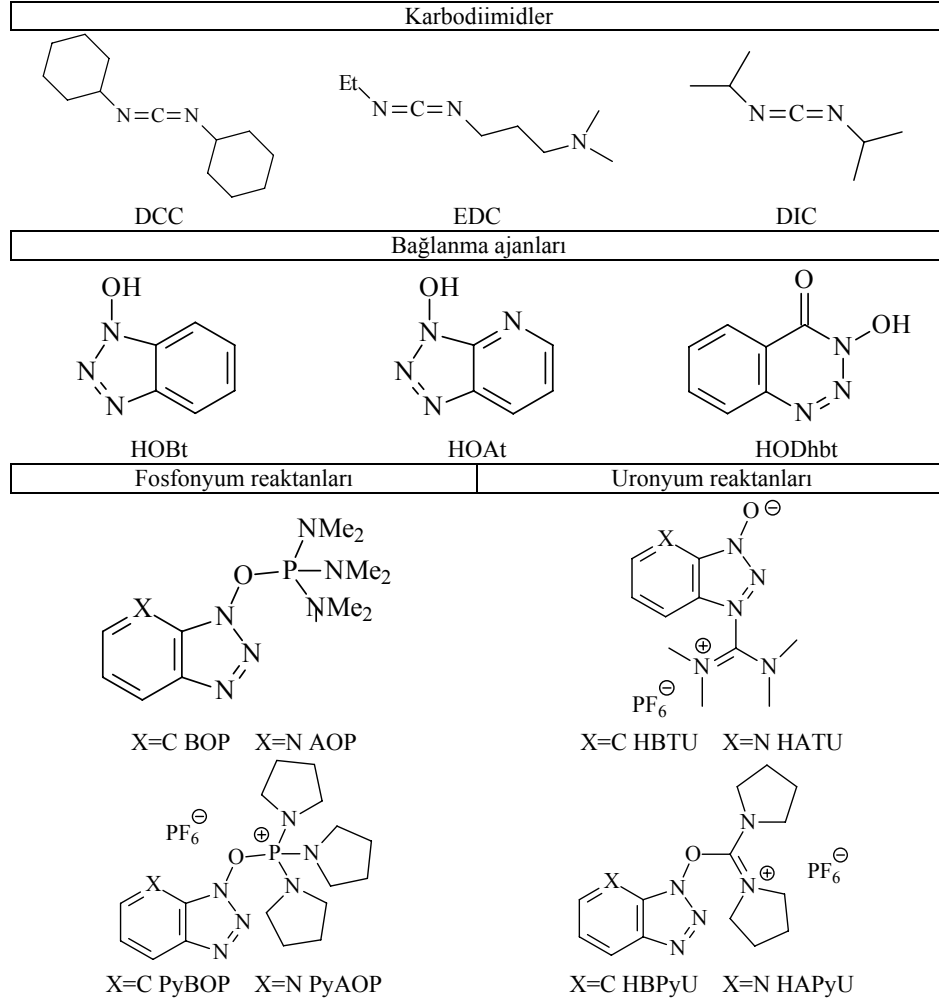


Şekil 13. SPSS'nin akım şeması [69].



