

**ÜÇLÜ BLOK POLİ(ETİLEN GLİKOL)-b-[POLİ(LAKTİT-ko-SERİN-NH₂)] POLİMERLERİN SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF TRIBLOCK
POLY(ETHYLENE GLYCOL)-b-[POLY(LACTIDE-co-SERINE-NH₂)] POLYMERS**

MATIN YAZDANI KOHNESHAHRI

Dr. Öğr. Üyesi CENGİZ UZUN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ÜÇLÜ BLOK POLİ(ETİLEN GLİKOL)-b-[POLİ(LAKTİT-ko-SERİN-NH₂)] POLİMERLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Matin YAZDANI KOHNESHARI

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Cengiz UZUN

Temmuz 2023, 89 sayfa

Bu çalışmada; poli(etilen glikol)-b-poli(laktit-ko-serin-NH₂), (PLDSNH₂-PEG-PLDSNH₂) blok-kopolimerleri sentezi amaçlanmıştır. Üç aşamada gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşamasında Boc-serin-OH amino asidi ile laktit moleküllerinin tepkimesi sonucu (95°C sıcaklıkta, 15-30 saat ısıtılması sonucu) LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik yapılar sentezlenmiştir. LDS monomerlerin FT-IR spektrumlarında metil, metilen ve metin C-H gerilme bandları 3000-2800 cm⁻¹, aralığında gözlenmiştir. Monomer yapısında, ürean hidrojeni –HN-CO-, hidroksi –OH ve karboksi –COOH grubundaki aktif hidrojen gerilmesi 3500-2500 cm⁻¹, aralığında yayvan band olarak gözlenmiştir. Monomer yapısında ester karbonili, karboksilik asit, ürean olmak üzere üç adet karbonil (C=O) grubu 1736, 1720 ve 1690 cm⁻¹ dalga sayısında üçlü pik olarak gözlenmiştir. Laktit halkasının karbonil C=O gerilme titreşimi 1781cm⁻¹, monomer oluşumunda 1736 cm⁻¹ dalga sayısı ve 1364 cm⁻¹, dalga sayısındaki koruma grubunun (ter-butiloksikarbonil) metil (-CH₃) bükülme titreşiminin monomer spektrumlarında da gözlenmesi sentez aşamasında koruma grubunun bozunmadan kaldığını açıklamıştır.

LDS monomerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda; ter-butiloksikarbonil koruma grubunun $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ (metil) protonları 1,47 ppm, laktit metil ($-\text{CH}_3$) protonları 1,60 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir. Laktit halkasının açılarak serinin hidroksi grubuyla ester oluşturduğu 4,00-3,70 ppm metilen ($-\text{CH}_2-$) protonlarının esterleşme sonucu 4,70-4,42 ppm kimyasal kayma değerine kayması ile belirlenmiştir. LDS monomerinin ürean $-\text{NH-CO}$ protonu ve metin protonu $=\text{CH-NH-}$ sırasıyla 5,67 ve 3,40 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir. LDS monomerik yapıdaki laktik asit tekrarlanan gruplardaki metin (O-HCCCH_3-) protonu hem uç, hem de ester grubuna bağlı olarak zincir üzerinde olması nedeniyle ayrıca LD_2D , LD_3S gibi birden fazla laktit takılmış monomerik yapılar da olması nedeniyle yayvan olarak 5,10-5,50 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir.

MALDI-TOF-MS spektrumundan, Boc-serin molekülüne halka açılması sonucu bir ile üç arası laktit bağlandığı ve LDS, LD_2S LD_3S monomerik moleküllerin oluştuğu belirlenmiştir. Boc-serin molekülünün molar kütlesi 205,11 g/mol, laktit'in molar kütlesi 144,13 g/mol ve sodyumun molar kütlesi 22,99 g/mol olmak üzere toplam $205,11+144,13+22,99=372,23$ g/mol değeri, LDS monomeri için spektrumda 372,244 m/z değerinde gözlenmiştir. LD_2S monomeri için teorik değer $205,11+(2\times 144,13)+22,99=516,36$ g/mol olup spektrumda 516,201 m/z değerinde gözlenmiştir.

LDS monomerlerinin sentezi tamamlanıp, poli(laktit-ko-serin) (PLDS) kopolimerinin sentezi çalışılmıştır. 15 ve 30 ısıtma sonucu elde edilen LDS15 ve LDS30 monomerleri kullanılarak DCC polimerizasyonu ile PLDS15 ve PLDS30 kopolimerleri sentezlenmiştir. PLDS örneklerin kaydedilen MALDI-TOF-MS spektrumlarında 700-1700 m/z kütle aralığında oligomer pozitif iyon pikleri belirlenmiştir. PLDS15 ve PLDS30 polimerlerin kütle spektrumunda ağırlıklı olarak LDS, LD_2S monomerik birimlerin oluşturduğu belirlenmiştir. PLDS15 ve PLDS30 Polimerin spektrumunda gözlenen en büyük molar kütleli pikler sırasıyla 1408 m/z ve 1696 m/z pikleri olduğu, 1408 m/z pikinin DL_3S_5 ve 1696 m/z pikinin DL_5S_5 polimerik yapılara ait olduğu bulunmuştur.

PEG-b-PLDS blok kopolimer çalışmaları iki uç grubu karboksilenmiş PEG-diasit (PEGDA), ya da iki ucu hidroksi PEG-Diol (PEGDO) olan poli(etilen glikol) kullanarak çalışılmıştır. PLDS-PEG-PLDS blok kopolimerin karakterizasyonu MALDI-MS, FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Son çalışmada, PLDS-PEG-PLDS blok kopolimerin korunmuş-amin yan grupları nitrik asit ile uzaklaştırılarak blok PLDSAm-PEG-PLDSAm

kopolimeri sentezlenmiştir. PLDS kopolimer ve PLDSAm-PEG-PLDSAm blok-kopolimeri sentezlenmesi sonucu polimer ana zincirinde ardışık amin yan grup içeren yeni bir polimer sentezi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktit, Serin, PEG, Serin fonksiyonel blok kopolimerler, Serbest amin grubu içeren kopolimerler.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF TRIBLOCK POLY(ETHYLENE GLYCOL)-b-[POLY(LACTIDE-co- SERINE-NH₂)] POLYMERS

Matin YAZDANI KOHNESHARI

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Cengiz UZUN

July 2023, 89 pages

The aim of this study was to synthesize PLDSNH₂-PEG-PLDSNH₂ block copolymers in three stages. Firstly, LDS, LD₂S, and LD₃S monomers were synthesized by reacting Boc-serine-OH amino acid with lactide, heated at 95°C for 15-30 hours. FT-IR spectra of the LDS monomers showed stretching bands for methyl, methylene, and methine groups (3000-2800 cm⁻¹). Active hydrogen stretching bands for urethane, hydroxyl, and carboxylic acid groups were observed (3500-2500 cm⁻¹). Three carbonyl groups (ester, carboxylic acid, and urethane) were identified at 1736, 1720, and 1690 cm⁻¹. The presence of tert-butoxycarbonyl protection group was confirmed by (tert-butoxycarbonyl) methyl bending vibrations.

The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the LDS monomers revealed proton peaks corresponding to the tert-butoxycarbonyl protection group $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ at 1.47 ppm and lactide methyl protons at 1.60 ppm chemical shift values. The shifting of methylene protons in the range of 4.00-3.70 ppm confirmed the ester formation between the lactide ring and the hydroxyl group of serine. Protons from the urethane group and the methine proton $=\text{CH-NH-}$ of the LDS monomer were observed at chemical shift values of 5.67 and 3.40 ppm, respectively. The broad signal in the 5.10-5.50 ppm chemical shift range indicated the presence of lactic acid repeating units in the LDS monomer, which can occur due to both end and ester group attachment on the chain, as well as the presence of multiple lactide units such as LD_2S and LD_3S .

MALDI-TOF-MS analysis showed binding of one to three lactides to Boc-serine, forming LDS, LD_2S , and LD_3S monomers. Boc-serine's molecular weight was 205.11 g/mol, lactide was 144.13 g/mol, and sodium was 22.99 g/mol, totaling 372.23 g/mol. The LDS monomer spectrum exhibited an observed m/z value of 372.244, corresponding to its theoretical molecular weight. LD_2S monomer's theoretical molecular weight was 516.36 g/mol, and the observed m/z value was 516.201.

After the completion of LDS monomer synthesis, the study focused on the synthesis of poly(lactide-co-serine) (PLDS) copolymers. Using LDS15 and LDS30 monomers obtained by varying the reaction time, PLDS15 and PLDS30 copolymers were synthesized through DCC polymerization. The MALDI-TOF-MS spectra of PLDS samples showed positive ion peaks in the mass range of 700-1700 m/z , indicating the presence of oligomers. The predominant units in the PLDS15 and PLDS30 polymers were identified as LDS and LD_2S monomers. The highest molecular weight peaks observed in the spectra were determined to belong to specific polymer structures, with 1408 m/z corresponding to DL_3S_5 and 1696 m/z corresponding to DL_5S_5 .

The studies on PEG-b-PLDS block copolymers were conducted using PEG-diacid (PEGDA) with carboxyl end groups or PEG-diol (PEGDO) with hydroxyl end groups. The characterization of the PLDS-PEG-PLDS block copolymer was performed through MALDI-MS, FTIR, and $^1\text{H-NMR}$ studies. In the final stage, the protected amine side groups of the

PLDS-PEG-PLDS block copolymer were removed using nitric acid, resulting in the synthesis of a block copolymer with consecutive amine side groups, known as PLDSAm-PEG-PLDSAm. This synthesis allowed for the incorporation of consecutive amine side groups in the polymer main chain, representing a novel approach with potential new applications and functionalities.

Keywords: Lactide, Serine, PEG, Serine Functional Block Copolymers, Copolymers Containing Free Amine Group.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İ
ABSTRACT	İV
TEŞEKKÜR	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Fonksiyonel Polimerler	3
2.1.1. Fonksiyonel Polimerlerin Polimerizasyon Yöntemleri	4
2.1.2. Poli(Laktik Asit) (Pla)	6
2.1.3. Amino Asit Fonksiyonel Polimerler.....	8
2.1.4. Fonksiyonel Amino Asit Monomer Sentezi	12
2.1.4.1. Amin Grup Modifikasyonu.....	12
2.1.4.2. Karboksil Grup Modifikasyonu	13
2.1.4.3. Amino Asitlerin R Grubu	14
2.1.5. Polimer Fonksiyonlaştırma	16
2.1.5.1. Polimer Zincirinde Amino Asit İçeren Polimerlerin Sentezi.....	16
2.1.5.2. Polimer Zincirinin Amino Asitlerle Modifikasyonu	22

2.2. Amino Asit Kopolimerler	24
2.2.1. Serbest Amin Grubu İçeren Kopolimerler	26
2.3. Serin Amino Asidi İçeren Polimerler	31
2.3.1. Serin Homopolimerleri	32
2.3.2. Serin Kopolimerleri	33
2.3.2.1. Serin Ko-Poliester	34
2.3.2.2. Serin Ko-Poliamit	39
2.4. Kopolimerlerde PEG Modifikasyonu	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	51
3.1. Kullanılan Kimyasallar	51
3.2. Laktit Saflaştırma	51
3.3. DCC'nin Saflaştırılması	51
3.4. Boc-Serin-Laktit Monomerik Birimlerin Hazırlanması	51
3.5. Poli(Laktit-ko-Serin) Ko-Polimerinin Hazırlanması	52
3.5.1. Eriyik Polimerizasyonu	53
3.5.2. Azeotropik Kondenzasyon Polimerizasyonu	53
3.5.3. Disikloheksilkarbodiimit Kondenzasyon Polimerizasyonu	53
3.6. Poli(Laktit-ko-Serin-NH ₂) Ko-Polimerinin Sentezi	54
3.7. Spektroskopik Ölçümler	54
3.7.1. ATR-FTIR Analizleri	54
3.7.2. ¹ H-NMR Analizi	55
3.7.3. MALDI-TOF-MS İle Polimerlerin Molekül Ağırlığı Tayini	55

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	57
4.1. Spektroskopik Karakterizasyonlar	57
4.1.1 LDS Monomerin Spektroskopik Karakterizasyonu	57
4.1.1.1. LDS Monomerin FTIR Karakterizasyonu	57
4.1.2. ¹ H-NMR Karakterizasyon.....	60
4.1.2.1. LDS Monomerin ¹ H-NMR Karakterizasyonu	60
4.1.3. LDS Monomerin MALDI-TOF-MS Karakterizasyonu	63
4.2. Poli(Laktit-ko-Serin) Kopolimerin Sentez ve Karakterizasyonu	66
4.2.1. LDS Monomer Karışımının Eriyik Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu	66
4.2.2. LDS Monomer Karışımının Disikloheksilkarbodiimit Reaktif İle Kondenzasyon Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu	68
4.2.3. PLDS 30 Saat Polimerin ¹ H-NMR Karakterizasyonu	74
4.3. PEG-PLDS-PEG 30 Saat Üçlü-Blok Kopolimerin FT-IR ve ¹ H-NMR Karakterizasyonu.....	75
5. YORUMLAR	81
6. KAYNAKLAR	83
EKLER.....	88
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Laktitin Halka Açılma Polimerizasyonunda Kullanılan Katalizörler.	7
Şekil 2.2. Laktitin Stereoizomerleri.	7
Şekil 2.3. Amino Asit Fonksiyonel Polimerlerini Sentezlemek için Mevcut Olan Farklı Sentez Stratejilerini Vurgulamak için Amino Asit Organik Fonksiyonel Grup İçeriğine Göre Üç Kısma Ayrılmıştır. Bu Organik Grupların her biri Farklı Kimyasal Özellik İçerir	10
Şekil 2.4. Amino Asidin Vinil Grup Modifikasyonu.....	12
Şekil 2.5. Aspartik Aside Vinil Grubu Takılması ve Polimerleşme Tepkimesi.....	13
Şekil 2.6. Alanin Amino Asidinin Karboksi Grubu Üzerinden Vinil Modifikasyonu.	14
Şekil 2.7. Reaksiyonu R Grubuna Yönlendirmek için Koruyucu Grup İçermeyen bir Strateji.	15
Şekil 2.8. Sisteinden Zwitteriyonik Bir Monomerin Sentezlenmesi.	15
Şekil 2.9. Sı-Pımp Aracılığıyla Altın Üzerinde Pserma'nın Hazırlanması.....	16
Şekil 2.10. A-Amino Asit N-Karboksianhidritlerin (NCA'lar) Halka Açma Polimerizasyonu.	17
Şekil 2.11. Polipeptit Sentezi için Ortogonal Olarak Reaktif NCA'lar.....	18
Şekil 2.12. Çeşitli Ana Zincir Amino Asit Fonksiyonel Polimerler.....	21
Şekil 2.13. NH ₂ -PEG-PLA Sentez için Kullanılan Reaksiyon.....	26
Şekil 2.14. PLL-DOCA-MPEG-Cyc5.5'in Sentez Aşamaları	27
Şekil 2.15. PLGA-PEG-FA Kopolimerin Sentezi.	28
Şekil 2.16. Poli(1-lizin hidroklorür)-b-poli(1-lösin) blok kopolimeri.....	28
Şekil 2.17. Katyonik Özellikler Gösteren Polilizin İçeren PPA Kopolimerlerinin Sentezi.	30
Şekil 2.18. Amino Asit Tabanlı Homopolimerlerin ve Blok Kopolimerlerin Raft Polimerizasyonuyla Sentezi, Ardından Yan Zincir Boc Gruplarının Uzaklaştırılması.	30
Şekil 2.19. Etilakrilat Kullanılarak Rasemic Serin Sentezi.....	32
Şekil 2.20. O-Benzil-L-Serin'den Yola Çıkararak Poli-L-Serin Sentezi.....	33
Şekil 2.21. Serin-b-Poli(Laktit)-b-Poli (Etilen Glikol)-b-Poli(Laktit)-b-Oligomer Serin (OS-PLA-PEG-PLA-OS) Beşli Blok Kopolimerin Sentez Aşamaları.....	35

Şekil 2.22. mRNA'nın Taşıyıcısı Olarak Kullanılan Oligomerserin Ester Kopolimer Sentezi.	36
Şekil 2.23. Poli(Ser)-g-Poli(Phe) Kopolimer Sentez Aşamaları.	37
Şekil 2.24. Poli[(ε-Kaprolakton)-ko-(Serin Lakton)] (P(Cl-ko-Sl)) Sentez Aşamaları.	38
Şekil 2.25. [Pla(Glc-Ser)]/Hema Mikro Parçacık Ağlarının Sentez Aşamaları	39
Şekil 2.26. Poli(Serin)-g-Oktadekanoik Asit Graft Kopolimerin Sentez Aşamaları.	40
Şekil 2.27. Polietilenimin ve Poli(L-Serin)'den Oluşan Serin ko-Poliamit (PEI-PSER) Sentezi.	41
Şekil 2.28. Ubenimeks Antitümör Molekülü Modifiye Edilmiş, Lisin Amino Asit İçeren (PEG-b-Plys (Ube)) Kopolimer.	44
Şekil 2.29. Poli(Etilen Glikol)-b-[Poli(L-Serin)-g-Poli(D,L-Laktit)] Kopolimerinin Sentez Aşamaları.	46
Şekil 2.30. PLA-PEG-PLA Üçlü-blok Kopolimer Sentez Reaksiyonu.	46
Şekil 2.31. ST-NH-PEGX-PLay Kopolimerin Sentezini Gösteren Reaksiyon Aşamalar. ..	48
Şekil 2.32. mPEG-blok-poli(N-Tritil Serin Lakton) Kopolimer Sentezi.	49
Şekil 2.33. PLA-b-PEG-b-poliHis-Mal Kopolimerin Sentez Aşamaları	50
Şekil 3.1. Laktit-Boc-Serin Monomerik Birimlerin Önerilen Sentezi.	52
Şekil 3.2. LDS Moleküllerin Kondenzasyon Polimerizasyonu Tepkimesi.	54
Şekil 4.1. 25 Saat Isıtılmış LDS, LD, Kolondan Alınan LD ve Saflaştırılan LDS Monomerin FTIR Spektrumu.	58
Şekil 4.2. LD, Boc-Serin-OH ve 10, 15 20, 25, 30 Saat Isıtma Sonucu Elde Edilen LDS Moleküllerinin FTIR Spektrumu.	59
Şekil 4.3. Asidik Ortamda Laktitin Halka Açılma Mekanizması.	59
Şekil 4.4. LD, PLLA, N-Boc-Serin ve 30 Saat Isıtma ile Elde Edilen LDS Monomer Yapıların ¹ H-NMR Spektrumu.	61
Şekil 4.5. 3.5-7.5 PPM Kimyasal Kayma Aralığında; A) D ₂ O Eklenmiş N-Boc-D-Serinin Ve B) Saf Serin'in ¹ H-NMR Spektrumları.	62
Şekil 4.6. 15-30 Saat Isıtma (95°C) Sonucu Elde Edilen LDS Monomer Yapıların ¹ H-NMR Spektrumu.	63
Şekil 4.7. LDS Sentezinde 95°C Sıcaklıkta 15-30 Saat Isıtma Sonucu Elde Edilen Örneklerin MALDI-TOF-MS Spektrumları.	65
Şekil 4.8. LDS 30 Saat Monomerin, 120 °C Sıcaklıkta Vakumda ve N ₂ Atm. Sb ₂ O ₃ Katalizörü Varlığında ve Katalizörsüz 5 Saat Eriyik Polimerizasyonu Çalışılmış Örneklerin FTIR Spektrumları.	66

Şekil 4.9. LDS 30 Saat Monomerin, 120 °C Sıcaklıkta Vakumda ve N ₂ Atm. Sb ₂ O ₃ Katalizörü Varlığında 5 Saat Eriyik Polimerizasyonu Çalışılmış Örneğin MALDI-TOF-MS Spektrumu.	67
Şekil 4.10. LDS Monomerlerin DCC Polimerizasyon Tepkimesi.	69
Şekil 4.11. LDS 15 Saat Monomer ve DCC Polimerizasyonu Sonucu Örneğin FTIR Spektrumu.	70
Şekil 4.12. LDS 30 Saat Monomerin ve DCC Polimerizasyonu Sonucu Elde Edilen Örneğin FTIR Spektrumu.	70
Şekil 4.13. PLDS30 Polimer Örneğin MALDI-TOF-MS Pozitif Toplam İyon Spektrumu.	72
Şekil 4.14. PLDS15 Polimer Örneğin MALDI-TOF-MS Pozitif Toplam İyon Spektrumu.	73
Şekil 4.15. LDS ve LD ₂ S Monomerlerin Polimerizasyonunda Ortaya Çıkan N-Açıl Üre Aktarımı.	74
Şekil 4.16. LDS30 Monomer ve PLDS30 Polimer Örneklerin ¹ H-NMR Spektrumu.	75
Şekil 4.17. PEG600, PLDS30, PEG-PLDS-PEG 30 saat ve PEG-PLDS-PEG 15 saat Örneklerin FT-IR Spektrumu.	76
Şekil 4.18. PLDS30, PEG-PLDS-PEG 30 saat ve PEG-PLDS-PEG 15 saat Örneklerin ¹ H-NMR Spektrumu.	77
Şekil 4.19. PLDS ve Hidroksi Uç Gruplu PEG600'ün Kopolimerizasyon Tepkimesi.	78
Şekil 4.20. PEG-PLDS-PEG Blok Kopolimerin t-Bütüilkarboksi Koruma Grubunun Uzaklaştırılması Tepkimesi.	79
Şekil 4.21. PEG-PLDS-PEG Kopolimerinin Boc Grubunun HNO ₃ ile Uzaklaştırılması Sonucu Elde Edilen Örneklerin FT-IR Spektrumları.	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Amino Asitlerin Organik Fonksiyonel Gruplarının Polimer Yapısında Yer Aldığı Tepkime Çeşitleri.....	11
Çizelge 2.2. PAA Bazlı Materyallerin Özeti.....	25
Çizelge 2.3. Piyasaya Başarıyla Sunulmuş PEG ile Modifiye Edilmiş Bazı İlaçların Listesi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

®	Tescillidir
m/z	Kütle/yük sayısı (g/z)
γ	Gamma

Kısaltmalar

ROP	Halka Açılma Polimerizasyonu
ATR-FTIR	Yansımali Tersinir Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
DCM	Diklorometan
TFA	Trifloroasetik asit
PAA	Poliamino asit
GC	Gaz Kromatografisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
MTT	Hücre Canlılık Testi
DLS	Dinamik Işın Saçılması
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
NCA	N-karboksianhidrit
PLiz	Polilizin
PSER	Poliserin

1. GİRİŞ

Biyobozunur ve biyoyumlu blok kopolimerlerin sentezi ve biyokimyasal uygulamalarda kullanımı bir çok bilim insanı tarafından incelenmektedir. Bu polimerlerin benzersiz yapısal özellikleri, farklı alanlarda kullanılmalarını mümkün kılar. Kopolimerizasyon, stereokopolimerizasyon ve karıştırma gibi yöntemlerle bu özellikler değiştirilebilir, böylece çok çeşitli uygulama alanlarına olanak sağlanır. Özellikle poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(laktik asit) (PLA) polimerinden hazırlanan blok kopolimerler, bu alanda sıkça kullanılan materyallerdir [1]. PLA'nın tamamen biyoyumlu ve biyobozunur olması, hidrofobik özelliklere sahip olması, yüksek mekanik dayanıklılığı ve farklı polimerlerle karışabilirliği, tercih edilme nedenlerindedir [2]. PLA, vücut içerisinde enzimatik olarak parçalanarak zararsız ürünlere dönüşebilir. Bu özellikler, biyobozunur ve biyoyumlu blok kopolimerlerin biyomedikal alanında geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir [3].

Laktik asit tabanlı homo ve ko-polimerler; kondenzasyon ve halka açılması polimerizasyonu (ROP) yöntemleriyle sentezlenir [4]. PEG, molekülün dallanmış, yıldız ve tarak benzeri farklı konfigürasyonlarda sentezlenebilme özelliğine sahiptir [5]. PEG polimeri vücudun bağışıklık sistemini uyarmadan polimer-ilaç sisteminin uzun süre vücutta dolaşmasını sağlamaktadır. PEG molekülü, polimer zincirlerine hidrofiliklik kazandırarak suyu seven ilaçların hücre içine taşınmasını kolaylaştırır. PEG tabanlı poli (laktik asit)'in kopolimerleşme potansiyeli yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Glikolik, [6] ϵ -kaprolakton, 1,5-dioksepan-2-on, poli(etilen glikol) veya poli(propilen glikol) gibi makromonomerler ile sentezlenmiş kopolimerler yayınlanmıştır. Bu kopolimerlerde istenilen en önemli husus biyobozunurluk ve toksik etkiler göstermemesidir [7].

Laktik asit/laktit ve fonksiyonel amino asitlerin (Serin, Metionin, Lizin vb.) kopolimerizasyonu, polilaktik asit bazlı malzemelerin kimyasal modifikasyonunda önemli bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntem, polimerlerin yapısal özelliklerini çeşitlendirmek ve özel uygulamalara yönelik özellikler kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Son zamanlarda serin ve lysin gibi protein bazlı kopolimerin sentezi bu

polimerlerin göstermiş olduğu avantajlardan dolayı, ilgi görmektedir. Protein bazlı kopolimer düşük toksisite immünojenisiteyi sağlar ve ayrıca doğal peptit ve proteinlere kıyasla enzimatik parçalanmaya dayanıklılık gibi özellikler sergilemektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalara bakıldığında, polilaktik asit (PLA) homopolimeri ve kopolimerlerinin çeşitli kullanım alanlarına sahip olduğu görülmektedir. Yukarıda sözü edilen çalışmalar incelendiğinde polilaktik asit homopolimeri ve kopolimerleri çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Dolayısıyla bu çalışmada; daha önce sentezlenmemiş serbest amin yan grupları olan üçlü blok poli(etilen glikol)-b-[poli(laktit-ko-serin-NH₂), (PEG-b-PLDSAm)], polimerleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Üç aşamada gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşamasında Boc-serin-OH ve laktit molekülleri molce 1/3 oranında THF çözücüsünde çözülerek basınçlı reaktörde 90 °C sıcaklıkta 15-30 saat ısıtılarak LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik yapılar sentezlenmiştir. Monomerler MALDI-TOF-MS, ATR-FTIR ve ¹H-NMR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Laktit fazlası kolonda ayrılan LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik yapıların bir ucu hidroksi, bir ucu karboksi olması nedeniyle kondenzasyon polimerizasyonu yapılarak poli(laktit-ko-serin), (PLDS), polimeri sentezi çalışılmıştır. Eriyik, Azeotropik kondenzasyon ve disiklohekzilkarbodiimit reaktifi ile kondenzasyon polimerizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PLDS kopolimerleri MALDI-TOF-MS, ATR-FTIR ve ¹H-NMR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. PEG-b-PLDS blok kopolimer çalışmaları iki uç grubu karboksilenmiş PEG-diasit (PEGDA), ya da iki ucu hidroksi PEG-Diol (PEGDO) olan poli(etilen glikol) kullanarak çalışılmıştır. PEG-b-PLDS blok kopolimerin karakterizasyonu MALDI-TOF-MS, ATR-FTIR ve ¹H-NMR çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Son çalışmada, PEG-b-PLDS blok kopolimerin korunmuş-amin yan grupları trifloro asetik asit (TFA) ile uzaklaştırılarak blok (PEG-b-PLDSAm) kopolimeri sentezlenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Fonksiyonel Polimerler

Geleneksel polimerler plastikler, suni elyaflar, kauçuklar ve boya kaplamaları gibi günlük hayatımızda kullanılan malzemelerdir. Bununla birlikte, modern toplumun gelişmesiyle birlikte, geleneksel polimerlerin tüm ihtiyaçları karşılayamadığı gerçeği, daha özel işlevlere sahip yeni polimerlerin geliştirilmesini son derece önemli kılmıştır. Bu tür polimerlere, enerji toplama ve depolama, kablosuz iletişim endüstrisi, biyotıp, petrol/su veya gaz ayırma ve akıllı ve biyonomik endüstriler gibi birçok alanda potansiyel uygulamaları olan gelişmiş fonksiyonel polimerler adı verilmektedir [8]. 1960'larda geliştirilen fonksiyonel polimer bilimi, polimer kimyası, polimer fiziği, malzeme bilimi, enerji, biyoloji, nanobilim ve çevre bilimlerini kapsayan disiplinler arası bir bilim haline gelmiştir [9].

Geleneksel polimerik malzemelerin mekanik özelliklerinin yanı sıra, gelişmiş fonksiyonel polimerik malzemeler ayrıca aşağıda sıralanmış özellikler göstermektedirler [10].

- kimyasal reaktivite
- ışığa duyarlılık
- elektriksel iletkenlik
- katalitik özellikler
- biyoyumluluk
- biyolojik aktivite
- farmakolojik özellikler
- seçici ayırma
- enerji dönüşümü

Fonksiyonel polimerler sahip olduğu özellikler sayesinde modern endüstrinin ve ileri teknolojinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Modern toplumun gelişimi için gerekli olan büyük talebi karşılamak için yeni fonksiyonel polimerlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişmiş fonksiyonel polimerler, birçok alanda araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. Fonksiyonel polimerler nerdeyse alanların bir çoğunda kayda değer bir şekilde kullanılmaktadır. Fonksiyonel polimerlerin uygulama alanları aşağıda sıralanmıştır [10].

- İletken polimerler
- İlaç ve gen dağıtımı için miseller veya veziküller
- Polimer jeller
- Organik güneş pillerinde kullanım için polimerik akseptör ve/veya donörler
- Doku mühendisliğinde skafold yapımında
- hafızalı polimerler
- Uyarılara duyarlı polimerler
- Ayırma membranları
- Işıldayan polimerler (luminesans polimerler)
- Supramoleküler polimerler (SP'ler)

Bu alanda kullanılan fonksiyonel polimerler, amaca bağlı olarak tekli veya çoklu homo veya hetero fonksiyonel gruplara sahip olabilirler. Son altmış yılda kullanım amacına uygun fonksiyonel polimerlerin elde edilmesi için bir çok grup tarafından çalışmalar devam etmiştir ve bu çalışmalar sayesinde fonksiyonel polimerlerin sentezi için farklı yöntemler geliştirilmiştir.

2.1.1. Fonksiyonel Polimerlerin Polimerizasyon Yöntemleri

Fonksiyonel polimerlerin sentezinin en temel unsuru, bu polimerlerin elde etmesi için kullanılan yöntemin minimum aşamaya sahip olması ve aynı zamanda ise yüksek bir verimlilikle elde edilmesidir. Bu nedenden dolayı yeni polimerizasyonların geliştirilmesine yönelik bir çok grup tarafından çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte genel olarak fonksiyonel polimerlerin sentezi için kullanılan metodlar aşağıda sıralanmıştır [10].

- Kontrollü radikal polimerizasyon (CRP): CRP veya tersinir-deaktivasyon radikal polimerizasyonu (RDRP), sayısız uygulama için hafif koşullar altında hazırlanabilen iyi tanımlanmış polimerlere uzman olmayanların erişmesine izin vererek polimer kimyası ve malzeme bilimi alanını yeniden şekillendirmiştir. CRP, hareketsiz ve aktif radikaller arasındaki dengeyi kontrol etmek amacıyla

reaksiyonu sadece sonlandırmak için değil ayrıca zincir transferinin gerçekleşmesinde ve polimerizasyon kontrolündeki dengeyi uyuyan türlere doğru yönelterek gerçekleşmesini sağlamaktadır [11].

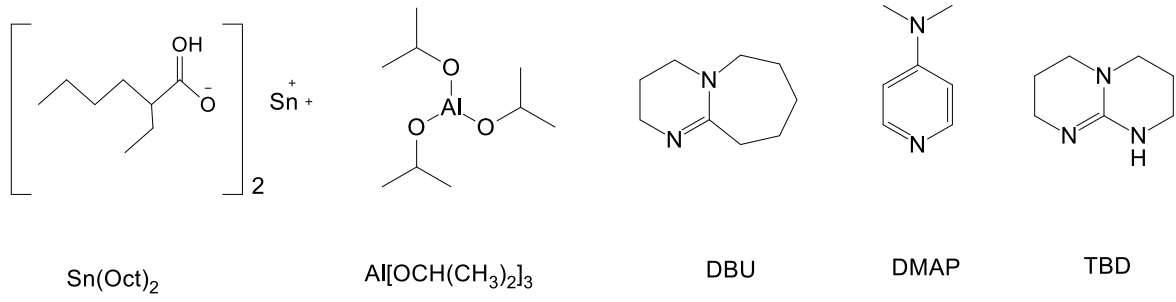
- Alkin-bazlı klik polimerizasyonu: Bu reaksiyon ilk kez 2001'de Sharpless ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Klik kimyası çeşitli alanlarda birçok bilim insanına ilham vererek çeşitli fonksiyonel polimerlerin sentezine büyük katkıda bulunmuştur. Yüksek verimlilik, atom ekonomisi, ılımlı reaksiyon koşulları, iyi fonksiyonel tolerans, kolay izolasyon prosedürü ve bölgesel/stereo seçicilik gibi tıklama reaksiyonlarının olağanüstü avantajlarından etkilenen polimer kimyagerleri, tıklama reaksiyonlarını çok yönlü polimerizasyon tekniklerine dönüştürmek için büyük çaba sarf etmektedirler. Bu teknikler arasında azid-alkin, tiyol-yne, amino-yne ve hidroksil-yne reaksiyonları yer almaktadır [12].
- Üçlü bağ yapı taşlarına dayalı çok bileşenli polimerizasyon (MCP) (MCP based on triple-bond building blocks): Polimer biliminde yeni bir strateji olan MCP, monomerlerin kolay hazırlanması, hafif reaksiyon koşulları, kontrol edilebilir polimer yapıları ve atom ekonomisi gibi birçok avantaj sağlamaktadır. Buna rağmen polimerizasyon için kullanılan monomerlerin sınırlı olması, düşük dönüşüm ve yan reaksiyonların fazla olması gibi birçok dezavantaj da göstermektedir [10].
- Biyolojik olarak yenilenebilir poli(γ -butirolakton) halka açma reaksiyonu: Fonksiyonel polimerlerin sentezi için kullanılan yöntemlerin biri ise yenilenebilir poli(γ -bütürolakton) halka açma reaksiyonudur. Bu reaksiyon ile elde edilen alifatik fonksiyonel poliestерler, göstermiş olduğu biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikler nedeni ile biyomedikal amaçlı olarak ilaç taşıyıcılar ve doku mühendisliği iskelelerinin yapımında geniş bir kullanım alanına sahiptirler [13].

Fonksiyon polimerlerin yapımında kullanılan fonksiyonel grupları tamamen amaca göre seçilmektedir. Örneğin negatif yüklü olan bir molekülün kromatografi tekniği ile ayırımında, sabit fazı olan matris $-COOH$ gibi negatif yüke sahip fonksiyonel

grubu içeren polimerlerden yapılması gerekmektedir. Başka bir örnek olarak ise negatif yüke sahip DNA gibi moleküllerin taşınması için bir taşıyıcı tasarımında $-NH_2$ gibi pozitif yüklü fonksiyonel gruplara sahip polimerler seçilmelidir. Fonksiyonel polimerlerin sentezinde çeşitli fonksiyonel gruplu monomerlerin kullanılabilmesi ile birlikte, biyolojik sistemlerinde doku iskelesi veya ilaç taşıyıcı uygulamalarında kullanmak amacıyla peptit ve proteinlerin yapısına benzer sentetik fonksiyonel polimerlerin hazırlanmasında $-COOH$ ve $-NH_2$ fonksiyonel grubuna sahip yapılar tercih edilmektedir [14].

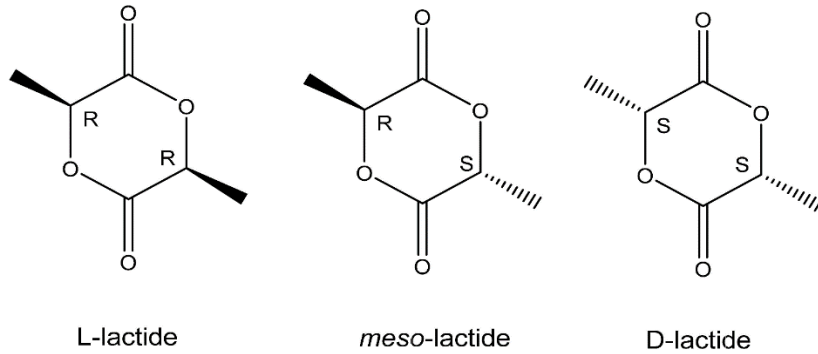
2.1.2. Poli(laktik Asit) (PLA)

Poli(laktik Asit) (PLA), laktik asitten türetilen biyobozunur ve biyouyumlu özelliklere sahip olduğu için birçok biyomedikal uygulama için tercih edilen bir poliesterdir [15]. Ester bağlarının varlığı sayesinde PLA, fizyolojik koşullarda enzimatik reaksiyonlar sonucunda normal hücrel aktivite yoluyla elimine edilebilen α -hidroksi asitlere hidroliz edilir [16]. Bu özellikler sayesinde, PLA bazlı ko(polimerler) doku mühendisliği yapı iskeleleri, kemik sabitleme implantları, ilaç dağıtım araçları, emilebilir/implante edilebilir cihazlar ve kaplamalar için kullanılmaktadır [17]. Laktit monomeri oligo L-laktik asidin negatif basınç altında katalitik depolimerizasyonu ile sentezlenir. Daha sonra elde edilen laktit, katalizör olarak güçlü baz potasyum tert-butoksit ($KOtBu$) veya kalay oktoat ($Sn(Oct)_2$) kullanılarak halka açma polimerizasyonu (ROP) yoluyla polimerize edilir. $Sn(Oct)_2$, hem yığın hem de çözelti halinde yüksek molar kütleli PLA sentezini mümkün kılarsa da, toksisitesi ve ROP mekanizması üzerinden elde edilen PLA polimerinin yüksek dispersiyon indisi ve düşük uç grup aktivitesi gibi dezavantajları vardır [18]. Bu dezavantajları minimize etmek için, toksik özellikleri olmayan alternatif katalizör/başlatıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır. Aynı zamanda, lityum [19], alüminyum [20], magnezyum [21], kalsiyum [22], itriyum, çinko [21] ve lantanitler [23] gibi bazı metal-alkoksit bazlı başlatıcılar laktitin kontrollü ROP polimerizasyonu için incelenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Laktitin halka açılma polimerizasyonunda kullanılan katalizörler.

katalizör olarak geleneksel organometalik ve güçlü baz kullanılarak yığın veya çözelti polimerizasyonu sonucu yüksek molekül ağırlıklı PLA sentezlenir, Ancak düşük mekanik özellikleri, katalizör toksisitesi, yavaş degradasyon oranları (kristallite ve molar kütleyle bağlı olarak), hidrofobiklik ve fonksiyonel yan zincir eksikliğinden dolayı belirli uygulamalarda kullanılmamaktadır. Bu nedenle, laktit genellikle glikolik asit ile kopolimerize edilerek amorf PLGA [24] elde edilir veya laktitin ROP polimerizasyonu PEG ile başlatılarak amfifilik PEG-b-PLA blok kopolimerleri hazırlanır [25]. Hidrofilik ve hidrofobik bileşenlerin oranı değişerek polimerin biyolojik bozunma hızı ve hidrofilikliği düzeltilir. Organometal katalitik yığın polimerizasyonun diğer dezavantajı yüksek sıcaklıkta gerçekleştiğinden dolayı mezo-laktit oluşmasıdır. Az miktarda mezo-laktit birimlerinin poli(L-laktit) yapısına dahil edilmesi, kristallliği, termal özellikleri ve biyolojik bozunma hızını azaltarak polimer özelliklerini bozabilir [26].



Şekil 2.2. Laktitin stereoisomerleri.

