

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IŞIĞA-DUYARLI AKILLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER:
DNA-POLİMER VE PROTEİN-POLİMER KONJUGATLARININ
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İrem AKAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Binnur TEMEL

HAZİRAN 2018

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IŞIĞA-DUYARLI AKILLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER:
DNA-POLİMER VE PROTEİN-POLİMER KONJUGATLARININ
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İrem AKAR
(160305006)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Binnur TEMEL

HAZİRAN 2018

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160305006 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi İrem AKAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “IŞIĞA-DUYARLI AKILLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: DNA-POLİMER VE PROTEİN-POLİMER KONJUGATLARININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Deniz CEYLAN TUNCABOYLU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **21 Mayıs 2018**
Savunma Tarihi : **28 Haziran 2018**



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından sonuna kadar gerek akademik gerek kişisel konularda tüm samimiyetiyle her türlü desteğini yanımda hissettiğim, bilgi ve birikimlerini hiç tereddütsüz çevresindekilere aktaran, sonu olmayan bir azimle elini attığı her işi en güzel şekilde tamamlayan ve eksik kaldığım her alanda yardımına koşan, öğrencisi olma ayrıcalığını yaşadığım çok değerli tez danışmanım, idolüm Doç. Dr. Binnur Temel'e bana kattığı her şey için içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışmayı ortaya çıkarana kadar laboratuvarında geçirdiğim her anımda özveriyle yanımda olan, hafta içi, hafta sonu ayırmadan ihtiyacım olduğunda desteğini hiç esirgemeyen yol arkadaşım Merve Keklik'e ve güzel enerjisiyle yorgun zamanlarımızı bile eğlenceli hale getiren Hatice Kübra Kurt'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın bu aşamasına kadar sabırla, yorulmadan, sıkılmadan, maddi ve manevi olarak hep yanımda olup bana güven veren, sevgi ve desteklerini hep yanımda hissettiğim, haklarını ödeyemeyeceğim annem İlknur Akar'a ve babam Adnan Akar'a; en zor zamanlarımda ve tüm önemli anlarımda beni yalnız bırakmayan kardeşlerim Rümeysa, Ömer Faruk ve Kerem Akar, Ahsen Nur Ürey, Canan Akar, Dilara Akar, Nesibe Özdebak, Şevval Akar ve Talha Ceylan'a sonsuz destekleri için teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamın bir kısmı için zamanını ve enerjisini harcayarak bana yardımcı olan Arş. Gör. Dilek Öztürk hocama çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 6.2012/22 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2018

İrem AKAR
(Biyomühendis)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İrem Akar

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	x
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİLER	4
2.1 Makromolekül Kavramı	4
2.2 Polimerlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1 Doğada bulunup bulunmamalarına göre polimerler	5
2.2.1.1 Sentetik polimerler	6
2.2.1.2 Yarı sentetik polimerler	6
2.2.1.3 Doğal polimerler	6
2.3 Polimerizasyon Türleri	8
2.3.1 Kondenzasyon polimerizasyonu	9
2.3.2 Katılma polimerizasyonu	9
2.3.3 Kontrollü polimerizasyonlar	10
2.3.3.1 Nitroksi ortamlı polimerizasyon (NOP)	10
2.3.3.2 Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)	10
2.3.3.3 Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)	10
2.4 Makromoleküllerin Fonksiyonlandırılması	11
2.4.1 “Click” Kimyası	11
2.4.1.1 Huisgen siklokatılması	12
2.5 Polimer-Biyomakromolekül Konjugatları	14
2.5.1 DNA-Polimer Konjugatları	15
2.5.1.1 DNA-polimer konjugatlarının sentezi	16
2.5.1.2 DNA-polimer konjugatlarının dış uyaranlara bağlı şekil değiştirme davranışları	18
2.5.1.3 DNA-polimer konjugatları ile oluşturulan nanaoparçacıkların kullanım alanları	20
2.6 Protein-Polimer Konjugatları	22
2.6.1 Albumin-polimer konjugatları	23
2.6.2 Protein-polimer konjugatları ile oluşturulan nanoparçacıklar	23
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1 Malzemeler	26

3.2 Kullanılan Cihazlar	26
3.3 Deneyisel Kısım	28
3.3.1 Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin sentezi.....	28
3.3.2 2-Azidoetanol sentezi.....	28
3.3.3 2-Azidoetil 2-bromoizobütirat (AEBI) sentezi	29
3.3.4 Poli(kumarin metakrilat-ko-ter-bütıl akrilat) (PKMAAtBA) sentezi	29
3.3.5 <i>N</i> -(4-Pentinoiloksi)süksinimit sentezi	30
3.3.6 Oligonükleotit-poli(kumarin metakrilat- <i>ko-ter</i> -bütıl akrilat (OLN- PKMAAtBA) sentezi	30
3.3.7 BSA- <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimit sentezi	32
3.3.8 BSA-PKMAAtBA sentezi	32
3.3.9 BSA-PKMAAtBA misellerinin oluşturulması.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1 Kumarin Metakrilat (KMA) Monomerinin Karakterizasyonu.....	33
4.2 2-Azidoetanol Karakterizasyonu.....	35
4.3 2-Azidoetil 2-Bromoizobütiratın (AEBI) Karakterizasyonu	36
4.4 Poli(kumarin metakrilat- <i>ko-ter</i> -bütıl akrilat) (PKMAAtBA) Karakterizasyonu	38
4.5 <i>N</i> -(4-Pentinoiloksi)süksinimit (PSIm) Karakterizasyonu	41
4.6 OLN-PKMAAtBA Konjugatının Karakterizasyonu.....	43
4.7 BSA-PKMAAtBA Konjugatının Karakterizasyonu	45
5. SONUÇ	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	58