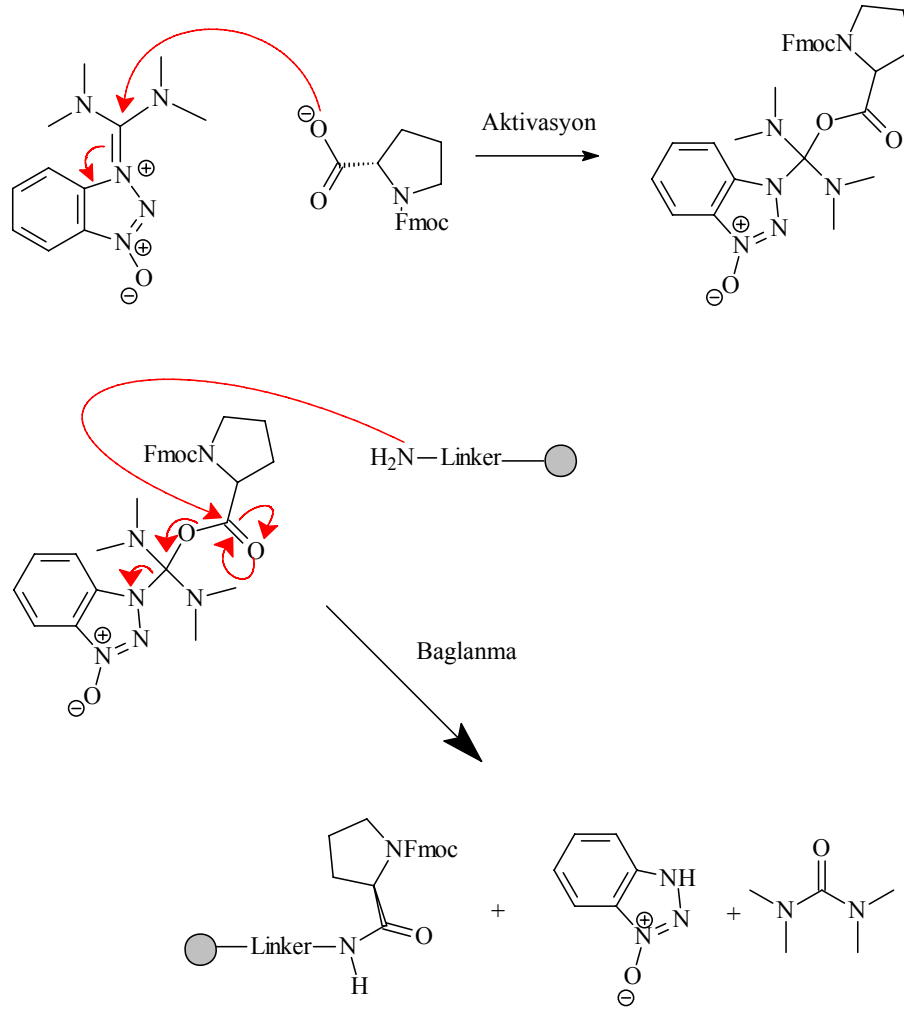
Şekil 14. Fmoc grubunun piperidinle eliminasyon mekanizması [70].

Peptid sentezinin başarısı, geçici (Fmoc, t-Boc) ve kalıcı (yan zincir koruma grupları) koruma gruplarının düzenlenmesi ile peptid zincirinin uzaması için seçilen aktivatörlerin etkinliğine bağlıdır. Zaman içinde yeni aktivatörlerin geliştirilmesi ile aktivatör etkinliği artırılmıştır [72].



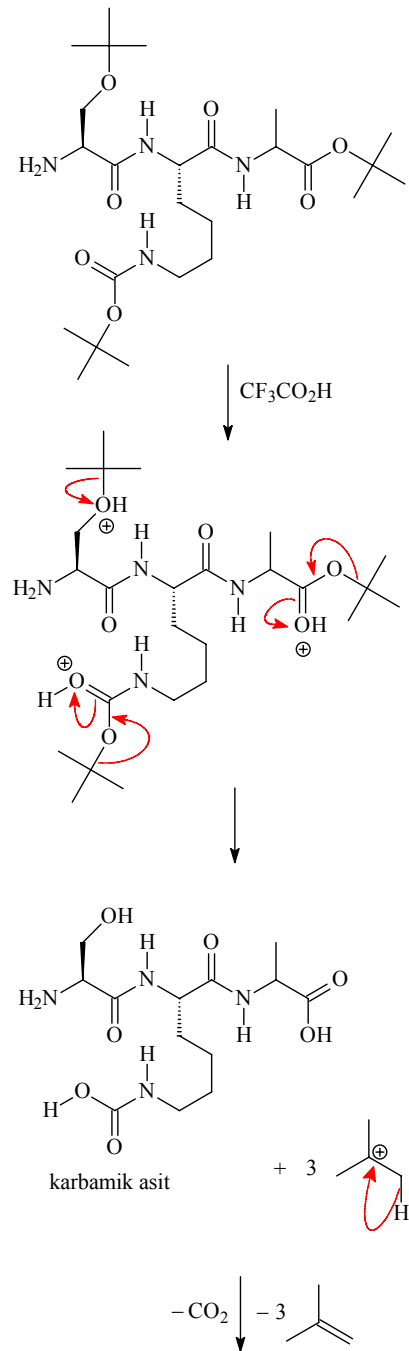
Şekil 15. Peptid sentezinde kullanılan aktivatörler.

Karbonil grubunun aktivasyonu Şekil 15'te gösterilen Karbodiimidler ile yapılabildiği gibi yeni geliştirilen Uronyum ve Fosforyum türü aktivatörlerle de yapılabilir. Günümüzde bu yeni türdeki aktivatörler, rasemizasyona daha az yol açtıkları için tercih edilmektedirler [51]. Şekil 16'da HBTU ile yapılan aktivasyon ve bağlanma reaksiyonları gösterilmektedir.