Son yıllarda laktit monomerinden yola çıkarak PLA türevleri sentezi için ROP polimerizasyonu haricinde polikondenzasyon, ROP kaynaklı-kristalleşme odaklı [27], ROP-reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) veya eşzamanlı ROP-polikondenzasyon (ROPPOC) [28] gibi yeni mekanizmalar türetilmiştir. Bu metotların

nihayi amacı molekül ağırlıkları ve monomerler dizilimleri kontrol edilebilir, uç ve yan grup fonksiyonları belirlenebilir farklı kimyasal ve fiziksel özellikler gösteren PLA tabanlı makromoleküller hazırlanabilir olmasıdır.

Bu tezin odak noktası, yumuşak koşullarda herhangi bir katalizör kullanılmadan ROP gerçekleşmesi sonucunda iyi-tanımlanmış çeşitli amino asit fonksiyonel oligo-esterlerin elde edilmesidir. Optimum koşullar altında saflaştırılmış olan oligo-esterler daha sonra polikondenzasyon yöntemiyle üçlü blok kopolimerlere dönüştürülmüştür. Bu iki strateji, proteinlerin ve peptitlerin kendi kendine montajında, metal iyonu koordinasyonunda, polimer zincirinde aktif grup oluşumunda ve işlevinde önemli roller oynayan amino asit monomerinin polimer yapısına dahil edilmesine ve amino asit fonksiyonel polimerlerin basitleştirilmiş sentezine izin verir.

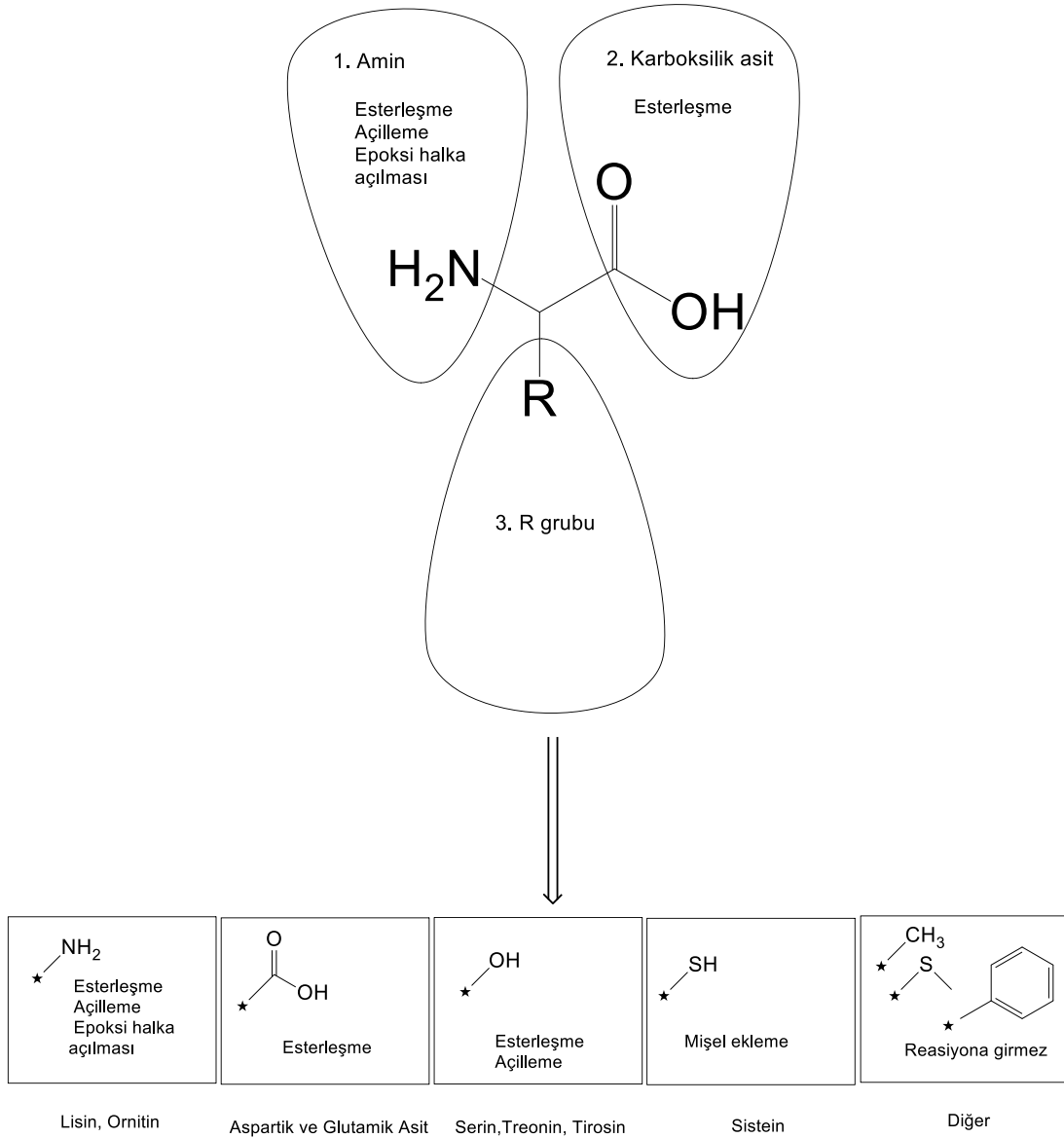
2.1.3. Amino Asit Fonksiyonel Polimerler

Amino asitler, yaşam süreci için vazgeçilmez bileşikler olan peptitlerin temel bileşenleridir. Amino asitlerin ve peptitlerin kimyası, biyolojik sistemlerin düzenini sağlayan peptitlerin yapısal açıklamasını ve sentezini yönlendirerek geliştirilmiştir. Günümüzde fermantasyon ve kimyasal sentez yöntemlerindeki gelişmelerden ötürü, yüksek optik saflığa sahip amino asitler sentezlenmektedir. Amino asitlerin biyolojik sistemlerdeki fonksiyonunu taklit eden polimerlerin sentezlenmesi, yeni akıllı malzemeler yaratmaya neden olmuştur [29]. Amino asit fonksiyonel polimerler kavramı, 1961 gibi erken bir tarihte Morawetz ve arkadaşları tarafından elde ettikleri polimerlerin optik aktivitesi üzerindeki kiral monomerlerin etkisini araştırırken rapor edilmiştir [30]. Morcellet grubu, 1980'lerde, elde edilen polimerik bobinlerin sudaki konformasyonunu manipüle etmek için çeşitli amino asitlerin hidrojen bağı karakterini açıklayarak konuyu tekrar gündeme getirmiştir. En son 1990'larda Endo ve Mori tarafından amino asit polimerleri alanı önemli ölçüde geliştirilmiştir [29]. Amino asit fonksiyonel polimerler sadece biyoyumlu malzemeler olarak değil, fonksiyonel kimyasal malzemeler olarak da çeşitli kimyasal reaksiyonlarda bilim insanları tarafından kullanılmaktadır. Amino asit fonksiyonel polimerler, amino asit grubu sayesinde şiralite, pH'ya duyarlılık, zitteriyonik ve antimikrobiyal özellikler gösteren malzemeler olarak sentetik polimerler sınıfında yer almaktadırlar [31].

Amino asitlerden türetilmiş fonksiyonel polimerler, Sanda ve Endo tarafından açıklanan ufuk açıcı makalede belirtildiği gibi iki gruba ayrılır: amino asitlerin polimer ana zincir yapısında bulunduğu polimerler (kondenzasyon polimerleri) ve asılı yan zincirlerde amino asit birimlerine sahip polimerler [29]. Bu polimerler, birçok ilginç ve ilgili malzemenin sentezine olanak sağlamıştır. İkinci yöntem, amino asit monomer ile reaksiyona girebilen fonksiyonel bir grup içeren polimerin polimerizasyon sonrası modifikasyonudur. Bu yöntemin, çözünür polimerlerin kimyasal özelliklerini değiştirmesi nadiren bildirilmiştir ve zarların ve jellerin yüzeyini değiştirmek için kullanılmıştır.

Amino asitler organik fonksiyonel grup içeriğine göre üç "fonksiyonel gruba" ayrılır (Şekil 2.3);

- 1- Amin Grubu
- 2- Karboksilik Asit Grubu
- 3- R Grubu



Şekil 2.3. Amino asit fonksiyonel polimerlerini sentezlemek için mevcut olan farklı sentez stratejilerini vurgulamak için amino asit organik fonksiyonel grup içeriğine göre üç kısma ayrılmıştır. Bu organik grupların her biri farklı kimyasal özellik içerir.

Eğer, R grubu bir amin veya karboksilik asit ise koruma grubu takılması istenen ürünü sentezlemek için gerekli olabilir. R grubu fonksiyonel bir grup olarak kullanılacaksa, sentez stratejisini dikkatli bir şekilde seçmek gerekir. Koruma kimyasını kaldırmak ve genel sentezi basitleştirmek için bazı ortogonal kimyaları kullanılabilir. Çizelge 2.1'de amino asitlerin organik fonksiyonel gruplarının polimer yapısında yer aldığı çeşitli tepkime türleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Amino asitlerin organik fonksiyonel gruplarının polimer yapısında yer aldığı tepkime çeşitleri.

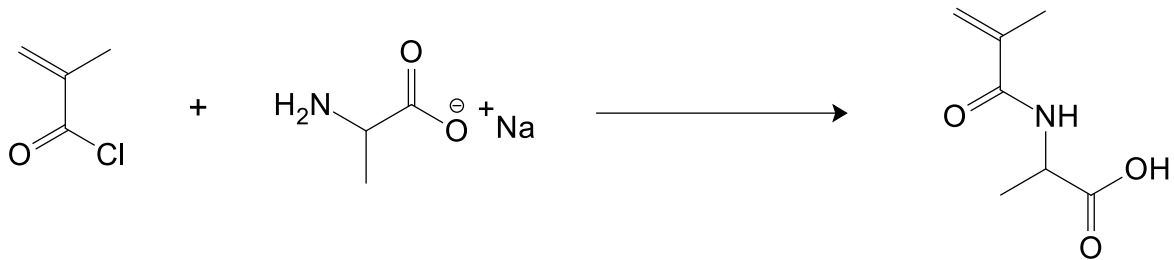
1. Amin Grubu			
kimyasal Reaksiyon	Özellikler	Avantajlar	Nihayi Yapı
Amitleşme Açılma	Polar Termal Duyarlılık R- grup Fonksiyonu	Basit kimyasal reaksiyonlar Kararlı amit bağı Serbest R-grubu	
Epoksi Halka Açılması	pH Duyarlı Zwitteriyonik pH R- grup Fonksiyonu	Kararlı amit bağı Hidroksi grubu kazandırmak Serbest R-grubu	
2. Karboksilik Asit Grubu			
kimyasal Reaksiyon	Özellikler	Avantajlar	Nihayi Yapı
Amitleşme	Polar Termal duyarlılık Katyonik pH duyarlılık R- grup fonksiyonu	Basit kimyasal reaksiyonlar Kararlı amit bağı Serbest R-grubu	
Esterleşme	Parçalanabilir Ester Bağı Polar Katyonik pH Duyarlılık R- grup Fonksiyonu	Basit kimyasal reaksiyonları Serbest R-grubu	
3. R-grubu			
kimyasal Reaksiyon	Özellikler	Avantajlar	Nihayi Yapı
✓ Sistein Mişel Ekleme Tiyol uç grup reaksiyonları		Basit kimyasal reaksiyonlar Kararlı Amit Bağı Serbest R-grubu	
✓ Serin, Treonin, Tirozin Esterleşme Açılma	Parçalanabilir ester bağı Polar Zwitteriyonik pH	Basit kimyasal reaksiyonları	
✓ Aspartik, Glutamik Asit Amitleşme	Polar Termal duyarlılık Zwitteriyonik pH	Basit Kimyasal reaksiyonları Kararlı amit bağı	
✓ Lizin, Ornitin Amitleşme Açılma	Polar Termal duyarlılık Zwitteriyonik pH	Basit kimyasal reaksiyonları Kararlı amit bağı	

2.1.4. Fonksiyonel Amino Asit Monomer Sentezi

Amino asit bileşenli fonksiyonel polimerlerin sentezi için en yaygın strateji, amino asitlerin amin, karboksi, hidroksi veya tiyol grupları üzerinden kimyasal modifiye edilerek yapıya vinil, epoksi gibi yapılar takarak polimerizasyonda kullanılmasıdır. Diğer yaklaşım; Serin amino asit molekülünde olduğu gibi; hidroksi, karboksi ve amin gibi üç organik fonksiyonel gruptan birini koruyup seçimli olarak poliester veya poliamit sentezinde kullanılmasıdır [32].

2.1.4.1. Amin Grup Modifikasyonu

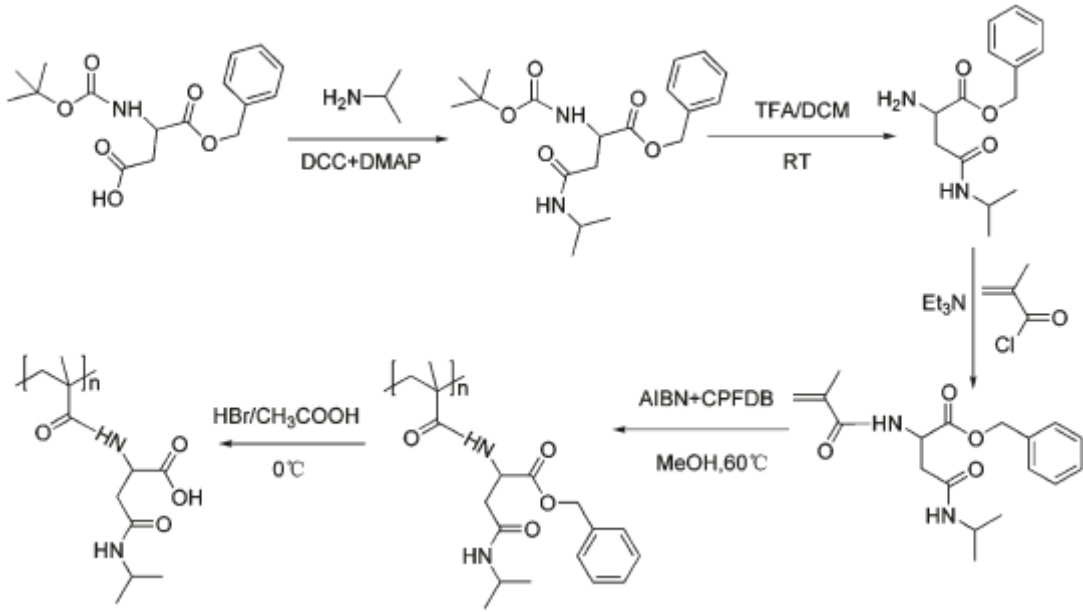
Morawetz ve arkadaşları tarafından poli(metakriloil-L-alanin) ve poli(metakriloil-L-glutamik asit) amino asit fonksiyonel polimerlerin hazırlanmasında kullandıkları yöntem amino asidin fonksiyonel polimerlerin sentezinde en yaygın kullanılan sentez yöntemi olmuştur [30]. Metakriloil klorürün amino asitlerin serbest amini ile reaksiyonu sonucu metakrilamit elde edilir (Şekil 2.4). Ancak eğer yan grup bu konuma ortogonal ise, amino asit yan grubunu serbest bırakır. Bu sentezde kullanılan amino asitler arasında alanin [30], glutamik asit [30], fenilalanin [33], metiyonin [33], valin [29], lösin [29], lizin [29], histidin [34], tirozin [29], prolin [35], ve hidroksprolin yer alır [29]. Bu malzemelerin çoğu daha sonra O'Reilly ve ark. [29, 36, 37] tarafından incelenmiştir. Amino asitlerin kimyasal modifikasyonu sonucu vinil polimerizasyona uygun sentezlenen monomere örnek olarak akriloil ile amitleştirilmiş alanin örnek olarak verilebilir. Amino asidin karboksilik asit grubu, anyonik pH'ya duyarlı bir kısım olmakla birlikte esterleşme reaksiyonuna uygun fonksiyonel grup olarak da kullanılabilir.



Şekil 2.4. Amino asidin vinil grup modifikasyonu.

Aynı zamanda sıcaklığa ve pH'ya duyarlı asparajin fonksiyonel polimer, Luo ve diğerleri tarafından ilk defa aspartik asit kullanılarak sentezlenmiştir [38]. Amin ve hidroksi grupları α -karboksilik asit benzil ester ve N-tert-butiloksikarbonil (Boc) korunmuş aspartik asit, N-

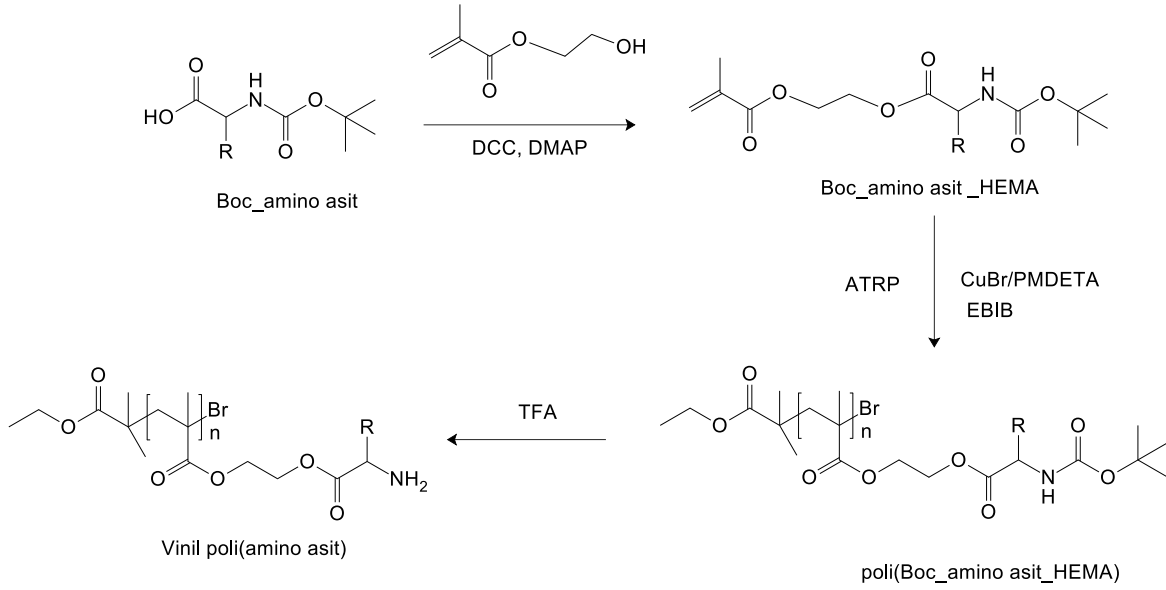
izopropil amin ile reaksiyona girerek, aspartik asidin asparagin'e dönüştürülmesi ve sıcaklığa duyarlı poli(N-izopropilakrilamid) eklenmesi sonucu sıcaklığa duyarlı monomer sentezlenmiştir. α -aminin koruma grubu uzaklaştırma sonrası, metakriloyl klorür ile reaksiyona sokularak asparagin ile modifiye edilmiş bir monomer oluşturulmuştur. polimerizasyondan sonra, α -karboksilik asidin koruma grubu uzaklaşması sonucu suda çözünürlüğü iyileştirdi ve pH duyarlılığı kazandırarak sıcaklığa ve pH'ya duyarlı bir polimer sentezlenmiştir (Şekil 2.5). Bu, çoklu fonksiyonlu malzemeleri yaratmak için amino asitlerin çok yönlülüğünü gösteren etkileyici bir çalışma örneğidir [38].



Şekil 2.5. Aspartik aside vinil grubu takılması ve polimerleşme tepkimesi.

2.1.4.2. Karboksil Grup Modifikasyonu

Amin grubu korunmuş alanin molekülünün karboksil grubuna esterleşme ile 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri takılarak amin yan gruplu polimer sentezi Sun ve Gao tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6) [39].



Şekil 2.6. Alanin amino asidinin karboksi grubu üzerinden vinil modifikasyonu.

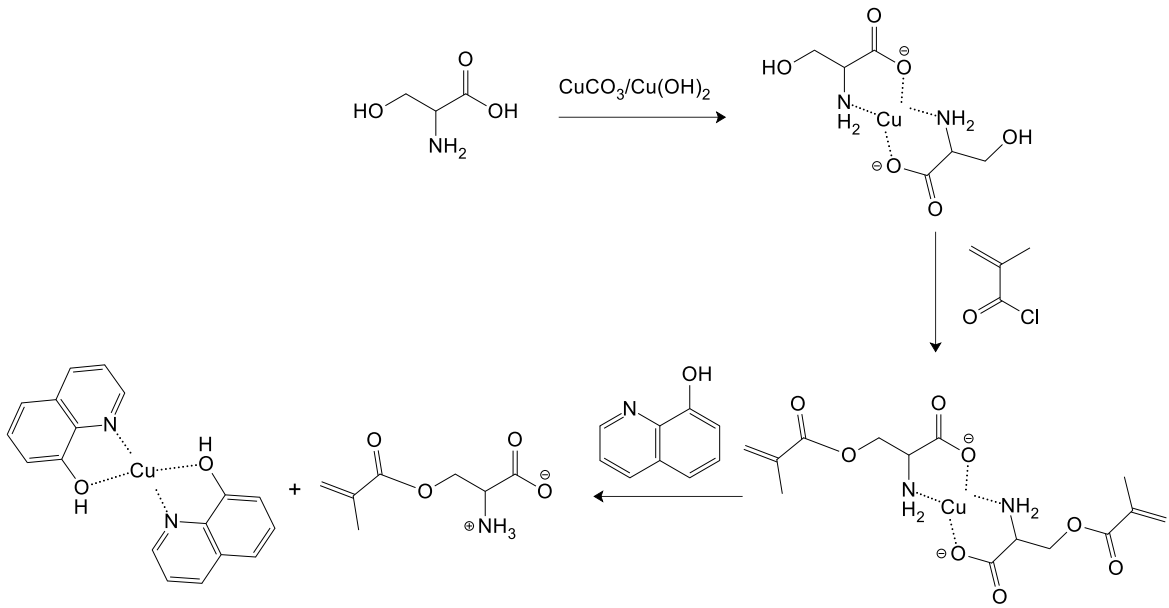
Fujii grubu, poliakrilik asit yan gruplarına uzun zicirli aralayıcı grup ile glutamik asit yan grubu modifiye etmiş ve zwitterion yapı oluşturmuştur, elde edilen yapıyı pH duyarlı protein seçimli adsorpsiyonda kullanmıştır [40].

De grubu, Sun ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzer şekilde HEMA ve N-Boc korumalı amino asitlerden monomerler oluşturmak için karbodiimit ajanı kullanarak amino asit fonksiyonlu polimerler hazırlamışlardır [41-43]. Koruma grubunun kaldırılması üzerine, ortaya çıkan polimerler, amin grubu nedeniyle katyonik davranış sergileyen, pH'ya duyarlı bir yapıya sahiptir.

2.1.4.3. Amino Asitlerin R Grubu

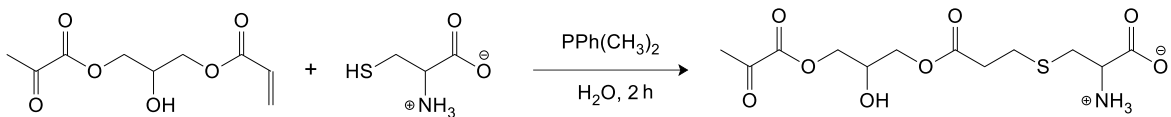
Sentez yöntemi gereğince, amino asit yan zinciri (R) fonksiyonel bir bölge olarak kullanılabilir. Bu, özellikle yüksek verim elde etmek için tiyol-ene klik reaksiyonu veya tiya-Michael katılması kolayca kullanılabilirdiği sistein gibi bir amino asit için uygulanabilir. Bir çalışmanın amacı, peptit davranışını taklit edebilecek bir materyal sentezlemekse, amino asit yan zincirleri çoğunlukla peptit davranışlarında önemli roller oynadığından dolayı bu bölgeden reaksiyon başlatmak kötü bir seçim olacaktır. Amaç, asılı gruplar olarak bırakılan karboksilik asit ve amin ile zwitteriyonik bir malzeme sentezlemekse (veya bunlar başka tepkimelerde aktif bölge olarak kullanmak istenirse), çok yararlı bir sentez stratejisi olabilir.

Fonksiyonel grupları ve organik çözücülerini koruma ihtiyacını ortadan kaldıran popüler bir strateji, bir kenetleme maddesi olarak Cu^{2+} 'nin kullanılmasıdır; iki amino asidin α -karboksilik asit ve α -amin ligand gibi davranır, esasen onları korur ve kimyasal reaksiyonu R grubuna yönlendirir [44]. Bu yöntem, her iki fonksiyonel grubun bağlanma reaksiyonlarında veya asil klorürlerle reaksiyonlarda α -amin ile rekabet edebilen lizin ve serin için yararlı bir stratejidir. Son aşamada bakır, metal iyonu için daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olan 8-hidroksikinolin ile kolayca uzaklaştırılır (Şekil 2.7). Bu yöntem, Kurtz ve ark. yaptığı çalışmada [45], lizin [46-48] serin [49], tirozin, ornitin [44, 50] ve hidroksiprolinden yapılan metakrilat monomerlerini sentezlemek için kullanılmıştır [51].



Şekil 2.7. Reaksiyonu R grubuna yönlendirmek için koruyucu grup içermeyen bir strateji.

Thia-Michael ekleme reaksiyonu, Leggett ve Armes grupları tarafından (3-akriloksi)-2-hidroksipropil metakrilat) ve sisteinden zwitteriyonik bir monomer sentezlemek için kullanılmıştır (Şekil 2.8). Sentez prosesi herhangi bir koruyucu grup olmadan yüksek verimle gerçekleştirilmiştir [52].

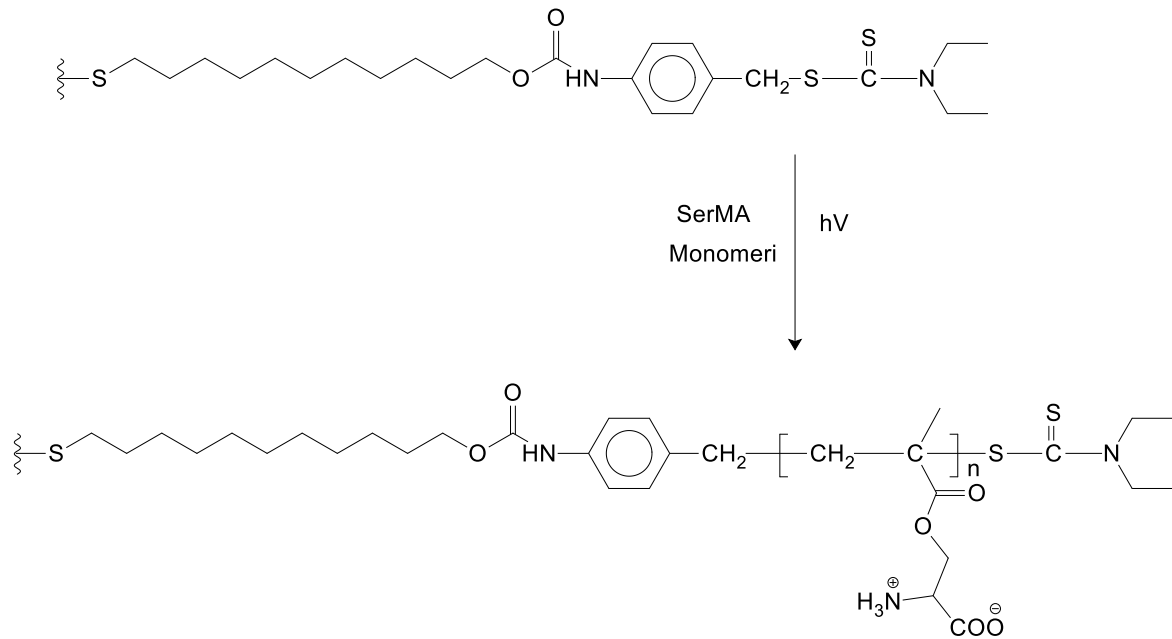


Şekil 2.8. Sisteinden zwitteriyonik bir monomerin sentezlenmesi.

2.1.5. Polimer Fonksiyonlaştırma

Son yıllarda, çözünür polimerleri ve polimer hidrojenleri ve membranları amino asitlerle işlevselleştirme stratejisi araştırılmıştır. Bu yöntem genelde membranları ve hidrojenleri sentezlerinden sonra amino asit grupları ile fonksiyonel hale getirmek için kullanılmıştır. Çözünür polimerlerin amino asitlerle polimerizasyon sonrası modifikasyon işlemine ilişkin raporları nadiren çalışılmıştır.

Liu ve ark. yaptığı çalışmada poli(serin metakrilat) monomeri sulu ortama açilmetakrilat klorür, 0°C sıcaklıkta, eklenerek sentezlenmiştir. Zwitterioik SerMA monomerinin koruma grubu 8-quinolinol kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.9) [49].

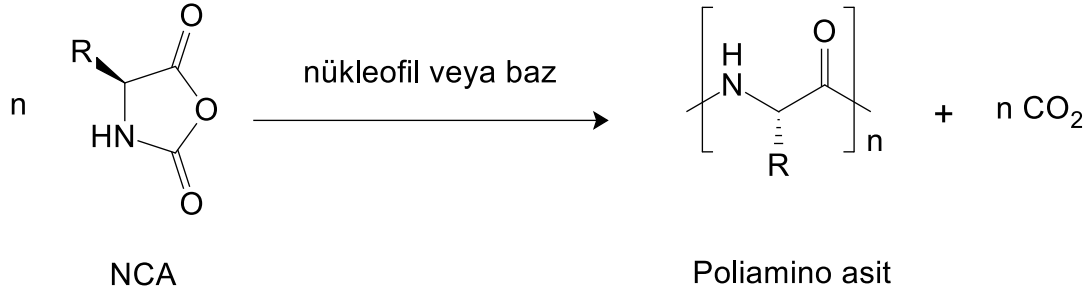


Şekil 2.9. SI-PIMP aracılığıyla Altın üzerinde pSerMA'nın hazırlanması.

2.1.5.1. Polimer Zincirinde Amino Asit İçeren Polimerlerin Sentezi

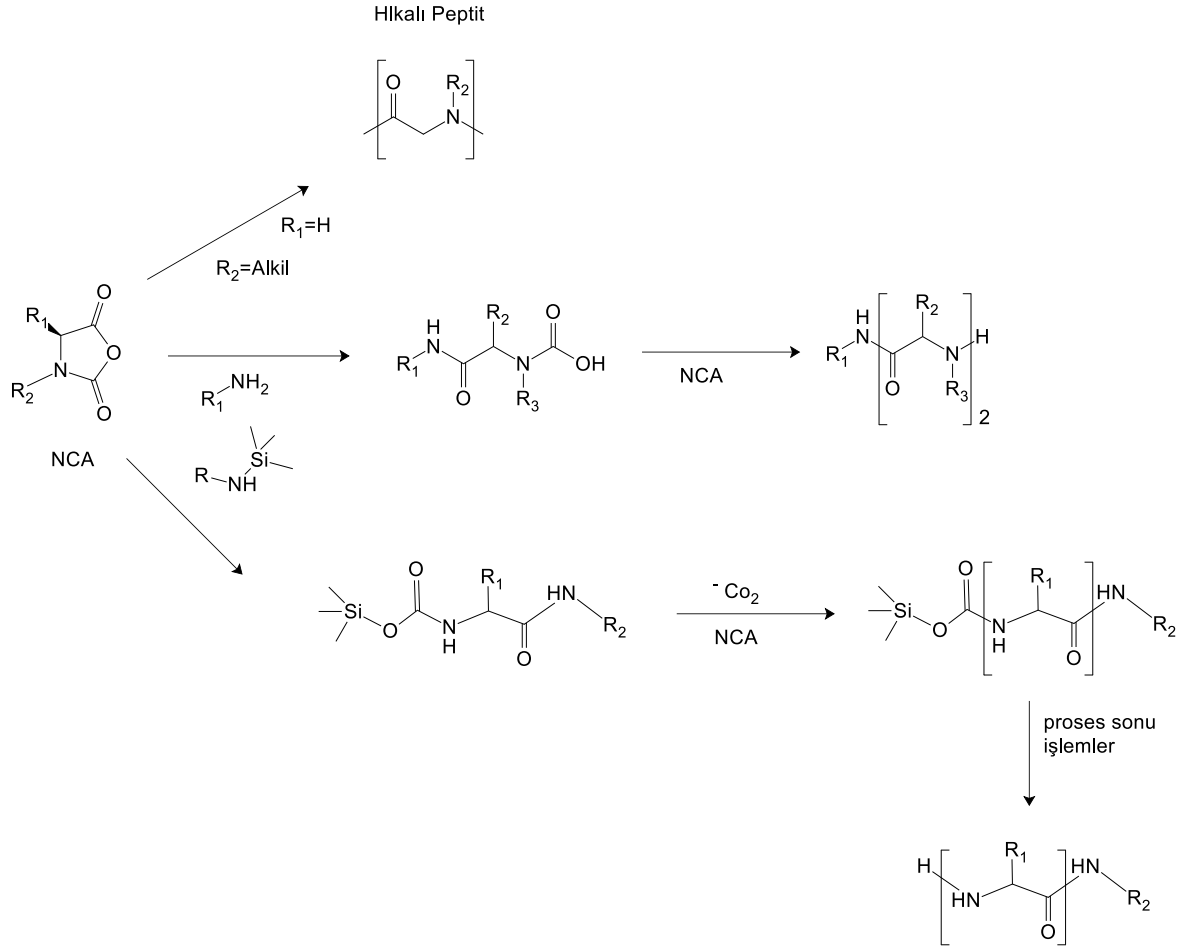
Poli(amino asit)'ler (PPA) veya polipeptitler, proteinlerin rekombinant DNA ifadesi, doğal kimyasal ligasyon, katı faz peptit sentezi (SPPS) ve α -amino asit N-karboksianhidritlerin (NCA) Halka Açma Polimerizasyonu (ROP) gibi çeşitli tekniklerle sentezlenebilir [53]. Burada, polialanin; Homo-PPA, PPA tabanlı blok ve rastgele kopolimerler elde etmenin ana teknikleri üzerinde tartışılacaktır. İlk NCA, 1906'da Leuchs tarafından sentezlenmiştir (Şekil 2.10) [54]. O zamandan beri, çok yönlü polimerizasyon yöntemiyle çeşitli doğal ve doğal

olmayan amino asitler nedeniyle, farklı tasarımlar ve yapılara sahip birden fazla PAA'yı sentezlenmiştir.



Şekil 2.10. α -amino asit N-karboksianhidritlerin (NCA'lar) halka açma polimerizasyonu.

Polimer bazlı malzemelerin geliştirilmesinde istenen amaç, iyi tanımlanmış, tekrarlanabilir ve homojen mimarilere sahip yapıların yüksek verimle sentezlenmesidir. Bu nedenle biyotıp veya diğer uygulamalarda potansiyel kullanımları için dar dağılımlı PAA'nın sentezi tercih edilmektedir. NCA'ların ROP yoluyla şu anda PAA sentezinde mükemmel kontrol sağlayamadığı yaygın bir şekilde bilinmektedir, ancak bu polimerizasyon yönteminin canlı karakteri bize daha da yakınlaşmamızı sağlar. Canlı polimerizasyon, uç gruplarda serbest amin bulunan her zincire çoklu monomer ilavelerine izin veren zincir büyüme süreci lehine yan reaksiyonların ortadan kaldırılması yoluyla PAA'nın başarılı sentezine olanak sağlar. Bu hedeflere ulaşmak için, yüksek saflıkta NCA monomerlerinin kullanılması ve böylece aşağıda açıklanan dezavantajların en aza indirilmesi gereklidir. NCA'ların saflığı, NCA'ların ROP polimerizasyonunda sınırlayıcı bir faktördür çünkü belirli elektrofilik safsızlıklar, PAA sentezi sırasında yan reaksiyonlar için potansiyel katalizörlerdir. Örneğin, bazı elektrofilik safsızlıklar, üretilen polimerlerin zincir uzunluğu dağılımını ve polidispersitesini olumsuz etkileyebilen potansiyel zincir transfer ajanlarıdır. NCA'daki klorür miktarı da kontrol edilmesi gereken önemli bir parametredir çünkü klorür iyonu polimerizasyonu etkileyebilir [55]. NCA sentezinde genellikle fosgenizasyon yöntemiyle yapıldığından dolayı HCl, bir yan ürün olarak NCA'da bulunur [56]. NCA monomerlerinin susuz koşullar altında tekrarlanan kristalleştirilmesi, laboratuvar ölçeğinde en yaygın olarak uygulanan saflaştırma yöntemidir. Bu yöntemle elde edilen saflık tatmin edicidir, ancak yeniden kristalleştirmenin kendisi de zaman alan bir işlemdir [57]. Şekil 2.11'de ROP yöntemiyle farklı PPA polimerlerinin farklı elde edilmiş tepkimesi gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Polipeptit sentezi için ortogonal olarak reaktif NCA'lar [58].

NCA kimyasının ROP dezavantajları veya sınırlamalarının yanı sıra, hedeflenen PAA yapılarının sentezini engelleyebilecek diğer faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörler arasında, yaşayan polimerizasyon karakterini etkileyen konformasyonel kısıtlamalar (örneğin, ikincil yapılar, büyüyen polimer zincirinin terminal amin üzerinde sterik engelleme ve zincir yayılımı üzerinde etkiler gibi) bulunmaktadır. Son zamanlarda, reaksiyon çözücüsü bileşiminde çözünürlük-agregasyon ilişkisi üzerine yapılan bir çalışma yayınlanmıştır. İlk bakışta, bu bir dezavantaj olarak değerlendirilebilir, ancak aynı zamanda polimerizasyonla tetiklenen kendi kendine birleşme yoluyla nanoparçacıkların tek adımda sentezlenmesi için bir fırsat olarak da görülebilir [59]. Bu nedenlerle, bu dezavantajları aşmak için yeni yaklaşımlar geliştirilmesine yönelik çabalara odaklanılmıştır. Bu yaklaşımlar arasında ağır metal katalizörlerin kullanımı [60], HVT (High Vacuum Technology) [61], primer amin hidroklorür tuzları [62] ve tetrafloroborat tuzları [63], düşük sıcaklıkta primer aminlerin kullanımı [64], başlatıcı olarak silazan türevlerinin kullanımı [65] veya reaksiyon

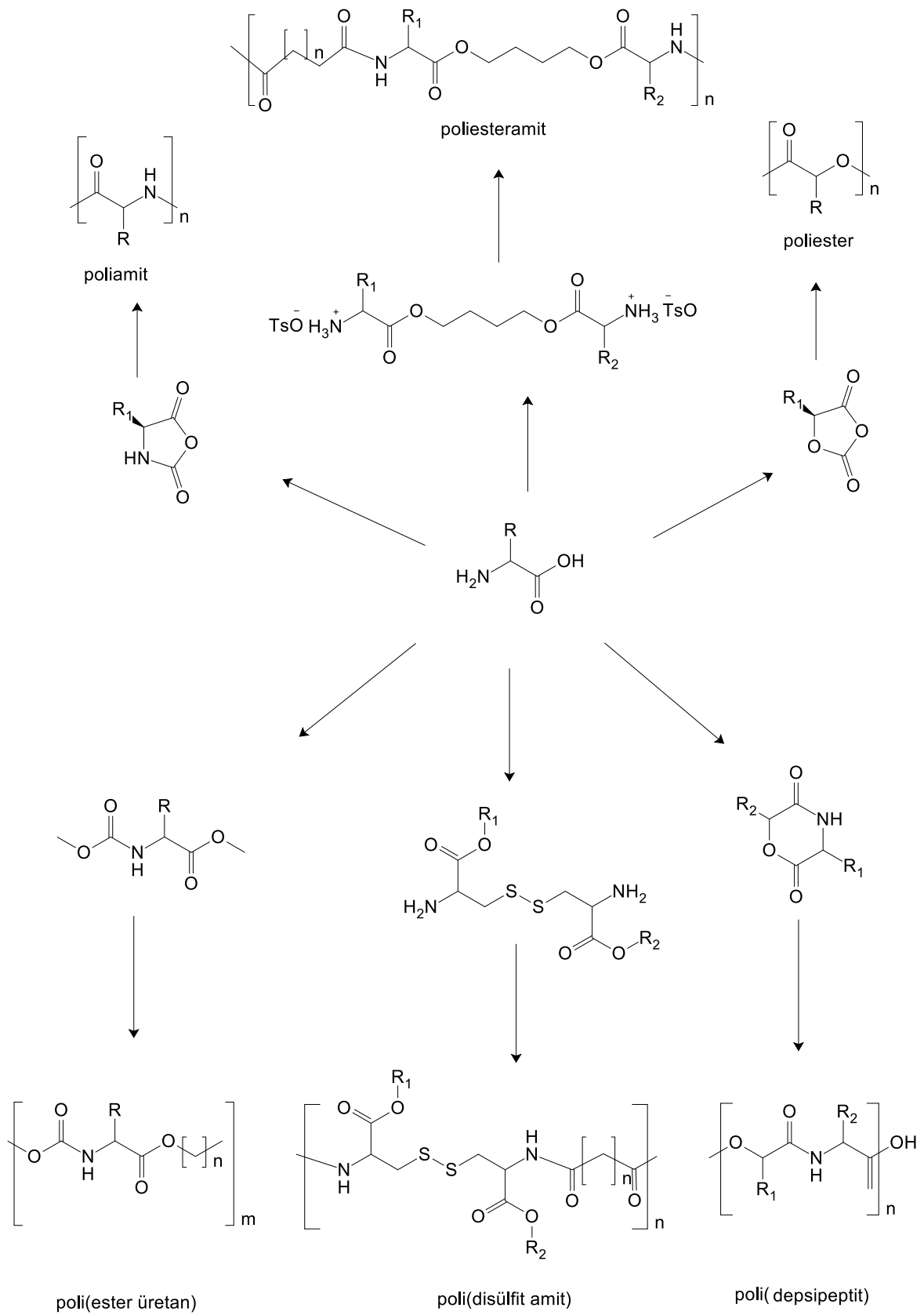
koşullarının optimizasyonu (basınç, sıcaklık vb.) bulunmaktadır. Ne yazık ki, tüm yöntemler kısıtlamalar içermekte ve aşağıda açıklanmaktadır.