KISALTMALAR

AEBI	: 2-Azidoetil 2-bromoizobütirat
ATRP	: Atom transfer radikal polimerizasyonu
AuNP	: Altın nanoparçacık
BSA	: Bovin serum albumin
CaH₂	: Kalsiyum hidrür
¹³C NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
CuAAC	: Bakır (I) katalizli azid-alkin halka katılması
CuBr	: Bakır bromür
CuSO₄	: Bakır sülfat
DCC	: <i>N,N'</i> -Disikloheksilkarbodiimit
DCM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik ışık saçılım spektrometresi
DMF	: <i>N,N</i> -Dimetilformamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
FT-IR	: Fourier dönüşümlü infrared
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
HCl	: Hidroklorik asit
¹H NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KMA	: Kumarin metakrilat
LCST	: Düşük kritik çözelti sıcaklığı
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
NaAsc	: L-sodyum askorbat
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NaN₃	: Sodyum azit
Na₂SO₄	: Sodyum sülfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NHS	: <i>N</i> -hidroksisüksinimit
NOP	: Nitroksi ortamlı polimerizasyon
OLN	: Oligonükleotit
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDI	: Polidispersite
PEG	: Polietilenglikol
PKMA_tBA	: Poli(kumarin metakrilat- <i>ko-ter</i> -bütil akrilat)
PMA	: Poli(metil akrilat)
PMDETA	: <i>N,N,N',N'',N'''</i> -pentametildietilentriamin
PNIPAM	: Poli(<i>N</i> -izopropilakrilamit)
PS	: Polistiren

RAFT	: Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu
TEA	: Trietilamin
TBTA	: Tris[(1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil]amin
T_g	: Camı geçiş sıcaklığı
THF	: Tetrahidrofuran
UV-Vis	: Ultraviyole-görünür ışık spektroskopisi



SEMBOLLER

$\text{\AA}$	: Angstrom
$^{\circ}\text{C}$	: Derece Santigrat
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mL/dak	: Mililitre bölü dakika
mm	: Milimetre
μL	: Mikrolitre
λ	: Dalgaboyu

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 : Polimerlerin sınıflandırılması.	5
Tablo 4.1 : Farklı sürelerde sentezlenen PKMAtBA-1 ve PKMAtBA-2 polimerlerinin karşılaştırılması.	38
Tablo 4.2 : BSA, BSA-PKMAtBA (1:20) ve BSA-PKMAtBA (1:10) zeta potansiyelleri.	53



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: a) Karbon-karbon bağları içeren poli(metilen), b) karbon-oksijen bağları içeren poli(etilen oksit) veya poli(oksietilen), c) karbon-azot bağları içeren polipeptidler ve d) ana zincirde hiç karbon atomu bulunmayan silikon	5
Şekil 2.2	: Aminoasit yapısı.....	8
Şekil 2.3	: Serum albumin yapısı.....	8
Şekil 2.4	: Tiyo-en “Click” reaksiyonu.....	12
Şekil 2.5	: Bakır katalizörlü 1,3-dipolar Huisgen siklokatalizasyon reaksiyonu.....	13
Şekil 2.6	: Polimer biyokonjugatlarının a) grafting to b) grafting from ve c) grafting through yöntemleriyle sentezi.....	15
Şekil 2.7	: DNA-polimer konjugatlarının kendiliğinden birleşme özellikleriyle oluşturduğu misel, vezikül ve tüp yapıları	16
Şekil 2.8	: DNA-polimer konjugatlarının kendiliğinden birleşme özellikleriyle oluşturduğu a) nanokapsül, b) nanoküre, c) lipozom, d) polimerik misel ve e) dendrimer yapıları.....	16
Şekil 2.9	: DNA-polimer konjugatı sentez yöntemleri: a) amid bağı oluşumuyla konjugasyon b) disülfid bağıyla bağlanma c) Michael katılması ve d) azit-alkin Huisgen siklokatalizasyonu.....	17
Şekil 2.10	: Altın nanoparçacıkla birleştirilmiş oligonükleotitler kullanılarak sentezlenen DNA-polimer konjugatının ısıya bağlı şekil değiştirme davranışı	18
Şekil 2.11	: DNA-b-PNIPAM-b-PMA misellerinin sıcaklık değişimine ve tamamlayıcı DNA zinciri ile hibridizasyonuna bağlı olarak morfoloji değişimleri	19
Şekil 2.12	: DNA-polimer konjugatları ile elde edilen ışığa duyarlı misellerin şekil değiştirme davranışları	20
Şekil 2.13	: DNA-polimer konjugatı ile mRNA tespiti	21
Şekil 2.14	: Folik asit molekülleri ile fonksiyonlandırılmış DNA-polimer konjugatlarından elde edilen misellerin ilaç taşıma mekanizması ve farklı tasarlanmış misellerin hücre canlılığına olan etkisini gösteren grafik: (A) hedefleme birimleri (folik asitler) ile fonksiyonlandırılmış ilaç yüklü miseller (B) konjuge olmamış folik asitlerin varlığında ilaç yüklü miseller (C) herhangi bir hedefleme birimi taşımayan ilaç yüklü miseller (D) ilaç içermeyen folik asit konjugatlı miseller.....	22
Şekil 2.15	: a) Büyük amfifilik yapılardan elde edilen albumin-polimer nanoparçacıkları, b) albumin korona ile kaplanmış polimerik nanoparçacıklar ve c) polimer ile kaplanmış albumin (doğal veya denatüre olmuş) veya albumin parçacıkları.....	24
Şekil 2.16	: Albumin-polimer konjugatından sentezlenen nanoparçacıklarla ilaç taşıma.....	25