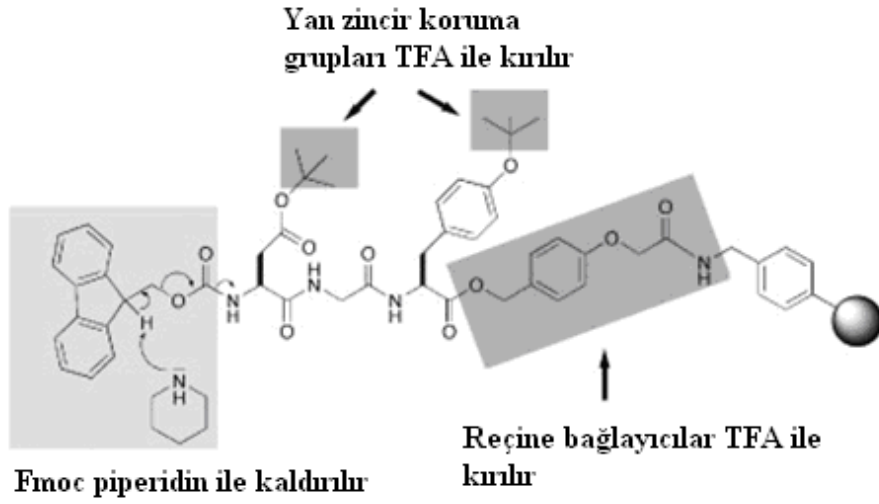


Şekil 16. Peptid sentezinin aktivasyon ve bağlanma aşamalarının mekanizması.

Karbamik asitten bir mol CO₂ ayrılması ile peptid molekülü son halini alır. Reaksiyon E1 reaksiyonudur ve karbokatyon üzerinden yürür. Şekil 17’de C- ucundaki amino asit olan glisin tersiyer bütül eter korumalı olarak gösterilmiştir. Daha geniş kapsamda düşünersek TFA ile kırma “cleavage” işlemi ile peptid dizisi reçineden de ayrılır.



Şekil 17. Peptid sentezinde yan zincir koruma gruplarının TFA ile eliminasyonunun mekanizması [70].



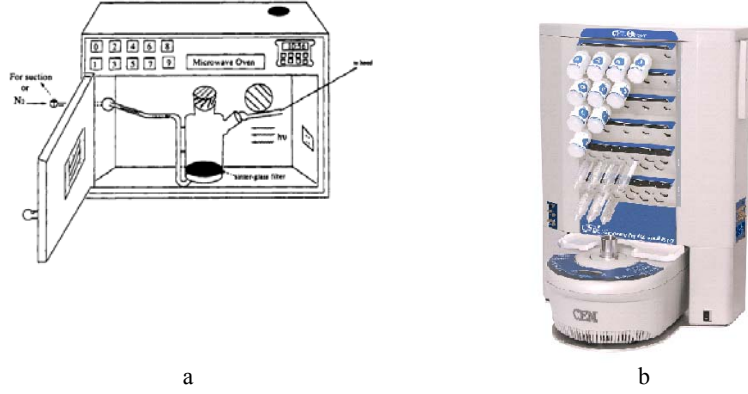
Şekil 18. Peptid sentezinde geçici ve kalıcı koruma gruplarının eliminasyonu [58].

Şekil 18’de gösterildiği gibi bağlayıcının peptide bağlandığı kısım kimyasal olarak yan zincir koruma grubunun ki ile aynıdır ve TFA etkisi ile peptid reçineden bu yolla ayrılır.

Kırma işlemi sırasında meydana gelen katyonik ürünlerin, yan zincirleri elektronca zengin Trp, Tyr ve Met gibi amino asitlere atak etmesini engellemek için “scavenger” adı verilen EDT, fenol, thioanisol vb. gibi ek maddeler kırma kokteyli ortamına eklenir. Bu maddeler genelde yumuşak (soft) nükleofildirler [73]. Scavenger’ların eklenmesinde dizide yer alan amino asitler dikkate alınmalıdır. Örneğin dizide Trp amino asidi olduğunda kırma kokteyline EDT eklemek Trp’yi oksidasyona karşı büyük ölçüde koruyacaktır [74, 75].