2003 yılında Schlaad ve arkadaşları, aktif monomer mekanizmasını (AMM) önlemek için primer amin hidroklorür tuzlarını makroinitiyatör olarak kullanmayı bildirmişlerdir [62]. Nükleofilik amino ucu, dormant (protonlu) bir duruma transfer edilir. Primer amin hidroklorürlerinin NCAs'a karşı reaktivitesi ilk olarak 1960'larda Knobler ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır [66]. Başlıca dezavantajlar, aktif sitelerin reaktivitesinin azalması nedeniyle polimerizasyon süresinin artması ve nükleofilik klorür anyonlarının varlığıdır ki bunlar aynı zamanda NCA polimerizasyonunun başlatıcısı olarak da işlev görebilir. Bu nedenle, ikinci bir bloğun sentezlenmeden önce kalan monomerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Schlaad ve meslektaşları çalışmalarında $PDI < 1,1$ ve M_n değerinin 22 kDa'dan yüksek olmadığını bildirmişlerdir [62].

2004 yılında Hadjichristidis ve ekibi tarafından, yaşayan polimerizasyon için primer aminlerin ve Yüksek Vakum Teknikleri'nin (HVT) kullanımı önerilmiştir [67]. Yazarlara göre, HVT kompleks makromoleküler mimarilere sahip iyi tanımlanmış homopolipeptitlerin ve kopolipeptitlerin sentezini sağlar ve bu durum polipeptit hibritleri için de geçerlidir. Bununla birlikte, HVT'ler karmaşık ve pahalı bir deneysel kurulum gerektirir, bu da sentezi karmaşıklaştırır. Ayrıca, kapalı sistem polimerizasyon sırasında bir basınç gradyanı oluşturur ve bu da polimerizasyon kinetiğini etkileyebilir. Düşük sıcaklıkların primer aminlerle birlikte kullanımı 2004 yılında Vayaboury ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [64] ve sonlandırma reaksiyonlarını azaltmaktadır. 0 °C'de, zincir yayılması için aktivasyon enerjisi bariyeri, yan reaksiyonların altına düşer. Bu yöntemin başlıca dezavantajı, tepkime sürelerinin 2-4 kat artması ve verimlerin azalmasıdır. Son olarak, silazan türevlerinin başlatıcı olarak kullanımı 2007 yılında Lu ve meslektaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [65] ve düşük PDI'lı polimerler, beklenen M_w ve neredeyse yüzde yüz verim elde edilmiştir. Bu yaklaşımın zayıf noktası, reaksiyon kapsamının sınırlı olmasıdır; N-süstitüe NCAs'ın polimerizasyonu için kullanılamaz ve heksametildisilazan (HMDS) aminleri hidrolitik reaksiyonlara duyarlıdır. Şekil 2.12, NCA polimerizasyonunun kimyasındaki karmaşıklığı temsil etmektedir [67].

2013 yılında, María Jesús Vicent liderliğindeki araştırma grubu, Matthias Barz ile işbirliği içinde, tetrafloroborat amonyum tuzu olarak birincil amin içeren başlatıcıların kullanımına dayanan iyi tanımlanmış PAA'ların hazırlanması için yeni bir yöntem geliştirmiştir [63]. BF_4^- karşı iyonunun nükleofilik olmayan karakteri, aminin nükleofilik davranışını en üst düzeye çıkarır ve bazik karakterini azaltır. Bu, genellikle amin amonyum tuzlarında kullanılan karşı iyonlara (Cl^- veya Br^-) kıyasla yeni bir avantajdır. Klorür ve bromür anyonları nükleofiliktir, bu nedenle polimerizasyonu aktive edebilir, istenen amin başlatıcıyla rekabet edebilir ve başlatıcı ile monomer arasındaki stokiometriyi değiştirerek istenmeyen Mw dağılımlarına sahip PAA elde edilmesine yol açabilir [62]. Bu başlatıcılar, birincil aminin HBF_4 eter kompleksi ile muamele edilmesi yoluyla kolayca hazırlanabilir [68]. Bu strateji, yaşayan polimerizasyon mekanizması aracılığıyla homo ve blok PAA kopolimerleri elde etmemizi sağlar [63].

ROP yöntemi dışında amino asit bazlı ana zincir polimerlerinin sentezi için şimdiye kadar çeşitli sentez stratejileri kullanılmıştır. poliamit veya polipeptitler, poliesterler, poli(depsipeptit) gibi polimerler, amino asit türevi monomerlerden elde edilir. Poli(ester amit), poliüretan ve poli(disülfid amit) gibi polimerler de amino asit türevlerinin bazı ortak moleküllerle kondenzasyon reaksiyonu ile yapılmıştır (Şekil 2.12) [69] .



Şekil 2.12. Çeşitli ana zincir amino asit fonksiyonel polimerler.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmada ortogonal amino asit monomerinde kullanılan ROP yönteminin yukarıda sözü geçen deavantajlarını yok etmek için aynı zamanda aktivitesini arttırmak için ilk önce iyi tanımlanmış amino asit dimer, trimer v.s. hazırlanmış ve kondenzasyon reaksiyonuyla blok kopolimerler sentezlenmiştir.

2.1.5.2. Polimer Zincirinin Amino Asitlerle Modifikasyonu

Bu bölümde bahsettiğimiz sentez stratejilerinin, bölüm 1.2.1'de sentezlenen bileşenlerle aynı nihai bileşenlere sahip olabileceğini belirtmek gerekir. Ancak, monomerlerin polimerize edilebilir hale getirilmesi ve polimerizasyon sonrası polimer zincirinin amino asitlerle modifikasyonu için farklı sentez adımları, koşullar ve reaktifler gerekmektedir.

Polimerlerin amino asitlerle modifikasyonu, son yıllarda büyük ilgi gören ve çok çeşitli uygulama potansiyeline sahip olan bir araştırma alanıdır. Bu yaklaşım, polimerlerin biyolojik uyumluluğunu artırarak biyomedikal, ilaç teslimatı ve doku mühendisliği gibi alanlarda yenilikçi malzemelerin geliştirilmesini sağlamaktadır. Amino asitler, polimer yapılarına entegre edilerek polimerlerin biyolojik özelliklerinin yanı sıra fonksiyonel gruplarının çeşitliliği de artırılmaktadır.

Bu çalışmada, amino asitlerle modifiye edilmiş polimerlerin sentezi ve uygulamaları hakkında yapılan araştırmalara odaklanılmıştır. Çeşitli yöntemler kullanılarak amino asitlerin polimerlerle reaksiyona girmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemler arasında kondenzasyon polimerizasyonu, polimerizasyon sonrası modifikasyon ve polimer zinciri üzerinde amino asit birimlerinin yerleştirilmesi gibi stratejiler yer almaktadır. Bu yöntemler, polimerlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin kontrol edilmesini ve uygulamalara özgü gereksinimlere uygun malzemelerin sentezlenmesini sağlamaktadır.

Amino asitlerin polimerlere entegrasyonu, polimerlerin biyoyuumluluğunu artırmanın yanı sıra hedeflenmiş ilaç teslimatı, hücre yönlendirme ve doku mühendisliği gibi alanlarda da önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, amino asitlerin çeşitliliği, polimerlerin yüzey

özelliklerinin ve fonksiyonel gruplarının kontrol edilmesini sağlamaktadır. Bu da polimerlerin çeşitli uygulamalarda kullanılabilirliğini artırmaktadır.

Amino asit fonksiyonlu monomerlerden yan zincir amino asit temelli polimerlerin sentezi için farklı tipte kontrollü polimerizasyon teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikler arasında ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization), NMP (Nitroxide Mediated Polymerization), RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization), canlı katyonik polimerizasyon, canlı anyonik polimerizasyon, ROP (Ring Opening Polymerization) yöntemi, ROMP (Ring Opening Metathesis Polymerization), ADMET (Acyclic Diene Metathesis Polymerization) ve metal katalizli metatez veya enjeksiyon polimerizasyonu tekniği yer almaktadır. Öte yandan, amino asit birimlerinin polimer zincirine dahil edilmesi post-polimerizasyon modifikasyon yöntemiyle de gerçekleştirilebilir [70]. Matyjaszewski, farklı kontrollü polimerizasyon yöntemlerinin detaylı bir karşılaştırmasını sunmuştur [71]. Ayrıca, amino asitlerin polimerik iskeletin yan zincirine dahil edilmesi için polimerize edilebilir fonksiyonel gruplar, amino asidin C-terminus veya N-terminus'una veya amino asitte bulunan diğer fonksiyonel gruba bağlanarak kullanılabilir. Bu konu Brisson ve diğerleri tarafından detaylı bir şekilde ele alınmıştır [72].

Polimerlerin uygulama veya istenen özellikleri göz önünde bulundurularak, belirli özelliklere sahip uygun polimerize edilebilir fonksiyonel gruplar seçilip belirli sentetik yöntemlerle polimerize edilebilir [30, 73]. İlk olarak, Kulkarni ve Morawetz, N-terminus modifiye edilmiş yan zincir alanin ve glutamik asit temelli metakrilamid ve akrilamid monomerlerini ve ilgili polimerik iskeletlerini geleneksel FRP (Free Radical Polymerization) yöntemiyle rapor etmiştir [68]. Ardından, 2004 yılında ilk kez amino asit temelli polimerler ATRP yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir [74]. ATRP yöntemiyle [39] düşük dispersiteye sahip olan ve terminal halojen fonksiyonelliği nedeniyle post-polimerizasyon modifikasyon yeteneği olan yan zincir amino asit temelli polimerlerin kontrol edilen molekül ağırlığı, moleküler mimarisi ve bileşimi rapor edilmiştir [75]. Daha sonra, Mori ve meslektaşları L-fenilalanin akrilamid türevlerinin RAFT polimerizasyonu tekniğiyle polimerizasyonunu bildirmişlerdir. Bu sentetik yöntemle birçok amino asit tabanlı akrilamid türevi polimerize edilmiştir [37].

2.2. Amino Asit Kopolimerler

Amino asit içeren blok kopolimer, hem endüstriyel hem de biyomedikal alanlarda, örneğin nanoreaktörler, nano/mikro şablonlar veya nano taşıyıcılar gibi nanoyapılı malzemelerin üretilmesi için ilginç bir araç olarak düşünülmektedir. Polimer sentezindeki son gelişmeler, iyi tasarlanmış ve iyi tanımlanmış yapılara sahip çeşitli blok kopolimerleri tasarlamak için fırsatlar sunmaktadır. Yapısal olarak düzenlenen biyobazlı polimerlerin ve geleneksel sentetik polimerlerin hibridizasyonu, bu amaç için iyi stratejilerden biri olacaktır [76]. Amino asitlerden sentezlenen kopolimerler doğal olarak oluşan L-amino asitlerden sentezlendikleri takdirde, fonksiyonel, kiralite ve çözünürlük açısından ilgili özellik profillerini korudukları için kimyasal ve fiziksel özellikler gösterirler. Proteinlerin aksine, poli amino asit kopolimerlerin tanımlanmış veya spesifik bir amino asit dizisi yoktur ve tipik olarak yalnızca bir veya iki farklı amino asitten sentezlenirler. Amfifilik blok kopolimerleri, biyomedikal açıdan araçlar olarak kullanıldıkları düşünüldüğünde, proteinlere yapısal benzerlikleri nedeniyle son derece uygundur. Ayrıca, L-amino asit yapı taşları, kopolimerlerin bozunma ürünleri yine vücut tarafından kolayca emilen L-amino asitler olduğundan, biyoyumluluğa katkıda bulunabilir [77-79].

Çizelge 2.2'de PAA bazlı malzemeler, bileşenleri ve kullanım amaçları için birkaç örnek özet olarak oluşturulmuştur. Büyük çoğunluğu geliştirmenin ilk aşamalarında, ancak klinik öncesi ve klinik deneylerde ve ayrıca piyasada (yeşil renkle vurgulanmış) bazı örnekler vardır. Aşağıda gösterildiği gibi, bu bileşikler en yaygın olarak kanser tedavisindeki uygulamalar için kullanılır ve Lys en yaygın kullanılan monomerdur.

Çizelge 2.2. PAA bazlı materyallerin özeti.

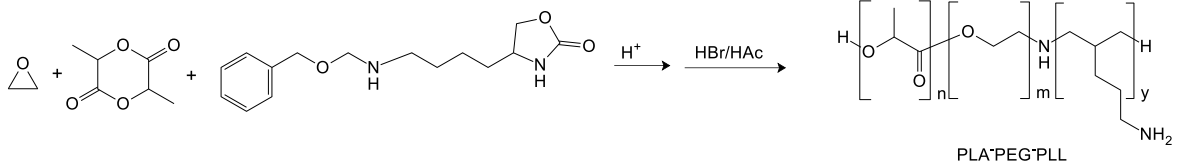
Bileşik	Aktif İlaç-Taşıyıcı Etkileşimi	Amino Asit	Diğer Polimerler	Aktif Madde	Polimer Yapısı	İlaç Taşıyıcı Malzeme
Copaxone		Glu, Liz, Tir		Polimerin kendisi	Random	Polimer
Pliz-blok-Pleu		Liz, Leu		Polimerin kendisi	Blok	Hidrojel
Pliz, Pglu		Liz, Glu		Polimerin kendisi	Homo	Hidrojel
VivaGel	Kovalent	Liz		Naftalin disülfonik asit	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
Opaxio	Kovalent	Glu		Paklitaksel	Homo	Polimer- ilaç konjügasyonu
Nc-6300, K-912	Kovalent	Asp	PEG	Epirobicin	Blok	Polimer- ilaç konjüge edilmiş misel
DEP DOCETAXEL	Kovalent	Liz	PEG	Dosetaksel	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
DEP CABAZITAXEL	Kovalent	Liz	PEG	Kabazitaksel	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
DEP IRINOTECAN	Kovalent	Liz	PEG	İrinotecan	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
DEP AZD0466	Kovalent	Liz	PEG	AZD0466	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
Pliz- ^a DOTA-Gd	Kovalent	Liz		DOTA-Gd	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
Pliz-RGD-DTPA- ^b Gd	Kovalent	Liz		RGD-DTPA-Gd	Dendirimer	Polimer- ilaç konjügasyonu
Pglu- ^c DTPA-Gd	Kovalent	Glu		DTPA-Gd	Homo	Polimer- ilaç konjügasyonu
NK-911	Kovalent	Asp	PEG	Doksorubisin	Blok	Polimer- ilaç konjüge edilmiş misel
Nk-012	Kovalent	Glu	PEG	SN-38 irinotecan aktif metaboliti	Blok	Polimer- ilaç konjüge edilmiş misel
PEG-Pglu-Siplatin	Kovalent	Glu	PEG	Siplatin	Blok	Misel
PEG-Pasp-Paklitaksel	Kovalent	Asp	PEG	Paklitaksel	Blok	Misel
Pliz-blok-Ptir	Kovalent olmayan	Liz ve Tir	PEG	Doksorubisin, Fleorasil	Blok	^d Polimerzom
Pliz-blok-Pglu-blok-Pliz	Kovalent olmayan	Glu, Liz		Plazmit DNA	Blok	Polimerzom
PEG-blok-Pglu-blok- ^e PPHE	Kovalent olmayan	Glu, Phe	PEG	Paklitaksel, Siplatin	Blok	Misel
PEG-blok-Pliz-blok-Pleu	Kovalent olmayan	Liz, Leu	PEG	OVA antigen	Blok	Misel
PEG-blok-PPhe-blok-Pglu	Kovalent olmayan	Glu, Liz, Pphe	PEG	Doksorubisin	Blok	Nanopartikül
Pliz dendrimer	Kovalent olmayan	Liz		DNA, siRNA	Dendrimer	Polimer kompleks
P(Liz-ko-His) dendrimer-DNA	Kovalent olmayan	Liz, His		DNA	Dendrimer	Polimer kompleks

- Dikarboksilat tetraasetat
- Gadolinyum
- Dietilentriaminpentaasetat
- Polimerlerden oluşan ve liposomlara benzer bir nano ölçekli yapıdır.
- Poli(p-fenilen etilen)

Bu tez çalışması kapsamında kondenzasyon reaksiyonu sonucu serbest amin yan grubu taşıyan serin amino asidi içeren blok kopolimerler hazırlanmıştır. Genel bilgi kısmının bu bölümünden sonra kopolimer kavramı üzerinde bahsedildiğinde, spesifik şekilde serbest amin fonksiyonel grubu içeren blok kopolimer kastedilmektedir.

2.2.1. Serbest Amin Grubu İçeren Kopolimerler

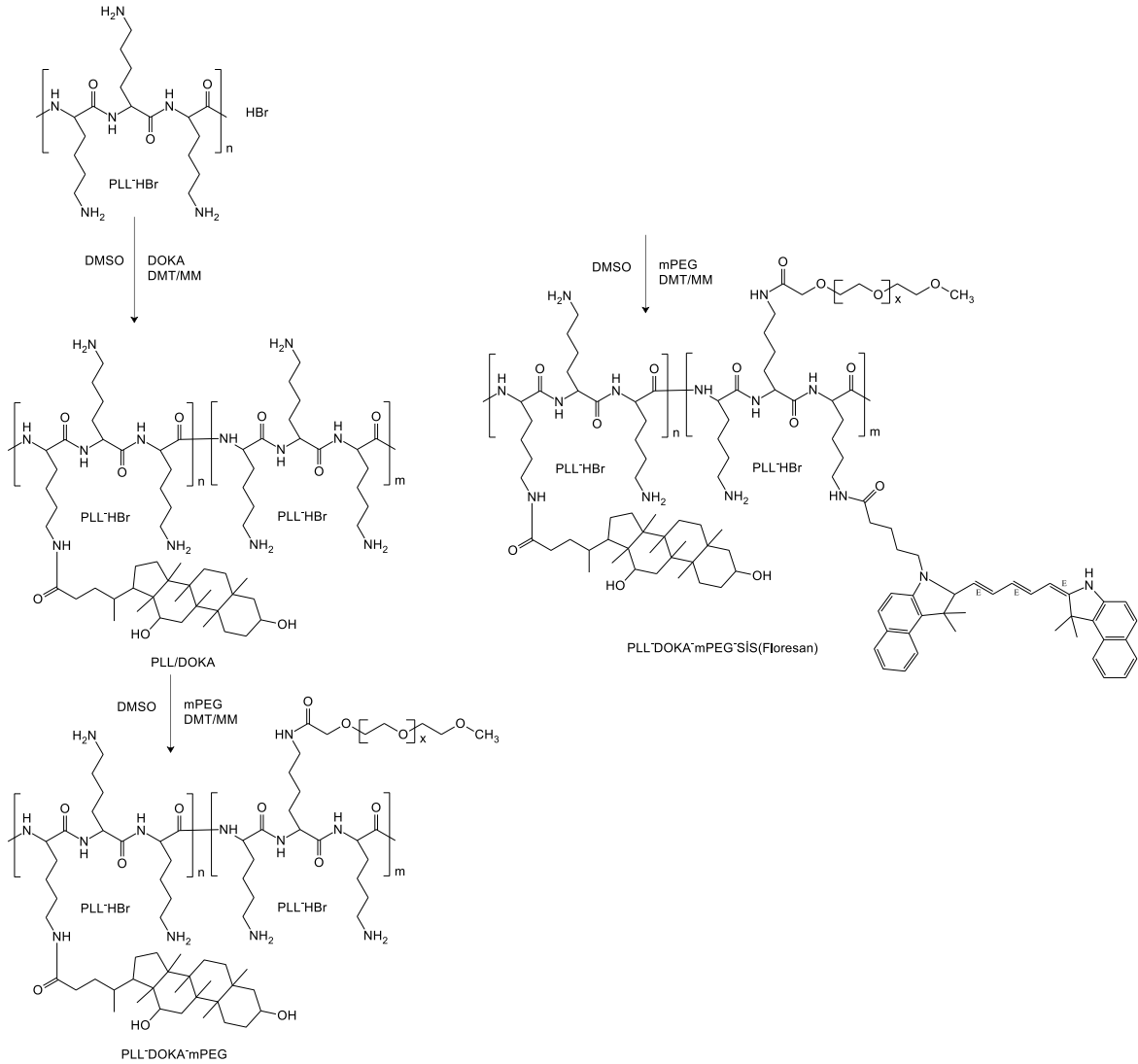
Amin fonksiyonel grubu içeren polimerler karboksilik, aktif esterler ve izosiyanatlarla reaksiyona girebilme özelliği gösterebildiği için farklı kullanım amacına göre yeni polimerlerin sentezinde kullanma özelliği göstermektedirler. Amin yan grubuna sahip olan polimerlerin biyomedikal ve endüstride sayısız uygulamaya sahiptir. Bununla birlikte en önemli uygulamalardan biri ise DNA, amino asit, oligopeptit ve proteinlerin farklı amaçlara göre modifikasyonudur [80]. Fu ve ark, viral olmayan gen taşıması amacıyla biyolojik olarak parçalanabilen yeni poli(laktik asit)-pol(etilen glikol)-poli(L-lizin) (PLA-PEG-PLL) kopolimerini sentezlemişlerdir. PLA-PEG-PLL üçlü-blok kopolimeri, Liz(Z)-NCA'nın amin uçlu NH₂-PEG-PLA polimerin varlığında gerçekleşen halka açılma polimerizasyonu sonucu sentezlenmiştir (Şekil 2.13) [81].



Şekil 2.13. NH₂-PEG-PLA sentezi için kullanılan reaksiyon.

Benziloksikarbonili grubu asitoliz ile uzaklaştırılmıştır. tri-blok kopolimer PLA-PEG-PLL, kationik olan PLL polimeri, PLA ve PEG karakterlerini birleştirerek onlardan oluşan nano parçacıkların yüksek dayanıklılık, hidrofilitik ve oligonükleotit DNA yapısına bağlanabilecek pozitif yük özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir.

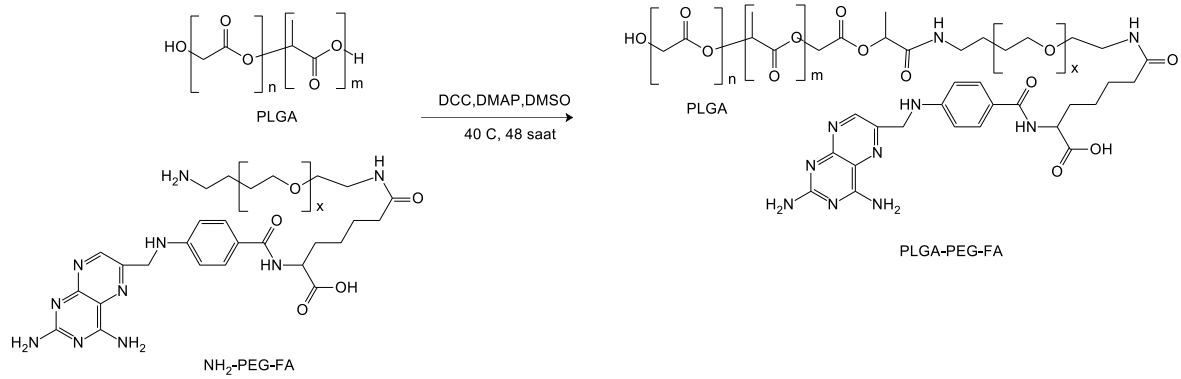
Ynag ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kanser hücrelerine kurkumin maddesinin verilmesi için polilizin bazlı nano partiküller'ler (NP) hazırlanmıştır [82]. Hazırlanan bu nano taşıyıcıda hidrofobik etkileşimler sayesinde daha çok kurkumin hapsedilmesini sağlamak amacıyla deoksikolik asit (DOCA) kullanılmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin dış kısmı m-PEG ile kaplanması sayesinde parçacıklara hidrofilik özelliği kazandırılmıştır. Nanopartiküllere kanser görüntüleme özelliği kazandırmak için ise Cyc5 floresan molekülü PLL ile konjuge edilerek, hem tedavi hem de teşhis amaçlı multi-fonksiyonel bir nataşıyıcı elde etmişlerdir. Konjugasyon reaksiyonarı 4-(4,6-Dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinyum klorür (DMT-MM) varlığında DMSO çözeltisi ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.14). Elde edilen polimer ¹H- NMR ile karakterize edilmiştir,



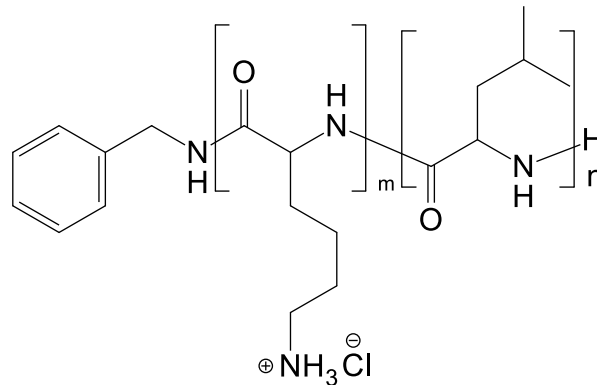
Şekil 2.14. PLL-DOCA-MPEG-cyc5.5'in sentez aşamaları [82].

Antitümör hedeflenme çalışmalarında spesifik ilacın tümör hücresine aktarımı sırasında istenmeyen yan reaksiyonları örneğin protein absorpsiyon veya bağışıklık sistemin nanoparçacıklara karşı tetiklenmesini önlemek için amfilik blok kopolimerler kullanılmaktadır. Örneğin PLA-PEG kopolimeri kullanılarak hazırlanan PLA-PEG-FA (folik asit) ilaç taşıyıcı sistemi FA reseptörlerine eşleşme yoluyla dekstrobisin anti kanser ilacını tümör hücresi içine başarılı bir şekilde taşımıştır [83]. PEG'lenmiş ve FA modifiye edilmiş PLGA (PLGA-PEG-FA) kopolimeri, tek adımlı amitleşme reaksiyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 2.15).

Şekil 2.15. PLGA-PEG-FA kopolimerin sentezi.



Antimikrobiyel özellikler gösteren yüksek molekül ağırlıklı poli(l-lizin hidroklorür)100-b-poli(l-lösin)40 (K100L40) amino asit blok kopolimeri başlatıcı olarak benzil amine kullanılarak ROP yöntem ile sentezlenmiştir. Kopolimerizasyon reaksiyonu yüksek vakum ortamında, dimetilasetamid çözelti fazında gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmanın ilginç noktası jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümler sonucu dar molekül ağırlığına sahip ($\overline{M}_w/\overline{M}_n=1,1$) yüksek molekül ağırlıklı kopolimerin hazırlanmasıdır (Şekil 2.16) [84].



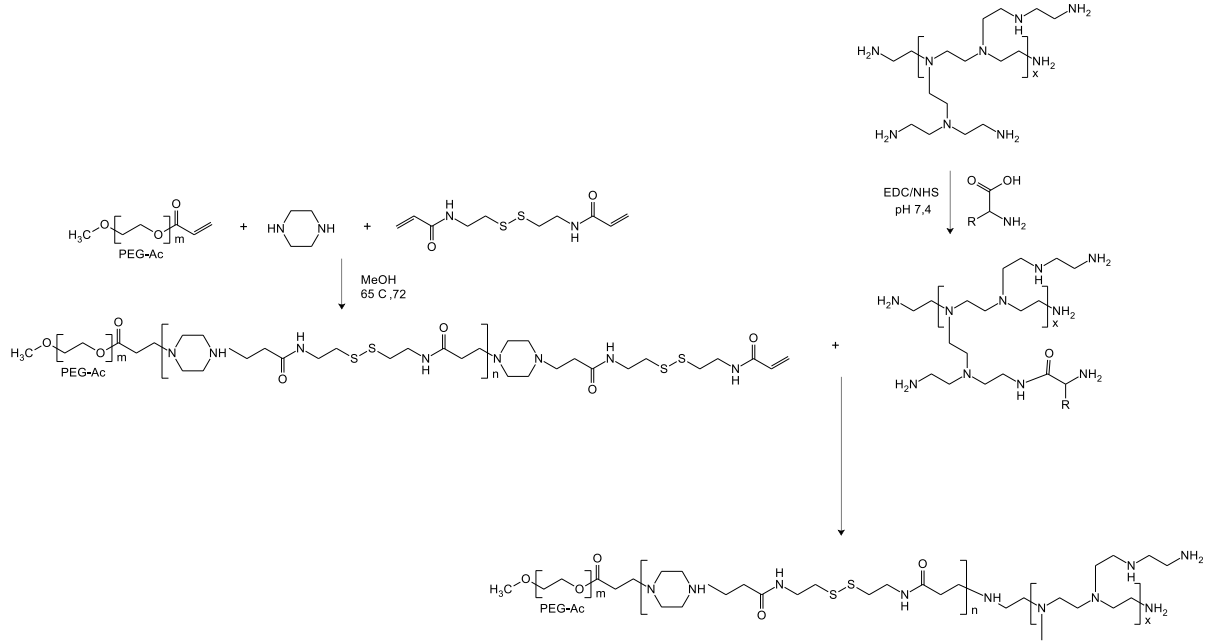
Şekil 2.16. Poli(l-lizin hidroklorür)-b-poli(l-lösin) blok kopolimeri.

Viral olmayan gen taşıyıcı ajanlar olarak kullanılabilen ve biyolojik olarak parçalanabilen R bazlı (NH_2 asılı polimerler) katyonik PAA'lerin hazırlanması, Yamanouchi ve diğerleri tarafından rapor edilmiştir. Son zamanlarda ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı ve sentezi üzerinde bir çok çalışma yapılmıştır. İlaç taşıyıcıların tasarımında dikkat edilmesi en önemli konulardan biri ise ilacın fizikokimyasal ve farmakokinetik yapısına uygun bir şekilde yapılmasıdır [85]. Örneğin katyonik bir ilaca karşılık taşıyıcı polimerin anyonik özellik göstermesi gerekmektedir. Bu özelliği kazandırabilmek için ise polimer zincirinde $-\text{OH}$ ve $-\text{COOH}$ serbest grupların yer alması gerekmektedir. Bunun tam tersi olarak ise anyonik bir ilaca karşılık polimerik bir taşıyıcının $-\text{NH}_2$ gibi yan gruplar taşıması karakteristik bir öneme sahiptir [86]. PPA'lerin, diğer polimerlere benzer bir şekilde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilmeleri için, taşınması hedeflenen ilacla kimyasal etkileşim göstermesi gerekmektedir. PPA'ler Amino asitlerin polimerizasyonu sonucunda reaksiyon mekanizmasına bağlı olarak polimerik zincir boyunca serbest $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ ve $-\text{R}$ grubunda bulunan fonksiyonel gruplarına sahip polimerler şeklinde sentezlenebilmektedir.

Katyonik PAA kategorisinde yer alan ve $-\text{NH}_2$ yan grubu içeren poli-l-lizin düşük toksisite, antijenik olmaması, mükemmel biyouyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle biyomedikal uygulamalarda, özellikle gen dağıtımında ve ilaç dağıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Serbest $-\text{NH}_2$ grupları sayesinde gen-esaslı ilaçların aktarımında yaygın olarak kullanma potansiyeline sahiptir. Çeşitli katyonik polimerler arasında, kitosan [87] gibi doğal polisakkaritler ve poli(etilen imin) (PEI) [88], poli(L-lizin) (PLL) [89] ve poli(amidoamin) (PAMAM) gibi sentetik polimerler [90] genellikle anyonik biyoterapötiklerin verilmesi için kullanılmıştır [91]. Polilizin, yüksek pozitif yük yoğunluğu nedeni ile negatif yüklü makromoleküller (Şekil 2.17) ile etkileşime girebilmektedir. Poli lizini kullanarak DNA [81, 92] ve negatif yüke sahip proteinlerin [93] aktarımı ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur [89, 94, 95].

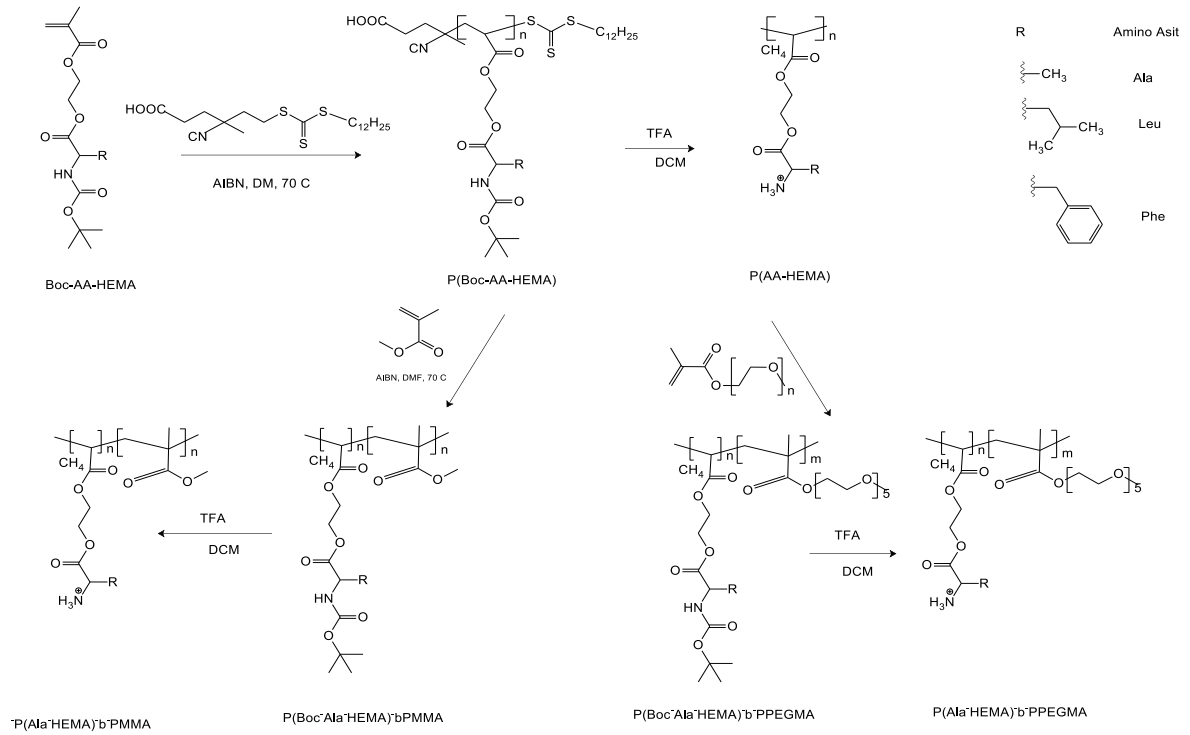
pH ve glutatyona poli(etilen glikol)-poli(β -amino ester)-polietilenimin (PPA) amino asit içeren kopolimer, mPEG-akrilat and poli(β -amino ester) with piperazin Michael addition polimerization yöntemiyle adenovirus salınımı için geliştirilmiştir. Sentezin ikinci aşamasında PEG- poli(β -amino ester)-PPA kopolimeri 0°C sıcaklığında EDC varlığında

etilen imine ile amitleşme tepkimesi sonucu $-NH_2$ asılı kopolimer sentezi gerçekleştirilmiştir [91].



Şekil 2.17. Katyonik özellikler gösteren polilizin içeren PPA kopolimerlerinin sentezi.

Katyonik homo ve blok kopolimerleri antibakteriyel materyal olarak Mukherjee ve diğerleri tarafından sentezlenmiştir [96].



Şekil 2.18. Amino asit tabanlı homopolimerlerin ve blok kopolimerlerin RAFT polimerizasyonu ile sentezi, ardından yan zincir Boc gruplarının uzaklaştırılması.

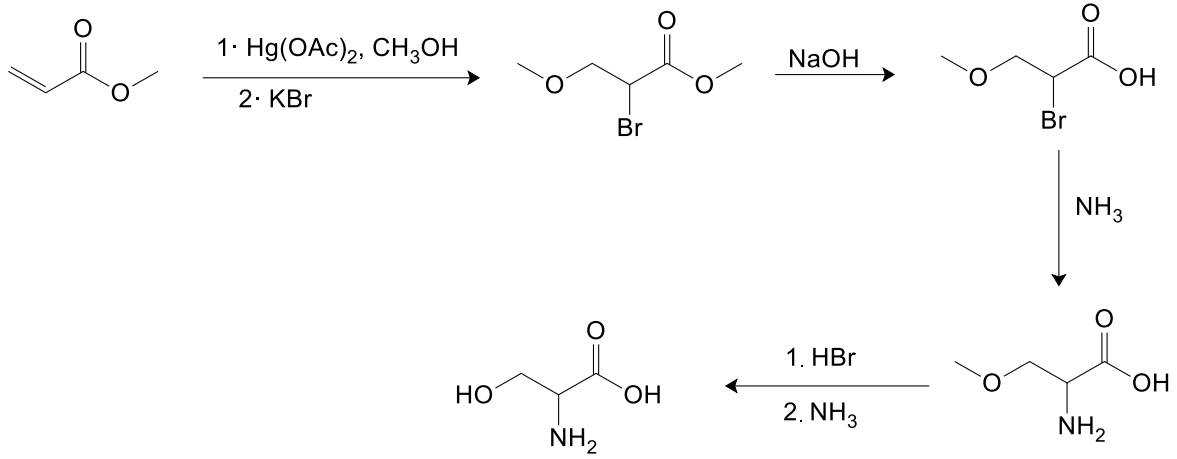
Şekil 2.18’de görüldüğü gibi Metakrilat monomerleri alanin (Ala) veya lösin (Leu) veya fenilalanin (Phe) dimetilformamit’de (DMF) RAFT tekniği ile polimerize edilmiştir. 70 °C’de radikal başlatıcı olarak AIBN ve zincir transfer ajanı olarak 4-siyano-4-(dodekilsülfaniltiyokarbonil)sülfanilpentanoik asit (CDP) kullanılarak [Boc-AAHEMA]/[CDP]/[AIBN] blok kopolimeri elde edilmiştir. Amin koruma grubu trifloroasetic asit ile hidroliz edilmiştir.