Şekil 3.1	: Kumarin metakrilat monomerinin sentezi.	28
Şekil 3.2	: 2-Azidoetanölün sentezi.	28
Şekil 3.3	: 2-Azidoetil 2-bromoizobütirat sentezi ve kimyasal yapısı.	29
Şekil 3.4	: PKMA _t BA polimerinin ATRP ile sentezlenmesi.	30
Şekil 3.5	: <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimit bileşiğinin sentezi.	30
Şekil 3.6	: OLN- <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimid sentezi.	31
Şekil 3.7	: OLN-PKMA _t BA konjugatının sentez reaksiyonu ve kimyasal yapısı. ...	31
Şekil 4.1	: a) 4-Metilumbelliferon ve b) kumarin metakrilat (KMA) monomerine ait FT-IR spektrumları	33
Şekil 4.2	: Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin CDCl ₃ içindeki ¹ H NMR spektrumu.	34
Şekil 4.3	: Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin [4.5x10 ⁻⁵ M] DCM içindeki floresans spektrumu (λ _{uyarılma} = 310 nm).	35
Şekil 4.4	: KMA monomerinin DSC grafiği.	35
Şekil 4.5	: 2-Azidoetanölün FT-IR spektrumu.	36
Şekil 4.6	: 2-Azidoetanölün CDCl ₃ içerisinde çekilen ¹ H NMR spektrumu.	36
Şekil 4.7	: a) 2-Azidoetanöl ve b) 2-azidoetil 2-bromoizobütirat (AEBI) bileşiklerinin FT-IR spektrumları.	37
Şekil 4.8	: 2-Azidoetil 2-bromoizobütiratın (AEBI) CDCl ₃ içinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	37
Şekil 4.9	: 2-Azidoetil 2-bromoizobütiratın (AEBI) CDCl ₃ içinde çekilmiş ¹³ C NMR spektrumu.	38
Şekil 4.10	: PKMA _t BA-2 kopolimerinin CDCl ₃ içinde alınan ¹ H NMR spektrumu.	39
Şekil 4.11	: a) PKMA _t BA-2 [1.4 x 10 ⁻⁸ M] ve b) KMA monomerinin [4.5 x 10 ⁻⁵ M] DCM içindeki UV spektrumu.	40
Şekil 4.12	: PKMA _t BA-2 [1.4 x 10 ⁻⁸ M] kopolimerinin DCM içindeki floresans spektrumu.	40
Şekil 4.13	: PKMA _t BA-2 kopolimerine ait DSC termogramı.	41
Şekil 4.14	: a) 4-Pentinoik asit ve b) <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimite (PSIm) ait FT-IR spektrumları.	42
Şekil 4.15	: <i>N</i> -(4-Pentinoiloksi)süksinimitin (PSIm) CDCl ₃ içinde alınan ¹ H NMR spektrumu.	42
Şekil 4.16	: a) PKMA _t BA kopolimerinin ve b) OLN-PKMA _t BA konjugatının FT-IR spektrumu.	43
Şekil 4.17	: OLN-PKMA _t BA [0.1 mg/mL] konjugatının su içindeki UV spektrumu.	44
Şekil 4.18	: OLN-PKMA _t BA [0.1 mg/mL] konjugatının su içindeki floresans spektrumu.	44
Şekil 4.19	: OLN-PKMA _t BA konjugatı ile oluşturulan miselin DLS grafiği.	45
Şekil 4.20	: a) <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimit, b) BSA ve c) BSA- <i>N</i> -(4-pentinoiloksi)süksinimitin FT-IR spektrumları.	46
Şekil 4.21	: a) PKMA _t BA kopolimerinin ve b) BSA-PKMA _t BA konjugatının FT-IR spektrumları.	46
Şekil 4.22	: a) BSA [0.5 mg/mL] ve b) BSA-PKMA _t BA [0.5 mg/mL] su içindeki UV spektrumu.	47
Şekil 4.23	: BSA'nın [0.005 mg/mL] su içindeki floresans spektrumu.	47

Şekil 4.24 :	BSA-PKMA _t BA [0.005 mg/mL] konjugatının su içindeki floresans spektrumu.	48
Şekil 4.25 :	a) BSA ve b) BSA-PKMA _t BA (BSA: PKMA _t BA= 1:20) konjugatının DSC termogramı.	49
Şekil 4.26 :	BSA-PKMA _t BA (BSA: PKMA _t BA= 1:20) konjugatının ikinci ısıtma sonucunda elde edilen DSC termogramı.	49
Şekil 4.27 :	a) BSA ve b) BSA-PKMA _t BA (BSA: PKMA _t BA= 1:10) konjugatının DSC termogramı.	50
Şekil 4.28 :	BSA-PKMA _t BA (BSA: PKMA _t BA= 1:10) konjugatının ikinci ısıtma sonucunda elde edilen DSC termogramı.	50
Şekil 4.29 :	Coomassie mavi boyaması ile görselleştirilen SDS-PAGE (şerit 1: protein işaretleyici; şerit 2: BSA indirgeyici olmayan koşullar; şerit 3: BSA-PKMA _t BA konjugat indirgeyici olmayan koşullar; şerit 4: protein işaretleyici, şerit 5: BSA indirgeyici koşullar, şerit 6: BSA-PKMA _t BA konjugat indirgeyici koşullar.	51
Şekil 4.30 :	BSA (—) ve BSA-PKMA _t BA-1 (—) misellerinin DLS ölçümleri....	52
Şekil 4.31 :	BSA: PKMA _t BA= 1:20 (—) ve 1:10 (—) oranında oluşturulan BSA-PKMA _t BA konjugatları ile hazırlanan misellerin DLS ölçümleri.	52
Şekil 4.32 :	BSA- PKMA _t BA (BSA: PKMA _t BA= 1:20) konjugatı ile oluşturulan miselin (—) ve 350 nm'de 1 saat aydınlatılmış miselin (—) DLS ölçümleri.	53

İŞİĞA-DUYARLI AKILLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: DNA-POLİMER VE PROTEİN-POLİMER KONJUGATLARININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Son zamanlarda özellikle kanser gibi önemli hastalıkların tedavisi için yeni metodların geliştirilmesine yönelik artan ihtiyaç sebebiyle, konvansiyonel ilaçların yerine daha etkili olabilecek ve hastaları daha az yan etkiyle tedavi edebilme potansiyeline sahip akıllı ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemler genellikle çeşitli polimerlerle oluşturulan nanoparçacıkların içine uygun ilaçların yüklenip hastalıklı bölgeye uygun hedeflendirmenin yapılarak ilacın tüm vücuda yayılmadan sadece istenilen bölgeye uygulanabileceği şekilde tasarlanmaktadır.