4.6. Peptid Sentezinde Mikrodalga Kullanımı

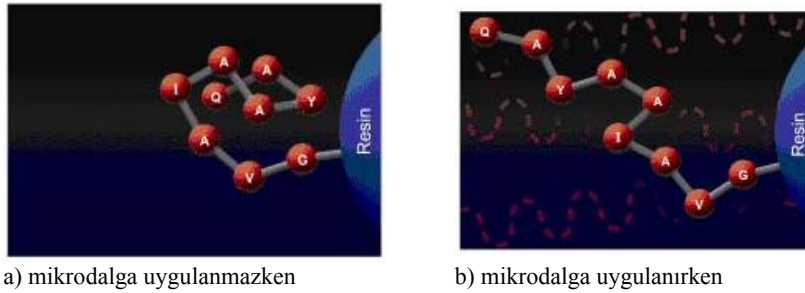
Peptid sentezinde mikrodalga kullanımı ilk kez 1992 yılında yapılan bir çalışma ile olmuştur. Bu çalışmada ev tipi bir mikrodalga fırın çeşitli modifikasyonlarla sentez yapılabilir duruma dönüştürülmüştür [76]. Şekil 19’da ilk mikrodalga destekli katı-faz peptid sentezinin yapıldığı ev tipi mikrodalga fırın ve günümüzde kullanılan otomatik mikrodalga destekli peptid sentezleyicilerden biri (Liberty, CEM) beraber gösterilmiştir [77].



Şekil 19. a) Mikrodalga fırın ve özel yapım katı-faz reaksiyon kabı [76].
b) Otomatik mikrodalga (tekli mod) destekli peptid sentezleyici (Liberty, CEM).

Bilindiği gibi mikrodalga fırınlar çoklu mod özelliğindedir. Bu tip çoklu mod cihazlarda sıcak noktalar oluşabildiğinden homojen bir enerji dağılımı söz konusu olamaz. Fakat tekli mod cihazlar mikrodalga enerjisini bir noktaya yönelttiğinden mikrodalga iletimi yönünden daha etkindirler.

Peptid sentezinde sürekli olarak mikrodalga enerjisi verilmemektedir. Mikrodalga enerjisi sadece reaksiyon sırasında belirlenen sürelerde veya belirlenen sıcaklığa ulaşılan kadar verilmektedir. Mikrodalga'nın dipol etkileşimlerden kaynaklanan titreştirme özelliği peptid sentezinde önemli etkinliğe sahiptir. Bu özellik mikrodalga enerjisinin ısısız olmayan (non-thermal effect) özelliği olarak adlandırılmaktadır [78, 79]. Mikrodalga'nın titreştirme özelliği sayesinde reçine üzerinde büyüyen peptid zincirinde meydana gelebilecek bir problem olan zincirlerin girişimi "agregasyon" engellenmiş olur. Sıklıkla uzun peptid dizilerinde karşılaşılan zincir girişimi dizide, eksik amino asit eklenmesi "deletion" gibi hasarlara yol açar. Sentez sırasında eksik amino asit eklenmesi sonuç ürünü direkt olarak etkiler.