Poli(glutamik asit) ve poli(α -L-aspartik asit) ise pozitif yüke sahip olan ilaçların aktarımı için kullanılan ve –COOH yan grubuna sahip olan anyonik PAA’lerdir. Poli(aspartik asit) pH’ya duyarlı hidrojel bir yapıya sahip olduğu için kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve aktarımında birçok uygulamaya sahiptir. Karboksilik yan grup sayesinde katyonik ilaçlar ile etkileşime girebilmektedir. Ortamın iyonik gücünü azaltarak veya pH’yı artırarak poli(aspartik asit) hidrojelinde yüksek oranda şişme görülmektedir. Bu şekilde pH ayarlarını değiştirerek ilaç ile yüklenmiş poli(aspartik asit) hidrojelinde gözenek boyutunu değiştirerek, kontrollü ilaç salımı gerçekleştirilir. Aynı zamanda bu polimerin enzimatik biyobozunurluğunu kimyasal modifikasyonlar ile kontrol ederek, ilaç salım kinetiği isteğe göre ayarlanabilmektedir. Ayrıca, poli(aspartik asit) bazlı hidrojel, herhangi bir katalizöre ihtiyaç duymadan ılımlı koşullar altında modifikasyona karşı esnek olması, poli(akrilik asit) bazlı geleneksel hidrojelere göre tercih edilmektedir.

Kullanım alanına uygun olarak biyomedikal alanında farklı kimyasal özelliklerine sahip amino asitler kullanılarak bir çok polimer sentezlenmektedir. Ancak sunulan bu tezin kapsamı gereği aşağıdaki bölümde serin amino asit ve bu amino asit ile sentezlenmiş/modifiye edilmiş çalışmalar üzerine odaklanmıştır.

2.3. Serin Amino Asidi İçeren Polimerler

Serin biyolojik sistemlerde proteinlerin sentezi için kullanılan hidroksil yan grubuna sahip polar bir amino asittir. Doğal formu ile bilinen L-serin, normal fizyolojik koşullarda vücut içinde glisin ve metanol molekülünden sentezlenir. Endüstride Rasemik serin, metil akrilattan birkaç adımda hazırlanabilir (Şekil 2.19) [97].



Şekil 2.19. Etilakrilat kullanılarak rasemic serin sentezi.

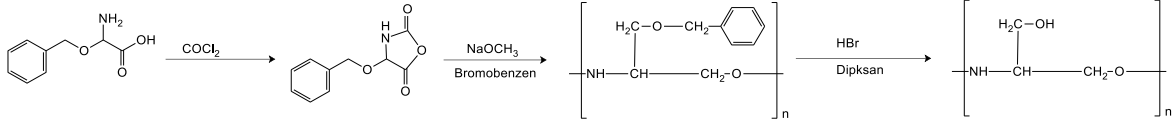
Bununla birlikte L-serin molekülü farklı uygulamalarda kullanmak amacıyla polimerler/biyopolimerlerin sentezinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. L-serin molekülü proteinler, enzimler, polipeptitler gibi kopolimer yapılarının temel taşı olması ile birlikte, sentetik olarak homopolimerlerin sentezinde de kullanılmaktadır.

2.3.1. Serin Homopolimerleri

Günümüzde doğal yol ile sentezlenmiş en büyük serin homopolimer *Dictyostelium discoideum* adı ile bilinen bir tek hücreli türü tarafından 306 tekrarlanan birim şeklinde elde edildiği Tian ve arkadaşları tarafından gözlenmiş/rapor edilmiştir [98]. Serin homopolimerin sentezi için biyopolimerizasyon yöntemi tercih edilen bir metot olsa da, bu polimerin kimyasal teknikleri kullanılarak sentezlenmesi ile çalışmalar rapor edilmiştir/edilmektedir.

1962 yılında Bohak ve arkadaşları, O-benzil-L-serin'den yola çıkarak, dört aşamalı bir reaksiyon sonucunda poly-L-serin molekülünün sentezlenmesini gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyonun ilk aşamasında, serin'in rasemik bir türevinin enzimatik çözülmesi ile O-benzil-L-serin elde edilmiş, fosgen ile muamele edildikten sonra O-benzil-N-karboksi-L-serin anhidrit sentezi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise O-benzil-N-karboksi-L-serin ile N-karboksiyanhidrit sodyum metoksit başlatıcısı içeren bromobenzen çözeltisinde oda sıcaklığında polimerize edilerek poli-O-benzil-L-serin molekülü elde edilmiştir. Son olarak ise poli-O-benzil-L-serinin dioksan içinde susuz hidrojen bromür ile debenzilasyonu ile suda

çözünmeyen poli-L-serin sentezi tamamlanmıştır [99]. Reaksiyon ayrıntılı olarak Şekil 2.20’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.20. O-benzil-L-serin’den yola çıkarak poli-L-serin sentezi.

Serin homopolimerleri sadece serin monomerlerinden oluştuğu için, kimyasal özellikleri kısıtlıdır ve biyomedikal uygulamalarında fazla tercih edilmemesi en büyük dezavantajdır. Dolayısıyla, serin amino asitinin diğer monomerlerle polimerizasyonu ve çeşitli özelliklere ve uygulamalara sahip serin bazlı kopolimerlerin elde edilmesi, birçok araştırma grubunun ilgi odağı haline gelmiştir.

2.3.2. Serin Kopolimerleri

Blok kopolimerler, iki veya daha fazla farklı monomerin kovalent olarak bağlandığı bir dizinimdir. Bir kopolimerin yapısında amino asit bulunduğunda, bu moleküle peptit, protein bazlı kopolimer veya hibrit blok kopolimerleri adı verilmektedir. Son zamanlarda protein bazlı kopolimerlerin sentezi bu polimerlerin göstermiş olduğu avantajlardan dolayı, artan bir ilgi görmektedir. Protein bazlı kopolimer düşük toksisite ve immünojenisiteyi sahip olması ve ayrıca doğal peptit ve proteinlere kıyasla enzimatik parçalanmaya dayanıklılık gibi özellikler sergilemektedirler [100]. Bu nedenle ilaç salınım, doku mühendisliği vb. gibi alanlarda birçok uygulamaya sahiptirler. Protein bazlı kopolimerlerin sentezi biyosentez ve kimyasal sentezi olarak iki farklı yaklaşım ile yapılmaktadır.

Biyosentez yönteminde, biyosistem mühendisliği sayesinde kullanım alanına uygun olarak farklı özelliklere sahip protein bazlı kopolimerlerin sentezi yapılmaktadır. Biyolojik yaklaşımlar ile bu malzemelerin hazırlanması için en çok tercih edilen yöntemlerin biri ise rekombinant DNA teknolojisidir [101]. Literatürde bu teknoloji ile elastin ve ipek benzeri blok kopolimerler, elastin benzeri kıkırdak oligomerik matris protein blok kopolimerleri, örümcek ipek blok kopolimerleri ve sarmal-sarmal alanları olan blok kopolimerlerin sentezi gibi birçok çalışma rapor edilmiştir [102-104]. Rekombinant DNA yaklaşımı,

programlanmış sekanslara, ikincil yapılara, mimarilere ve kesin moleküler ağırlığa sahip blok kopolimerlerin oluşumunu sağlamaktadır. Biyosentez yaklaşımları kontrollu polimerizasyon gibi bir çok avantaja sahip olsa da, maliyet, ekipman ve uzman personel gerektirdiği gibi bazı dezavantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile, protein bazlı kopolimerlerin sentezi için kimyasal yöntemlerin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır.

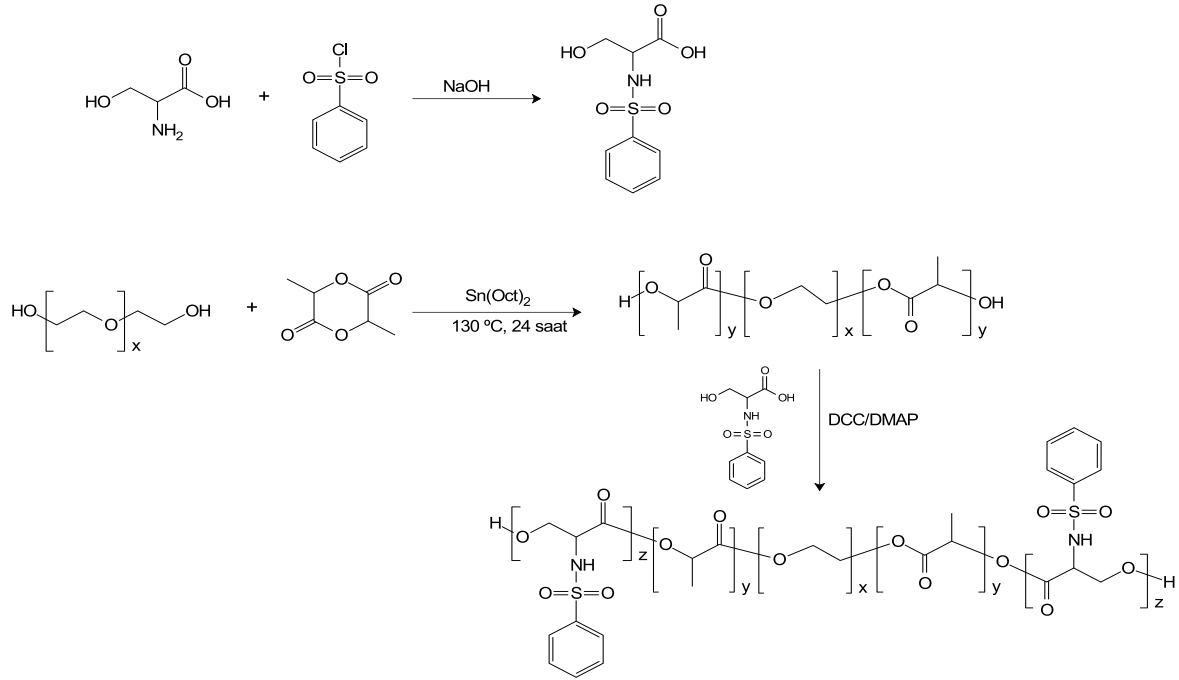
Serin, diğer monomerler ile birlikte polimerizasyonu sonucunda özellikle biyoyumluluğu sayesinde tıpta özellikle ilaç taşıyıcısı ve doku iskelesi malzemesi olarak birçok uygulamaya sahip kopolimerler yapısında elde edilebilmektedir. Literatürde serin kopolimer çeşitleri arasında en çok blok kopolimerin sentezlendiği görülmektedir. Serin blok kopolimerleri uygulama amacına bağlı olarak kopoliester veya kopoliamin yapısında sentezlenmektedir.

2.3.2.1. Serin Ko-Poliester

Serin ko-poliester, polimerik ana zincirinde monomerlerin ester bağı ile bağlanması sonucunda oluşturulmaktadır. Serin ko-poliesterlerin biyomedikal alanında en önemli uygulamalarından biri kontrollu salım sistemleri/ilâç taşınımı malzemesi olarak kullanımıdır. Serin ko-poliesterin sentezinde –OH ile –COOH grupları arasında reaksiyon gerçekleştirilip, –NH₂ grupları serbest olarak polimerin ana zinciri boyunca yer almaktadır. Bu sayede –NH₂ ile reaksiyona girebilen fonksiyonel gruba sahip ilâçların modifikasyonu, kontrollu salımı ve aktarımı için kullanma özelliği göstermektedir.

Le ve ark. kontrollu ilâç salınım/hedeflenme uygulamalarında kullanma amacıyla pH ve sıcaklığa duyarlı özelliği gösteren serin-b-poli(laktit)-b-poli(etilen glikol)-b-poli(laktit)-b-oligomerserin (OS-PLA-PEG-PLA-OS) beşli blok kopolimer molekülünü sentezlemişlerdir. Bu kopolimerin sentezi için Steglich esterifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu reaksiyon üç bloklu PLA-PEG-PLA kopolimerinin -OH grupları ile serin sülfonamidler arasında gerçekleşmiştir. Reaksiyonun devamlılığını sağlamak amacıyla hidroksil gruplarının aktive edilmesi DCC ve DMAP (4-Dimetilaminopiridin), (asil transfer katalizörü) ile sağlanmıştır. Kopolimerin başarılı ile sentezlenmesi NMR ile kanıtlanmıştır. Ayrıca kopolimerin medikal uygulamalara uygunluğu hücre üzerinde MTT (Metiltiyazol

Tetrazolyum) testi ile araştırılmış, sonuçlar bu kopolimerin biyoyumluluğunu göstermiştir [105]. Reaksiyon aşamaları Şekil 2.21’de gösterilmiştir.

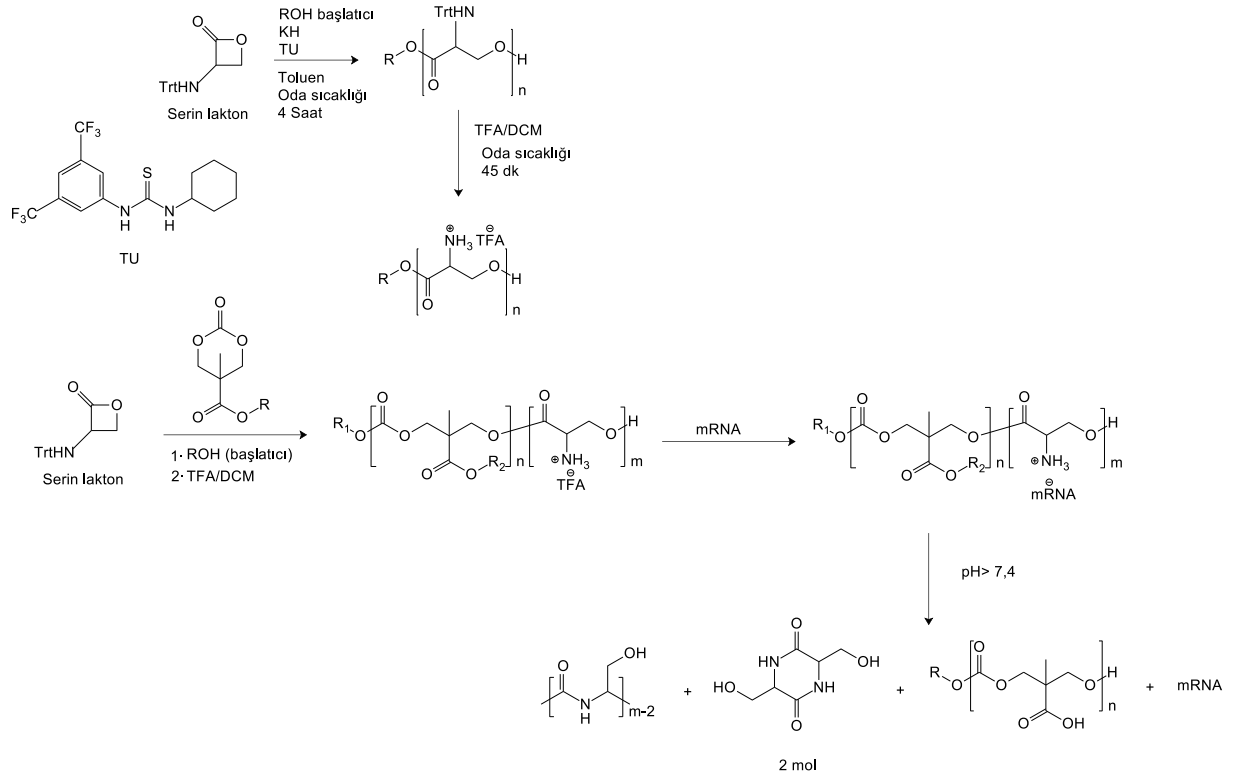


Şekil 2.21. Serin-b-poli(laktit)-b-poli (etilen glikol)-b-poli(laktit)-b-oligomer serin (OS-PLA-PEG-PLA-OS) beşli blok kopolimerin sentez aşamaları [105].

Bu grup tarafından yapılan başka bir çalışmada, diyabet tip 1 hastalığı tedavisinde kullanma potansiyeli gösteren insülin taşıyıcısı ve kontrollü salım özelliğine sahip pH ve sıcaklığa duyarlı oligomer serin-b-poli(laktit)-b poli(etilen glikol)-b-poli(laktit)-b-oligomer serin (OS-PLA-PEG-PLA-OS) beşli blok ko-poliester hidrojel geliştirilmiştir [106]. Hayvan deneyleri sonucu insülin yüklü (OS-PLA-PEG-PLA-OS) kopolimeri kan şeker değerlerinde kontrollü bir şekilde kayda değer bir düşüş göstermiştir.

Benner ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada RNA'nın taşıyıcısı olarak oligo (serin ester) bazlı dublajlı şarj değiştiren serbest bırakılabilir taşıyıcılar (Ser-CARTs) ile bilinin molekülü sentezlenmiştir. Bu amaç için lakton monomeri olan N-tritil-L-serin tiyoüre anyon katalizörü varlığında organokatalitik halka açma polimerizasyon (OROP) yöntemi kullanmıştır (Şekil 2.22). Bu molekül mRNA ile karıştırıldıktan sonra, serin bazlı kompleksler oluşturulup,

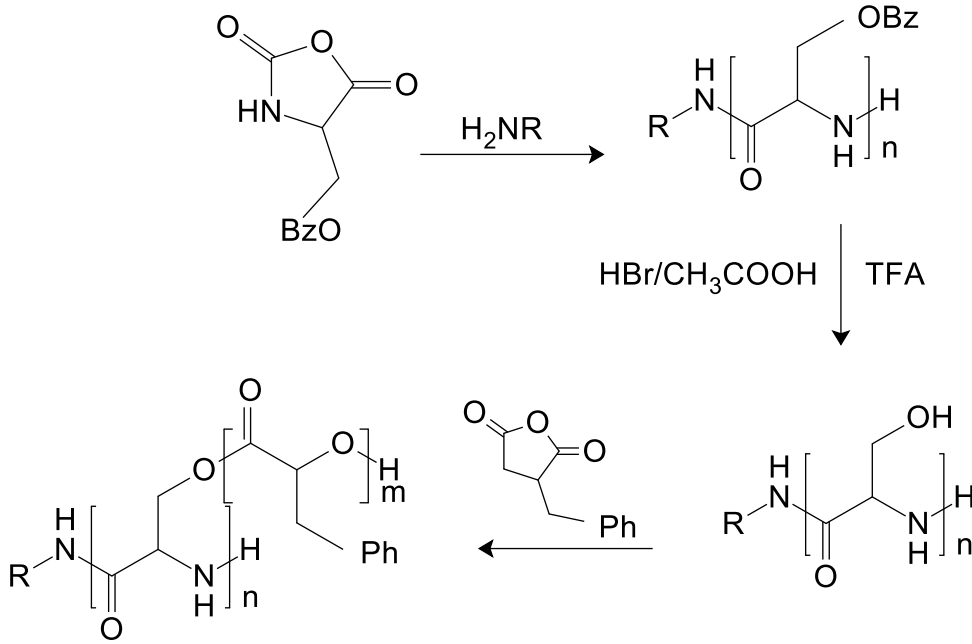
mRNA (messenger RNA) aktarımı için kullanışlı/verimli bir taşıma özelliği göstermiştir [107].



Şekil 2.22. mRNA'nın taşıyıcısı olarak kullanılan oligomerserin ester kopolimer sentezi.

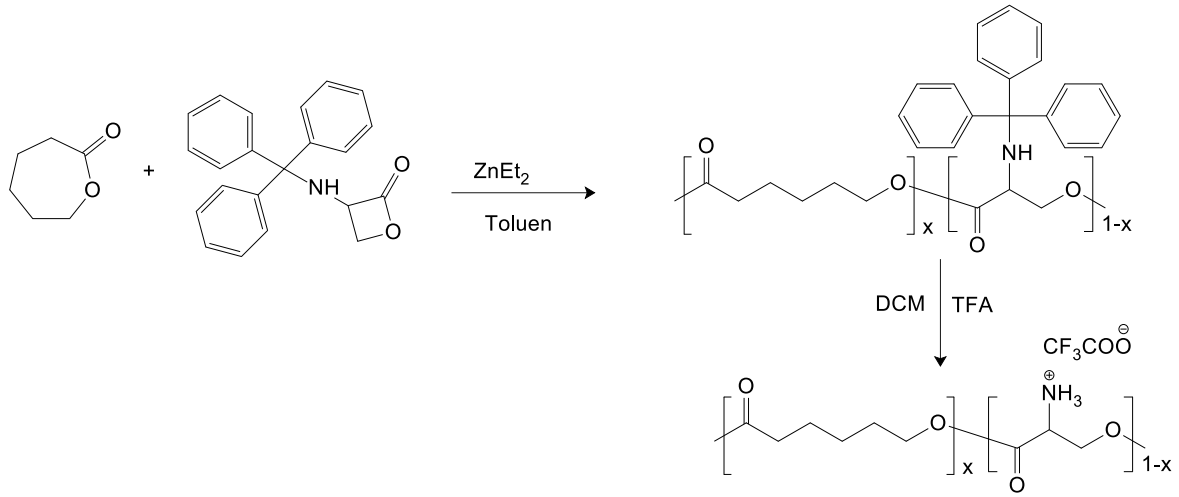
Price ve ark., kontrollü ilaç salım sistemleri ve ilaç taşınım uygulamalarında kullanılabilecek poli(amino asit)-polyester greft kopolimer nanopartikül sentezi üzerinde bir çalışma yapmışlardır. İlk aşamada O-benzil-L-serin' in N-karboksianhidrit formu ve fenilalanin'in O-karboksianhidrit formun sentezlenmesi yapılmıştır. Daha sonra benzil koruma gruplarının kırılması ile birlikte elde edilen poli(ser), DMAP varlığında fenilalanin (phe) O-karboksianhidrit halka açma polimerizasyonunu başlatarak, poli(ser)-g-poli(phe) kopolimerin sentezini gerçekleştirmiştir (Şekil 2.23). Son aşamada ise kendiliğinden düzenlenen (self-assemble) fenomenin ardından polimer zincirleri birleşerek nanopartikül yapısı oluşturulmuştur. DLS (Dinamik Işık Saçılması) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizleri ise nanopartiküllerin başarılı bir şekilde hazırlanmış olduğunu göstermiştir. Elde edilen malzemeyi kontrollü salım sistemlerinde kullanmayı hedefleyen Price ve ark., nanopartiküllerin şişme özelliğini ve bu esnada ilaç salınım yüzdesini araştırarak, pH=5'te en çok ilaç salınımını gözlenmişlerdir. Ayrıca elde edilen poli(ser)-g-poli(phe) kopolimer nanopartiküllerine anti-kanser özelliği gösteren doksorubisin

yükleyerek, kanserli hücre üzerinde etkisini araştırmışlardır. Elde edilen sonuca göre, nanopartiküllere yüklenmiş doksorubisin başarılı bir şekilde salınımı gözlenmiş, 72 saat sonra 1 µg/mL ilaç salınımı gerçekleşerek kanserli hücrelerde %100 oranda ölüme neden olmuştur [108].



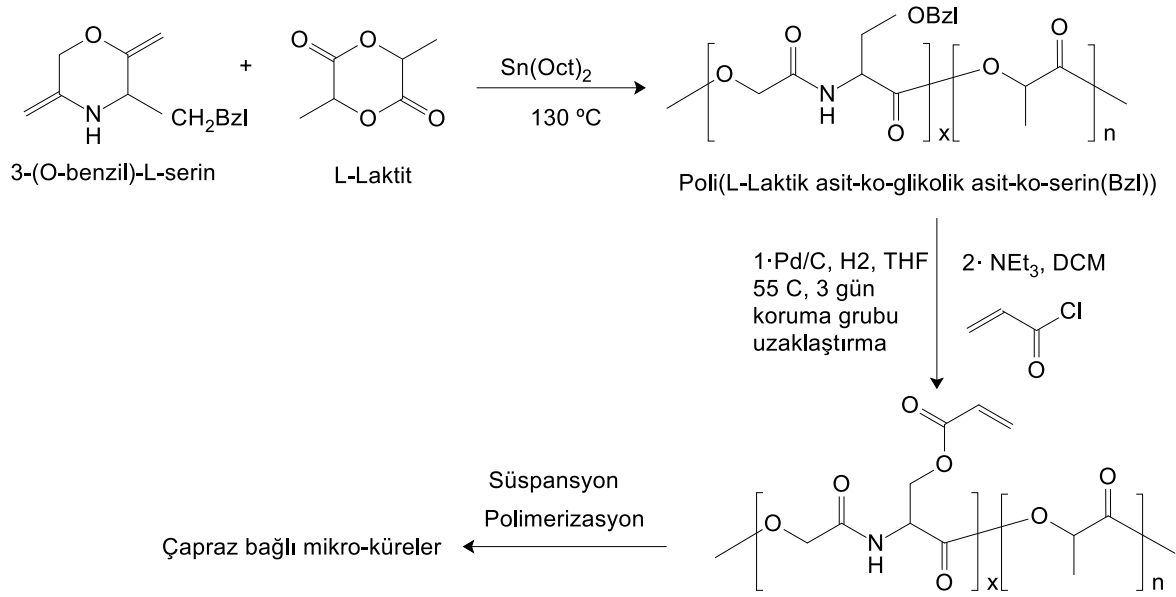
Şekil 2.23. Poli(L-serin)-g-poli(L-phe) kopolimer sentez aşamaları.

Başka bir çalışmada biyosistemlerde farklı amaçlarda kullanma potansiyeli taşıyan serin içeren bir poliester kopolimeri Wei ve ark. tarafından başarıyla sentezlenmiştir. Bu çalışmada poli[(ε-kaprolakton)-ko-(N-tritil-L-serin-β-lakton)] kopolimerinin sentezi için ZnEt₂ katalizörü varlığında ε-kaprolakton'un N-tritil-L-serin-β-lakton monomeri ile kopolimerize edilmiştir (Şekil 2.24). Bu aşamadan ilk önce N-tritil-L-serin-β-lakton monomerin sentezlenmesi DCM (diklorometan) ortamında çözülmüş benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonyum heksaflorofosfat (BOP) reaktifine N-tritil-L-serin molekülü eklenmesi sonucunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilmiş serin bazlı kopolimer NMR ile karakterize edilmiş ve sonuçlar bu kopolimerin başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca sentezlenen kopolimerin biyouyumluluğu L929 fibroblast hücre hattı üzerinde araştırılmış, biyouygulamalar için güvenli bir kopolimer olduğu belirlenmiştir [109].



Şekil 2.24. Poli[(ε-kaprolakton)-ko-(serin lakton)] (P(CL-ko-SL)) sentez aşamaları.

Başka bir çalışmada doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılabilme özelliği gösteren poli(l-laktik asit-ko-glikolik asit-ko-l-serin) polimerinin sentezi ve HEMA (2-hidroksietil metakrilat) ile birlikte mikro-parçacıklar halinde fabrikasyonu John ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [110]. Bu parçacıklar doku iskelesi malzemesi olmakla birlikte ilaç kontrollu salımı, ilaç taşıyıcısı v.b uygulamalarda ise kullanılabilmesi John ve ark. tarafından vurgulanmıştır. Bu çalışmada Şekil 2.25'te gösterilmiş reaksiyonlar sonucunda elde edilmiş [PLA(Glc-Ser)] kopolimerleri UV radyasyonu ile (UV ile başlatılan süspansiyon polimerizasyonu) çapraz bağlanarak [PLA(Glc-Ser)]/HEMA mikro parçacıklar halinde ağ bir yapıda elde edilmiştir. Elde edilen kopolimer ve UV sonucunda elde edilen mikro parçacıklar FTIR ve NMR ile karakterize edilmiş, sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır.



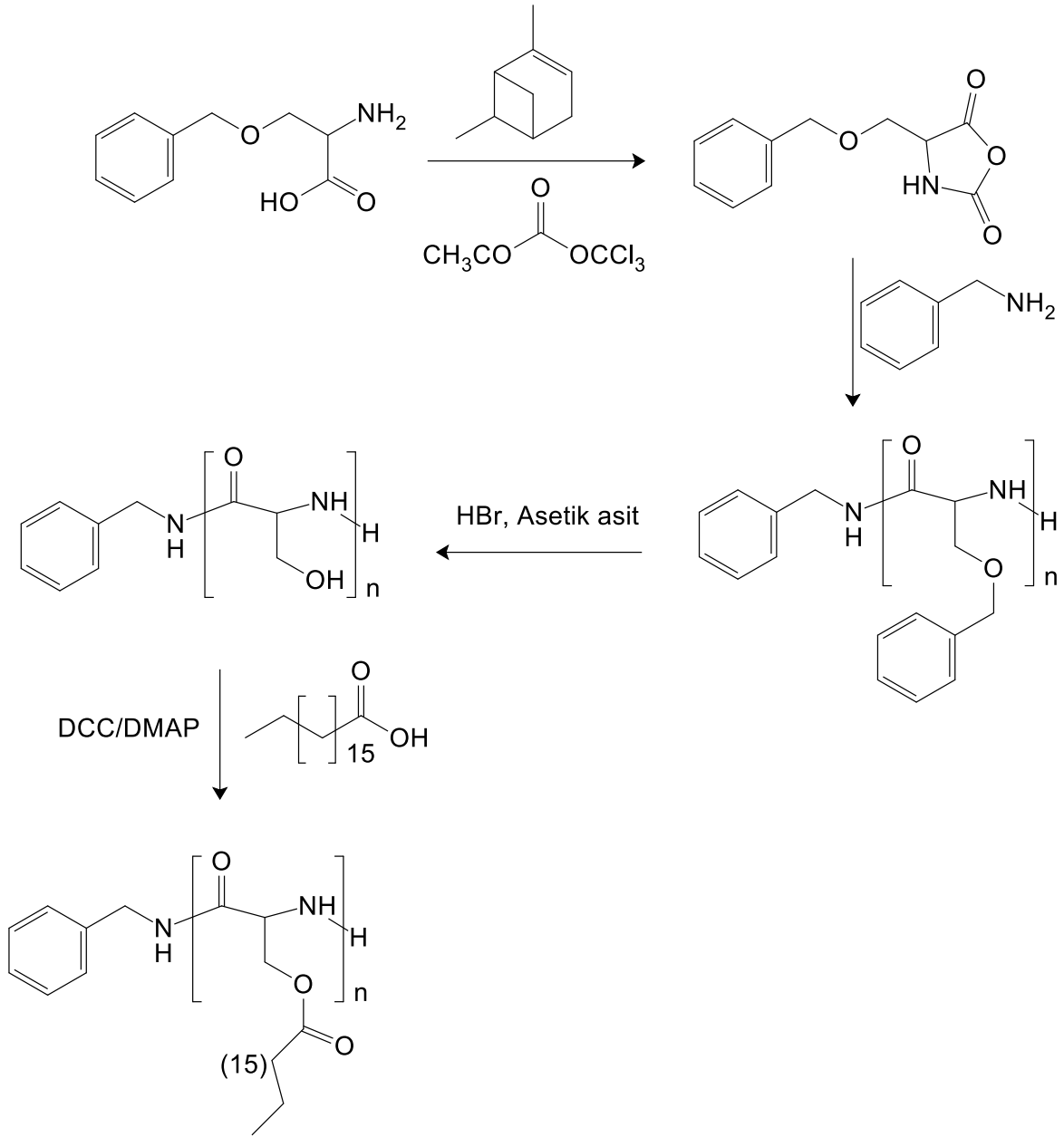
Şekil 2.25. [PLA(Glc-Ser)]/HEMA mikro parçacık ağlarının sentez aşamaları [110].

2.3.2.2. Serin Ko-poliamit

Serin kopoliamid, monomerlerin amit bağı ile bir araya gelmesi elde edilmektedir. Serin kopoliestere benzer bir şekilde kopoliamidler kontrollü salım sistemleri/ilaç taşınımı malzemesi olarak biyomedikal alanında kullanılmaktadır. Serin kopoliamid sentezinde $-\text{NH}_2$ ile $-\text{COOH}$ grupları arasında amit bağı oluşarak, $-\text{OH}$ fonksiyonel grupları serbest olarak ana zincirde yer almaktadır. Bu sayede $-\text{OH}$ ile reaksiyona girebilen fonksiyonel grubuna sahip ilaçların modifikasyonu, kontrollü salımı ve aktarımı gibi birçok uygulama potansiyeline sahip olmaktadır.

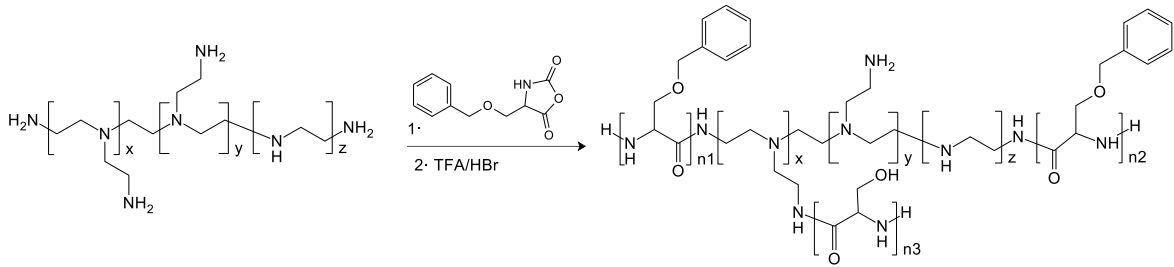
Khuphe ve ark. ilaç taşıyıcı özelliği gösteren poli serin ve oktadekanoik asit graft kopolimeri sentezi üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Bu amaç için ilk aşamada O-benzil-l-serin molekülü N-karboksianhidrit fonksiyonel grubuna çevirilmiş, böylece O-benzil-l-serin molekülünün N-karboksianhidrit formu elde edilmiştir. Daha sonra O-benzil-l-serin molekülünün N-karboksianhidrit formu benzilamin içeren DMF çözeltisinde polimerizasyonu gerçekleştirilip, poli(O-benzil-l-serin) elde edilmiştir. Devamında ise HBr ve asetik asit ile THF ortamında polimerin deprotonizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise DMAP ve DCC kullanması ile birlikte poli(O-benzil-l-serin) molekülleri oktadekanoik asit ile reaksiyona girerek, poli(serin)-g-oktadekanoik asit graft kopolimeri

elde edilmiştir. Bu reaksiyon ayrıntılı olarak Şekil 2.26’da gösterilmiştir. Her aşamada elde edilen moleküller ve polimerler ATR-FTIR spektroskopisi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Yansıma Spektroskopisi) ile analiz edilmiş, karakteristik pikler gözlenmiştir. Poli(serin)-g-oktadekanoik asit grafit kopolimerinin sitotoksik özellikleri hücre kültürü üzerinde test edilmiş, biyouyumluluğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak poli(serin)-g-oktadekanoik asit grafit kopolimerinin enjekte edilebilir bir malzeme olarak kanser tedavisinde kontrollü ilaç salınım malzemesi olarak kullanılabilir özelliğe sahip olduğu kabul edilmiştir [111].



Şekil 2.26. Poli(serin)-g-oktadekanoik asit grafit kopolimerinin sentez aşamaları.

Son zamanlarda gen tedavisi yöntemi kanser ile mücadelede yeni umutlar vaat etmiştir/etmektedir. Buna rağmen bu teknikte kullanılan pDNA ve siDNA gibi gen tabanlı ilaçların eş-zamanlı olarak kanserli hücelere aktarımı başarı açısından halen eksiklikler göstermektedir. Chen ve ark. kanser tedavisinde gen tabanlı ilaçların kombine bir şekilde taşınmasını sağlayabilecek potansiyeline sahip polietilenimin–poli(L-serin) kopolimerini sentezlemişlerdir. Bu kopolimerin sentezi polietileniminler tarafından başlatılan L-serin-N-karboksianhidridin halka açma polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir (şekil 2.27). Proton NMR ve jel geçirgenlik kromatografisi sonuçları bu kopolimerin başarılı bir şekilde sentelenmiş olduğunu kanıtlamıştır. Kopolimerin gen tabanlı ilaç taşıma özelliği ise Zeta-potansiyel ve SEM ile araştırılmış, veriler ve görüntüler gen-kopolimer konjugatının başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermiştir [112].



Şekil 2.27. Polietilenimin ve poli(L-serin)’den oluşan serin ko-poliamit (PEI–PSer) sentezi.

Başka bir çalışmada, Nguyen ve arkadaşları tarafından biyobozunur özellik gösteren ko(benzensülfonamid-serinolaktit) kopolimerinin ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılması amacıyla sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezin ilk aşamasında benzensülfonil klorür ve serinol kullanılarak benzensülfonamid-serinol monomerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonraki adımda benzensülfonamid-serinolün başlatıcı olarak Sn(Oct)₂ katalizörü varlığında laktit ve hidroksil gruplarının halka açma reaksiyonu ile ko(benzensülfonamid serinolaktit) kopolimerin sentezi tamamlanmıştır. NMR ve FTIR analizleri bu molekülün başarıyla sentezlenmiş olduğunu göstermiştir. Sentezlenmiş olan kopolimerin pH-duyarlı özelliğine sahip, biyouyumlu ve enjekte edilebilir bir hidrogel yapısına sahip olduğu belirlenmiştir [113].

Biyomedikal uygulamalarında kullanılan sentetik polimerlerin biyouyumluluğu dikkat edilmesi gereken en kritik konulardan biridir. Aynı zamanda kopolimerler özellikle hidrofobik monomerler ile sentezlendiğinde, biyouyumluluk açısından bazı handikaplar sergileyebilmektedir. Bu nedenle kopolimerlerin biyouyumluluğunu artırmak ve biyolojik

sistemlerde kullanılmasında ortaya çıkacak riskleri minimum seviyeye indirmek için PEG gibi yüksek biyouyumluluk özelliği gösteren polimerler ile kombine edilmesi üzerinde çalışmalar son hızla devam etmektedir.

2.4. Kopolimerlerde PEG Modifikasyonu

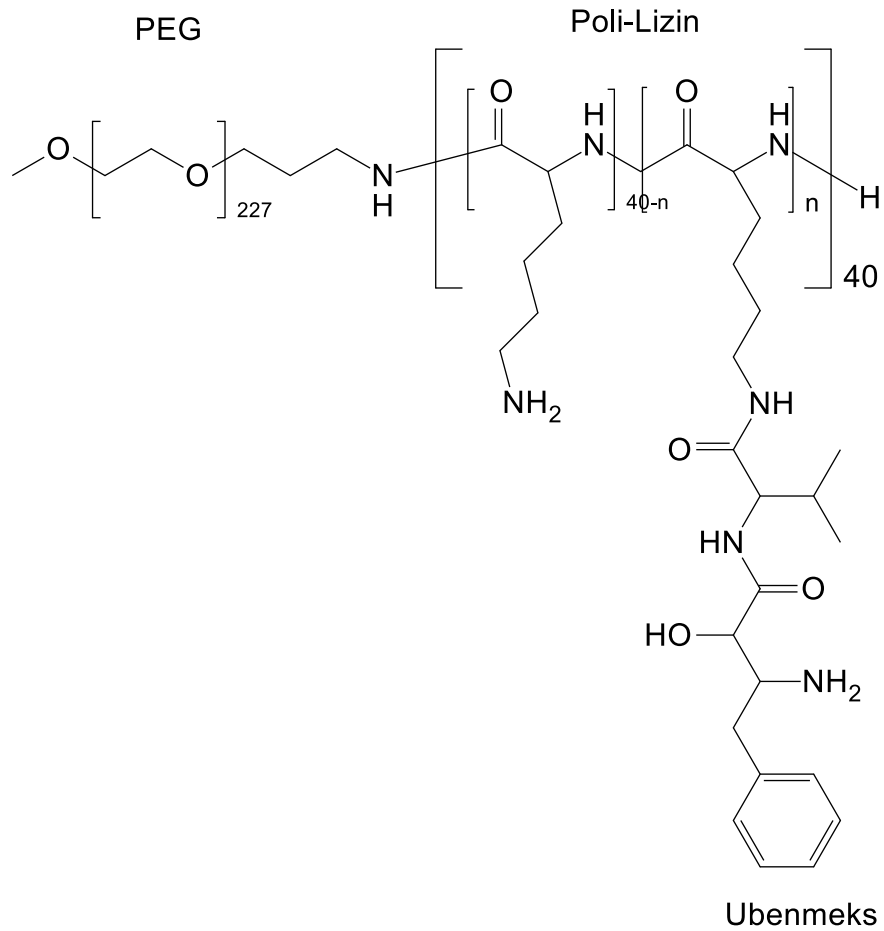
Son 15 yılda PEG türevlendirilmesi ve bioaktif moleküller ile konjugasyonu konusunda birçok bilimsel çalışmalar yapılmıştır [114]. PEG molekülünün biyolojik özellikler taşıması, düşük polidispersite ve inert bir yapıya sahip olması, su gibi bir çok genel çözücüde stabil bir şekilde çözünebilmesi ve en önemlisi farklı gruplar ile fonksiyonelleştirilebilmesi ve kullanım amacına uygun uç gruplara sahip olabilmesi, bu molekülün biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak vermektedir. Son zamanlarda özellikle ilaçların güvenilirliğini ve biyouyumluluğunu artırmak için bu moleküllerin PEG ile modifikasyonu yaygın bir şekilde yapılmaktadır. PEG'ilyasyon, ilaç molekülün biyomedikal özelliğini, elektrostatik bağlanması ve hidrofobikliği gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirip, farmakokinetik davranışlarında gelişmelere neden olmaktadır. Genel olarak, PEG'ilyasyon ilaç çözünürlüğünü artırıp, immünojeniteyi azaltmaktadır. PEG'ilyasyon ayrıca ilaç stabilitesini ve konjugatların kanda kalma süresini arttırmaktadır. Bu olumlu farmakokinetik sonuçlardan yararlanmak için, çeşitli terapötik proteinler, peptitler ve antikor fragmanlarının yanı sıra küçük molekül ağırlığına sahip ilaçlar da dahil olmak üzere PEG ile modifiye edilmektedir [114]. Ek olarak, PEG'ilyasyon, ilaçların minimum dozda uygulanmasını sağlayarak klinik yanıtlarında süreklilik kazandırarak hem maliyet açısından hem de hasta rahatlığı açısından yaşam kalitesinin artırılması için büyük katkıda bulunmaktadır. PEG'ilyasyonun göstermiş olduğu olağanüstü avantajları sayesinde birçok firma tarafından yeni nesil ilaçlar olarak piyasaya sunulmuştur. Halihazırda sağlık sektöründe PEG ile modifiye edilmiş onaylı ilaçların kısa bir listesi Çizelge 2.3'te verilmiştir [114].