Bu amaçla oluşturulacak taşıyıcı sistemlerin sentezinde uygun çözücüler içinde kendiliğinden birleşme özelliğine sahip amfifilik konjugatların kullanılması bu sistemlerin kolaylıkla elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Amfifilik yapıları oluşturmak için hidrofobik ve hidrofilik iki blok çeşitli konjugasyon yöntemleriyle bir araya getirilir. Bu yapılar tamamen sentetik polimerlerle hazırlanabilirken canlı ortamla uyumlu olmaları sebebiyle günümüzde hidrofilik blok olarak biyomakromoleküller daha yaygın olarak çalışılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada fotoaktif bir molekül olan kumarin içeren metakrilat monomeri ile tersiyer bütül akrilat monomerinin ATRP ile polimerizasyonu sonucu hidrofobik bir polimer bloğu elde edilmiştir. Hidrofilik blok olarak ise iki ayrı biyomakromolekül kullanılmıştır. İlk olarak 22 bazlı tek zincirli bir oligonükleotit ile hidrofobik polimerin CuAAC “click” reaksiyonu vasıtasıyla konjugasyonu yapılmış ve bu konjugatın karakterizasyonu için FT-IR, DLS ve UV ölçümleri alınmıştır. Bir diğer hidrofilik blok olarak ise BSA proteini kullanılmıştır. Hidrofobik polimer ile BSA’nın CuAAC “click” reaksiyonu vasıtasıyla konjuge edilmesinden sonra elde edilen konjugatın karakterizasyonu FT-IR, DSC, SDS-PAGE, UV ve floresans ile yapılmıştır.

Daha sonra konjugatların distile su içerisinde misel oluşumu sağlanmış ve DLS ölçümleri ile bu misellerin parçacık boyutları belirlenmiştir. Miseller UV ışık altında (350 nm) 1 saat aydınlatılarak tekrar DLS ölçümleri yapılmış ve parçacık boyutlarındaki değişim gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: DNA-polimer konjugatları, Protein-polimer konjugatları, Misel, Işığa Duyarlı Malzemeler, Click Kimyası

LIGHT RESPONSIVE SMART DRUG DELIVERY SYSTEMS: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DNA-POLYMER AND PROTEIN-POLYMER CONJUGATES

SUMMARY

Recently more effective smart drug delivery systems having potential of treating patients with less side effects compared to conventional drugs having been developed because of the increase in need for finding new methods for treating important diseases such as cancer. These systems are designed to be applied only to desired parts without spreading in the whole body by targeting polymeric nanoparticles appropriately to diseased area after loading drugs in them.

Using amphiphilic conjugates self-assembling in suitable solvents in order to synthesize delivery systems for aforementioned purposes enables to obtain such systems easily. Hydrophobic and hydrophilic blocks are joined together for building amphiphilic structures by using different conjugation systems. Amphiphilic structures may be prepared by using only synthetic polymers. On the other hand biomacromolecules are nowadays widely used as hydrophilic blocks for the reason of being biocompatible.

In this study, a hydrophobic copolymer was synthesized via ATRP of a methacrylate monomer containing photoactive coumarin group and a tert-butyl acrylate monomer. Two different biomacromolecules were used as hydrophilic blocks in amphiphilic structures. First, 5'-aminohexyl functionalized oligonucleotide was conjugated to PCMA_tBA polymer via CuAAC click reaction. Obtained OLN-polymer and conjugate was characterized with FT-IR, DLS, UV and fluorescence spectroscopy. BSA protein was used as another hydrophilic block. After conjugation of BSA to hydrophobic polymer via click reaction, characterization of the conjugate was carried out using FT-IR, DSC, SDS-PAGE, UV and fluorescence spectroscopy.

Micelles of the synthesized conjugates were formed in distilled water and particule sizes of the micelles were observed via DLS. DLS measurements were repeated after UV irradiation of BSA-PCMA_tBA micelles at 350 nm for 1 hour. Difference in sizes of irradiated and non-irradiated micelles were compared.

Keywords: DNA-polymer conjugates, Protein-polymer conjugates, Micelle, Light-responsive Materials, ATRP, Click Chemistry

1. GİRİŞ

Günümüzde yeni bir ilaç molekülü geliştirilmesinin yeterli olmaması, ilacın dozaj şeklinin ve ambalajının da önemli olduğunun anlaşılması sonucunda yeni arayışlar kontrollü ve hedefli ilaç salım sistemlerinin keşfini sağlamıştır. Son zamanlarda bu alanda yapılan çalışmaların sayısındaki artıştan da anlaşılacağı üzere giderek önem kazanan kontrollü ve hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin geleneksel ilaçlara kıyasla sahip oldukları en büyük avantajlar; taşıyıcı sistemlerin tedavi edilecek bölgeye uygun olarak hedeflendirilmesi ve ilacın vücut içinde hedeflenen bölge dışında salımının yapılmaması, bu sayede sağlıklı bölgelerde meydana gelebilecek yan etkilerin en düşük seviyeye getirilmesinin amaçlanması, dış uyaranlarla kontrol edilebilmeleri sayesinde sık aralıklarla ilaç alımının önlenmesi, bu sistemlere daha az miktarda ilaç yüklenmesi ile yüksek dozajda toksik etki gösterebilecek ilaçların bu yöntemle ortaya çıkabilecek toksik etkinin minimuma indirilebilmesi veya tamamen ortadan kaldırılabilmesi olarak sayılabilir [1].

Son zamanlarda en çok ilgi çeken ilaç taşıyıcı sistemlerinden biri amfifilik blok kopolimerlerin sulu çözeltilerde kendiliğinden bir araya gelmesiyle (self-assembly) oluşturulan misellerdir. Amfifilik blok kopolimerler, hidrofilik (suyu seven) ve hidrofobik (suyu sevmeyen) monomer ünitelerinden oluşurlar. Bu polimerler sulu çözeltilerde çözündürme kapasitesi yüksek ve dayanıklı küresel miseller oluştururlar [2, 3].

Miseller morfolojik olarak hidrofobik bloklardan meydana gelen çekirdekten (core) ve hidrofilik polimer zincirleriyle dayanıklı hale getirilmiş kabuktan (shell) oluşan küresel partiküllerdir. Küresel misellerin yanı sıra çubuk, vezikül, lamel ve hekzagonal yapıdaki misellerin oluşturulabileceği de bilinmektedir. Misel yapılarının bu denli çeşitlilik göstermesi; blok kopolimerlerin bileşimi, kopolimer konsantrasyonu, kabuk kısmını oluşturan hidrofilik zincirler arasındaki etkileşimler, miselin oluşturulduğu ortam, kullanılan organik çözücünün özellikleri ve blokların çözünürlükleri ile doğrudan alakalıdır [2, 3].

Blok kopolimer misellerin ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmasının başlıca sebepleri: hidrofobik ilaçların fiziksel olarak blok kopolimer misellerin merkezinde (core) tutularak suda çözünürlüklerini aşan konsantrasyonlarda taşınabilmeleri ve genellikle poli(etilen oksit)ten oluşan hidrofilik blokların sulu ortam ile hidrojen bağı yaparak misel merkezinin etrafında sıkı bir kabuk oluşturmalarıdır [2, 3].