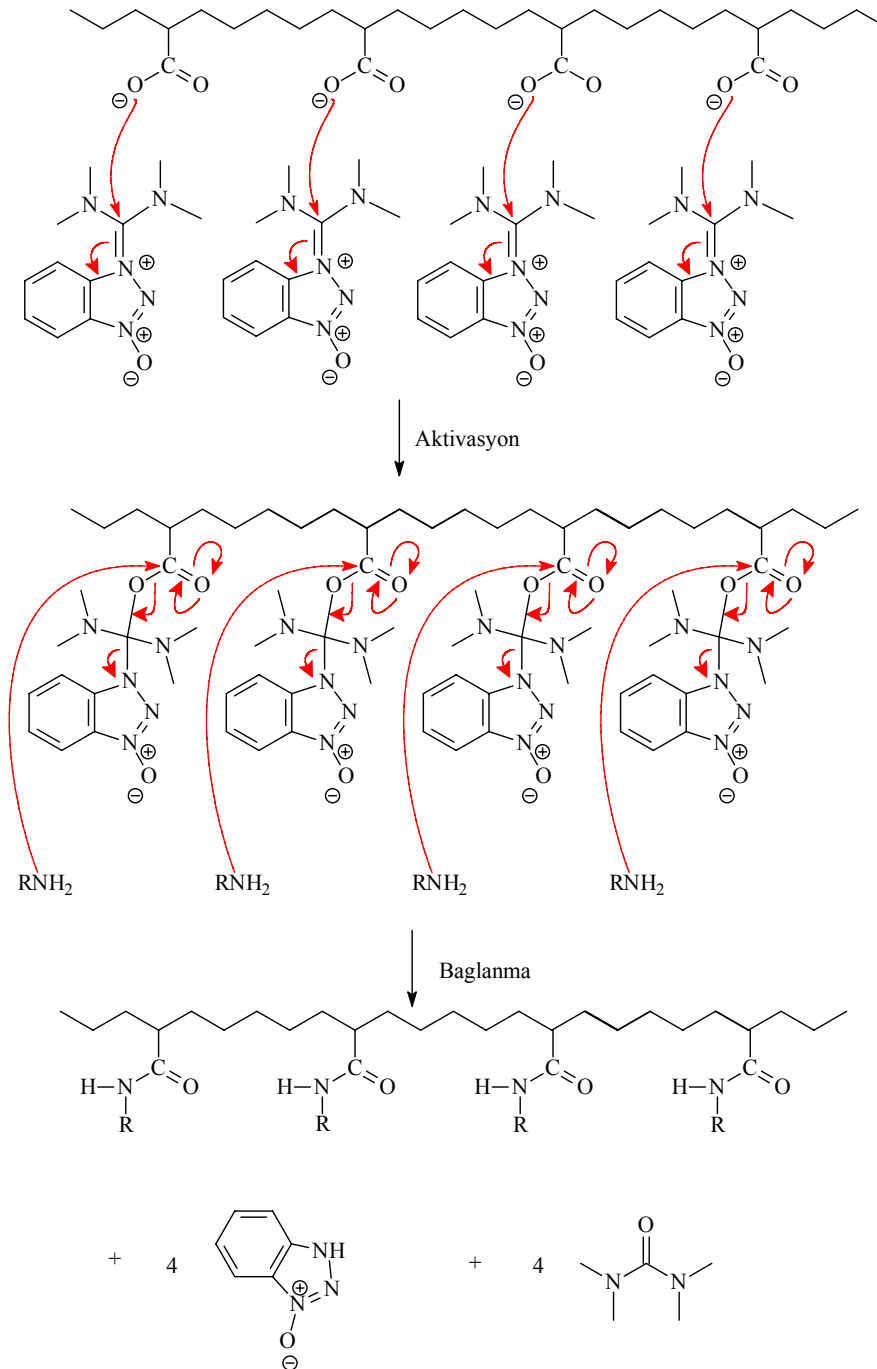
a) mikrodalga uygulanmazken

b) mikrodalga uygulanırken

Şekil 20. Mikrodalga'nın reçine üzerindeki peptid zincirine etkisi.

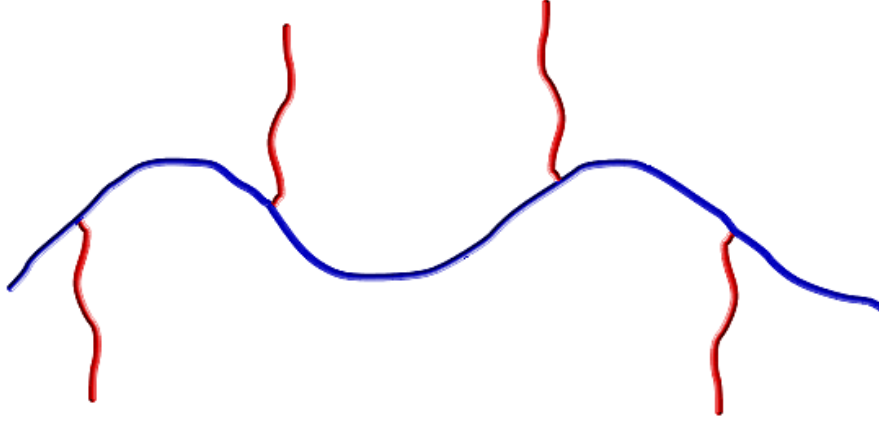
5. BİYOKONJUGASYON

Bu çalışmaya konu olan biyokonjugatların oluşumu polielektrolitlerle peptidlerin reaksiyon mekanizmasına benzer olarak Şekil 21'de gösterildiği gibi yürür. Burada aktivatör olarak HBTU kullanılmıştır.



Şekil 21. Peptid polimer konjugatının yeni yöntemle sentezinin mekanizması.

Polielektrolit olarak poliakrilik asit kullanıldığında peptidin $-NH_2$ grubu ile polielektrolitin $-COOH$ grubu arasında kovalent bağ oluşur. Bu sayede peptid gibi biyolojik kaynaktan gelen ve polielektrolit gibi farklı bir kaynaktan (xenobiotic) gelen moleküllerin bir araya gelmesi ile biyokonjugat yapısı oluşur.



Şekil 22. Polimer zincirine bağlı tek tip peptidle sentezlenen konjugatın teorik şematik gösterimi [81].

6. SONUÇ

Biyokonjugatlar kullanım alanı çok geniş yapılardır. Sıcaklığa, pH'a, vb. duyarlı polielektrolitler ile peptid, antikor vb. farklı özellikli moleküllerin bir araya getirilmesi ile sınırsız kullanım alanında biyokonjugatlar oluşturulabilir. Ayrıca biyokonjugatlar nano teknolojik yaklaşımların gelişimine katkıda bulunabilirler.

Amaca yönelik olarak tasarlanacak biyokonjugatların nanoteknolojide kullanımı yakın geleceğin araştırma konuları olacaktır.