Çizelge 2.3. Piyasaya başarıyla sunulmuş PEG ile modifiye edilmiş bazı ilaçların listesi.

İlaç Ticari adı	Etken madde	Tedavi alanı
Adagen®, Enzon Inc.	PEG'lenmiş sığır adenosin deaminaz	Şiddetli kombine immün yetmezlik hastalığı
Oncaspar®, Enzon Inc.	PEG'lenmiş L-asparaginaz	akut lenfoblastik lösemi
Neulasta®, Amgen Inc.	PEG'lenmiş filgrastim proteini	Nötrofillerin çoğalması ve farklılaştırılması
PEGIntron®, Schering Plough Corporation	PEG'lenmiş interferon-alpha 2b (IFN α 2b)	Viral enfeksiyonlar ve hücre proliferatif bozukluklar
PEGasys®, Hoffmann La Roche Inc.	PEG'lenmiş interferon-alpha 2b (IFN α 2b)	Viral enfeksiyonlar ve hücre proliferatif bozukluklar
Somavert®, Pfizer Inc	PEG'lenmiş spesifik büyüme hormonu reseptör antagonisti	Akromegali hastalığı
Macugen®, Eyetech Inc. and Pfizer Inc.	Vasküler endotelial büyüme faktörüne karşı PEG'lenmiş aptamer	patolojik oküler neovaskülarizasyon
Cimzia®, UCB S.A.	PEG'lenmiş insanlaştırılmış anti-tümör nekroz faktörü (TNF- α) monoklonal antibodisi	Romatoid artrit ve sedef hastalığı

PEG'in istenilen biyo-özelliklerini diğer polimerik yapılar üzerinde bulundurmak amacıyla blok kopolimerleri hazırlanmaktadır. Örneğin kontrollü ilaç salımı sistemlerinde hidrofobik polimerlerin PEG varlığında kopolimeri hazırlanarak amfifilik yapıya sahip ilaç taşıyıcı sistemler sentezlenebilmektedir [115]. PEG'in tekrarlanan eterik yapısının aktif olmamasından dolayı, farklı polimerle blok kopolimerini hazırlamak için gerçekleşecek kimyasal reaksiyonda PEG'in uçlarında bulunan hidroksi gruplarına uygun fonksiyonel grupların takılması gerekmektedir. Örneğin, PEG'in metalik veya metal oksit yüzeylere immobilize edilmesi için sırayla tiyollenmiş ve karboksillenmiş PEG polimerleri kullanılır [116, 117].

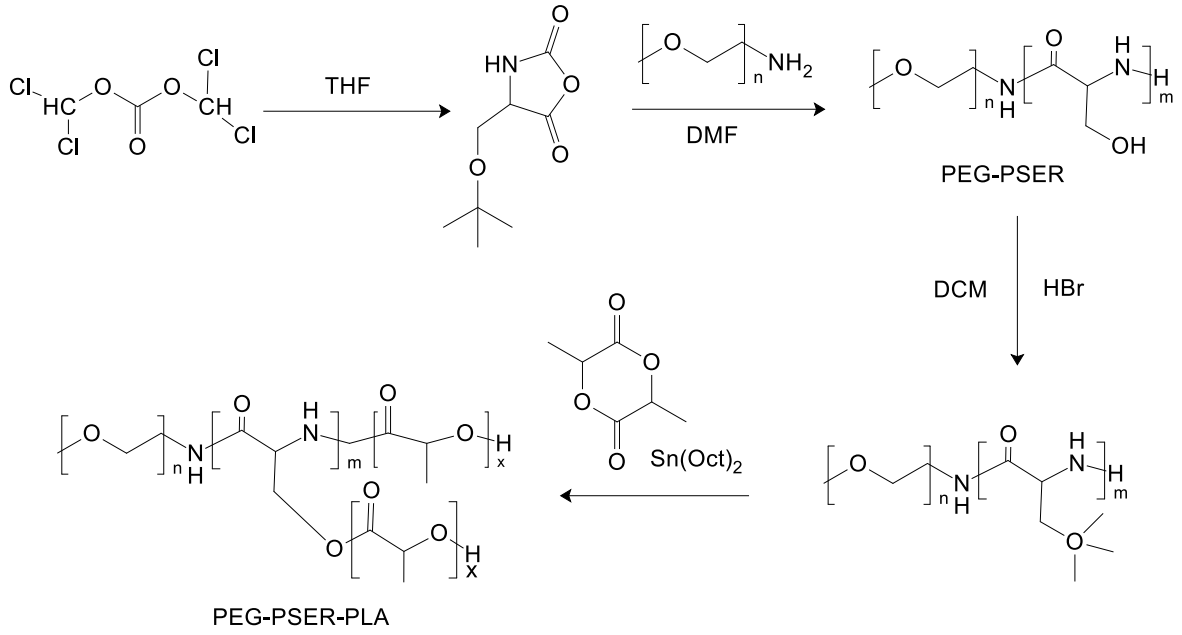
2019 yılında Toshima ve ark., ilaç salım sistemlerinde kullanmak üzere yaptıkları bir araştırmada, APN/CD13⁺ kanserli kök hücrelerinde reaktiflerin etkinliğini artırmak için bir poli(etilen glikol)-b-pol(lizin)-ubenimeks konjugatını (PEG-b-PLys-(Ube)) geliştirmişlerdir. N(APN)/CD13 aminopeptidazı, hepatoselüler karsinoma (HCC) kanser kök hücrelerinin reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini azaltarak hücrelerin canlı tutulması için bir temizleyici görevini üstlenmişlerdir. Bu nedenle, APN/CD13 inhibisyonunun, hücre ROS seviyelerini arttırabileceği ve hücreleri kemoterapötik maddelere duyarlılaştırabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Bu amaç doğrultusunda kullanılan ubenimeks ilacı hücre içi ROS seviyesini çoğaltarak HCC kanser kök hücrelerinin üremesini engellediğini ve onların ölümüne sebep olduğu iddia edilmiştir. Ubenimeks salımı poli(etilen glikol) -b-pol(lizin)- ubenimeks konjugatı (PEG-b-PLys (Ube)) şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.28). Sonuçlara göre, (PEG-b-PLys (Ube)) konjugatı kullanılarak ilacın kan dolaşımı sırasında bileşiğin enzimatik bozulmaya karşı korunduğu ve hedef dokuda birikiminin kolaylaştırıldığı gözlemlenmiştir. [118].



Şekil 2.28. Ubenimeks antitümör molekülü modifiye edilmiş, lizin amino asit içeren (PEG-b-PLys (Ube)) kopolimer.

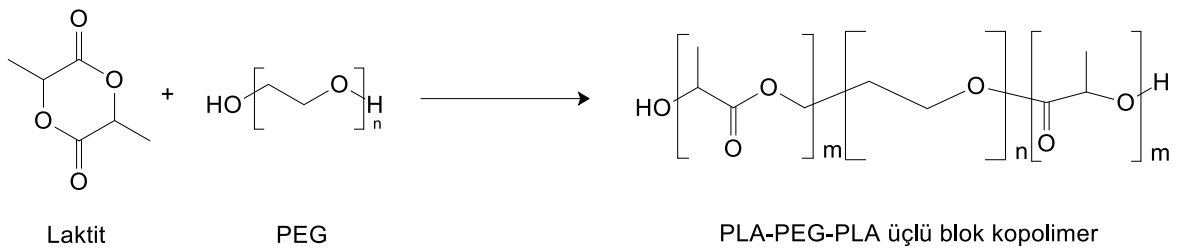
PLA göstermiş olduğu biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi özelliklerden dolayı biyomedikal alanında kontrollü ilaç salınımı, ilaç aktarımı ve doku mühendisliğinde doku iskelesi tasarımı birçok uygulamaya sahiptir. Buna rağmen nispeten hidrofilik özelliği göstermesinden dolayı hücrelere düşük afinite göstermekte olup aynı zamanda biyolojik sıvılarla temas halinde enflamatuvar tepkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle PLA'nın biyomedikal uygulamaları için uygun hale getirebilmesi için farklı tekniklerle PEG ile modifikasyonu gerçekleştirilmektedir [115]. Çekirdek-kabuk yapılarından oluşan miseller, amfifilik blok kopolimerlerinden, sulu bir çözelti içerisinde kendiliğinden düzenlenme olgusu sonucu oluşturulabilmektedir. Bu miseller, doğal olarak mevcut taşıma sistemini taklit ettikleri için ilaçların, biyoaktif maddelerin, proteinlerin ve floresan boyaların taşınmasında yüksek bir potansiyele sahiptirler. Poli(etilen glikol)-block-poli(laktik asit) kopolimer (PEG-b-PLA), sulu bir çözelti içerisinde kendiliğinden düzenlenme yoluyla bir PLA-çekirdek, PEG-kabuk yapısına sahip küresel miseller oluşturabilmektedir. Hidrofobik yapıya sahip olan bir ilaç örneğinin paklitaksel ve doksorubisin (DOX) hidrofobik çekirdeğe kolayca yüklenebilirken, hidrofilik kabuk dolaşım süresini uzatmaya yardımcı olabilmektedir. Bu şekilde PEG-b-PLA miseller, paklitaksel ve DOX gibi hidrofobik ilaçların kontrollü salınımları için geniş bir şekilde kullanılmaktadırlar. Sözü geçen PEG-b-PLA ikili-blok kopolimer Sn(Oct)₂ katalizörü ve PEG₅₀₀₀'in varlığında, L-laktitin halka-açılma polimerizasyonu sonucu sentezlenmiştir.

Benzer bir çalışmada, Lee ve arkadaşları ilaç taşıma potansiyeli gösteren, PEG içeren, bir nanopartikül kopolimerin sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu kopolimer hidrofilik PEG ile hidrofobik PLA moleküllerini L-serin ile birbirine bağlanmış şekilde sentezlenmiştir. İlk aşamada poli(etilen glikol)-b-poli(L-serin) kopolimerin sentezi 5000 mol kütlesine sahip metoksi-poli(etilen glikol)-amin başlatıcının varlığında O-(tert-butil)-L-serinin N-karboksiyanhidridinin halka açılma polimerizasyonu ve ardından tert-butilin çıkarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada elde edilen kopolimer D,L-laktik asit ile polimerize edilerek poli(etilen glikol)-b-[poli(L-serin)-g-poli(D,L-laktit)] kopolimeri elde edilmiştir. ¹H-NMR sonuçları kopolimerin başarı ile sentezlendiğini göstermiştir. Daha sonra emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile kopolimer nanopartikülleri elde edilmiş, örnek bir çalışma olarak aminopiren antikanser ilacı ile yüklenmiş ve ilaç salınım özelliği araştırılmıştır [119]. Lee ve ark. tarafından yapılan reaksiyon aşamaları Şekil 2.29'da verilmiştir.



Şekil 2.29. Poli(etilen glikol)-b-[poli(L-serin)-g-poli(D,L-laktit)] kopolimerinin sentez aşamaları.

Başka bir çalışmada, Li ve ark.'larının yaptığı araştırmaya göre PLA'nın termal direncini arttırmak için en basit ve etkili yaklaşımlardan biri, plastikleştirici yardımıyla PLA'nın kristalleşmesini yükseltmesidir. Yeşil ve yüksek verimli bir plastikleştirici olarak PEG, PLA için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaç için değişik molekül ağırlıklarına sahip PEG polimerleri kullanılarak PLA-PEG-PLA üçlü-blok kopolimeri kalay oktoat $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ katalizörü varlığında halka açılma polikondenzasyonuyla sentezlenmiştir [120]. Reaksiyon Şekil 2.30'da verilmiştir.

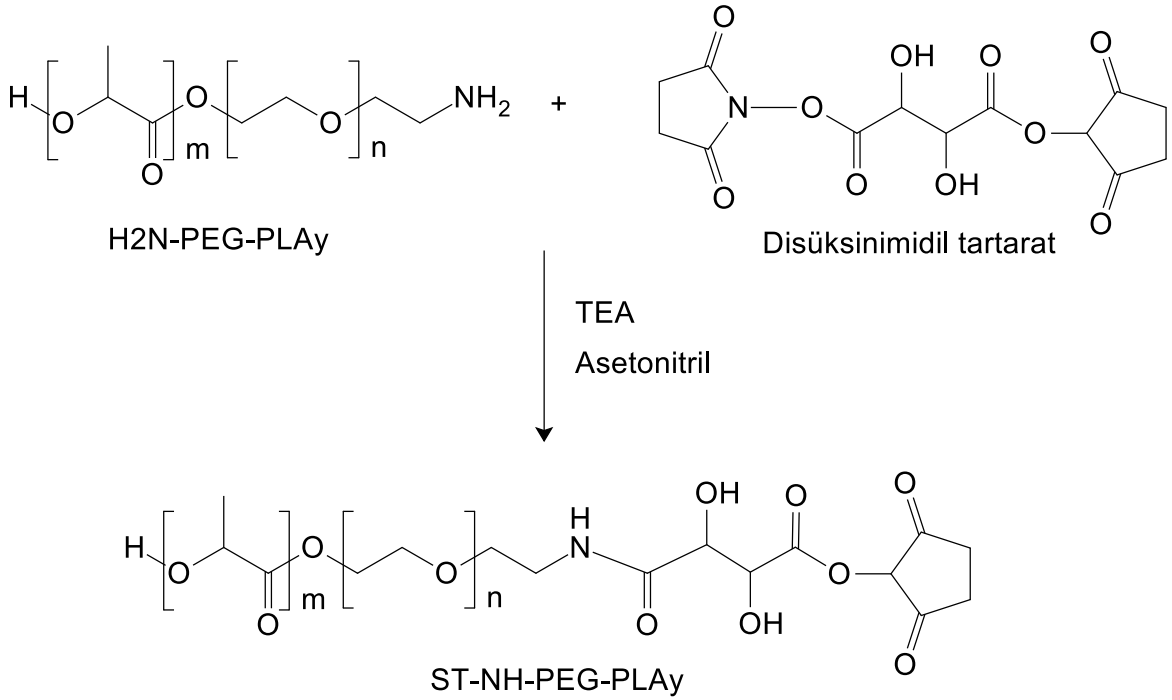


Şekil 2.30. PLA-PEG-PLA üçlü-blok kopolimer sentez reaksiyonu.

Shan ve ark., kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) adı ile bilinen kemik ve kırıkta gelişiminde önemli bir rola sahip olan proteinin kontrollu bir şekilde vücut içinde taşınması

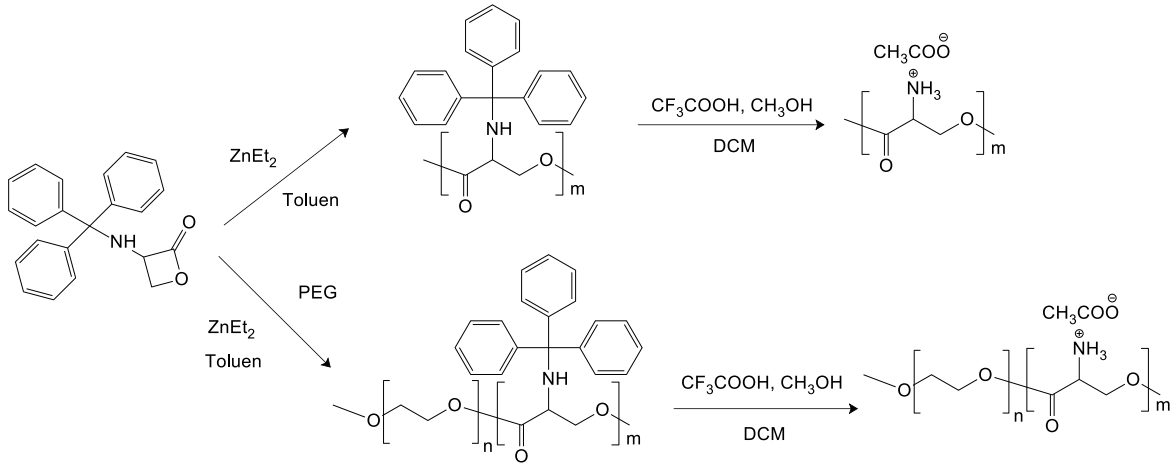
için glisiretinik asit (GA)-poli(etilen glikol)-b-poli(L-lizin) polimerini sentezlemişlerdir. Biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliği gösteren bu polimerin sentezi için ilk aşamada paralel olarak GA-PEG-NH₂ ve PEG-b-PLL monomerleri sentezlenmiş daha sonra bu iki monomerin amino asit N-karboksianhidrid halka açma polimerizasyonu sonucunda GA-PEG-b-PLL polimerini elde etmişlerdir. Sentezlenen polimer ¹H-NMR ile karakterize edilmiş, elde edilen spektruma dayanarak bu polimerin başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır. BMP-2 proteinin enkapsulasyonu PBS'de (Fosfat Tamponlu Salin) GA-PEG-b-PLL ve PEG-b-PLL karışımı ile birlikte elektrostatik olarak kendiliğinden gerçekleştirilmiş, TEM ile konfirme edilmiştir. Sitotoksosite çalışmaları ve histopatolojik analizleri ise GA-PEG-b-PLL polimerin biyouyumlu olduğunu göstermiştir [121].

Tessma ve ark., doku mühendisliği alanında kullanma potansiyeli gösteren biyomimetik yüzeylerinin tasarlanması için yeni PEG ve laktik asit içeren N-süksinimidil tartrat (ST) monoamin poli(etilen glikol)-blok-poli(d,l-laktik asit) kopolimerini sentezlemişlerdir. Polimerizasyon monoamin poli(etilen glikol)-blok-poli(d,l-laktikasit) ile disüksinimidil tartrat molekülünün reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.31). Elde edilen polimer proton NMR ile karakterize edilmiş sentezlenen polimere ait spektrum gözlenmiştir. Kopolimerin amin ve tiyo reaktif özelliği flüresan boyası olan EDANS ve insan insülin üzerinde test edilmiş, sonuçlar bu kopolimerin hücre yapışmasını sağlayabilecek özelliğine sahip olduğunu ve biyomimetik yüzeylerin hazırlanmasında kullanabileceğini göstermiştir [122].



Şekil 2.31. ST-NH-PEG-PLAy kopolimerin sentezini gösteren reaksiyon aşamaları.

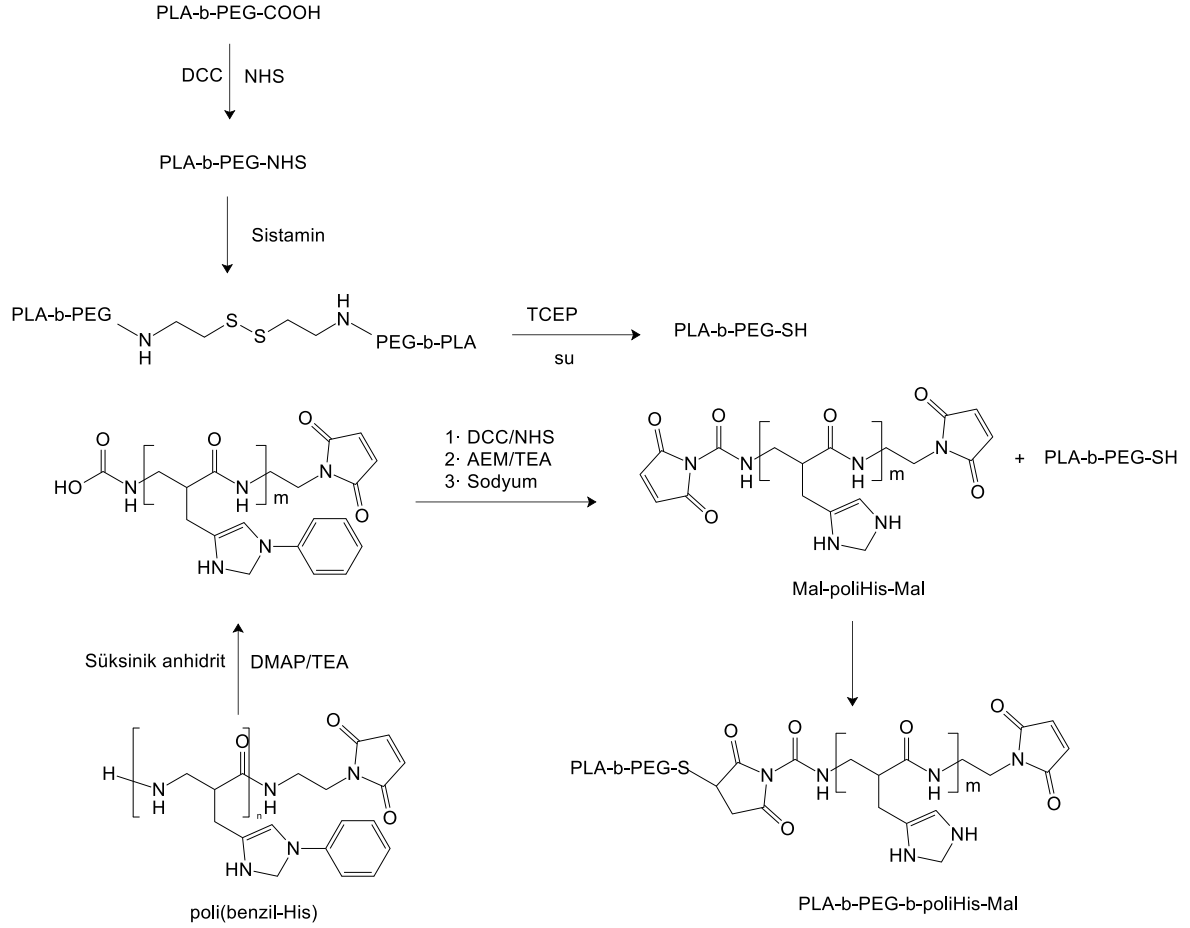
Ying ve ark. ise düşük sitotoksisite özelliği gösteren ve ilaç taşıma potansiyeline sahip amino asit bazlı kopolimer sentezini amaçlamışlardır. Bu çalışmada, dietil çinko (ZnEt_2) katalizörünü kullanarak N-tritil serin laktonun (TSL) halka açma polimerizasyonu sonucunda mPEG-blok-poli(N-tritil serin lakton) kopolimerinin sentezini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.32). Polimerin başarıyla sentezlenmiş olduğunu karbon ve proton NMR ile kanıtlamışlardır. Kopolimerin biyoyumluluğu ise hücre kültürü üzerinde MTT yöntemi ile test edilmiş ve hücre canlılığının %95 üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde sentezlenmiş olan mPEG-blok-poli(N-tritil serin lakton) kopolimeri biyosistemlerde kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir [123].



Şekil 2.32. mPEG-blok-poli(N-tritil serin lakton) kopolimer sentezi.

Lee ve ark., kanserli hücrelerin spesifik olarak görüntülenmesi ve tedavisi için PEG ile modifiye edilmiş PLA ve histidin (His) amino asit içeren bir kopolimerin sentezini başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir [124, 125]. Bu molekülün sentezi için ilk etapta PLA-b-PEG-COOH molekülünde bulunan karboksilik asit grubu N-hidroksisüksinimit (NHS) ile aktifleştirilmiştir. Sonraki aşamada sistamin varlığında PLA-b-PEG-NHS moleküllerinde di-tiyol bağı oluşturarak PLA-b-PEG dimer molekülünü elde etmişlerdir. Daha sonra Tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP) molekülü ile sulu fazda di-tiyol bağların hidroliz edilmesi sağlanmış, böylece PLA-b-PEG-SH polimeri elde edilmiştir. Paralel olarak poli(benzil-His) molekülünden iki aşamalı bir reaksiyon sonucunda iki ucunda malemit fonksiyonel grubu içeren polihistidin (Mal-poliHis-Mal) elde edilmiştir. Son aşamasında ise PLA-b-PEG-SH ile Mal-poliHis-Mal moleküllerin reaksiyonu sonucunda PLA-b-PEG-b-poliHis-Mal kopolimeri elde edilmiştir. PLA-b-PEG-b-poliHis-Mal polimerin sentez aşamaları ayrıntılı olarak Şekil 2.33'te gösterilmiştir. Tüm aşamalarda sentezlenen polimerler ¹H-NMR ile karakterize edilerek, başarılı ile sentezlendiği ispat edilmiştir. Elde edilen polimer, doksorubisin (DOX) ilacının aktarımı için bir taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu amaç için elde edilen polimer farklı oranlarda DOX ile dimetil sülfoksit (DMSO) ortamında diyaliz yöntemi ile misel yapısında elde edilmiştir. Kanser hücrelere afinite gösterebilmesi için ise Trans-Aktivatör Transkriptör (TAT) proteini kullanılmıştır. TAT proteinin'de bulunan sistein amino asitinin tiyol grubu ile polimerin maleimit grupları arasında tiyoeter bağı oluşturularak, ısıya duyarlı özelliğine sahip PLA-b-PEG-b-poliHis-Mal-TAT konjugasyonu oluşmuştur. Bu sayede kanserli hücrelerin ekstra hücrel matrikslerinin (ECM) hafif asidik doğası nedeni ile TAT molekülleri misel dışına açılarak reseptörlere erişimi sağlanmıştır.

Misellerin sitotoksikite ve anti-tümör özellikleri hücre kültüründe araştırılmış ve hazırlanan sistem yüksek bir anti-tümör aktivite göstermiştir. Ayrıca hayvan deneyleri bu sistemin hem tümör görüntülenmesi hem de tedavisi için etkili olduğunu belirlemiştir.



Şekil 2.33. PLA-b-PEG-b-poliHis-Mal kopolimerin sentez aşamaları [124, 125].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

L-laktit (LA, $\geq\%99,9$), N-Boc-dl-serin (ser, $\geq\%99$), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP, $\geq\%99$), N,N'-disikloheksilkarbodiimit (DCC, $\geq\%99$), poli(etilen glikol) (PEG Mw ~ 600, 1000, 1500 Da), tiyonil klorür ($\geq\%99,9$), tetrahidrofuran (THF, $\geq\%99,5$), metanol ($\geq\%99,9$), etanol ($\geq\%99,9$) ve etilasetat (EtOAC, $\geq\%99,5$) kimyasal maddeler Sigma Aldrich' ten satın alınmış ve olduğu gibi kullanılmıştır. Diklorometan (DCM), N-hegzan ve aseton teknik seviye Birpa firmasından temin edilip gerekli koşullarda destile edildikten sonra kullanılmıştır. Tez çalışması boyunca tüm deneylerde su kaynağı olarak deiyonize su kullanılmıştır. Deiyonize su Expe-Ultrapure Water System (Mirae St Co., Güney Kore) cihazıyla üretilmiştir.

3.2. Laktit Saflaştırma

10 g laktit (LD) 100 mL etanol'da, 50 °C sıcaklıkta çözüldü ve sıcakken çözünmeyen safsızlıkların uzaklaştırılması için şırınga filtresi (0,6 μ gözenek çapı) ile süzüldü. Laktit çözeltisi laboratuvar sıcaklığına soğuması bekletilip kristalizasyon işlemi tamamlandı. Süzülüp, soğuk etanol ile yıkanıp kurutuldu.

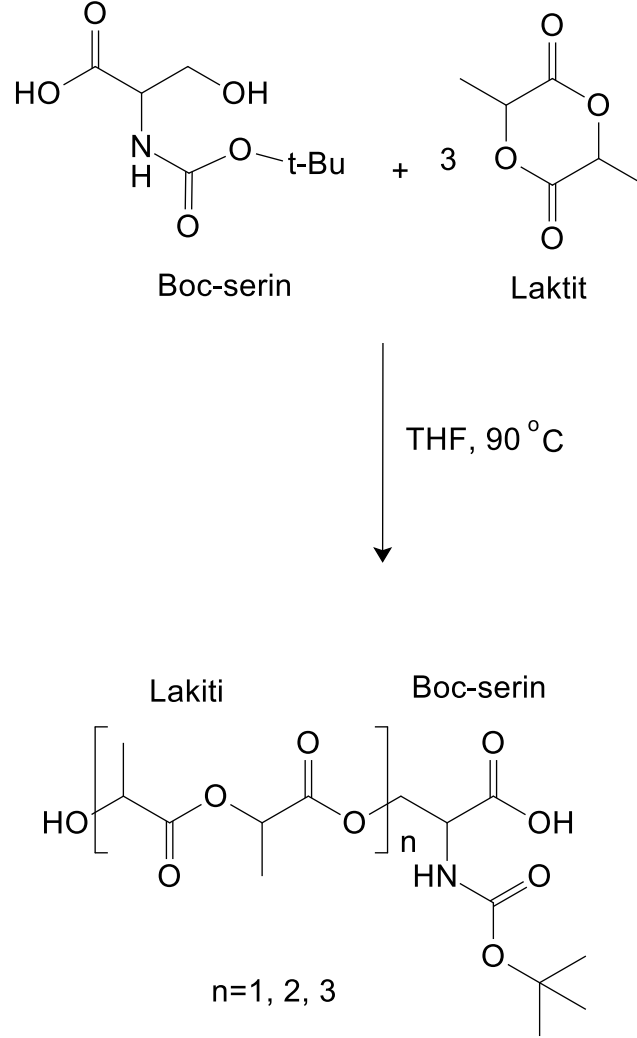
3.3. DCC nin Saflaştırılması

1 g ağırlıkça %98 lik DCC numunesi 15 mL kuru metilen klorürde çözüldü, yaklaşık 1 g susuz MgSO₄ eklendi ve oda sıcaklığında 4 saat karıştırarak bekletildi. DCC ve MgSO₄ bileşenleri süzülerek ayrıldı, diklorometan çözücüsü dönerli rotada 30 °C ta uçurularak saf DCC elde edildi.

3.4. Boc-Serin-Laktit Monomerik Birimlerin Hazırlanması

0,250 g (1,22 mmol) Boc-serin-OH ve 0,53 g (3,66 mmol) laktit 10 mL'lik küçük bir cam şişede 3 mL THF'te çözüldü, şişenin kapağı açık olarak teflon kaplı basınca dayanıklı çelik reaktöre yerleştirildi. Reaktör ve şişe içerisinden azot geçirilerek reaktörün kapağı sıkıca kapatıldı. Etüvde 15, 20, 25 ve 30 saat ısıtılarak LDS, LD₂S ve LD₃S molekül yapılarının

oluşması sağlandı. THF dönerli karıştırıcıda uzaklaştırılıp LD fazlası silika dolgulu kolondan geçirilerek uzaklaştırıldı (kütlece verim %90). Sentezde LD miktarı Serin molünün 3 katı seçilerek laktit halkasının serin molekülleri tarafından açılarak, serin molekülüne tek, iki ve üçlü LD moleküllerinin halka açılımı ile ester oluşumu sağlanmıştır. Önerilen monomerik yapı Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Laktit-Boc-Serin monomerik birimlerin önerilen sentezi.

3.5. Poli(laktit-ko-Serin) ko-polimerinin hazırlanması

Sentezlenen karışım halindeki LDS, LD₂S ve LD₃S monomer moleküllerin polimerizasyonu eriyik, azeotropik kondenzasyon ve N,N'-disikloheksilkorbodiimit kondenzasyonu olmak üzere üç yöntem ile çalışılmıştır.

3.5.1. Eriyik Polimerizasyonu

Eriyik polimerizasyonu iki boyunlu balonda azot atmosferinde, vakumda 120 °C sıcaklıkta 5 saat ısıtım ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler katalizörsüz ve Sb₂O₃ katalizörü kullanarak eriyik polimerizasyonu çalışılmıştır. Soğutulan örnekler çöz çöktür yöntemiyle saflaştırılmıştır. Örneklerin ısısız bozunmasına neden olan eriyik polimerizasyonu sonucu kırmızı oligomerik yapılar elde edilmiştir.

3.5.2. Azeotropik Kondenzasyon Polimerizasyonu

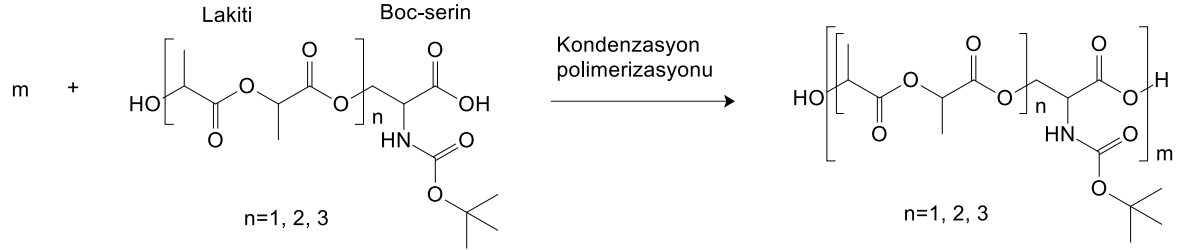
Azeotropik kondenzasyon polimerizasyonu çalışmasında; çözücü olarak THF, toluen ve etil asetat kullanılmıştır. Geri-soğutucuda yoğunlaşan çözücü moleküler sieve den teması sağlanarak kondenzasyon ile açığa çıkan su uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Monomerlerin yapısında serin molekülünün amin grubu t-butiloksikarbonil grubu ile korunduğu için asit katalizörü kullanılamamıştır. Karboksi gruplarında var olan protonun yeterli olması hedeflenmiştir. Polimerizasyon oluşmamıştır.

3.5.3. Disiklohekzilkarbodiimid Kondenzasyon Polimerizasyonu

LDS monomerlerin, kondenzasyon polimerizasyonu (Şekil 3.2) N,N'-disiklohekzilkarbodiimid (DCC) reaktifi ve 4-dimetilamino piridin (DMAP) katalizörlüğünde 0 °C sıcaklıkta kloroform (HCCl₃) çözücüsünde gerçekleştirilmiştir. Kondenzasyon polimerizasyonu öncesi 1,0 g monomer karışımındaki karboksi grup mol sayısı zayıf asit titrasyonu ile belirlenmiştir. Karboksi uç grupların mol sayısının monomer mol sayısına eşit olması nedeniyle LDS monomerinin ortalama molar kütlesi 392 g/mol olarak bulunmuştur. Bu sonuç, LDS monomerlerinin polimerizasyonda ortama eklenecek DCC miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

100 mg LDS monomer küçük bir cam şişede 1-2 mL HCCl₃ çözümlü 0 °C sıcaklığa soğutuldu, gerekli 58 mg DCC miktarının %50'si (29 mg) katı olarak eklendi, üç saat sonra 1/4 (yaklaşık 30 mg) DCC eklendi, bir gece beklenecek kalan DCC eklendi. 12 saat sonra DCC'nin üre formu (üre-DCC) ucuna çam pamuğu takılmış pipet ile süzülerek çözeltilerden ayrıldı. Katı tekrar HCCl₃ ile yıkanarak çözeltiler birleştirildi. Çözücü dönerli karıştırıcıda

vakumda uzaklaştırılıp PLDS ko-polimeri elde edildi. PLDS ko-polimeri'ne THF eklenip çözüldü ve içerisinde kalan üre-DCC'yi uzaklaştırmak için buzdolabında soğutularak tekrar süzülde. THF uzaklaştırılıp PLDS kopolimeri DCM çözücüsünde çözüldü ve n-hekzan ile çöktürülüp, kurutuldu ve karakterize edildi (%50 verim ile).



Şekil 3.2. LDS moleküllerin kondenzasyon polimerizasyonu tepkimesi.

3.6. Poli(laktit-ko-Serin-NH₂) ko-polimerinin Sentezi

Çalışmanın son aşamasında; PEG-LDS-PEG üçlü-blok kopolimerlerinin bileşimindeki serin aminine bağlı koruma (t-butiloksikarbonil) grubunun kimyasal uzaklaştırılması sonucu amin yan grup taşıyan PEG-LDS(NH₂)-PEG üçlü-blok kopolimerleri sentezlenmiştir. Yaklaşık 100 mg PEG-LDS-PEG blok kopolimeri 1 mL DCM çözücüsünde çözüldü, 80 mg %90 HNO₃/ mL DCM çözeltisi azar azar eklenerek FT-IR spektrumu kaydedilip 1366 cm⁻¹ bandının azalması takip edildi. 1366 cm⁻¹ bandının azalması tamamlandığında ortama çapraz bağlı poli(vinil piridin) eklenerek asit piridin tuzu oluşturması sağlanarak uzaklaştırıldı. Elde edilen PEG-LDS(NH₂)-PEG üçlü-blok kopolimerleri çözücüsü uzaklaştırılıp, DCM da çözüldü ve n-hekzanla çöktürülerek saflaştırıldı.

3.7. Spektroskopik Ölçümler

3.7.1. ATR-FTIR Analizleri

FT-IR spektrumları, Thermo Scientific Nicolet IS10 FT-IR spektrofotometre kullanılarak ATR modunda elde edilmiştir. Spektrumların çözünürlüğü 4 cm⁻¹ ve tarama sayısı 64 olarak ayarlanmıştır. Elmas kristal internal yansıtıcı olarak kullanılmış ve yansıma açısı 45 derece olarak belirlenmiştir. Her bir spektrum, 4000-550 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçülmüştür. Spektrumların analizi, OMNIC Software programı kullanılarak yapılmıştır. Bu yazılım, bölgesel entegrasyon, bant analizi ve bölgesel bölme gibi analitik işlemler yapmak için

kullanılan gelişmiş bir spektrum analiz yazılımıdır. Ayrıca, spektrumların işlenmesi, yorumlanması ve verilerin raporlanması için de kullanılmaktadır.

FT-IR spektrumları, örneklerin kimyasal bileşimleri hakkında bilgi sağlamak için kullanılmaktadır. Bu spektrumlar, örneklerin moleküler yapılarını, kimyasal bağlarını ve fonksiyonel gruplarını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, LDS monomerlerinin FT-IR spektrumları, sentezlenen monomerlerin doğrulanmasında ve kimyasal bileşimlerinin karakterizasyonunda önemli bir araçtır.

3.7.2. ¹H-NMR Analizi

Örnekler, oda sıcaklığında CDCl₃ ile çözülmüş ve Bruker 400 MHz-AV FT-NMR spektrometresi kullanılarak ¹H-NMR spektrumları elde edilmiştir. Spektrumlar, KnowItALL Informatic programı kullanılarak analiz edilmiştir. Spektrumların yüksek çözünürlüklü olması için, spektrum kaydı sırasında 32k veri noktası kullanılmıştır. ¹H-NMR spektrumları, dönen çerçeve tekniği (DPFGSE) kullanılarak 16 adet akışkan sıra kullanılarak alınmıştır. Analizde spektrum arka planı için TMS kullanılmıştır.