Blok kopolimerlerin sadece organik polimerlerden oluştuğu düşünülse de araştırmacılar giderek sentetik materyalleri ve biyomakromolekülleri birleştiren materyallerle ilgilenmektedir. Bu amaçla DNA-polimer ve protein-polimer konjugatları üzerine yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. DNA ve proteinlerin kendilerine has özelliklere sahip olmaları ve canlı ortamla uyumlu olmaları onların taşıyıcı sistemlerde polimer bloğu olarak kullanılmasını avantajlı kılmaktadır. DNA'nın otomatik sentez yöntemleri ile belli nükleotidlere sahip olarak sentezlenebilmesinin mümkün olması, tek sarmal DNA'nın Watson Crick baz eşleştirmesiyle fonksiyonlandırılabilmesi, DNA sekansı ve organik polimerin uygun seçimi ile malzeme özellikleri ve kendi kendine bir araya gelme özellikleri üzerinde kontrolün sağlanması konjugat oluştururken DNA'nın tercih edilme sebeplerinden sayılabilir [4, 5].

Polimer bloklarının proteinlerin sahip oldukları aminoasitlere uygun olarak fonksiyonlandırılabilmesi, bu fonksiyonlandırmanın farklı aminoasitler üzerinden polimer bloklarının taşıdığı fonksiyonel gruplara göre çeşitlendirilebilmesi, proteinlerin vücut içinde immün cevap oluşturmayacak biyolojik makromoleküller olmaları protein-polimer konjugatlarıyla sentezlenecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geniş kullanım alanına sahip olma potansiyeli taşımasındaki önemli etkenlerdendir [6].

Proteinlerin polimerlerle konjugasyonu sonucunda meydana gelen yeni yapının fiziksel ve kimyasal özelliklerinde bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlardan bazıları çözünürlük, stabilite ve *in vitro* aktivitedeki artış toksisite ve immünojenisitedeki azalmadır [6].

Bu çalışmanın amacı, fotoaktif kumarin grubu içeren hidrofobik bir blok kopolimer ile tek zincirli oligonükleotitin ve ayrıca aynı polimerle bovin serum albumin (BSA) proteininin "Click" reaksiyonuyla birleştirilerek iki farklı konjugat sentezlenmesi, bu konjugatlar ile diyaliz membran yöntemi kullanılarak misel oluşturulması ve

oluşturulan bu misellerin UV aydınlatma sonucundaki davranışlarının incelenmesidir.



2. TEORİK BİLGİLER

2.1 Makromolekül Kavramı

1800'lerin sonunda ve 1900'lü yılların başında sıradan organik malzemelerden daha büyük moleküller içeren doğal malzemelerin varlığı birçok bilim adamı tarafından bildirilmiştir. 1900'lü yılların ortalarında ise bu doğal malzemelerin içerdiği moleküllerin birbirlerine temel kimyasal bağlarla bağlı olmasından ziyade ikincil kuvvetler tarafından bir arada tutulduklarına inanılan kolloid kimyası kavramı yaygındı. Birçok bilim adamı kolloid kavramını savunurken Hermann Staudinger adlı organik kimyacı uzun zincirlerin içerdiği moleküllerin birbirlerine kimyasal bağlarla bağlı olduğunu net bir şekilde ortaya koyarak “makromoleküler kavram”ın ortaya çıkışında yol gösterici olmuştur [7].

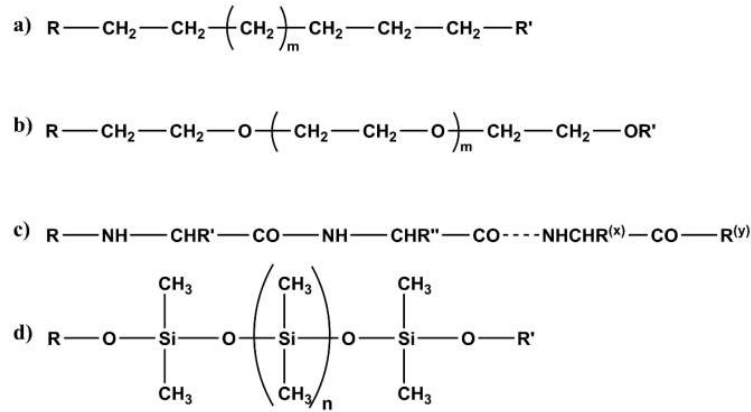
Sonraki yıllarda Carothers ve arkadaşları tarafından kondenzasyon ve katılma reaksiyonları ile polimerizasyon sonucunda uzun zincirli moleküllerin elde edildiği birçok çalışmanın yapılması ile makromoleküler hipotez de kesin olarak doğrulanmıştır [8].

Makromoleküller çok sayıda atomun bir araya gelerek oluşturdukları yüksek molekül ağırlığına sahip kimyasal bileşiklerdir. Makromoleküllerin temel yapısı, atomların bir araya gelerek oluşturduğu en az bir zincirden oluşur ve bu zincir Şekil 2.1'de gösterildiği gibi karbon-karbon, karbon-oksijen, karbon-azot bağları içerebilir veya zincirde hiç karbon atomu bulunmayabilir [9].

Polimerler de monomer birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan makromoleküllerdir. Bu birimler tek bir atomdan ya da birbirlerine kimyasal olarak bağlanmış atom gruplarından oluşabilir. Polimeri oluşturan monomerler aynıysa oluşan polimere homopolimer, farklı monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan polimerlere ise kopolimer denir [9].

Polimerlerin molekül ağırlıkları net olarak hesaplanamamakla birlikte molekül ağırlıkları 1.000-20.000 arasında olan polimerler düşük molekül ağırlıklı, 20.000'den büyük olanlar ise yüksek molekül ağırlıklı polimerler olarak adlandırılır [10].

Polimerler sahip oldukları başka özelliklere göre de sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.1 : a) Karbon-karbon bağları içeren poli(metilen), b) karbon-oksijen bağları içeren poli(etilen oksit) veya poli(oksietilen), c) karbon-azot bağları içeren polipeptidler ve d) ana zincirde hiç karbon atomu bulunmayan silikon

2.2 Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerlerin sınıflandırılmasında kullanılan temel özellikler aşağıda verilen Tablo 2.1'de gösterildiği şekildedir [10].