Acknowledgments / Teşekkür

Haziran 2007'de aramızdan ayrılan YTÜ Biyomühendislik Bölümü kurucu başkanı, doktora hocam Mehmet Mustafa AKDESTE'yi saygıyla anıyorum.

KISALTMALAR

aa	Amino asit (Amino asitlere ait kısaltmalar Şekil 6'da verilmiştir)
Boc	BenzylOxyCarbonyl
Cbz	Carboxybenzyl
DCC	<u>Dicyclohexylcarbodiimide</u>
DCM	Diklor metan
DIEA	Diisopropil etil amin
DMF	Dimetil formamid
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDC	<u>N,N'-Diisopropylcarbodiimide</u>

EDT	Etan di tiol	
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl hexafluorophosphate Methanaminium	uronium
HBPyU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylene)uroniumhexafluorophosphate	
HBTU	N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide	
HCl	Hidroklorik Asit	
HCTU	1H-Benzotriazolium-1-[bis(dimethylamino)methylene]5-chloro hexafluorophosphate (1-),3-oxide	hexa-
HF	Hidroflorik asit	
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole	
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	
HODhbt	3-hydroxy-3,4-dihydrobenzotriazine-4-one	
PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	
RADAR	Radyo yönlendirme ve sıralama (Radio Direction And Ranging)	
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis	
TFA	Trifluoro asetik asit	

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Gold book Available from: <http://www.iupac.org/goldbook/BT06756.pdf>
DOI :10.1351/goldbook.BT06756 [Erişim Tarihi; October 12, 2010].
- [2] Ringsdorf H., "Structure and properties of pharmacologically active polymers", J. Polym. Sci., Polym. Symp. 51, 135–153, 1975.
- [3] Monfardini C., Veronese F.M., "Stabilization of substances in circulation", Bioconj. Chem. 9, 418–450, 1998.
- [4] Nucci M.L., Shorr R., Abuchoski A., "The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins", Adv. Drug Deliv. Rev. 6, 133–151, 1991.
- [5] Delgado C., Francis G.E., Derek F., "The uses and properties of PEG-linked proteins", Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 9, 249–304, 1992.
- [6] Katre N.V., "The conjugation of proteins with poly(ethylene glycol) and other polymers. Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential", Adv. Drug Deliv. Rev. 10, 91–114, 1993.
- [7] Zalipsky S., "Chemistry of poly(ethylene glycol) conjugates with biologically active molecules", Adv. Drug Deliv. Rev. 16, 157–182, 1995.
- [8] Duncan R., "Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy", Anti-Cancer Drugs 3, 175–210, 1992.
- [9] Maeda H., "SMANCS and polymer conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy", Adv. Drug Deliv. Rev. 6, 181–202, 1991.
- [10] Putnam D., Kopecek J., "Polymer conjugates with anticancer activity", Adv. Polym. Sci. 122, 55–123, 1995.
- [11] Dreborg S., Akerblom E.B., "Immunotherapy with monomethoxypoly(ethylene glycol) modified allergens", Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 6, 315–365, 1990.
- [12] Russell-Jones G.J., "The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery", Adv. Drug Deliv. Rev. 20, 83–97, 1996.
- [13] Okamoto C.T., "Endocytosis and transcytosis", Adv. Drug Deliv. Rev. 29, 215–228, 1998.