3.7.3. MALDI-TOF-MS ile Polimerlerin Molekül Ağırlığı Tayini

MALDI-TOF-MS analizleri, molekül ağırlığı tayini için kullanılan bir tekniktir ve genellikle yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin analizinde kullanılır. Bu çalışmada, analizler için UltrafleXtreme MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) kullanılmıştır. Analizler için 337 nm dalga boyunda çalışan azot lazeri kullanılmış ve uygulanan lazer enerjisi gerektiği gibi değiştirilmiştir. İyonlara yaklaşık 20 kV kadar bir hızlandırma potansiyeli uygulanmıştır.

MALDI-TOF-MS analizleri lineer modda alınmış ve yaklaşık 15000 lazer vuruşu toplanarak elde edilmiştir. Analizlerde 20 mg/mL 2,5-Dihidroksibenzoik asit (DHB) (50:50 (v/v) Asetonitril : H₂O) matriks olarak kullanılmıştır. Polimer çözeltisi (10 mg/mL, THF içerisinde) ve matriks çözeltisi homojen hale getirildikten sonra 1:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Elde edilen örnek-matriks karışımları bir MALDI örnek plakasındaki her bir spota 0,5 ile 1,0 µL hacimleri arasında uygulanıp açık havada kurutulmuştur.

MALDI-TOF-MS analizleri, çok hassas ve yüksek çözünürlüklü bir molekül ağırlığı tayini yöntemidir. Bu analizler sayesinde polimer örneklerinin molekül ağırlığı dağılımları belirlenmiştir. MALDI-TOF-MS, polimerlerin karakterizasyonu için önemli bir araçtır ve geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

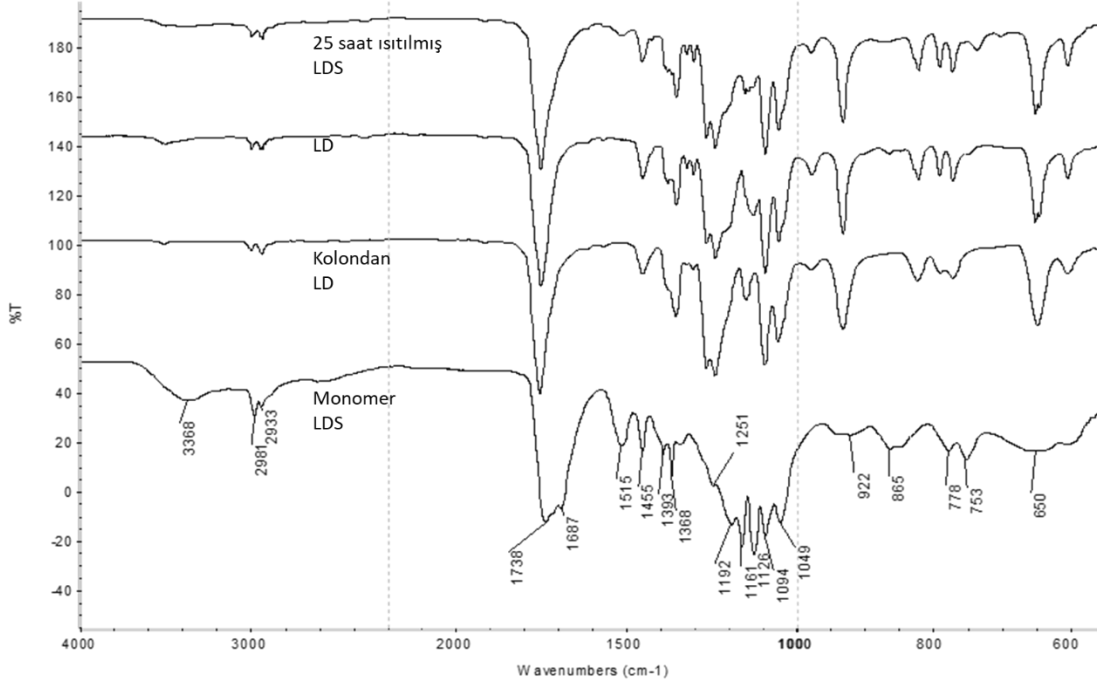
4.1. Spektroskopik Karakterizasyonlar

4.1.1 LDS Monomerin Spektroskopik Karakterizasyonu

Bu çalışmada LD-k-SER-b-PEG polimerlerin üçlü blok kopolimerlerinin sentezi amaçlanmıştır. İlk aşamada SER molekülü kullanılarak laktit halkasının açılımı sonucunda LD-SER mono, di ve tri laktit içeren LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik molekül karışımları hazırlanmıştır. ROP reaksiyonu gerçekleştikten sonra ortamda reaksiyona girmeyen laktit kolon kromatografisi ile uzaklaştırılıp monomerik yapı ATR-FTIR, MALDI-TOF-MS ve ¹H-NMR çalışması ile karakterize edilmiştir.

4.1.1.1. LDS Monomerin FTIR Karakterizasyonu

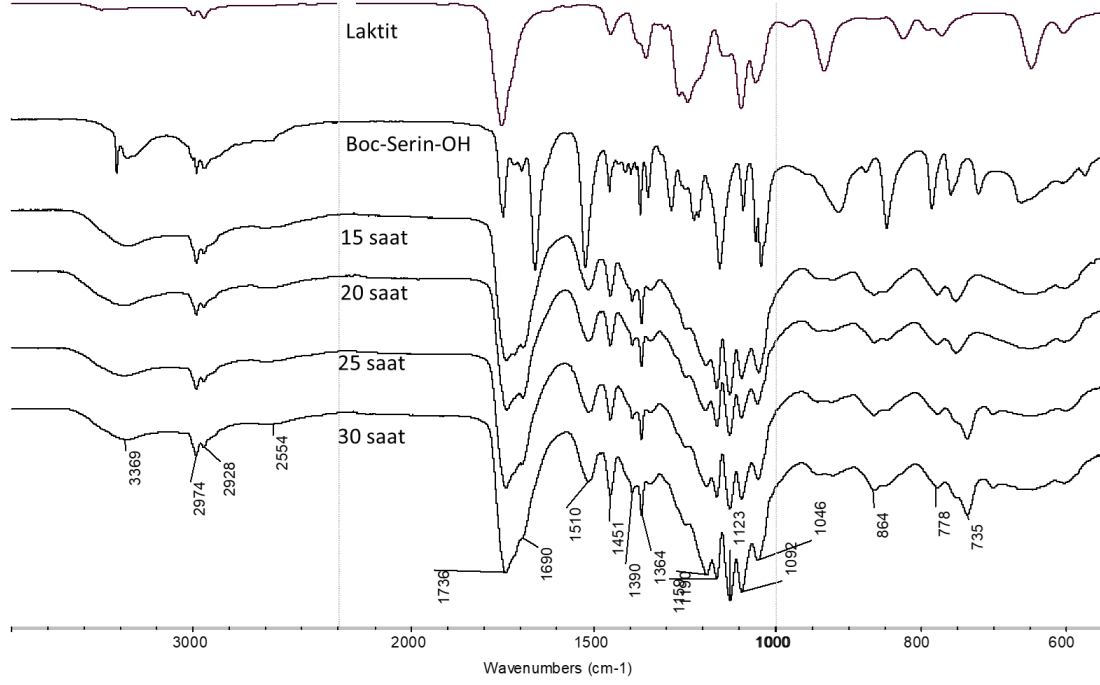
Boc-serin-OH ve laktit reaktiflerinin 1mol serin/3mol LD oranında THF çözücüsünde reaktörde ısıtılması sonucu elde edilen karışımın THF uzaklaştırıldıktan sonra kaydedilen FTIR spektrumu Şekil 4.1 de verilmiştir. Silika kolona DCM çözücüsü ile yüklenen karışım üzerinden DCM çözücüsü geçirildiğinde LD fazlası çözünerek uzaklaştığı, LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik moleküllerin silika kolana adsorplandığı belirlenmiştir. Kolonda tutulan monomerik yapılar etanol ile desorbe edilerek alınmış ve kaydedilen FTIR spektrumu aynı spektrum üzerinde verilmiştir. Spektrumda verilen saf LD molekülün spektrumu DCM çözücüsü ile uzaklaştırılan LD fazlası ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Etanol ile desorbe edilen 15-30 saat ısıtma ile sentezlenen LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik molekülleri DCM da çözülüp n-hekzan ile çöktürülerek saflaştırılmış ve spektrumlar Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. 25 saat ısıtılmış LDS, LD, kolondan alınan LD ve saflaştırılan LDS monomerin FTIR spektrumu.

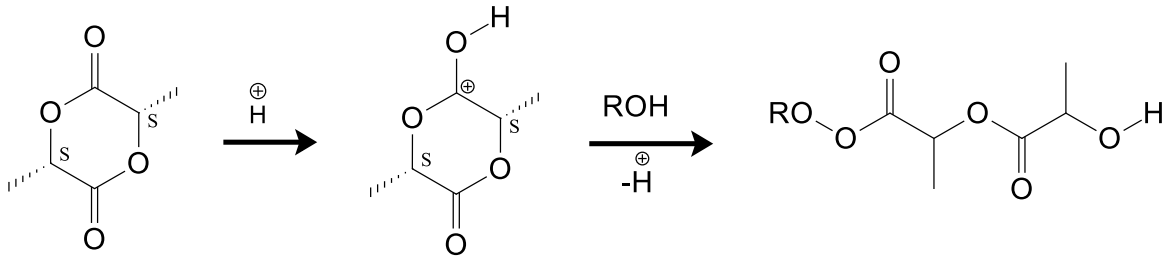
LD, Boc-Serin reaktiflerinin spektrumları ile karşılaştırılan LDS monomerlerin spektrumlarında belirlenen bandlar; metil, metilen ve metin C-H gerilme bandları 3000 - 2800 cm^{-1} , aralığında gözlenmiştir. Monomer yapısında, ürean hidrojeni $-\text{HN}-\text{CO}-$, hidroksi $-\text{OH}$ ve karboksi $-\text{COOH}$ grubundaki aktif hidrojen gerilmesi 3500-3000 cm^{-1} , aralığında yayvan band olarak gözlenmiştir. Monomer yapısında ester karbonili karboksilik asit, ve ürean olmak üzere üç adet karbonil ($\text{C}=\text{O}$) grubu vardır, bu gruplara ait karbonil gerilme bandları sırasıyla 1736, 1720 ve 1690 cm^{-1} dalga sayısında üçlü pik olarak gözlenmiştir. Laktit halkasının karbonil $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimi 1781 cm^{-1} , monomer oluşumunda 1736 cm^{-1} dalga sayısına kaymıştır. 1364 cm^{-1} , dalga sayısındaki amin koruma grubunun (ter-butylkarbonil) metil ($-\text{CH}_3$) bükülme titreşiminin monomer spektrumlarında da gözlenmesi sentez aşamasında koruma grubunun bozunmadan kaldığını göstermektedir. LDS monomer spektrumlarında laktit reaktifinin fazlasının karışımdan ayrılması 936 cm^{-1} 'de bulunan karakteristik C-O-C'nin asimetrik titreşimleri dikkate alınarak takip edilir [126]. Serin yapısındaki $-\text{CHN}-$ deformasyon titreşimi 1510 cm^{-1} çıkmıştır ve bu bandın şiddeti spektrumlarda eşitlenerek diğer bandların yorumlanmasında kullanılmıştır. LDS monomerik yapıların 1510 cm^{-1} bandı eşitlenerek çizilen spektrumlarında sentezde ısıtma süresi arttıkça 1736 cm^{-1} karbonil pik şiddetinin arttığı gözlenmiştir [127]. Bu sonuç; ısıtma süresi arttıkça

serin molekülüne halka açılması ile bağlanan laktit sayısının artmakta olduğunu ve LDS mono katılmanın yanında LD₂S ve LD₃S monomerik yapıların da oluştuğunu açıklamaktadır. Bu sonuç MALDI-TOF-MS spektrumlarında daha net izlenmiştir.



Şekil 4.2. LD, Boc-Serin-OH ve 10, 15 20, 25, 30 saat ısıtma sonucu elde edilen LDS moleküllerinin FTIR spektrumu.

Laktitin halka açılması, bir alkol grubu ve güçlü organik asidin bulunduğu bir ortamda gerçekleşebilir. Genel olarak, bu katyonik halka açılma işlemi, asit protonu alarak aktive edilen laktit halkasının alkol karbonil grubu tarafından saldırıya uğrayarak açılması ve laktit alkolün oluşmasıyla gerçekleşir (Şekil 4.3). Alkolün nükleofilik saldırı yapabilmesi için laktitin protonla aktifleştirilmesi gerekmektedir [128].



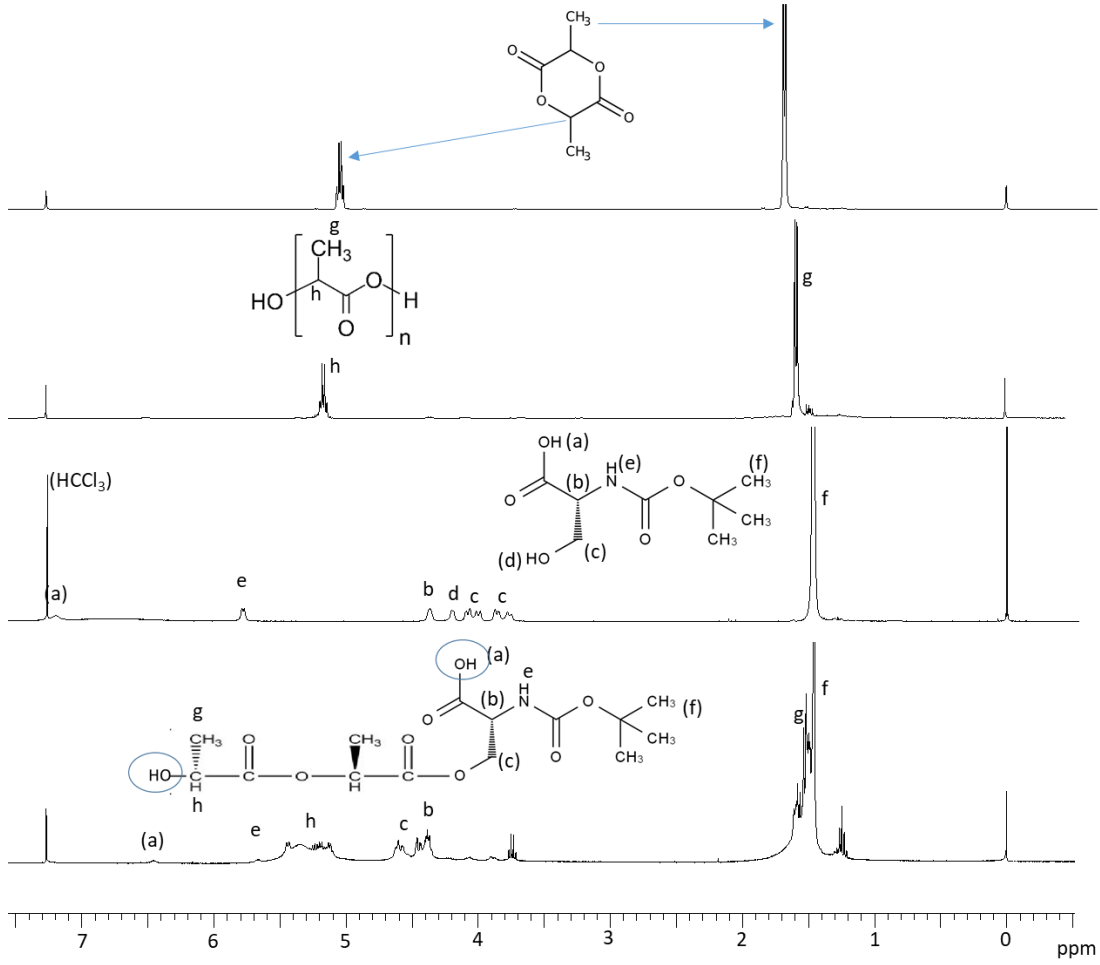
Şekil 4.3. Asidik ortamda laktitin halka açılma mekanizması.

4.1.2. ¹H-NMR Karakterizasyon

4.1.2.1. LDS Monomerin ¹H-NMR Karakterizasyonu

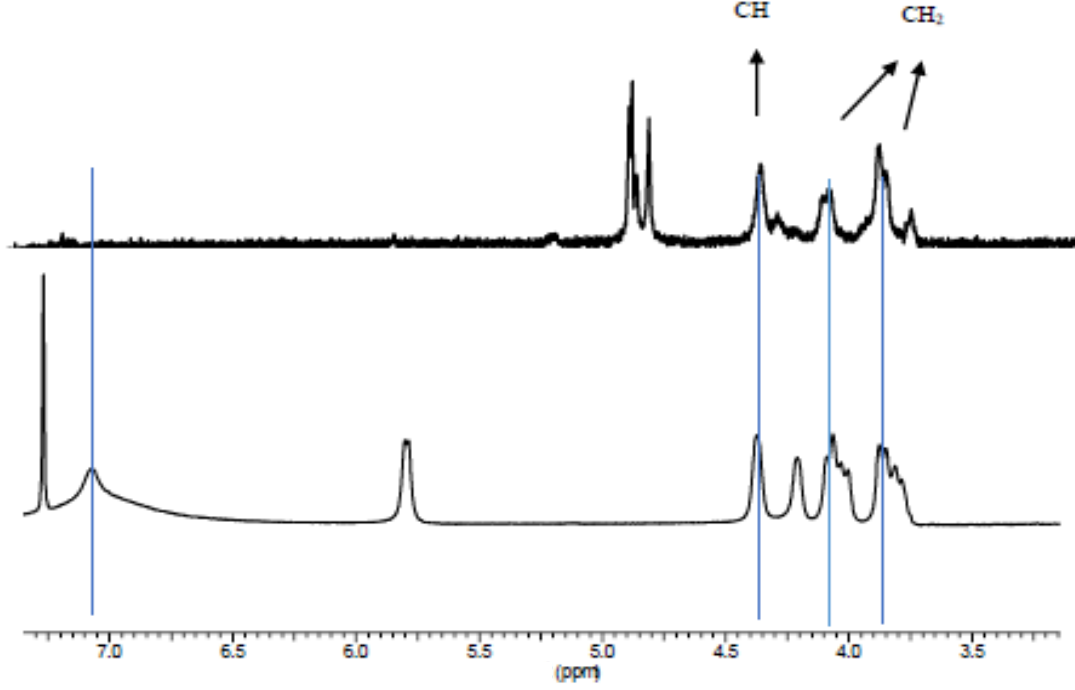
Boc-serin molekülü ile LD'in halka açılması sonucu sentezlenmiş LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik molekül karışımlarını incelemek amacıyla ¹H-NMR analizleri kaydedilmiştir ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Aynı spektrumda laktit, poli(laktik asit) ve Boc-serin moleküllerinin ¹H-NMR spektrumları verilerek proton piklerinin kimyasal kayma değerleri ve değişimi açıklanmıştır. Serin molekülünün ¹H-NMR spektrumunda 1,47 ppm kimyasal kayma değerinde (f) t-butiloksikarbonil koruma grubunun OC(CH₃)₃ (metil) protonları gözlenmiştir ve LDS monomer spektrumunda da aynı kimyasal kayma değerinde çıktığı gözlenmiştir. Bu sonuç, sentez aşamasında koruma grubunun kimyasal bozunmaya uğramadığını açıklamaktadır. Laktit metil (-CH₃) protonları 1,68 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenirken, PLLA polimerinde olduğu gibi, halka açılması sonucu yüksek alana kaymış ve 1,60 ppm kimyasal kayma değerinde çıkmıştır. LDS monomerik moleküllerinde laktit metilleri (g) 1,50-1,60 ppm kimyasal kayma değerlerinde gözlenmiştir. Bu sonuç laktit halkasının açılarak serinin hidroksi grubuyla ester oluşturduğunu açıklar. Ester oluşumuna en büyük kanıt; serin molekülünde gözlenen 4,00-3,70 ppm kimyasal kayma değerindeki metilen (-CH₂-, c) protonlarının esterleşme sonucu 4,70-4,42 ppm kimyasal kayma değerine kaymasıdır. Ayrıca, serin molekülünün hidroksi (-OH, d) grubu esterleşme sonucu kaybolmuştur [129].

LDS monomerinin üretan -NH-COO- protonu ve metin protonu =CH-NH- sırasıyla 5,67 ve 3,40 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir. LDS monomerik yapıdaki laktik asit tekrarlanan gruptaki metin (O-*H*CCH₃-) protonu hem uç, hem de ester grubuna bağlı olarak zincir üzerinde olması nedeniyle ayrıca LD₂S, LD₃S gibi birden fazla laktit takılmış monomerik yapılarda olması nedeniyle yayvan olarak 5,10-5,50 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir [130].



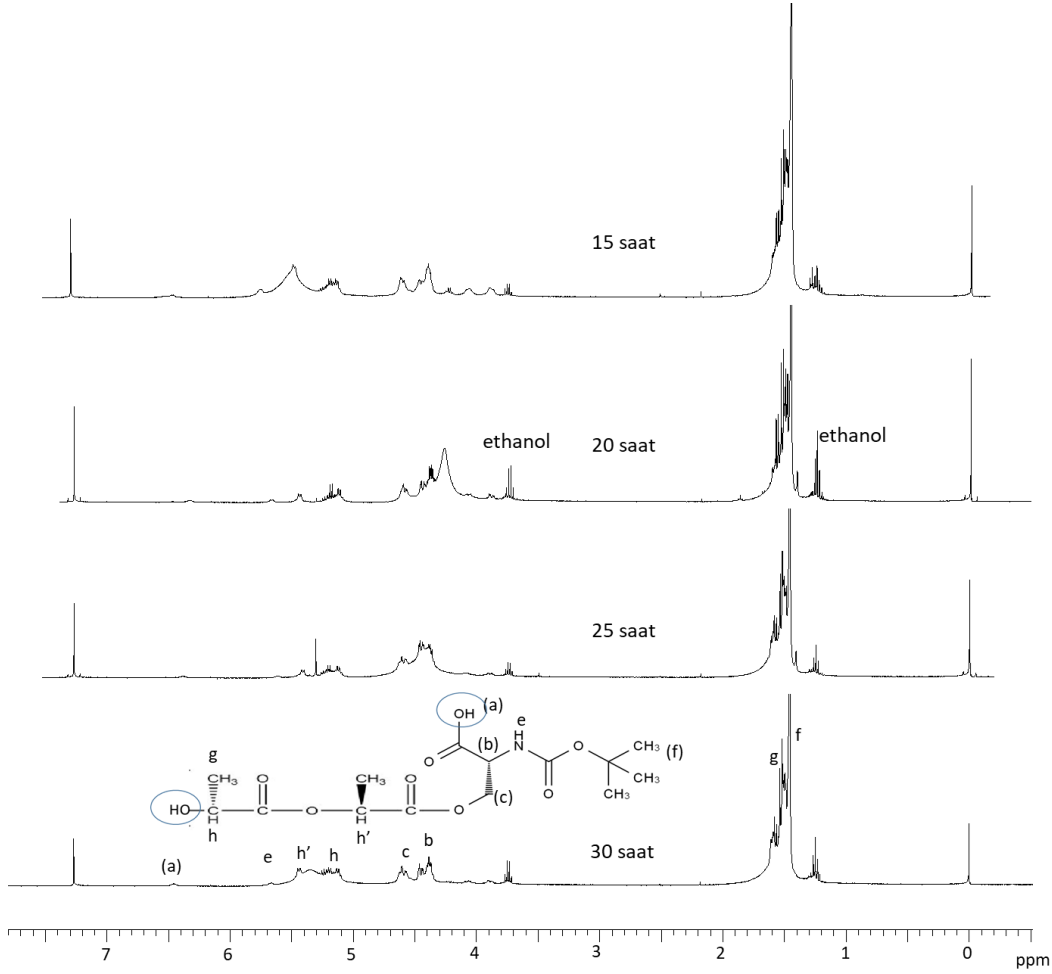
Şekil 4.4. LD, PLLA, N-Boc-serin ve 30 saat ısıtma ile elde edilen LDS monomer yapılarının $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

Literatürde N-Boc-serin $^1\text{H-NMR}$ ile ilgili açıklayıcı bilgilere rastalanmamıştır. Bu yüzden $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ ve $-\text{NH}$ fonksiyonel gruplarına ait olan aktif protonların aktifliğini kanıtlamak için DCCl_3 çözücüsünde spektrum kaydedilirken ortama D_2O eklenerek tespit edilmiştir. Şekil 4.5 (a) kısmında görüldüğü gibi D_2O eklendikten sonra 4,2 ppm $-\text{OH}$, 5,67 ppm $-\text{NH}-$ ve 7,20 ppm COOH (f) protonlarından kaynaklanan pikler kaybolmuştur [131].



Şekil 4.5. 3,5-7,5 ppm kimyasal kayma aralığında; a) D₂O eklenmiş N-Boc-d-serinin ve b) saf serin'in ¹H-NMR spektrumları.

15-30 saat aralığında ısıtma (95°C) sonucu elde edilen LDS monomer yapıların ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.6'da verilmiştir. 15 saat ısıtılmış örneğin spektrumunda gözlenen 4,00-3,70 ppm kimyasal kayma değerindeki metilen (-CH₂-, c) protonlarının hala gözlenmesi, serin laktit reaksiyonunun tamamlanmadığını geriye serin molekülünün kaldığını açıklamaktadır. Monomer sentezinde oluşan LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik molekül karışımlarının kolon kromatografisi ile ayrılması çalışması henüz başarısız olmuştur. Çözelti ortamında karboksi dimerlerinin oluşması farklı monomer yapıların birlikte yürütmesine neden olmaktadır. İleriki çalışmalarda geliştirilecek flaş kromatografi çalışması ile ayırma işlemi başarılı olduğunda her bir monomerin polimerizasyonunun çalışılması geniş konu aralığı oluşturacaktır.



Şekil 4.6. 15-30 saat ısıtma (95 °C) sonucu elde edilen LDS monomer yapılarının ¹H-NMR spektrumu.

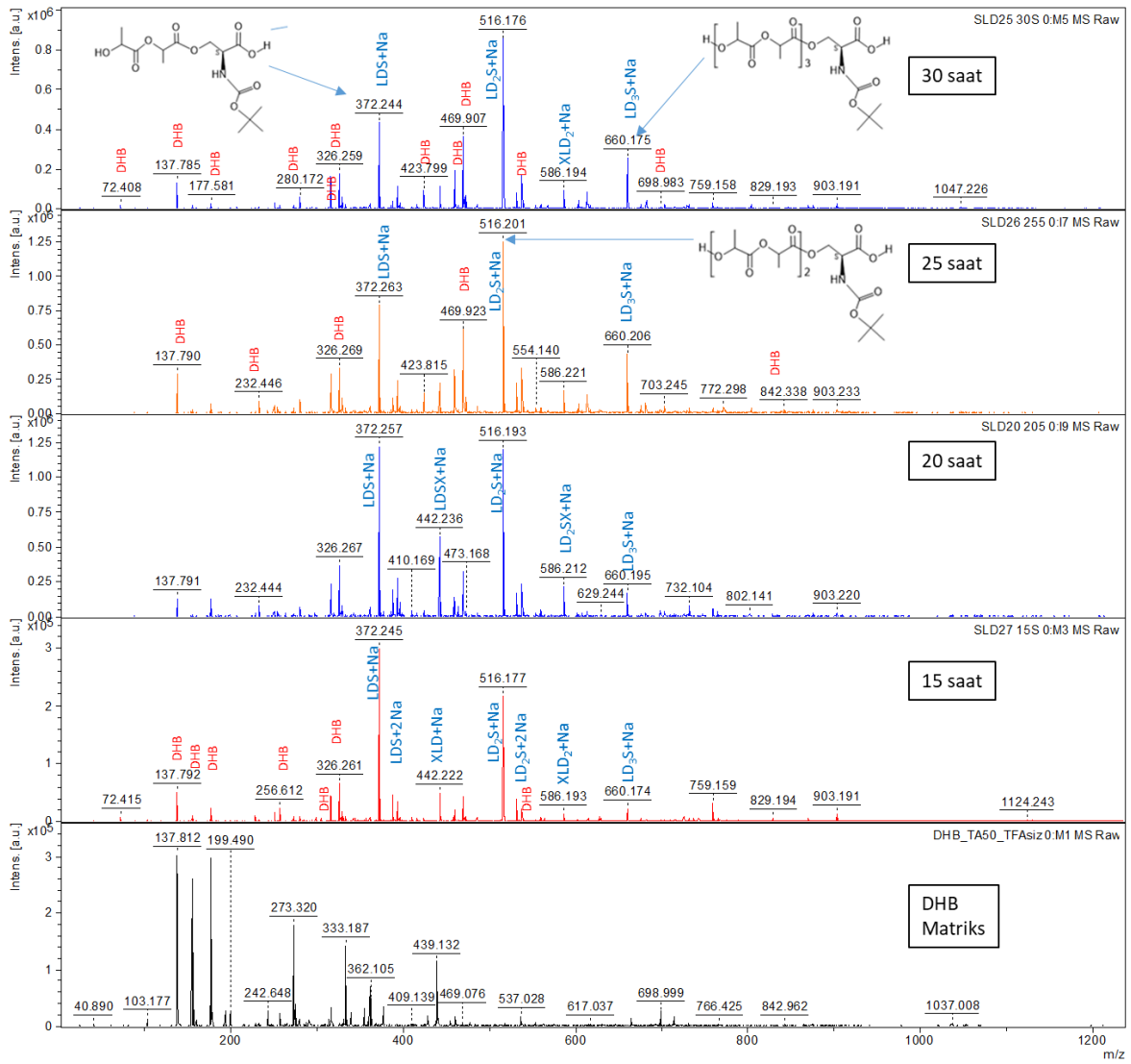
4.1.3. LDS Monomerin MALDI-TOF-MS Karakterizasyonu

Reaktörde 15-30 saat sıcaklık aralığında ısıtılarak sentezlenmiş LDS monomer örneklerin MALDI-TOF-MS çalışması yapılmış ve 0-1220 m/z aralığında Şekil 4.7'de verilmiştir. Matriks olarak kullanılan 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) bileşiğinin kütle spektrumu da verilerek LDS örneklerin pikleri dışında matriks'ten gelen piklerin belirlenmesine çalışılmıştır. MALDI-TOF-MS çalışmasının amacı; LD ve serin reaksiyonu sonucu sentezi hedeflenen LDS monomerik yapıların oluşup oluşmadığını molar kütle tayini ile belirlemektir. LDS monomerlerin kütlelerinin yüksek olması, polar yapıda olması ve bunun sonucu buhar basınçlarının düşük olması nedeniyle GC-MS çalışmasında belirlenememiştir.

0-350 m/z aralığındaki pozitif iyon piklerinin çoğunluğu matriksten geldiği belirlenmiştir. Matriksten gelen diğer bazı pikler 469, 537, 698 ve 842 m/z oranına sahip pozitif iyon pikleridir. Ancak, örnek pikleriyle karşılaştırıldığında, bu piklerin şiddeti önemsizdir ve dikkate alınması gerekmeyen pikler olarak gözlenmektedir (Şekil 4.7).

LDS örneklerin MALDI-TOF-MS spektrumunda sentez sonucu oluşmuş önemli pikler; 326, 372, 394, 442, 516, 538, 586 ve 660 m/z kütleli piklerdir. Spektrumlar pozitif modda kaydedildiği için piklerin sodyum katılmış $[M+Na]^+$ moleküler pozitif iyon pikleri olduğu belirlenmiştir. Kondenzasyon polimerizasyonunda verebilecek en önemli moleküllerin pikleri 372, 516 ve 660 m/z pikleridir ve sırasıyla LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerine aittir. Serin molekülüne halka açılması ile bir adet laktit bağlandığında LDS, iki adet laktit bağlandığında LD₂S ve üç adet laktit bağlandığında LD₃S olduğu gözlenmiştir. Boc-serin molekülünün molar kütlesi 205,11 g/mol, laktit'in molar kütlesi 144,13 g/mol ve sodyumun molar kütlesi 22,99 olmak üzere toplam $205,11+144,13+22,99=372,23$ g/mol değeri LDS monomeri için spektrumda 372,244 m/z değerinde gözlenmiştir. LD₂S monomeri için teorik değer $205,11+(2 \times 144,13)+22,99=516,36$ g/mol olup spektrumda 516,201 m/z değerinde gözlenmiştir. LD₃S monomeri için teorik değer $205,11+(3 \times 144,13)+22,99=660,49$ g/mol olup spektrumda 516,206 m/z değerinde gözlenmiştir. Bu sonuç, serin molekülüne halka açılması ile laktit bağlandığını ve LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerin oluştuğunu göstermektedir. Stokiyometrisi farklı olan LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerinin karışımdaki oranlarının ısıtma süresine göre değiştiği spektrumlarda açıkça izlenmektedir. Sentez aşamasında ısıtma sonucu öncelikle bir serin ve bir laktit birleşmesiyle LDS monomerinin oluşması beklenen bir durumdur ve 15 saat ısıtma sonucu öncelikle LDS monomeri en fazla oluşan moleküldür. LDS monomerinin oluşması ve ısıtma süresinin artması ile bu moleküle ikinci bir LD ve sürenin artmasıyla üçüncü bir LD molekülün bağlanması monomer çeşitliliğini arttırmıştır. 30 saat ısıtma sonucu LD₂S monomer oluşumu en fazla olmaktadır. MALDI spektrumundan LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerin molar oranları izlenmekle birlikte, pik şiddetlerine göre hangisinin daha fazla oluştuğunu söylemek sakıncalıdır. Çünkü, moleküllerin sodyum katkılı olarak pozitif iyon oluşturma eğilimi farklı olabilir ve pik şiddetlerinin oranına göre moleküllerin mol kesri ya da yüzdesini hesaplamak yanlış olur. LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerin kromatografi ile ayrılıp kütlece veya molce oranları bulunabilir. Fakat, yoğun denemelerimize rağmen moleküller birbirinden henüz ayıramamıştır. Ayırma işlemi başarılı olduğunda farklı oranlarda LD ve serin içeren kopolimerlerin kazırılması olanaklı olacaktır. Spektrumda 442 ve 586 m/z oranında

gözlenen piklerin belirlenemeyen bir x molekülünün laktit zincirini açması sonucu oluşan XLD+Na ve XLD₂+Na pikleridir ve uç grubunun aktif olması kondenzasyon polimerizasyonunu etkilemeyeceği kabulü yapılmıştır. Son olarak; LDS, LD₂S ve LD₃S monomerlerin spektrumunda gözlenen bir sodyum katkılı 372, 516 ve 660 m/z pozitif iyon piklerinin yanında iki sodyum katkılı [M+2Na-H]⁺ pozitif iyon pikleri 294, 538 ve 682 m/z değerlerinde gözlenmiştir. MALDI-TOF-MS sonucu LDS monomerik yapıların sentezlendiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.7).



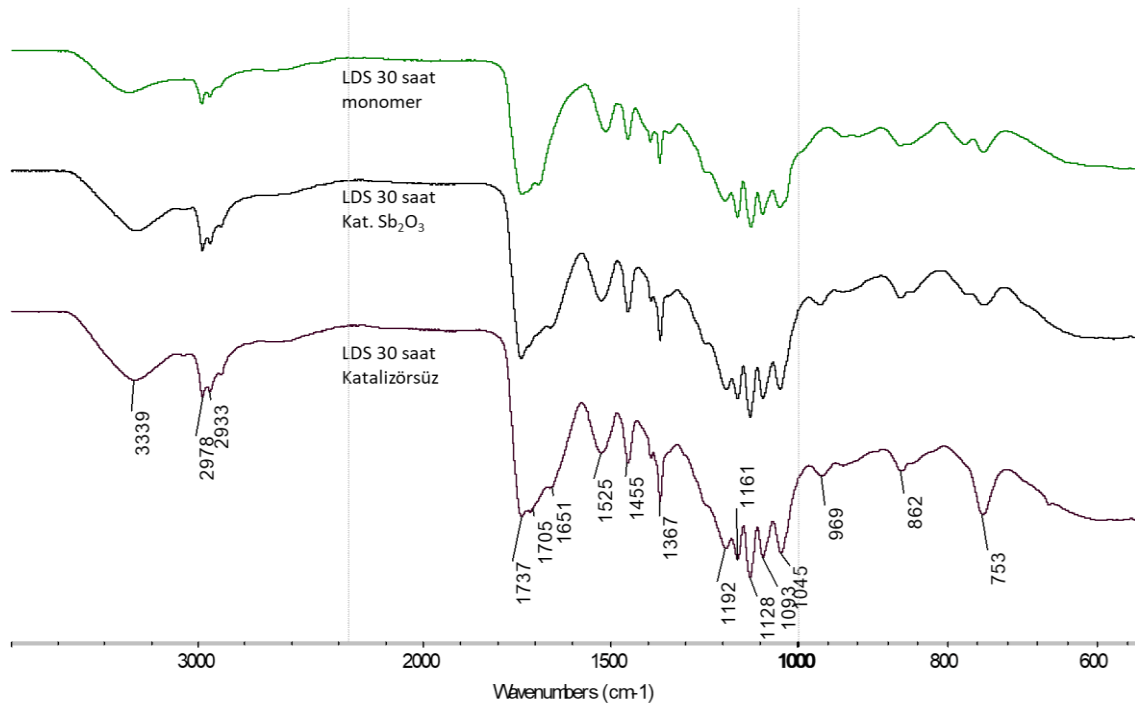
Şekil 4.7. LDS sentezinde 95 °C sıcaklıkta 15-30 saat ısıtma sonucu elde edilen örneklerin MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.2. Poli(laktit-ko-Serin) Kopolimerin Sentez ve Karakterizasyonu

Çalışmanın ikinci aşamasında; sentezlenen LDS monomerlerin kondenzasyon polimerizasyonu çalışılarak poli(laktit-ko-Boc-serin) (PLDS) kopolimerleri sentezlenmiştir. Polimerizasyon; Eriyik, azeotropik kondenzasyon ve disikloheksilkarbodiimit reaktifi ile polimerizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PLDS kopolimerleri MALDI-TOF-MS, FTIR ve ¹H-NMR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Azeotropik kondenzasyon sonucu LDS monomerinin polimerize olmadığı belirlenmiş ve değerlendirilmemiştir.