Tablo 2.1 : Polimerlerin sınıflandırılması.

Sınıflandırma	Polimer Türleri
Isıya verdikleri cevap	Termoplastik, termoset
Sentezlenme yöntemi	Katılma, kondenzasyon
Yapı	Lineer, dallanmış, çapraz bağlı
Fiziksel özellik	Kauçuk, plastik, elyaf
Taktisite	İzotaktik, sindiyotaktik, ataktik
Kristallik	Amorf, yarı-kristal, kristal
Doğada bulunup bulunmama	Doğal, yarı sentetik, sentetik

Polimerler; farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu çalışma ile yakından alakalı olduğu için yalnızca polimerlerin kökenine göre sınıflandırılmasından detaylı olarak bahsedilecektir.

2.2.1 Doğada bulunup bulunmamalarına göre polimerler

Özellikle medikal amaçlarla kullanılacak olan polimerlerin biyolojik sistemlerdeki etkisinin çok az olması önemlidir. Bu sebeple ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılacak polimerlerin biyobozunur olması ve canlı ortamda toksik etki göstermemesi gerekir.

Birçok farklı alanda kullanılmakta olan bu polimerler kökenlerine göre sentetik, yarı sentetik ve doğal polimerler olarak sınıflandırılmaktadır.

2.2.1.1 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, monomer birimlerinin farklı kimyasal yöntemlerle bir araya getirilerek yapay olarak sentezlenmesiyle elde edilir. Endüstride yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlere örnek olarak polietilen, polistiren, polivinilklorür verilebilir [10].

Tıp alanında kullanılan birçok sentetik polimer de bulunmaktadır. Örneğin; Dacron ve Teflon kardiyovasküler sistemlerde, polietilen, polipropilen ve poli(metil metakrilat) ortopedi alanında, poliakrilonitril ise yapay organlarda kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra günümüzde çalışma alanı genişleyen ilaç taşıma sistemlerinde de çok çeşitli sentetik polimerler kullanılmaktadır [11].

2.2.1.2 Yarı sentetik polimerler

Yarı sentetik polimerler doğal polimerlerin modifiye edilmesiyle elde edilmektedir. Doğada bozunan veya bozunmayan türleri bulunur. Etil selüloz, hidroksipropilmetil selüloz, metakrilik asit türevleri en çok kullanılan yarı sentetik polimerlere örnek olarak gösterilebilir [12].

2.2.1.3 Doğal polimerler

Doğal polimerler bir diğer adıyla biyopolimerler, canlı organizmalarda halihazırda bulunur veya bu organizmalar tarafından sentezlenirler. Bu polimerlerin, özellikle canlı ortamlarda kullanıldıklarında, sentetik polimerlere kıyasla önemli avantajları vardır. İlk olarak, biyoyumlu oldukları için vücut tarafından tehlike olarak algılanmazlar ve dolayısıyla vücudun yabancı maddelere karşı oluşturduğu immün cevap biyopolimerler için oluşturulmaz. İkincisi bu polimerlerin büyük bir kısmı hidrofilik ve suda çözünür oldukları için vücut sıvısı içinde rahatlıkla dolaşabilirler. Bu da özellikle hedefli ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmaları açısından çok yararlı bir özelliktir [13].

Doğal polimerlerin en bilinen örnekleri nişasta, kitin, kolajen, selüloz, lignin, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerdir. Nükleik asitler, nükleotit monomerlerinin bir araya gelerek oluşturdukları polimerlerdir. Nükleik asitler içerdikleri şekerin türüne göre

ikiye ayrılır. Birincisi riboz şekeri içeren RNA, diğeri ise yapısında deoksiriboz şekeri bulunduran DNA'dır [12].

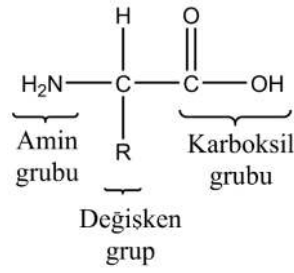
DNA ve RNA

DNA'nın kendine has özelliklerinin olması, yaşamın devamlılığı için gerekliliğinin yanında onu farklı alanlarda kullanılmaya da elverişli kılmaktadır. Bu eşsiz özelliklerden en önemlisi DNA'nın çift sarmallı yapısında yer alan bazlar arasındaki spesifik ve stabil etkileşimdir. DNA molekülünde yalnızca dört çeşit baz bulunması ve bu bazların birbirlerine Watson-Crick baz eşlenmesi ile seçici olarak bağlanması DNA'yı kolayca programlanabilir hale getirmektedir ki bu da kontrollü sistemlerin tasarlanmasına olanak verir. DNA'nın hidrofilik bir polimer olması da, çeşitli amaçlarla biyolojik ortamlarda kullanılması durumunda vücut içerisinde kolaylıkla taşınması bakımından büyük avantaj sağlamaktadır [14].

DNA ve RNA molekülleri hücre içinde özel enzimlerin kullanılmasıyla sentezlenmektedir. DNA ve RNA polimeraz enzimleri olarak adlandırılan bu enzimler nükleotid monomerlerini bir araya getirerek uzun DNA ve RNA moleküllerini sentezlerler. 1970'li yıllarda katı faz sentezi yöntemi keşfedilmiş ve bu yöntemin kullanılmasıyla yaklaşık 100 nükleotid uzunluğundaki zincirlerin sentezlenmesi mümkün hale gelmiştir. Yapay olarak sentezlenen bu kısa DNA veya RNA zincirleri oligonükleotit olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca bu yöntemle sentezlenen oligonükleotitler fonksiyonlandırılabilir. Bu özellikleri sayesinde oligonükleotitlerin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılması bu sistemlerin hedef bölgeye uygun olarak fonksiyonlandırılarak ilacın kontrollü olarak salınma şansını artırmaktadır [15].