- [14] Takakura Y., Mahoto R.I., Hashida M., "Extravasation of macromolecules", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34, 93–108, 1998.
- [15] Veronese F.M., Morpurgo M., "Bioconjugation in pharmaceutical chemistry" *Il Farmaco* 54, 497–516, 1999.
- [16] Scranton A.B., Rangarajan B., Klier J., "Biomedical applications of polyelectrolytes, Biopolymers II". Berlin, Springer, 1995.
- [17] Mustafaev M.I., Osada Y., Endo T., "Advanced Biopolymer Systems", First Japanese-Turkish Workshop, TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, 1998, 1-76.
- [18] Shchukin D.G., Shutava T., Shchukina E., Sukhorukov G.B., Lvov Y.M., "Modified Polyelectrolyte Microcapsules as Smart Defense Systems" *Chem. Mater.*, 16, 3446-3451, 2004.
- [19] Sukhishvili S.A., Kharlampieva E., Izumrudov V., "Where Polyelectrolyte Multilayers and Polyelectrolyte Complexes Meet", *Macromolecules*, 39, 26, 8873–8881, 2006.
- [20] Larijani B., Rosser C.A., Woscholski R., "Chemical Biology Applications and Techniques", John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 2006.
- [21] Dautzenberg H, Jaeger W, Kötz J, Philipp B, Seidel Ch, Stscherbina D, "Polyelectrolytes" Munich, 1994.
- [22] Oosawa F, "Polyelectrolytes", New York. Marcel Dekker, 1970.
- [23] Manning G.S., "Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties", *J Chem Phys*; 51,924-934, 1969.
- [24] Morawetz H., Hughes W.L.J., "The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin", *J. Phys. Chem.*, 56, 64-69, 1952.
- [25] Robert V. Rice, Mark A. Stahmann, and Robert A. Alberty "The interaction of lysine polypeptides and bovine plasma Albumin", *J. Biol. Chem.* 209, 105–115, 1954.
- [26] Katchalski E., Berger A., Neumann H., "Reversible Inhibition of Pepsin by Polylysine", *Nature*, 173, 998-999, 1954.
- [27] Morawetz H., "Macromolecules in Solution", New York, 1965.
- [28] Mustafaev M.I., "Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives", *Turkish Journal of Chem. Soc.* 20, 126–138, 1996.
- [29] Radeva T., "Physical Chemistry of Polyelectrolytes", Marcel Dekker Inc., New York, 2001.
- [30] Mazumder M.A.J., Shen F., Burke N.A.D., Potter M.A., Stover H.D.H., "Self-Cross-Linking Polyelectrolyte Complexes for Therapeutic Cell Encapsulation" *Biomacromolecules*, 9, 2292–2300, 2008.
- [31] Donath E., Sukhorukov G.B.; Caruso F., Davis S.A., Mohwald H., "Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes", *Angew. Chem., Int. Ed.*, 37, 16, 2202–2205, 1998.
- [32] Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.I., Lvov Y., Mohwald H., "Entrapment of alpha-chymotrypsin into hollow polyelectrolyte microcapsules" *Macromol. Biosci.*, 1, 5, 209–214. 2001.
- [33] Petrov R.V., Mustafaev M.I., Norimov A.Sh., "Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes", Harwood Acad. publ. GmbH, UK., 1992.
- [34] Gao C.Y., Donath E., Mohwald H., Shen J.C., "Spontaneous deposition of water-soluble substances into microcapsules: Phenomenon, mechanism, and application", *Angew. Chem., Int. Ed.*, 41, 20, 3789–3793, 2002.
- [35] Liu X.Y., Gao C.Y., Shen J.C., Mohwald H., "Multilayer Microcapsules as Anti-Cancer Drug Delivery Vehicle: Deposition, Sustained Release, and in vitro Bioactivity", *Macromol. Biosci.*, 5, 12, 1209–1219, 2005.

- [36] Ye S., Wang C., Liu X., Tong Z., Ren B., Zeng F., "New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly", *J. Controlled Release*, 112, 1, 79–87, 2006.
- [37] Shalaby SW, Burg KJL, editors. "Absorbable and biodegradable polymers, (Advances in polymeric materials)", Boca Raton, CRC press, 2003.
- [38] Domb A.J., Wiseman D.M., editors. "Handbook of Biodegradable Polymers", Boca Raton: CRC Press; 1998.
- [39] Piskin E., "Biodegradable polymers as biomaterials". *J Biomat Sci Polym Ed.*, 6, 775–95, 1995.
- [40] Nair L.S., "Biodegradable polymers as biomaterials" *Prog. Polym. Sci.*, 32, 762–798, 2007.
- [41] Neas E.D., Collins M.J., "Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice", *J. American Chem. Soc.*, 2, 7-32, 1988.
- [42] Mingos D.M.P., Baghurst D.R., "Microwave-Enhanced Chemistry Fundamentals, Sample Preparation, and Applications", *American Chemical Society*, ch. 1, 3–53, 1997.
- [43] Gedye R., Smith F., Westaway K., Ali H., Baldisera L., Laberge L., Rousell J., "The use of microwave ovens for rapid organic synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 27, 279-282, 1986.
- [44] Giguere R.J., Bray T.L., Duncan S.M., Majetich G., "Application of commercial microwave ovens to organic synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 27, 4945-48, 1986.
- [45] Kappe C.O., Stadler A., "Microwaves in organic and medicinal chemistry", Wiley-VCH, 2005.
- [46] Lindström P., Tierney J., Wathey B., Westman J., "Microwave assisted organic synthesis – a review", *Tetrahedron*, 57, 9225, 2001.
- [47] Kappe C.O., "Controlled microwave heating in modern organic synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6250–6284, 2004.
- [48] Loupy A., "Microwaves in Organic Synthesis 2nd Ed.", Wiley-Vch, Weinheim, 2006.
- [49] Hayes B.L., "Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light", CEM Publishing, Matthews, NC, 2002.
- [50] Kappe C.O., Dallinger D., "The impact of microwave synthesis on drug discovery", *Nature Reviews, Drug Discovery*, 5, 51, 63, January, 2006.
- [51] Sewald N., Jakubke H., "Peptides: Chemistry and Biology", Wiley–VCH, 2002.
- [52] Nijkamp F.P., Parnham M.J., "Principles of Immunopharmacology", Birkhauser, Verlag, 2005.
- [53] Wnek G.E., Bowlin G.L., "Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical engineering", Informa Healthcare, USA, Inc. 52 Vanderbilt Avenue New York, NY, 2008.
- [54] Curtius T., "Ueber einige neue Hippursäureanalog substituierte synthetisch dargestellte Aminosäuren", *J. Prakt. Chemie*, 26, 145–208, 1882.
- [55] Fischer E., Fourneau E., "Ueber einige Derivate des Glykokolls", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34, 2868–2879, 1901.
- [56] Fields G.B. (Editor), "Methods in Enzymology, Volume 289 Solid-Phase Peptide Synthesis", Academic Press., 1997.
- [57] David I.J., Margaret M., "The Cambridge Dictionary of Scientists 2nd Ed.", Cambridge University Press., 2002.
- [58] Kimmerlin T., Seebach D., "100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies", *J. Peptide Res.*, 65, 229–260, 2005.
- [59] Bergmann M., Zervas L., *Chem. Ber.*, 65, 1192, 1932.
- [60] du Vigneaud V., et.al., "The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin", *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4879-4880, 1953.
- [61] Merrifield R.B., "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149–2154, 1963.