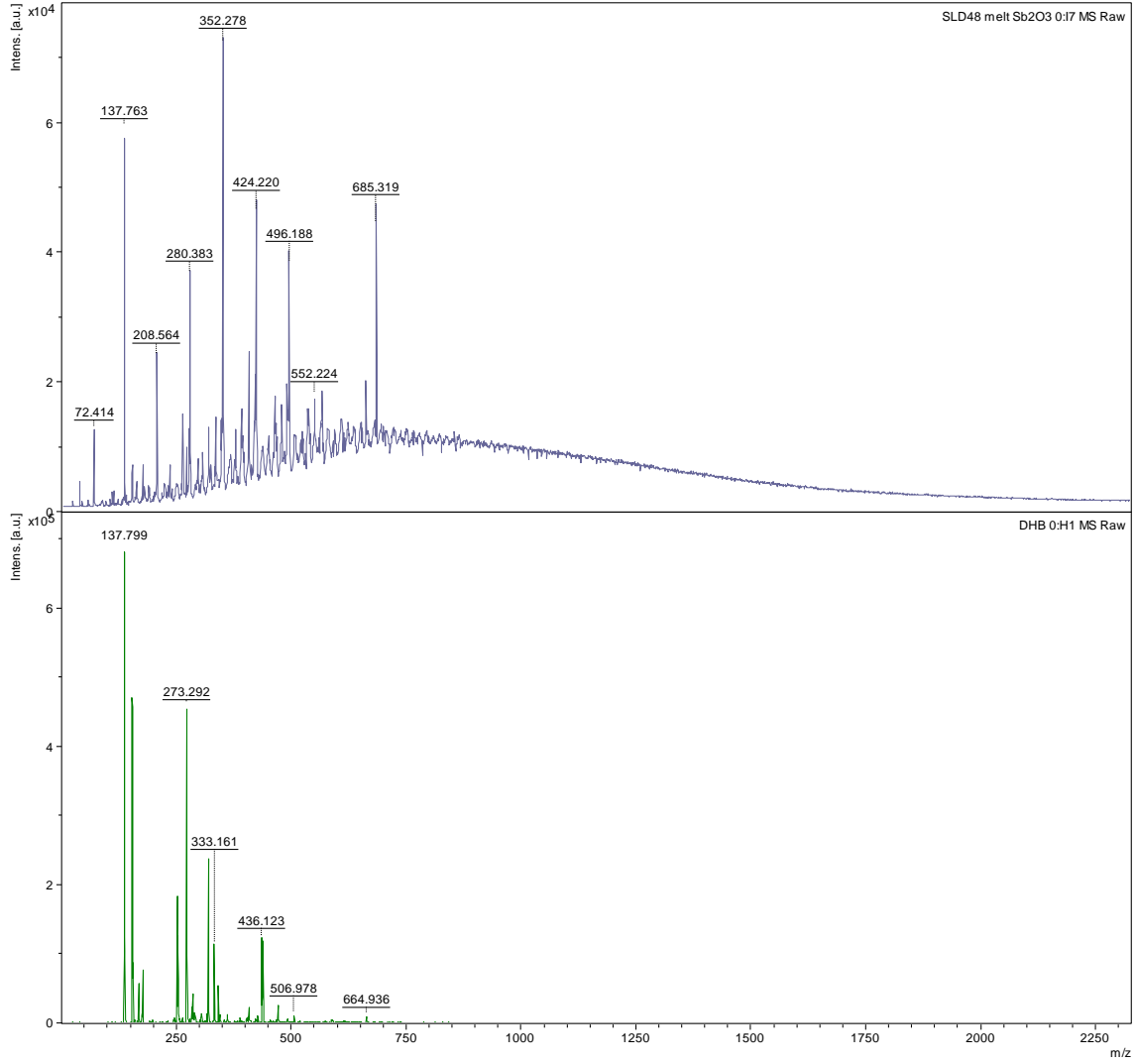
4.2.1. LDS Monomer Karışımının Eriyik Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu

LDS 30 saat monomerin, 120 °C sıcaklıkta vakumda ve N₂ atm. Sb₂O₃ katalizörü varlığında ve katalizörsüz 5 saat ısıtılarak yapılan eriyik polimerizasyonu çalışılmış örneklerin FTIR spektrumları Şekil 4.8'de verilmiştir. Spektrumda 3500-2500 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında karboksil ve hidroksil hidrojen gerilme bandında ve 1250 cm⁻¹ C-O-C gerilme bandında bariz bir değişim gözlenememiştir. Bu sonuç, polimerizasyonun gerçekleşmediği şeklinde olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.8. LDS 30 saat monomerin, 120 °C sıcaklıkta vakumda ve N₂ atm. Sb₂O₃ katalizörü varlığında ve katalizörsüz 5 saat eriyik polimerizasyonu çalışılmış örneklerin FTIR spektrumları.

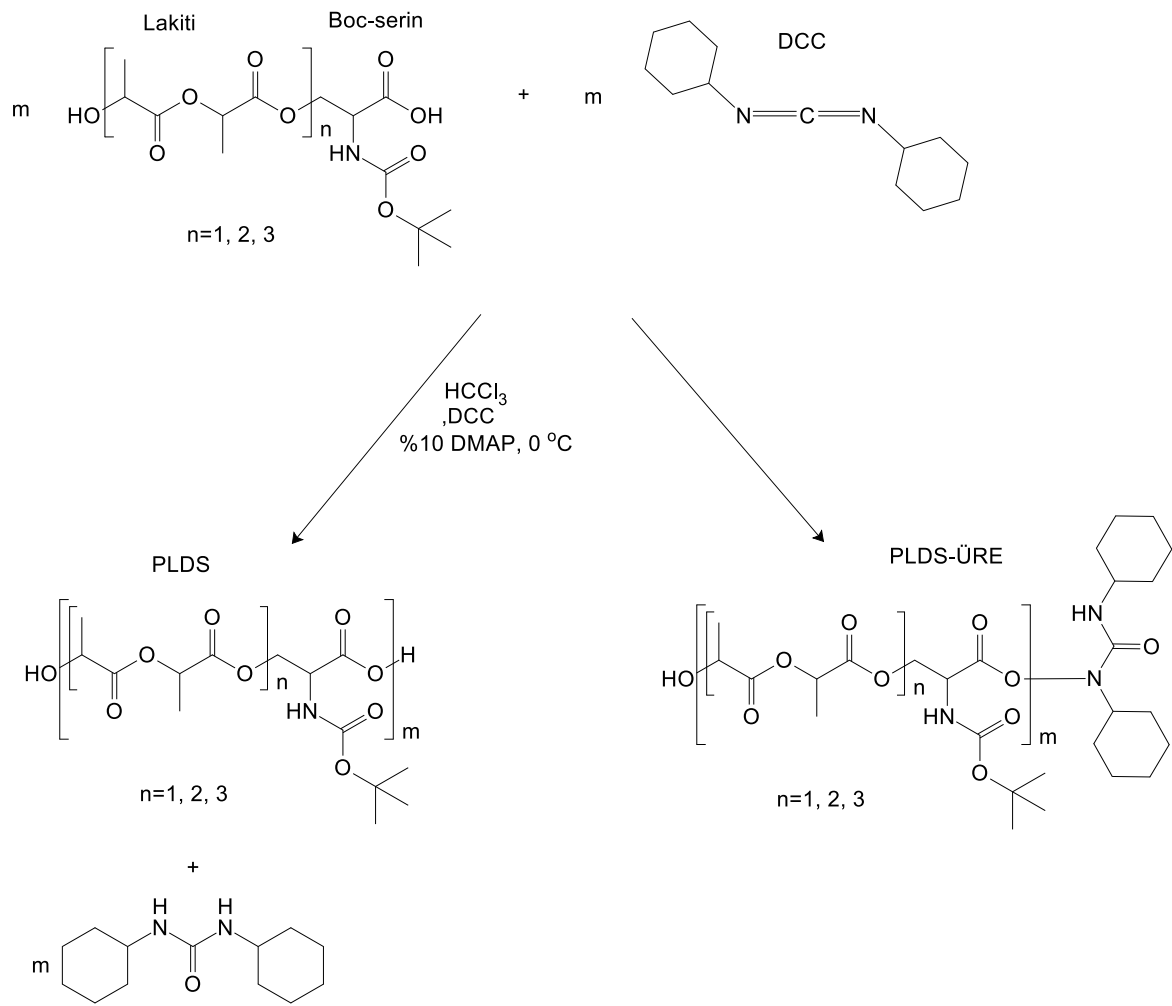
Sb_2O_3 katalizörü varlığında eriyik polimerizasyonu yapılmış LDS 30 saat örneğin molekül ağırlığı dağılımındaki olası değişimi incelemek için MALDI-TOF-MS çalışması yapılmış ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Spektrumda 100-2000 m/z kütle aralığında polimerik bir dağılım gözlenmiş, fakat serin, laktit veya LDS monomerik birimlerin oluşturması gereken tekrarlanan gruplarının kütle pikleri gözlenememiştir. Polimerizasyon olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.



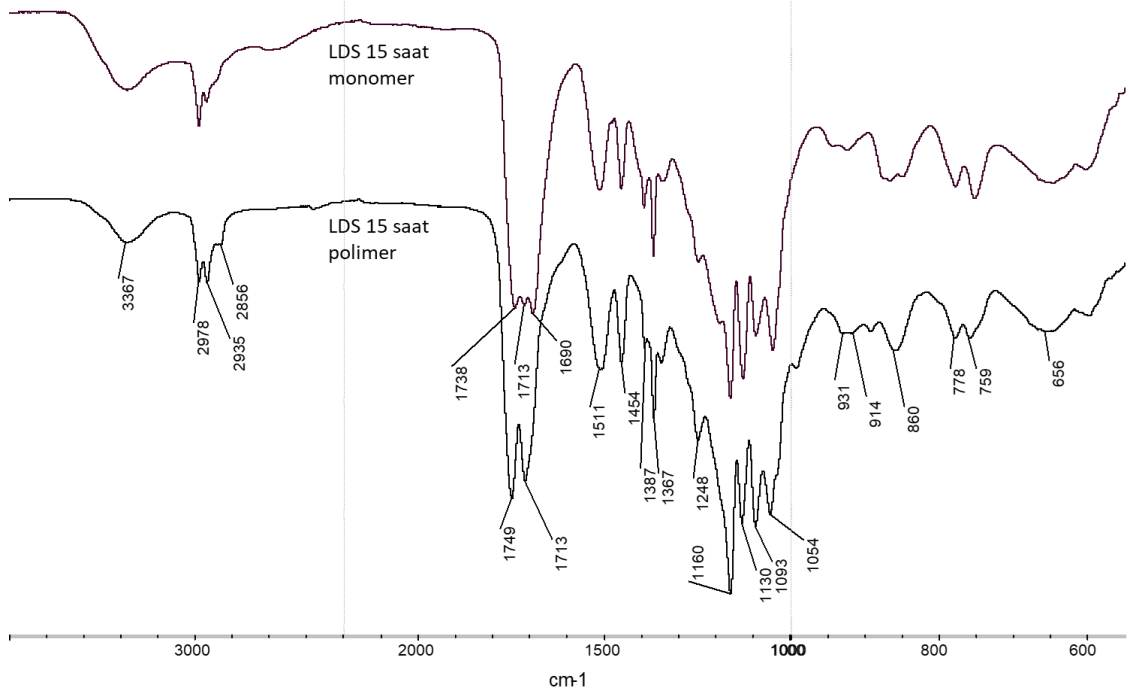
Şekil 4.9. LDS 30 saat monomerin, 120 °C sıcaklıkta vakumda ve N_2 atm. Sb_2O_3 katalizörü varlığında 5 saat eriyik polimerizasyonu çalışılmış örneğin MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.2.2. LDS Monomer Karışımının Disikloheksilkarbodiimit Reaktifi İle Kondenzasyon Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu

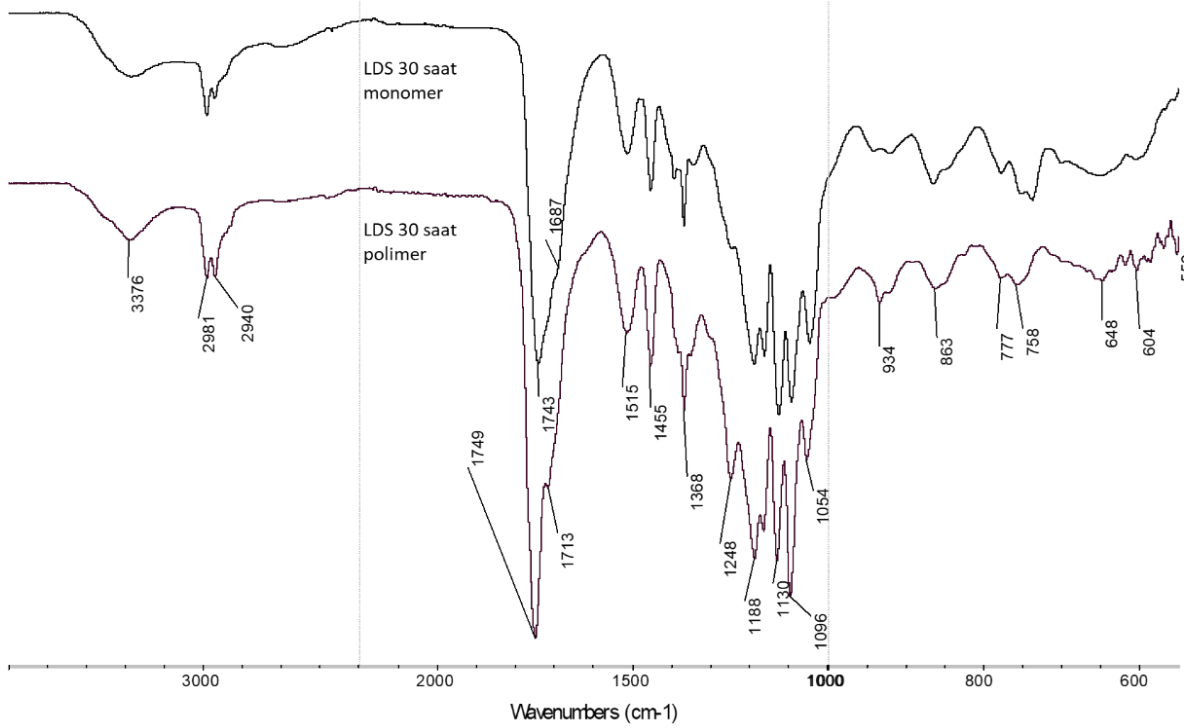
LDS 30 saat ve LDS 15 saat monomerlerin kondenzasyon polimerizasyonu (Şekil 4.10) disikloheksilkarbodiimit reaktifi ve 4-dimetilamino piridin katalizörlüğünde 0 °C sıcaklıkta kloroform çözücüsünde gerçekleştirilmiş ve kaydedilen FTIR spektrumları Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir. Monomer spektrumunda 3500-2500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gözlenen yayvan karboksil ve hidroksil hidrojen gerilme bandının polimerleşme sonucu oldukça azaldığı gözlenmiştir. Özellikle karboksil grubundan kaynaklanan yayvanlık oldukça azalmıştır. Uç gruplarda var olan hidroksi karboksi ve ana zincirdeki üretan-NH-COO gruplarından gelen aktif hidrojen gerilme bandı 3367 cm^{-1} dalga sayısında gözlenmiştir. Kondenzasyon polimerizasyonu sonucu elde edilen ester polimerinde 1250 cm^{-1} C-O-C gerilme bandındaki artış polimer sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir. Spektrumlarda esterleşme polimerizasyonunun gerçekleştiğini açıklayan en önemli sonuç monomer spektrumunda gözlenen 1750-1690 cm^{-1} aralığındaki üçlü karbonil gerilme bandının ikiye düşmesidir. Monomer yapılarındaki karboksi uç grubun esterleşme sonucu harcanması ve yeni ester bağının oluşmasıyla 1749 cm^{-1} bandının şiddeti artmıştır. PLDS polimerin bileşimindeki Boc-serin bileşenine ait -CHN- deformasyon titreşimi 1510 cm^{-1} koruma grubundaki t-butiloksi karbonil metilleri 1367 cm^{-1} dalga sayısında çıkmıştır. PLDS kopolimerlerin kimyasal yapısındaki tekrarlanan laktit(laktik asit grupları) bileşeninden gelen karakteristik pikler 1387 cm^{-1} ve 1160 cm^{-1} sırasıyla CH_3 metil hidrojen bükülme bandı ve ester eterik grup -C-O-C- gerilme titreşimi olup, bandları hem monomer hem de polimerin spektrumunda gözlenmiştir [132]. Spektrumlarda gözlenen bandlar LDS monomerlerin polimerleştiğini açıklamaktadır.



Şekil 4.10. LDS monomerlerin DCC polimerizasyon tepkimesi.



Şekil 4.11. LDS 15 saat monomer ve DCC polimerizasyonu sonucu örneğin FTIR spektrumu.



Şekil 4.12. LDS 30 saat monomerin ve DCC polimerizasyonu sonucu elde edilen örneğin FTIR spektrumu.

Reaktörde 15-30 saat sıcaklık aralığında ısıtılarak sentezlenmiş LDS monomerlerin DCC polimerizasyonu sonucu elde edilen polimer örneklerin MALDI-TOF-MS çalışması yapılmış ve spektrumlar 600-1700 m/z aralığında Şekil 4.13'te verilmiştir. MALDI-TOF-MS çalışmasının amacı; poli(laktit-ko-serin) (PLDS15, PLDS30) polimerinin oluşup oluşmadığını ve polimerizasyonda kullanılan LDS, LD₂S ve LD₃S monomer karışımlarının birbirine esterleşme sonucu bağlanma sayılarını (her bir polimer zincirinin polimerizasyon derecesini) belirlemektir.

PLDS15 ve PLDS30 örneklerin MALDI-TOF-MS spektrumunda pozitif iyon piklerinin 700-1700 m/z aralığında değiştiği gözlenmiştir. MALDI spektrumunda polimerlerin Gaussian molekül kütle dağılımını vermediği gözlenmiştir. Bunun nedeni; düşük molekül kütleli zincirlerin sodyum katılı pozitif iyon haline geçmesinin daha kolay ve toplam iyon şiddetlerinin artması olduğu düşünülmüştür. PLDS polimerlerin FTIR spektrumunda 2500-3500 cm⁻¹ dalga sayısı arası karboksi grubunun yayvan hidrojen gerilme pikinin kaybolması, 703 m/z gibi düşük kütleli zincirlerin az olduğunu ve daha kolay pozitif iyon oluşturduğu düşüncesini desteklemektedir.

LD₃S monomer oranı LDS15 ve LD30 karışımlarda az olduğu için PLDS15 ve PLDS30 polimerlerin kütle spektrumunda ağırlıklı olarak LDS, LD₂S monomerik birimlerin oluşturduğu oligomerik yapılar gözlenmiştir. PLDS15 ve PLDS30 polimerin spektrumunda gözlenen en büyük molar kütleli pikler sırasıyla 1408 m/z ve 1696 m/z pikleridir. 1408 m/z piki DL₃S₅, 1696 m/z piki DL₅S₅ kapalı formülü ile dizilimi aşağıdaki gibi önerilebilir.

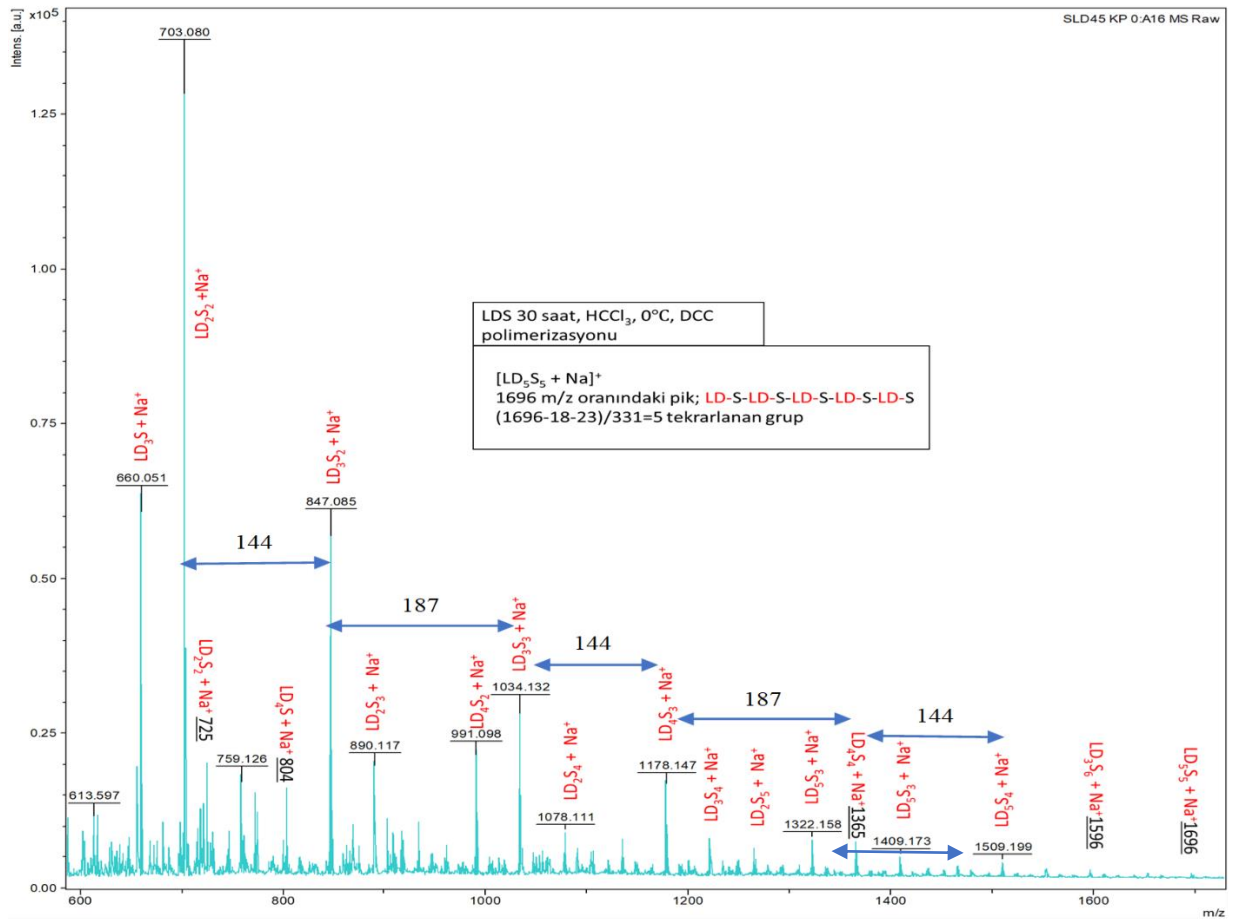
1408 m/z; S-LD-S-LD-S-LD-S-S

1696 m/z; S-LD-S-LD-S-LD-S-LD-S-LD

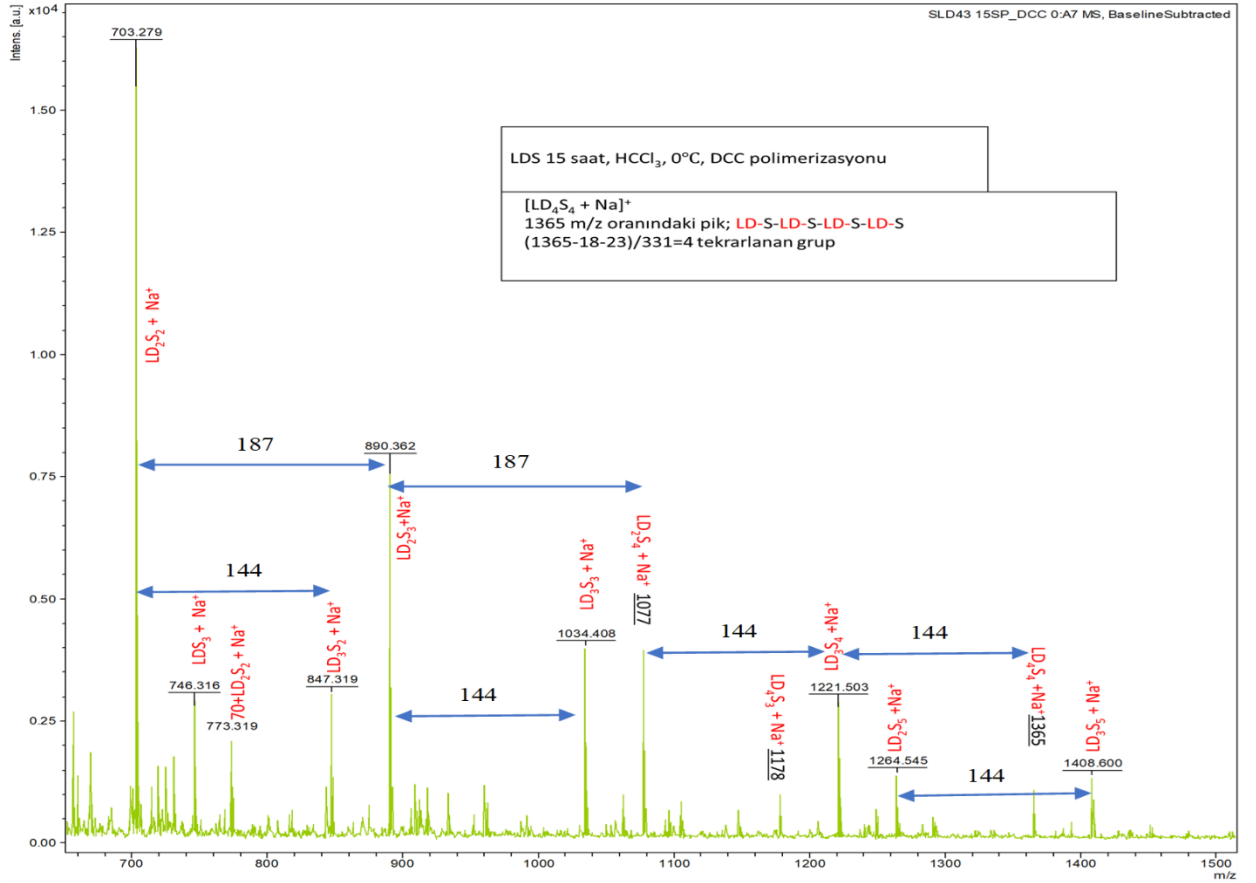
Sadece LD₂S monomerlerin oluşturduğu polimer zincirleri PLDS15 için 703, 1034, ve 1365 m/z pikleridir, PLDS30 polimeri için 703, 1034, 1365 ve 1696 m/z pikleridir. PLDS15 ve PLDS30 polimerlerin spektrumlarında LDS-LD₂S ve LD₂S-LD₃S kombinasyonlarının oluşturduğu oligomer zincirleri de gözlenmiştir. PLDS polimerlerin spektrumlarında gözlenen farklı sonuçlardan biri de LDS_x (x>1), yapısında olan polimer zincirlerin de gözlenmesidir. Çalışmada serin molekülüne en az bir laktit bağlanması koşullarında monomer sentezi çalışılmıştır. Fakat, serin molekülünün fazla olduğu polimer zincirlerinin oluştuğu gözlenmiştir. Bunun iki nedeni olduğu düşünülebilir; birinci neden, monomer

karışımında reaksiyona girmemiş serin moleküllerinin kalmış olması, diğer yorum da polimerizasyon esnasında ester aktarım reaksiyonları oluşması sonucu serin tekrarlanan gruplar açısından zengin polimer zincirlerinin oluşmasıdır. Bu sonucun açıklanması çalışmaları devam etmektedir.

PLDS kopolimerlerin oligomerik düzeyde de sentezlenmiş olması ve koruma grubunun uzaklaştırıldığında kimyasal modifiye edilebilir polimerlerin hazırlanmasına olanak sağlayacaktır.

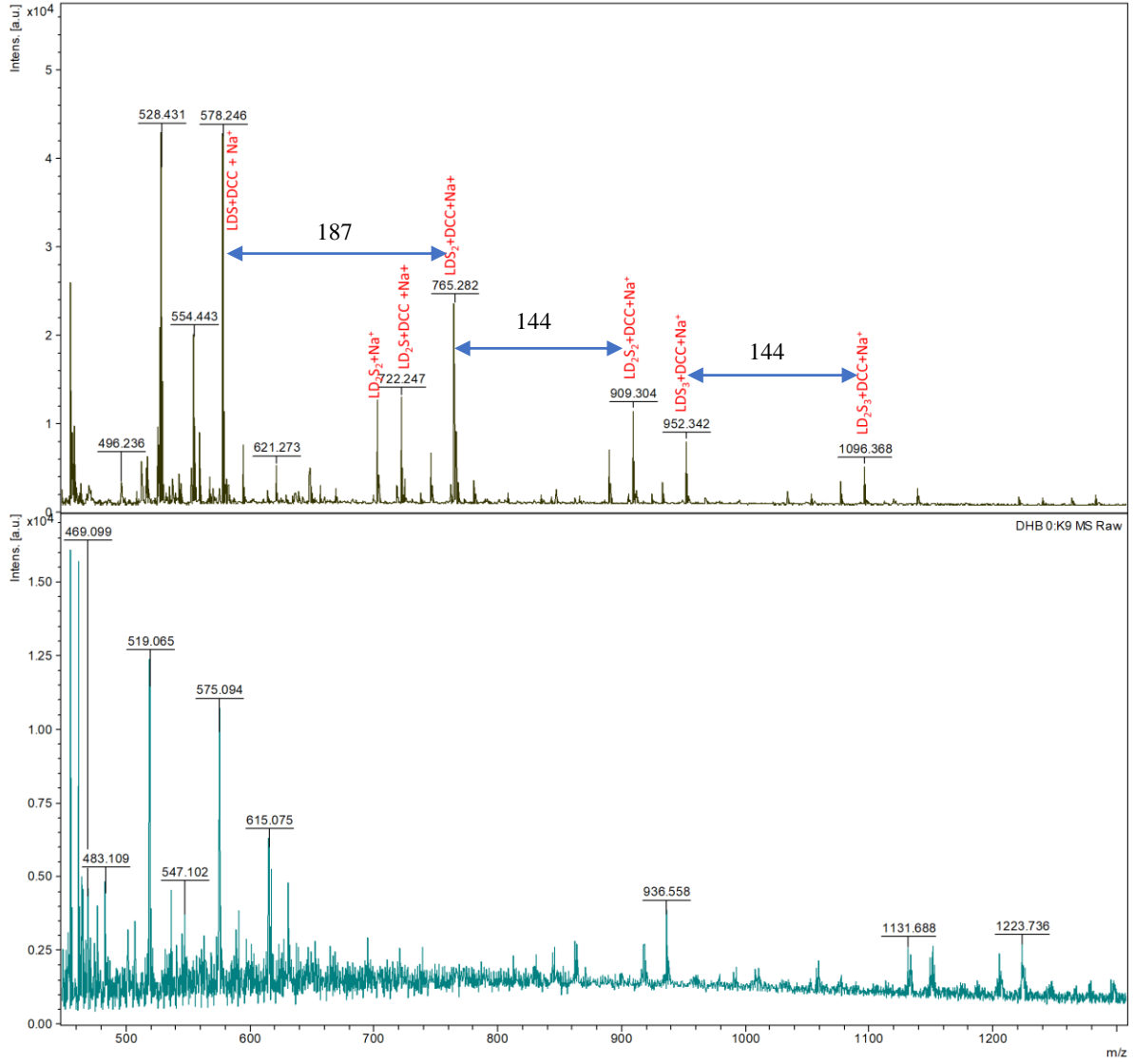


Şekil 4.13. PLDS30 polimer örneğin MALDI-TOF-MS pozitif toplam iyon spektrumu.



Şekil 4.14. PLDS15 polimer örneğin MALDI-TOF-MS pozitif toplam iyon spektrumu.

LDS monomerlerin DCC kondenzasyon polimerizasyonu; DCM, THF ve HCCl_3 çözücülerini kullanılarak laboratuvar sıcaklığı, 5,0 ve 0°C 'de test edilmiştir. En iyi çözücü HCCl_3 , çalışma sıcaklığı 0°C olarak belirlenmiştir. DCM, THF, yüksek sıcaklıklarda ve ayrıca DCC reaktifin aşırısının eklenmesi açıl üre aktarımına neden olarak polimer zincirinin karboksil uç grubunun bloke olmasına neden olmaktadır (Şekil 4.15). Bu sonuç Şekil 4.15'te verilen MALDI spektrumunda açıklanmıştır. DCM çözücüsünde ve laboratuvar sıcaklığında gerçekleştirilen DCC polimerizasyon çalışmasının spektrumunda 578 ve 909 m/z pikleri LDS ve LD_2S monomerik moleküllerin karboksil uç gruplarının polimerizasyona gitmeden açıl üre aktarımı ile sonlandığını açıklamaktadır.

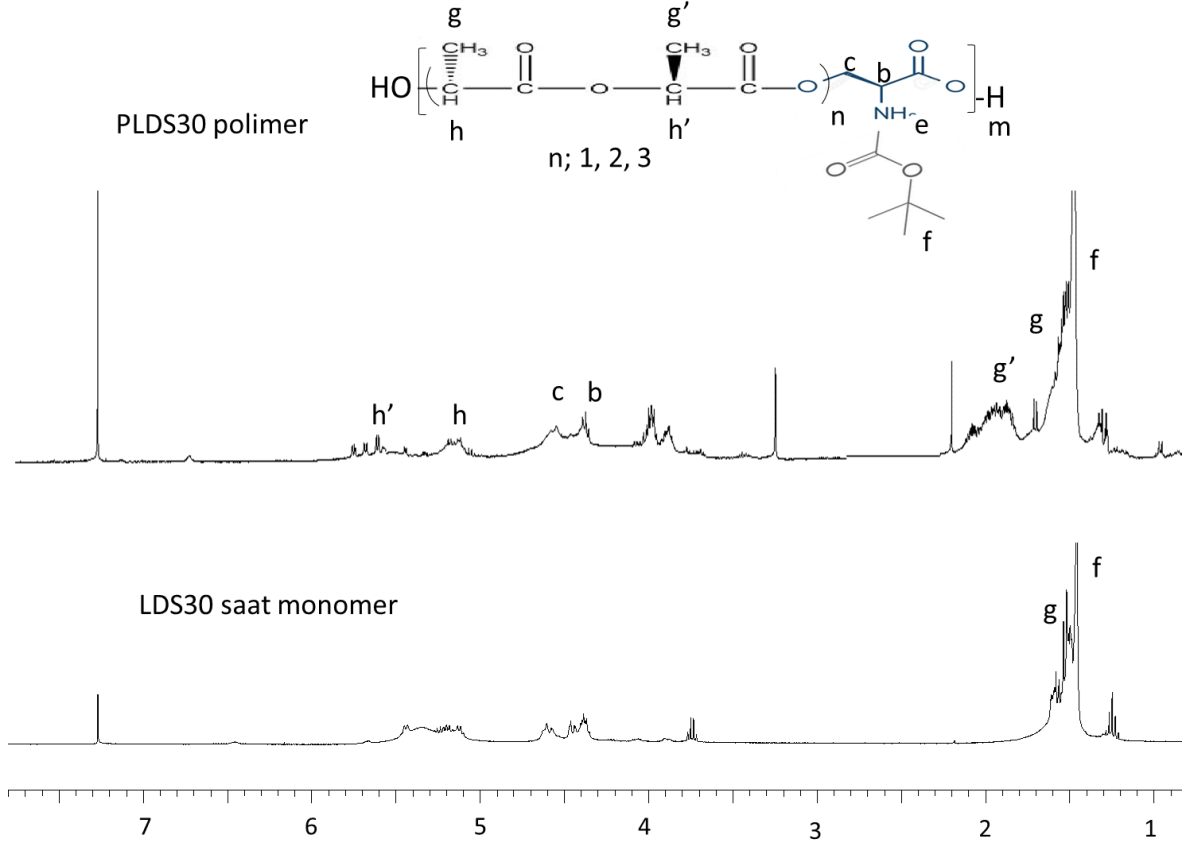


Şekil 4.15. LDS ve LD₂S monomerlerin polimerizasyonunda ortaya çıkan N-açil üre aktarımı.

4.2.3. PLDS 30 Saat Polimerin¹H-NMR Karakterizasyonu

PLDS 30 saat polimerin ve LDS30 monomerin ¹H-NMR spektrumları Şekil 4.16'da verilmiştir. DCC kondenzasyon polimerizasyonu sonucu laktit metil protonları 1,60 ppm (g) kimyasal kayma değerinden 1,80 ppm (g') değerine kaymıştır [133]. Bunun nedeni; hidroksi grubunun esterleşmeye katılması ve metil protonlarının elektron yoğunluğunun azalmasıdır. Bu etki düşük alan kaymasına neden olur. PLDS30 polimer yapısındaki Boc-serin grubuna ait t-butil, metin ve metilen grupları 1,47(f), 4,40(b) ve 4,6(c) değişmeden aynı kimyasal

kayma değerlerinde gözlenmiştir. Monomer spektrumunda gözlenen 5,10-5,50 ppm (h') ve (h) laktit metin (-CH-) protonları polimerizasyon sonucu birbirinden ayrılarak polimer zinciri üzerindeki proton (h') daha düşük alana kayarak 5,60 ppm kimyasal kayma değerlerinde gözlenmiştir [133]. Bu sonuçlar DCC kondenzasyon polimerizasyonunun gerçekleştiğini açıklamaktadır.

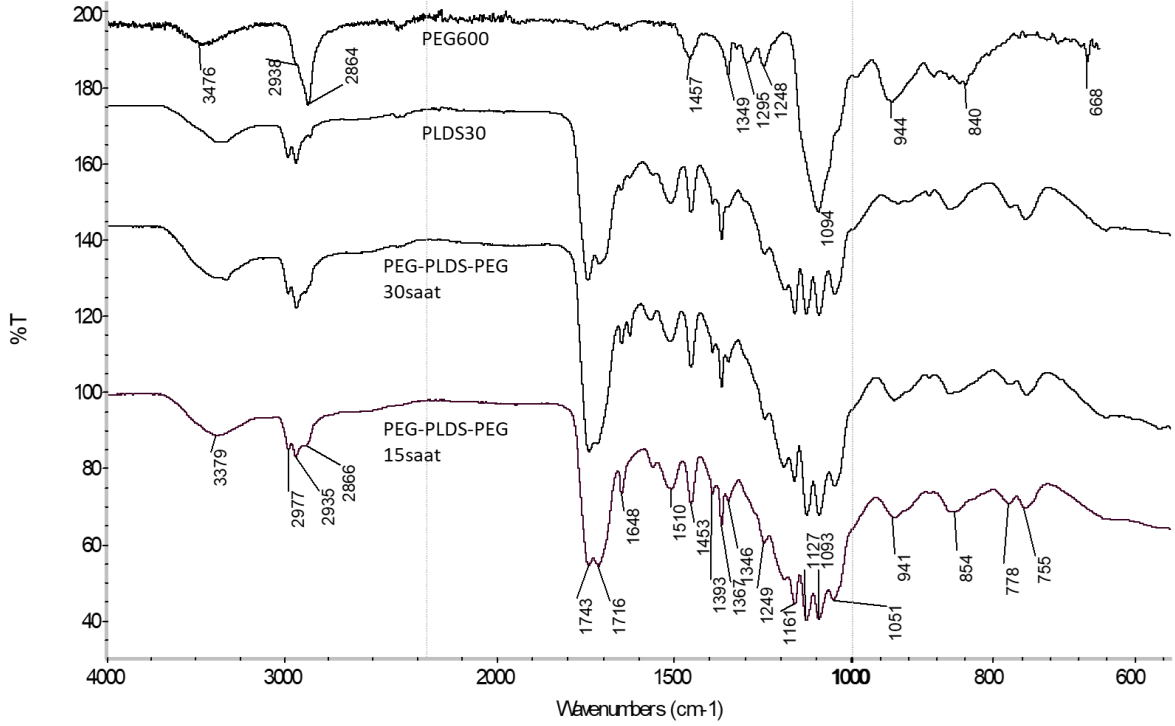


Şekil 4.16. LDS30 monomer ve PLDS30 polimer örneklerin ¹H-NMR spektrumu.