Proteinler

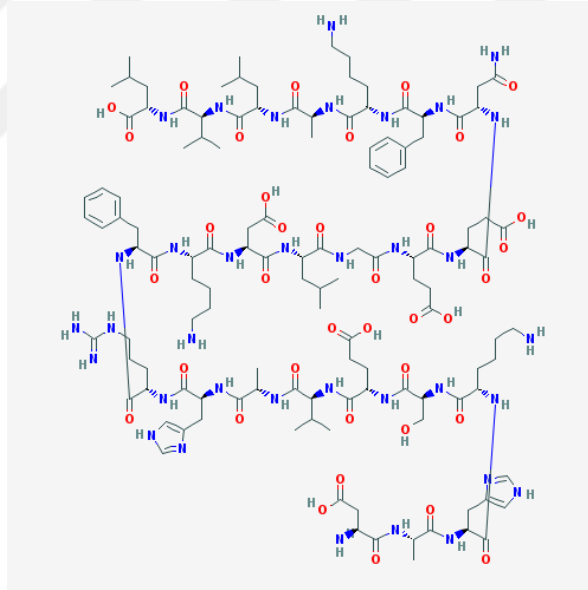
Proteinler aminoasit monomerlerinin kovalent bağlarla birbirlerine bağlanmasıyla meydana gelen polimerlerdir. 20 çeşit aminoasitin farklı dizilimlerle bir araya gelmesiyle farklı proteinler oluşmaktadır. Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitlerin genel yapısı Şekil 2.2'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.2 : Aminoasit yapısı.

İnsan serumunda en fazla bulunan protein olan albumin 60 kDa moleküler ağırlığına sahip bir glukoprotein olup özellikle ilaç taşıyıcı sistem oluşturmak için sentezlenen konjugatlarda kullanılmak için çok elverişlidir. Bunun nedeni albuminin toksik olmaması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması, düşük immunojenisite göstermesi ve aynı zamanda kan plazmasında çeşitli maddeleri taşımak için kullanılabilmesidir.

Albuminin insan serum albumini (Şekil 2.3) ve bovin serum albumin (BSA) olmak üzere iki türü üzerinde en fazla çalışma yapılan protein türleridir [16].



Şekil 2.3 : Serum albumin yapısı.

2.3 Polimerizasyon Türleri

Polimerizasyon çeşitleri genel olarak iki başlık altında toplanabilir. Bunlardan birincisi kondenzasyon polimerizasyonu olarak da adlandırılan basamaklı polimerizasyon, diğeri ise katılma bir diğeri adıyla zincir polimerizasyonudur. Katılma polimerizasyonu kendi içinde de gruplara ayrılır. Bu gruplar; serbest radikal

polimerizasyonu ve iyonik polimerizasyondur. İyonik polimerizasyonlar da anyonik ve katyonik polimerizasyon türlerini içermektedir [10].

Kondenzasyon polimerizasyonlarına polimerlerin molekül ağırlıkları kademeli olarak artarken, katılma polimerizasyonlarında ise molekül ağırlıkları eş zamanlı olarak artmaktadır [17].

Polimerizasyon reaksiyonlarının kontrollü olması istenilen yapıda ve özelliklerde polimerler elde edebilmek açısından önemlidir. Bu amaçla kullanılan başlıca kontrollü polimerizasyon çeşitleri; Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP), Nitroksi Ortamlı Polimerizasyon (NOP) ve Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer Polimerizasyonu (RAFT) olmak üzere üç başlıkta incelenmektedir.

2.3.1 Kondenzasyon polimerizasyonu

-OH, -COOH, -NH₂ vb. fonksiyonel gruplara sahip olan monomerlerin uygun koşullar altında bir araya gelmesi ile gerçekleşen polimerizasyonlardır. Diğer polimerizasyon türlerine kıyasla daha yavaş meydana gelirler.

Kondenzasyon polimerizasyonlarının gerçekleşebilmesi için monomerlerin birden fazla fonksiyonel gruba sahip olması gerekir. Tek fonksiyonel gruplu iki farklı monomer kullanılarak veya farklı iki fonksiyonel gruba sahip tek bir monomerle de bu polimerizasyon gerçekleşir. Reaksiyon sırasında H₂O, HCl, NH₃ gibi yan ürünler açığa çıkar [17].

2.3.2 Katılma polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonları üç aşamadan oluşur. Bunlar başlama, çoğalma ve sonlanma basamaklarıdır. Başlama basamağında başlangıç radikali oluşturulur ve bu radikal monomer moleküllerine eklenir. Çoğalma aşamasında, monomer radikali başka bir monomer molekülüne bağlanarak zincir uzatılır. Sonlanma basamağında da aktif olan monomer uçlarının pasif hale gelmesiyle reaksiyon durdurulmuş olur ve polimerizasyon reaksiyonu tamamlanır. Aktif monomerler, iki radikalin “coupling” reaksiyonuyla bir araya gelmesiyle pasif duruma geçer [17].

2.3.3 Kontrollü polimerizasyonlar

2.3.3.1 Nitroksi ortamlı polimerizasyon (NOP)

Nitroksi Ortamlı Polimerizasyon reaksiyonlarında büyüyen polimer zincirinin bir nitroksi radikali ile kapatılması ve tekrar açılması ile kontrol sağlanır ve bu şekilde istenilen özelliklere sahip polimerler elde edilir [18].

2.3.3.2 Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)

Bir diğer kontrollü polimerizasyon türü olan Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer Polimerizasyonu (RAFT) ile de belirli zincir transfer ajanları kullanılarak polimerizasyon reaksiyonlarının kontrolü sağlanır. Bu reaksiyonlar sırasında, bir zincir transfer ajanı büyümekte olan polimer zinciri ile etkileşime girerek yeni bir zincir transfer ajanı ve bir serbest radikal meydana gelmesini sağlar. Bu şekilde kontrol sağlanarak her polimer zincirinin neredeyse eşit miktarda büyümesi sağlanır. Dolayısıyla düşük polidispersite (PDI) değerleri elde edilir. Ayrıca RAFT polimerizasyonunda metal kullanılmaması da bu yöntemin en büyük avantajlarından biridir. Bu sayede polimerizasyon sonunda metali uzaklaştırmak için yapılması gereken uzun saflaştırma tekniklerine gerek kalmamaktadır [6].