- [62] Merrifield, R.B., "Solid Phase Peptide Synthesis Nobel lecture", 8 December, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, 1984.
- [63] Atherton E., Sheppard R.C., "Solid Phase Synthesis; A Practical Approach", IRL Press., 1989.
- [64] McKay S.C., Albertson N.F., "New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis", J. Am. Chem. Soc. 79, 4686, 1957.
- [65] Dikshith, T. S. S., "Safe use of chemicals: a practical guide", CRC Press Taylor & Francis Group., 2008.
- [66] Carpino L.A., Han G.Y., "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group" J. Org. Chem. 37, 3404-3409, 1972.
- [67] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), (1984), "Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides Recommendations", Pure & Appl. Chem., 56, 5, 595-624, 1983.
- [68] Wang S., "p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments", J. Am. Chem. Soc., 95, 1328-1333, 1973.
- [69] Howl J., "Peptide synthesis and applications, Methods in molecular biology; 298", Humana Press Inc., 2005.
- [70] Bruckner R., "Advanced Organic Chemistry, Reaction Mechanism", Elsevier., 2002.
- [71] Smith M.B., March J., "March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure, 5th Ed.", John Wiley & Sons., 2001.
- [72] Albericio F., Bofill J.M., El-Faham A., Kates S.A., "Use of Onium Salt Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis", J. Org. Chem., 63., 9678-9683, 1998.
- [73] Jones J., "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford Science Publications, 1997.
- [74] Grant G.A. (Editor), "Synthetic Peptides: A User's Guide, 2. Ed.", Oxford University Press, Inc., 2002.
- [75] Ozdemir Z.O., Karabulut E., Topuzoğulları M., Mustafaeva Z.; "Difficulties In Synthesis and Characterization of Viral Capsid Peptides", Hacettepe J. Biol. & Chem., 36, 4, 329-337, 2008,
- [76] Yu H.M., Chen S.T., Wang K. T., "Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation", Organic Chemistry, 57, 18, 4781-4784, 1992.
- [77] Ozdemir Z.O., Mustafaeva Z., "Mikrodalga Enerjisi ve Peptid Sentezinde Uygulanması, Kimya & Sanayi, 42, 230, 24-27, 2009.
- [78] Doaa F. George, Marcela M. Bilek, David R; "Non-Thermal Effects in the Microwave Induced Unfolding of Proteins Observed by Chaperone Binding" Bioelectromagnetics 29: 324-330, 2008.
- [79] de la Hoz A, Diaz-Ortiz A, Moreno A., "Microwaves in Organic synthesis. Thermal and non-thermal effects", Chem Soc Rev 34,164-178, 2005.
- [80] Ozdemir Z.O., Karahan M, Karabulut E, Mustafaeva Z, "Characterization of Foot-and-Mouth Disease Virus's Viral Peptides with LC-ESI-MS", J. Chem. Soc. Pakistan 32, 4, 531-536, 2010.
- [81] Ozdemir Z.O., Mustafaeva Z., "The Importance of Peptides in Nanotechnology", 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 08-12 Haziran, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 2009.