4.3. PEG-PLDS-PEG 30 Saat Üçlü-blok Kopolimerin FT-IR ve ¹H-NMR Karakterizasyonu

PLDS polimerlerin poli(etilen glikol) ile PEGilasyonu sonucu üçlü-blok kopolimerler sentzlenebilir. Kullanılan PEG polimerlerinin her iki uç grubunun hidroksi ya da karboksi gruplarının olması yeterlidir. Bu çalışmada LDS monomerlerin DCC polimerizasyonunun %80 ilerlediği aşamada hidroksi uç gruplu PEG600Da polimerleri çözelti ortamına eklenerek PLDS polimerlerine blok olarak bağlanması çalışılmıştır. Elde edilen PEG-PLDS-PEG 15 saat ve PEG-PLDS-PEG 30 saat üçlü-blok polimerlerin FT-IR spektrumları Şekil 4.17'de verilmiştir. Üçlü-blok kopolimerlerin spektrumunda 2866 cm⁻¹ PEG bileşeninin

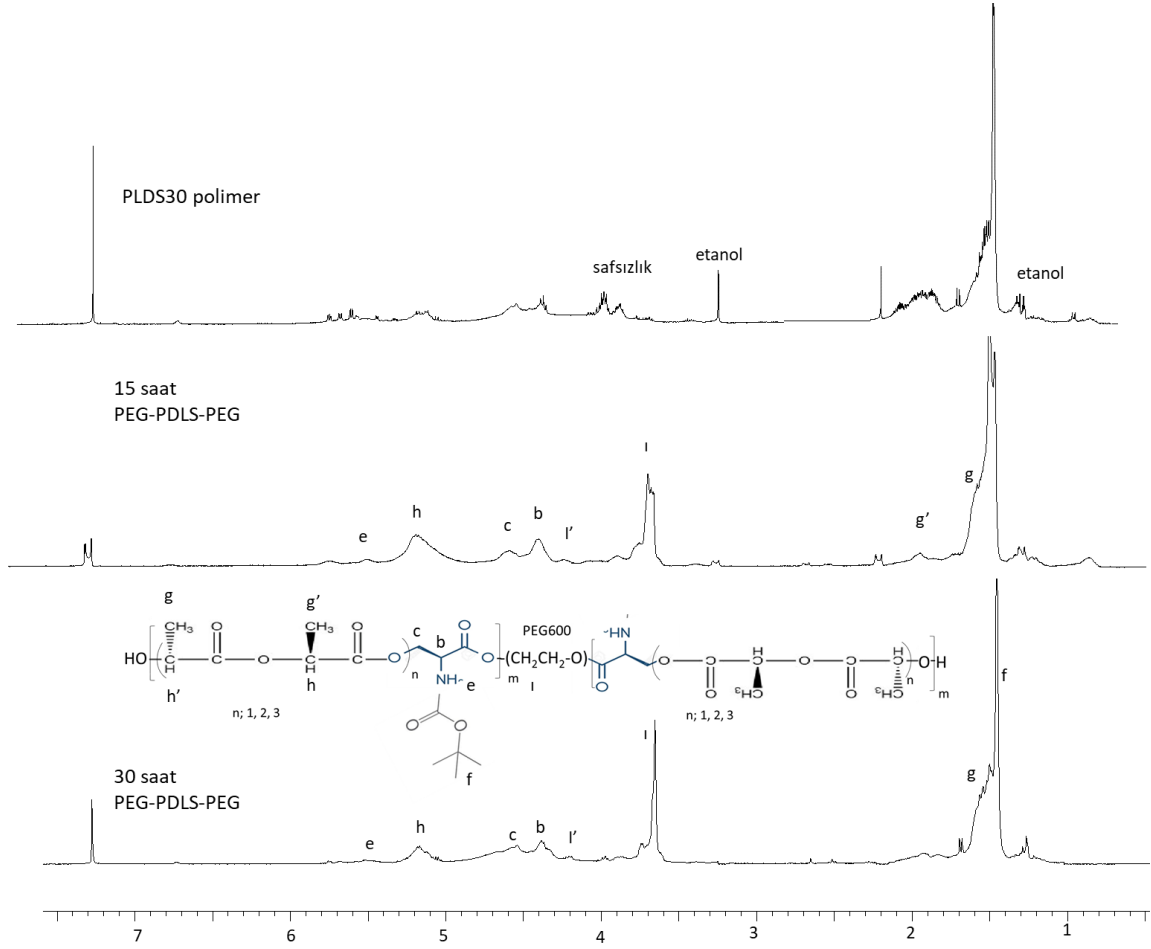
tekrarlanan grubunun metilen (-OCH₂CH₂-) gerilme bandı gözlenmiştir. Ayrıca, PEG yapısındaki eterik -C-O-C gerilme bandı 1100 cm⁻¹ üçlü-blok kopolimerlerin spektrumunda da izlenmiştir.



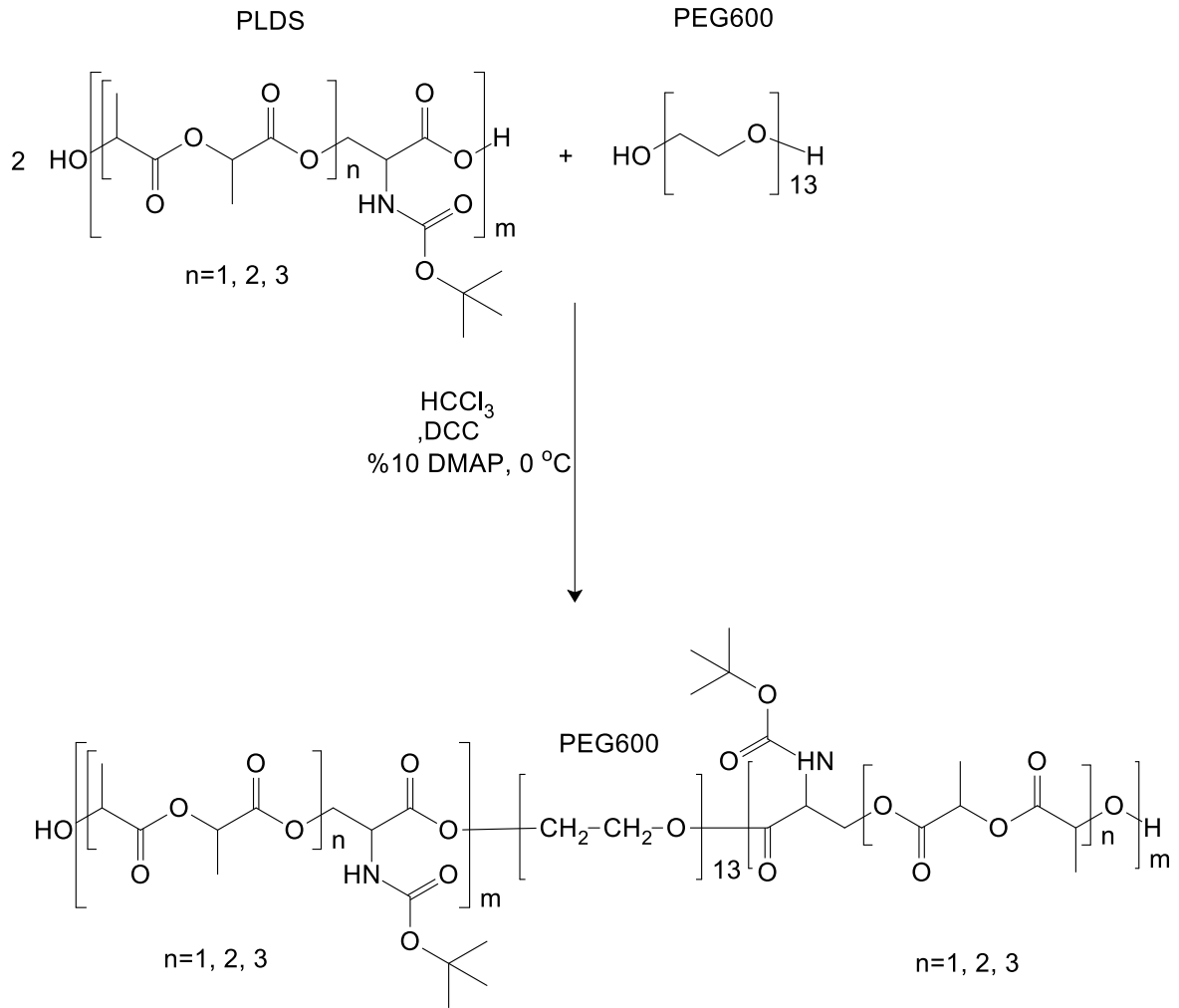
Şekil 4.17. PEG600, PLDS30, PEG-PLDS-PEG 30 saat ve PEG-PLDS-PEG 15 saat örneklerin FT-IR spektrumu.

PEG-PLDS-PEG 15 saat ve PEG-PLDS-PEG 30 saat üçlü-blok polimerlerin ¹H-NMR spektrumları Şekil 4.18'de verilmiştir. Üçlü-blok kopolimerlerin spektrumunda 3,65 ppm kimyasal kayma değerindeki pik PEG bileşenin tekrarlanan grubunun metilen (-OCH₂CH₂-) protonlarının absorpsiyon bandıdır. Ayrıca, PEG yapısındaki uç hidroksi grubun esterleşme ile PLDS gruplarına bağlanması HO-CH₂CH₂-PEG metilen protonlarının düşük alana kaymasına neden olur. Üçlü-blok kopolimerlerin ¹H-NMR spektrumunda gözlenen 4,20 ppm pikinin metilen gruplarına ait olduğu değerlendirilmiştir [134]. PLDS bileşenin diğer pikleri aynı kimyasal kayma değerlerinde gözlenmiştir. -NH- ve uç -COOH gruplarının pikleri net olarak belirlenememiştir.

PEG-PLDS-PEG 15 saat ve PEG-PLDS-PEG 30 saat üçlü-blok polimerlerin MALDI-TOF-MAS çalışmalarında pozitif toplam iyon spektrumları oluşmadığı için polimerlerin molar kütleleri açısından değerlendirme yapılamamıştır. Değişik matrikler kullanılarak üçlü-blok kopolimerlerin molar kütlelerinin belirlenmesi çalışmaları devam etmektedir. PLDS ve hidroksi uç grulu PEG600'ün kopolimerizasyon tepkimesi Şekil 4.19'da verilmiştir.



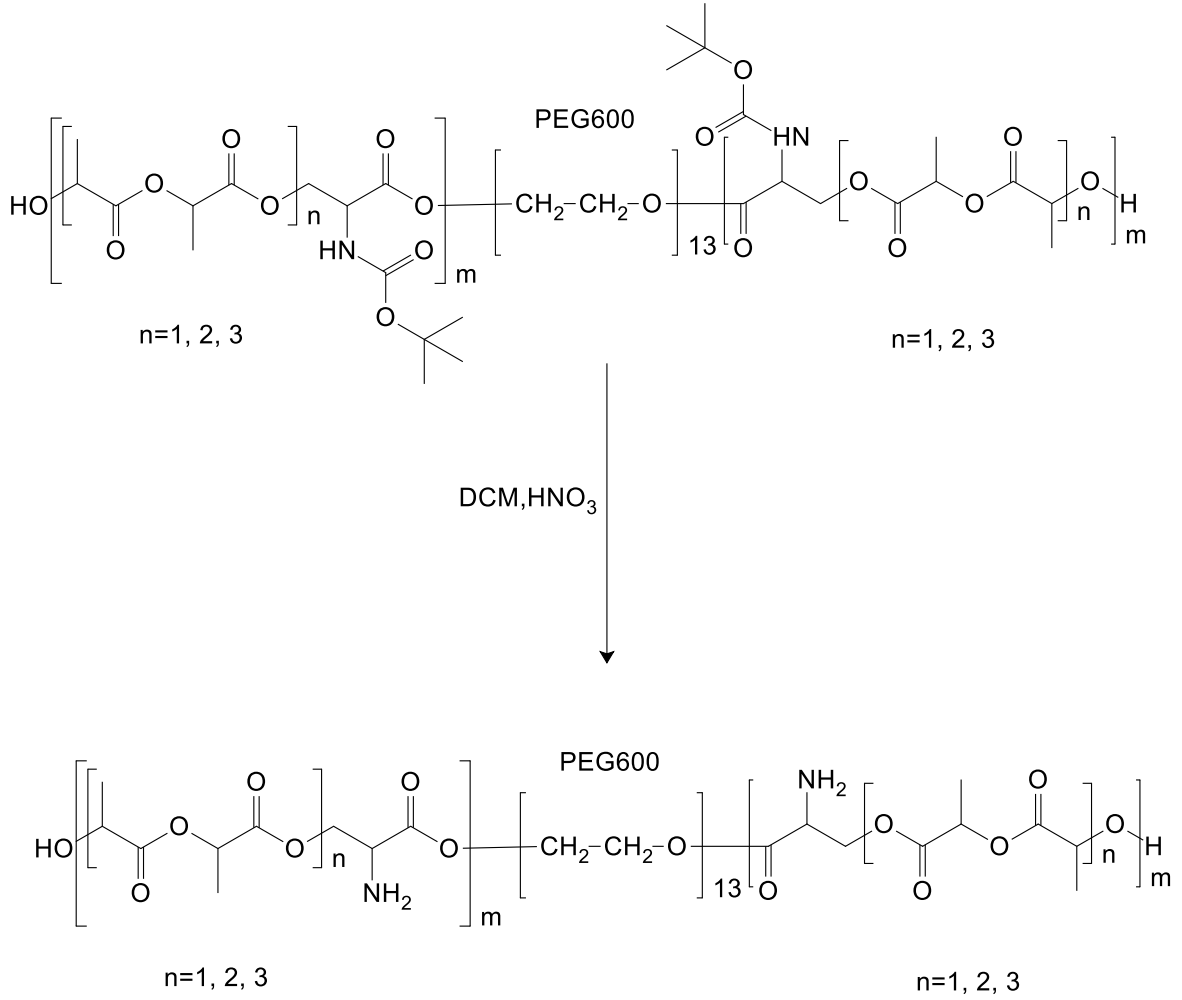
Şekil 4.18. PLDS30, PEG-PLDS-PEG 30 saat ve PEG-PLDS-PEG 15 saat örneklerin ^1H -NMR spektrumu.



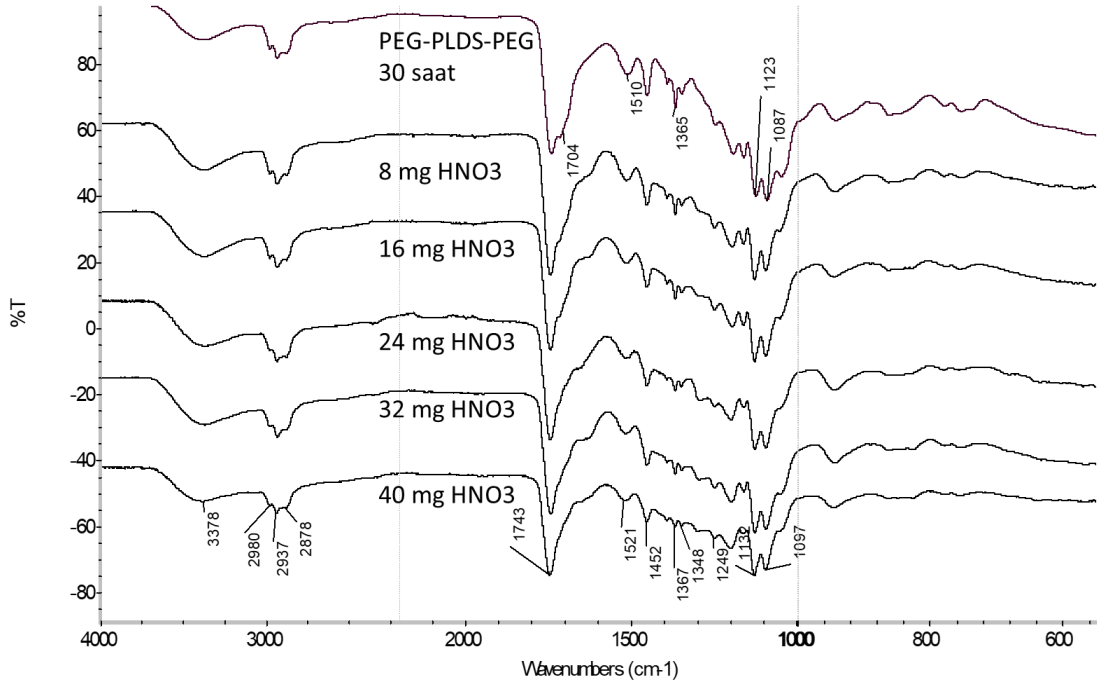
Şekil 4.19. PLDS ve hidroksi uç grublu PEG600'ün kopolimerizasyon tepkimesi.

Çalışmanın son aşamasında; PEG-LDS-PEG üçlü-blok kopolimerlerinin bileşimindeki serin amin grubuna bağlı koruma grubunun kimyasal uzaklaştırılması sonucu amin yan grup taşıyan PEG-LDS(NH₂)-PEG üçlü-blok ko-polimerleri sentezlenmiştir (Şekil 4.20). Yaklaşık 100 mg PEG-LDS-PEG 30 saat blok kopolimerinin t-butiloksikarbonil grubunun uzaklaştırılması için 1 mL DCM çözücüsünde çözülmüş örneğe bir mL DCM çözücüsünde çözülmüş HNO₃ veya TFA ekleyerek elde edilmiştir. Bok grubunun hidrolizinde kullanılan asit, ortama eklenen poli(vinil piridin) ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen örneklerin FT-IR spektrumları Şekil 4.21'de verilmiştir. Spektrumlarda görüldüğü gibi HNO₃ eklenmemiş örnekte gözlenen 1738 ve 1711 cm⁻¹ ikili karbonil gerilme bandı tek karbonil bandına dönüşerek 1743 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenmiştir. Bu sonuç, laktit ve serin tekrarlanan gruplarından gelen polimer zincirini oluşturan ester karbonilinin Poli(etilen glikol)-b-

poli(laktit-ko-serin-NH₂) kopolimer yapısında kaldığını göstermektedir. Ayrıca ter-bütillkarbonil grubunun metil bandı, 1367 cm⁻¹, yaklaşık %80 oranında azalma göstermiştir. Bu sonuçlar, PEG-LDS(NH₂)-PEG blok kopolimerinin sentezlendiğini açıklamaktadır.



Şekil 4.20. PEG-PLDS-PEG blok kopolimerin t-butiloksikarbonil koruma grubunun uzaklaştırılması tepkimesi.



Şekil 4.21. PEG-PLDS-PEG kopolimerinin Boc grubunun HNO₃ ile uzaklaştırılması sonucu elde edilen örneklerin FT-IR spektrumları.

5. YORUMLAR

Bu çalışmada poli(etilen glikol)-b-poli(laktit-ko-serin-NH₂) (PLDSNH₂-PEG-PLDSNH₂) blok kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentez işlemi üç aşamada tamamlanmıştır.

İlk aşamada, Boc-serin-OH amino asidi ile laktit moleküllerinin tepkimesi sonucunda LDS, LD₂S ve LD₃S monomerik yapılar sentezlenmiştir. FT-IR spektrum analizi, LDS monomerlerinin 3000-2800 cm⁻¹ aralığında metil, metilen ve metin C-H gerilme bandlarını gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, monomer yapısında ürethan hidrojeni –HN-CO-, hidroksi –OH ve karboksi –COOH gruplarındaki aktif hidrojen gerilmeleri 3500-2500 cm⁻¹ aralığında yayvan bir bant olarak gözlenmiştir. Monomer yapısında üç adet karbonil grubu (ester karbonili, karboksilik asit, ürethan) 1736, 1720 ve 1690 cm⁻¹ dalga sayılarında üçlü pik olarak belirlenmiştir.

¹H-NMR spektrumu analizinde, LDS monomerinde ter-butiloksikarbonil koruma grubunun metil protonları ve laktit metil protonları 1,47 ppm ve 1,60 ppm kimyasal kayma değerlerinde tespit edilmiştir. Laktit halkasının serin hidroksi grubuyla esterleşerek oluşturduğu metilen (-CH₂-) protonlarının esterleşme sonucunda 4,70-4,42 ppm kimyasal kayma değerine kaydığı belirlenmiştir. LDS monomerinde yer alan ürethan –NH-CO protonu ve metin protonu ise sırasıyla 5,67 ppm ve 3,40 ppm kimyasal kayma değerlerinde gözlemlenmiştir.

MALDI-TOF-MS spektrum analizi sonucunda, Boc-serin molekülünün molar kütlesi 205,11 g/mol, laktitin molar kütlesi 144,13 g/mol ve sodyumun molar kütlesi 22,99 g/mol olarak hesaplanmıştır. LDS monomerinin spektrumunda 372,244 m/z değeri gözlenmiştir. LD₂S monomerinin teorik değeri ise 516,36 g/mol olup, spektrumda 516,201 m/z değeri olarak tespit edilmiştir.

FT-IR, ¹H-NMR ve MALDI-TOF-MS sonuçları incelendiğinde, serin'in -OH grubunun varlığında ve kontrollü reaksiyon koşullarında laktit halkasının açılması sonucu başarılı bir şekilde LDS monomerinin sentezlendiği tespit edilmiştir.

LDS monomerlerinin sentezi tamamlandıktan sonra, DCC polimerizasyonu ile PLDS15 ve PLDS30 kopolimerleri sentezlenmiştir. MALDI-TOF-MS spektrum analizi, PLDS15 ve PLDS30 polimerlerinin kütle spektrumunda 700-1700 m/z kütle aralığında oligomer pozitif iyon pikleri belirlenmiştir. PLDS15 polimerinin en büyük molar kütleli pikinin 1408 m/z olduğu, PLDS30 polimerinin en büyük molar kütleli pikinin ise 1696 m/z olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ayrıca PEG-b-PLDS blok kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu üzerine de odaklanmıştır. PEG-diasit (PEGDA) veya PEG-Diol (PEGDO) kullanılarak PLDS-PEG-PLDS blok kopolimerleri sentezlenmiştir. MALDI-TOF-MS, FTIR ve ¹H-NMR analizleri ile bu blok kopolimerlerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Son olarak, PLDS-PEG-PLDS blok kopolimerinin korunmuş amin yan gruplarının trifloro asetik asit ile uzaklaştırılması sonucunda blok PLDSAm-PEG-PLDSAm kopolimeri sentezlenmiştir. Bu çalışma, polimer ana zincirinde ardışık amin yan gruplarını içeren yeni bir polimer sentezi gerçekleştirmiştir.

Bu çalışma, poli(etilen glikol), laktik asit ve serin gibi biyouyumluluk ve biyobozunur özellikleri gösteren polimerlerin birleştirilerek biyomedikal uygulamalar için yeni blok kopolimerlerin sentezlenmesini sağlamıştır. Bu blok kopolimerlerin uygun fiziksel özellikler, biyobozunurluk ve biyoyumluluk özelliklerine sahip olması, onları doku mühendisliği, ilaç taşıyıcı sistemler ve biyomedikal implantlar gibi alanlarda kullanılabilir kılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Alibolandi, F. Sadeghi, S.H. Sazmand, S.M. Shahrokhi, M. Seifi, and F. Hadizadeh, *International journal of pharmaceutical investigation*, 5 (2015) 134.
- [2] M. Hiljanen-Vainio, P. Varpomaa, J. Seppälä, and P. Törmälä, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 197 (1996) 1503.
- [3] M. Hartmann, *High molecular weight polylactic acid polymers*, Springer, 1998.
- [4] A. Gupta and V. Kumar, *Eur. Polym. J.*, 43 (2007) 4053.
- [5] P. Zarrintaj, M.R. Saeb, S.H. Jafari, and M. Mozafari, *Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields*, Elsevier, 2020.
- [6] D.R. Perinelli, M. Cespi, G. Bonacucina, and G.F. Palmieri, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49 (2019) 443.
- [7] R.M. Rasal, A.V. Janorkar, and D.E. Hirt, *Progress in polymer science*, 35 (2010) 338.
- [8] W. Zhang, B. Aguila, and S. Ma, *Journal of Materials Chemistry A*, 5 (2017) 18896.
- [9] B. Anderson, G. Andrews, P. Arthur Jr, H. Jacobson, L. Melby, A. Playtis, and W. Sharkey, *Macromolecules*, 14 (1981) 1599.
- [10] K. Wang, K. Amin, Z. An, Z. Cai, H. Chen, H. Chen, Y. Dong, X. Feng, W. Fu, and J. Gu, *Materials Chemistry Frontiers*, 4 (2020) 1803.
- [11] K. Matyjaszewski, (2002)
- [12] A. Qin, J.W. Lam, and B.Z. Tang, *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 2522.
- [13] Q. Song, J. Zhao, G. Zhang, F. Peruch, and S. Carlotti, *Polymer Journal*, 52 (2020) 3.
- [14] F.T. Moreira, J. Guerreiro, L. Brandão, and M.G.F. Sales, *Synthesis of molecular biomimetics*, Elsevier, 2015.
- [15] C.M. Thomas and J.F. Lutz, *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (2011) 9244.
- [16] A.J. Lasprilla, G.A. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, and R. Maciel Filho, *Biotechnology advances*, 30 (2012) 321.
- [17] K.M. Nampoothiri, N.R. Nair, and R.P. John, *Bioresource technology*, 101 (2010) 8493.
- [18] J.-M. Raquez, Y. Habibi, M. Murariu, and P. Dubois, *Progress in Polymer Science*, 38 (2013) 1504.
- [19] B.-T. Ko and C.-C. Lin, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 7973.
- [20] A. Löfgren, A.-C. Albertsson, P. Dubois, R. Jérôme, and P. Teyssié, *Macromolecules*, 27 (1994) 5556.
- [21] M.H. Chisholm, J.C. Huffman, and K. Phomphrai, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (2001) 222.
- [22] Z. Zhong, S. Schneiderbauer, P.J. Dijkstra, M. Westerhausen, and J. Feijen, *Journal of Polymers and the Environment*, 9 (2001) 31.
- [23] K. Nie, L. Fang, Y. Yao, Y. Zhang, Q. Shen, and Y. Wang, *Inorganic chemistry*, 51 (2012) 11133.
- [24] G. Mittal, D. Sahana, V. Bhardwaj, and M.R. Kumar, *Journal of controlled release*, 119 (2007) 77.
- [25] S. Zhou, X. Liao, X. Li, X. Deng, and H. Li, *Journal of Controlled Release*, 86 (2003) 195.
- [26] S. Teixeira, K.M. Eblagon, F. Miranda, M.F. R. Pereira, and J.L. Figueiredo, *C*, 7 (2021) 42.

- [27] P.J. Hurst, A.M. Rakowski, and J.P. Patterson, *Nature communications*, 11 (2020) 1.
- [28] H.R. Kricheldorf and S.M. Weidner, *Macromolecular Rapid Communications*, 41 (2020) 2000152.
- [29] F. Sanda and T. Endo, *Macromolecular chemistry and physics*, 200 (1999) 2651.
- [30] R. Kulkarni and H. Morawetz, *Journal of Polymer Science*, 54 (1961) 491.
- [31] E.R. Brisson, Z. Xiao, G.V. Franks, and L.A. Connal, *Biomacromolecules*, 18 (2017) 272.
- [32] R.A.R. Galán, M.L.F. García, and J.P. Bellalta, *Biodegradable Poly(Ester Amide)s: Synthesis and Applications*.in 2011, 2011.
- [33] C. Methenitis, J. Morcellet, G. Pneumatikakis, and M. Morcellet, *Macromolecules*, 27 (1994) 1455.
- [34] M. Casolaro, S. Bottari, A. Cappelli, R. Mendichi, and Y. Ito, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 1325.
- [35] F. Sanda, J. Kamatani, H. Handa, and T. Endo, *Macromolecules*, 32 (1999) 2490.
- [36] R.K. O'Reilly, *Polymer international*, 59 (2010) 568.
- [37] H. Mori and T. Endo, *Macromolecular rapid communications*, 33 (2012) 1090.
- [38] C. Luo, Y. Liu, and Z. Li, *Macromolecules*, 43 (2010) 8101.
- [39] H. Sun and C. Gao, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 3609.
- [40] S. Fujii, M. Kido, M. Sato, Y. Higaki, T. Hirai, N. Ohta, K. Kojio, and A. Takahara, *Polymer Chemistry*, 6 (2015) 7053.
- [41] S.G. Roy and P. De, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014)
- [42] S.G. Roy, R. Acharya, U. Chatterji, and P. De, *Polymer Chemistry*, 4 (2013) 1141.
- [43] K. Bauri, S.G. Roy, S. Pant, and P. De, *Langmuir*, 29 (2013) 2764.
- [44] S. Nagaoka, A. Shundo, T. Satoh, K. Nagira, R. Kishi, K. Ueno, K. Iio, and H. Ihara, *Synthetic communications*, 35 (2005) 2529.
- [45] A.C. Kurtz, *Journal of Biological Chemistry*, 140 (1941) 705.
- [46] S. Banerjee, T. Maji, T.K. Paira, and T.K. Mandal, *Macromolecular rapid communications*, 34 (2013) 1480.
- [47] W. Li, Q. Liu, and L. Liu, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25 (2014) 1730.
- [48] D.s.e. Weller, A. Medina-Oliva, H. Claus, S. Gietzen, K. Mohr, A. Reuter, D. Schäffel, S. Schöttler, K. Koynov, and M. Bros, *Macromolecules*, 46 (2013) 8519.
- [49] Q. Liu, A. Singh, and L. Liu, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 226.
- [50] Q. Liu, W. Li, A. Singh, G. Cheng, and L. Liu, *Acta biomaterialia*, 10 (2014) 2956.
- [51] T.E. Kristensen, F.K. Hansen, and T. Hansen, 2009 (2009) 387.
- [52] A.M. Alswieleh, N. Cheng, I. Canton, B. Ustbas, X. Xue, V. Ladmiral, S. Xia, R.E. Ducker, O. El Zubir, and M.L. Cartron, *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2014) 9404.
- [53] A. Duro-Castano, I. Conejos-Sánchez, and M.J. Vicent, *Polymers*, 6 (2014) 515.
- [54] O. Piloty and J. Neresheimer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 39 (1906) 514.
- [55] T. Deming, *Angew. Chem., Int. Ed*, 45 (2006) 5752.
- [56] O. Schäfer, K. Klinker, L. Braun, D. Huesmann, J. Schultze, K. Koynov, and M. Barz, *ACS Macro Letters*, 6 (2017) 1140.
- [57] S. Waley, u. J. Watson: *Proc.in Roy. Soc.(London) A*. 1949, 1949. p. 499.
- [58] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, and M.J. Vicent, *Polymer Chemistry*, 2 (2011) 1900.
- [59] C. Gazon, P. Salas-Ambrosio, E. Ibarboure, A. Buol, E. Garanger, M.W. Grinstaff, S. Lecommandoux, and C. Bonduelle, *Angewandte Chemie*, 132 (2020) 632.
- [60] T.J. Deming, *Nature*, 390 (1997) 386.

- [61] T. Aliferis, H. Iatrou, and N. Hadjichristidis, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43 (2005) 4670.
- [62] I. Dimitrov and H. Schlaad, *Chemical Communications*, (2003) 2944.
- [63] I. Conejos-Sánchez, A. Duro-Castano, A. Birke, M. Barz, and M.J. Vicent, *Polymer Chemistry*, 4 (2013) 3182.
- [64] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, and F. Schué, *Macromolecular rapid communications*, 25 (2004) 1221.
- [65] H. Lu and J. Cheng, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 14114.
- [66] Y. Knobler, S. Bittner, and M. Frankel, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (1964) 3941.
- [67] T. Aliferis, H. Iatrou, and N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 1653.
- [68] C.-L. Chang, M.-k. Leung, and M.-H. Yang, *Tetrahedron*, 60 (2004) 9205.
- [69] K. Bauri, M. Nandi, and P. De, *Polymer Chemistry*, 9 (2018) 1257.
- [70] C. Xu, X. Hu, J. Wang, Y.-M. Zhang, X.-J. Liu, B.-B. Xie, C. Yao, Y. Li, and X.-S. Li, *ACS applied materials & interfaces*, 7 (2015) 17337.
- [71] K. Matyjaszewski, *Comparison and classification of controlled/living radical polymerizations*, ACS Publications, 2000.
- [72] E.R. Brisson, Z. Xiao, and L.A. Connal, *Australian Journal of Chemistry*, 69 (2016) 705.
- [73] K. Bauri, S.G. Roy, and P. De, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217 (2016) 365.
- [74] I.-D. Chung, P. Britt, D. Xie, E. Harth, and J. Mays, *Chemical communications*, (2005) 1046.
- [75] M. Moeller and K. Matyjaszewski, *Polymer science: a comprehensive reference*, Newnes, Chapter, 2012.
- [76] T. Koga, E. Aso, and N. Higashi, *Langmuir*, 32 (2016) 12378.
- [77] B. Song, J. Song, S. Zhang, M.A. Anderson, Y. Ao, C.-Y. Yang, T.J. Deming, and M.V. Sofroniew, *Biomaterials*, 33 (2012) 9105.
- [78] S. Hehir and N.R. Cameron, *Polymer international*, 63 (2014) 943.
- [79] D. Ulkoski, A. Meister, K. Busse, J. Kressler, and C. Scholz, *Colloid and Polymer Science*, 293 (2015) 2147.
- [80] A. Boto, C.C. González, D. Hernández, I. Romero-Estudillo, and C.J. Saavedra, *Organic Chemistry Frontiers*, 8 (2021) 6720.
- [81] C. Fu, X. Sun, D. Liu, Z. Chen, Z. Lu, and N. Zhang, *International journal of molecular sciences*, 12 (2011) 1371.
- [82] D.H. Yang, H.J. Kim, K. Park, J.K. Kim, and H.J. Chun, *Drug Delivery*, 25 (2018) 950.
- [83] Q. Chen, N. De Marco, Y. Yang, and T. Song, *Chen, CC*, (2014) 355.
- [84] M.P. Bevilacqua, D.J. Huang, B.D. Wall, S.J. Lane, C.K. Edwards III, J.A. Hanson, D. Benitez, J.S. Solomkin, and T.J. Deming, *Macromolecular bioscience*, 17 (2017) 1600492.
- [85] S.H. Boddu, P. Bhagav, P.K. Karla, S. Jacob, M.D. Adatiya, T.M. Dhameliya, K.M. Ranch, and A.K. Tiwari, *Journal of Functional Biomaterials*, 12 (2021) 58.
- [86] I. Tabujew and K. Peneva, (2014)
- [87] M. Lara-Velazquez, R. Alkharboosh, E.S. Norton, C. Ramirez-Loera, W.D. Freeman, H. Guerrero-Cazares, A.J. Forte, A. Quiñones-Hinojosa, and R. Sarabia-Estrada, *Frontiers in neurology*, 11 (2020) 740.
- [88] C.-H. Lee, D. Kasala, Y. Na, M.S. Lee, S.W. Kim, J.H. Jeong, and C.-O. Yun, *Biomaterials*, 35 (2014) 5505.

- [89] S. Manouchehri, P. Zarrintaj, M.R. Saeb, and J.D. Ramsey, *Molecular Pharmaceutics*, 18 (2021) 3652.
- [90] J. Li, H. Liang, J. Liu, and Z. Wang, *International journal of pharmaceutics*, 546 (2018) 215.
- [91] T. Thambi, J. Lee, A.-R. Yoon, D. Kasala, and C.-O. Yun, *Pharmaceutics*, 14 (2022) 597.
- [92] S. Zenoozi, S. Agbolaghi, E. Poormahdi, M. Hashemzadeh-Gargari, and M. Mahmoudi, *Macromolecular Research*, 25 (2017) 826.
- [93] S.H. Kim, J.H. Jeong, C.O. Joe, and T.G. Park, *Journal of controlled release*, 103 (2005) 625.
- [94] Z. Kadlecova, Y. Rajendra, M. Matasci, L. Baldi, D.L. Hacker, F.M. Wurm, and H.-A. Klok, *Journal of controlled release*, 169 (2013) 276.
- [95] N.A. Patil and B. Kandasubramanian, *European Polymer Journal*, 146 (2021) 110248.
- [96] I. Mukherjee, A. Ghosh, P. Bhadury, and P. De, *ACS omega*, 2 (2017) 1633.
- [97] H.E. Carter and H.D. West, *Organic Syntheses*, 20 (2003) 81.
- [98] X. Tian, J. Strassmann, and D. Queller, *Heredity*, 112 (2014) 215.
- [99] Z. Bohak and E. Katchalski, *Biochemistry*, 2 (1963) 228.
- [100] M.J. Krysmann, S.S. Funari, E. Canetta, and I.W. Hamley, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209 (2008) 883.
- [101] O.S. Rabotyagova, P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 269.
- [102] O.S. Rabotyagova, P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 229.
- [103] J.T. Prince, K.P. McGrath, C.M. DiGirolamo, and D.L. Kaplan, *Biochemistry*, 34 (1995) 10879.
- [104] C. Xu and J. Kopeček, *Pharmaceutical research*, 25 (2008) 674.
- [105] T.M.D. Le, V.V.L. Nguyen, T.A. Trinh, N.S. Pham, D.S. Lee, and D.P. Huynh, *Journal of Applied Polymer Science*, 138 (2021) 50488.
- [106] T.A. Trinh, T.M.D. Le, H.G.V. Ho, T.C.T. To, V.V.L. Nguyen, and D.S. Lee, *Biomaterials Science*, 8 (2020) 3830.
- [107] N.L. Benner, R.L. McClellan, C.R. Turlington, O.A. Haabeth, R.M. Waymouth, and P.A. Wender, *Journal of the American Chemical Society*, 141 (2019) 8416.
- [108] D.J. Price, M. Khuphe, R.P. Davies, J.R. McLaughlan, N. Ingram, and P.D. Thornton, *Chemical Communications*, 53 (2017) 8687.
- [109] Y. Wei, X. Li, X. Jing, X. Chen, and Y. Huang, *Polymer international*, 62 (2013) 454.
- [110] G. John and M. Morita, *Macromolecules*, 32 (1999) 1853.
- [111] M. Khuphe, B. Mukonoweshuro, A. Kazlauciusas, and P.D. Thornton, *Soft Matter*, 11 (2015) 9160.
- [112] J. Chen, Z. Guo, L. Lin, Y. Hu, H. Tian, M. Chen, and X. Chen, *Materials Chemistry Frontiers*, 1 (2017) 937.
- [113] V.V.L. Nguyen, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 59 (2021) 60.
- [114] F.M. Veronese and A. Mero, *BioDrugs*, 22 (2008) 315.
- [115] P. Kubisa, G. Lapienis, and T. Biela, *Polymers for Advanced Technologies*, 32 (2021) 3857.
- [116] W. Wang, Q.-Q. Wei, J. Wang, B.-C. Wang, S.-h. Zhang, and Z. Yuan, *Journal of colloid and interface science*, 404 (2013) 223.
- [117] E. Illés, E. Tombácz, M. Szekeres, I.Y. Tóth, Á. Szabó, and B. Iván, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380 (2015) 132.
- [118] R. Toshiyama, M. Konno, H. Eguchi, H. Takemoto, T. Noda, A. Asai, J. Koseki, N. Haraguchi, Y. Ueda, and K. Matsushita, *Oncogene*, 38 (2019) 244.

- [119] H. Lee, J.B. Park, and J.Y. Chang, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49 (2011) 2859.
- [120] Y. Wu, L. Li, S. Chen, J. Qin, X. Chen, D. Zhou, and H. Wu, *Scientific Reports*, 10 (2020) 1.
- [121] F. Shan, Y. Liu, H. Jiang, and F. Tong, *International Journal of Nanomedicine*, 12 (2017) 7613.
- [122] J. Tessmar, A. Mikos, and A. Göpferich, *Biomaterials*, 24 (2003) 4475.
- [123] Y. Wei, X. Li, X. Jing, X. Chen, and Y. Huang, *Chemical Research in Chinese Universities*, 29 (2013) 177.
- [124] T. Yoshida, *Stimuli-sensitive polymers for drug delivery and diagnostic systems interacting with biosurfaces*, Elsevier, 2015.
- [125] E.S. Lee, Z. Gao, D. Kim, K. Park, I.C. Kwon, and Y.H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 129 (2008) 228.
- [126] A.F. Alwan, *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 33 (2022) 24.
- [127] L. Nikolic, I. Ristic, B. Adnadjevic, V. Nikolic, J. Jovanovic, and M. Stankovic, *Sensors*, 10 (2010) 5063.
- [128] C. Lee and S. Hong, *An overview of the synthesis and synthetic mechanism of poly (lactic acid)*. *Mod Chem Appl* 2: 144. 2014.
- [129] A. Silvana, S. Castellaro, *Organic Communications* 10 (2017) 144.
- [130] S. Koto, T. Asakura, M. Oshimura, T. Hirano, K. Ute and H. N. Cheng, *Polymers* 11 (2019) 725.
- [131] *The Use of Deuterium in ¹H-NMR Spectroscopy*, 14.17_ The Use of Deuterium in ¹H NMR Spectroscopy - Chemistry LibreTexts.html (Erişim tarihi: 03 Temmuz 2023).
- [132] R.J. Awale, F.B. Ali, A.S. Azmi, N.I.M. Puad, H. Anuar, and A. Hassan, *Polymers*, 10 (2018) 977.
- [133] O. Ewa, W. Czerwiński, J. Nowaczyk, M. O. Sepulchre, M. Tessier, S. Salhi and A. Fradet, *European Polymer Journal* 43 (2007) 1009.
- [134] S. Shota, K. Masutani, Y. I. Hsu, A. Mahara, Y. Kimura and T. Yamaoka, *Polymers* 7 (2015) 1177.