2.3.3.3 Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)

Kontrollü polimerizasyon türlerinin en yaygın olarak kullanılanı Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) olup bu polimerizasyonda katalizör olarak bakır, demir, nikel vb. bazlı metal kompleksleri kullanılır. Halojen içeren başlatıcılarla metal/ligand kompleksleri arasında meydana gelen halojen transferi sonucu aktif polimer radikali oluşturularak zincire sürekli monomer eklenmesiyle polimerizasyon kontrollü bir şekilde ilerler. Reaksiyonun deaktivasyon sabiti, aktivasyon sabitine göre daha büyük olduğu için monomerlerin polimer radikallerine eklenmesinin ardından aktif olan bu radikaller pasif hallerine geri döner. Ortamda bulunan bütün monomerlerin tükenmesiyle polimerizasyon reaksiyonu sonlanır [18].

ATRP'nin diğer polimerizasyon çeşitlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. ATRP ile sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıklarının ve polidispersitelerinin kontrol edilebilmesi ve fonksiyonlandırılabilmesi bu avantajlar arasında sayılabilir. Ayrıca, ATRP'nin farklı çözücülerle ve farklı şartlar altında gerçekleştirilebilmesi de bu polimerizasyonu tercih edilebilir yapan

özelliklerindendir. Bir diğer avantaj ise ATRP başlatıcılarının proteinlere, organik ve inorganik maddelere bağlanarak, polimerizasyonun doğrudan bu yüzeyler üzerinden yapılabilmesidir. Peptid dizilerinin ve streptavidin, bovin serum albumin (BSA) gibi proteinlerin başlatıcı olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle ATRP ile protein-polimer konjugatlarının sentezlenebiliyor olması bu polimerizasyon türünün bir diğer avantajıdır [18].

ATRP'nin en büyük dezavantajı, polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan ve kullanılan metallerin polimerizasyon sonunda ortamdan uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyulmasıdır [18].

2.4 Makromoleküllerin Fonksiyonlandırılması

İlaç taşıyıcı sistemlerin sentezi için gerekli olan konjugat yapılarında kullanılan makromoleküllerin, polimerlerle konjuge edilmeye hazır hale getirilmeleri için çeşitli fonksiyonlandırmaların yapılması gerekmektedir. Bu fonksiyonlandırma işlemi polimerle molekül arasında spesifik bir etkileşim oluşturulacak ve tercih edilen konjugasyon reaksiyonunun gerekliliklerini sağlayacak şekilde yapılır. Örneğin; bir DNA-polimer veya protein-polimer konjugatı sentezlenirken, oligonükleotitler veya proteinler amino, tiyol veya azit grupları ile fonksiyonlandırılarak bunlarla reaksiyon verebilecek uç gruplara sahip polimerlerle konjuge edilirler [5, 19].

Bu konjugatları sentezlemek için çeşitli 'coupling' reaksiyonları kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan konjugasyon reaksiyonu olan "Click" kimyasıdır.

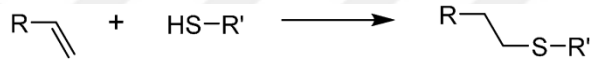
2.4.1 "Click" Kimyası

"Click" kimyası, 2001 yılında K. B. Sharpless ve arkadaşları tarafından tanımlanmış bir 'coupling' reaksiyonudur. Bu reaksiyonun diğerlerine göre avantajları daha fazladır. Oda sıcaklığında yapılması, yüksek verimle çalışması, stereospesifik olması, reaksiyon koşullarının basit olması, reaksiyon sonucu oluşan yan ürünlerin uzaklaştırılması için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi zor tekniklere ihtiyaç duyulmaması, elde edilen ürünün fizyolojik olarak stabil olması, çözücü olmadan yapılabilmesi veya kolay uzaklaştırılabilen çözücüler kullanılabilmesi, kolay ulaşılabilir başlangıç malzemelerinin kullanılması "Click" reaksiyonunun avantajları arasında sayılmaktadır [20].

Farklı türlerde “Click” reaksiyonları kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları, Diels-Alder siklokatılması, tiyol-en “Click” reaksiyonu ve en yaygın olarak kullanılan Huisgen siklokatılmasıdır [20].

Diels-Alder reaksiyonu konjuge bir dien ile bir dienofil arasında gerçekleşen bir siklokatılma reaksiyonudur. Reaksiyonun sonucunda yan ürün oluşmaması, reaktanların çözücülerden etkilenmemesi, katalizör kullanma gerekliliğinin olmaması ve suda çok hızlı gerçekleşen bir reaksiyon olması bu reaksiyonun avantajlarından. Tersinir olması ve yer seçimli bir reaksiyon olmaması ise Diels-Alder reaksiyonunun dezavantajları olarak gösterilebilir [20].

Tiyol-en reaksiyonunda (Şekil 2.4), tiyol grupları ile karbon-karbon çiftli bağları arasında reaksiyon olması sonucu konjugasyon gerçekleşir. Tiyoller fotokimyasal veya termal olarak uyarılabilen kimyasal ajanlardır [20].



Şekil 2.4 : Tiyol-en “Click” reaksiyonu.

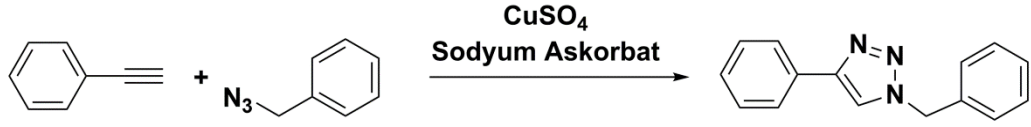
Çözücü ve ağır metaller kullanılmadan gerçekleştirildikleri için bu reaksiyonlar sıklıkla kullanılmaktadır. Tiyol-en reaksiyonunun mekanizması başlama, büyüme ve sonlanma basamaklarını içerir. Başlama basamağında tiyol grubu bir başlatıcıyla etkileşime girer ve radikal oluşur. Büyüme aşamasında, oluşan radikal karbon-karbon çiftli bağlarına eklenir ve yeni bir radikal meydana gelir. Sonlanma basamağında ise radikaller arasında birleşme reaksiyonu gerçekleşir [21].

Bir diğer “Click” reaksiyonu olan Huisgen siklokatılması reaksiyonu bir sonraki başlıkta anlatılacaktır.

2.4.1.1 Huisgen siklokatılması

Huisgen siklokatılması bir diğer adıyla 1,3 dipolar Huisgen siklokatılması, alkinlere 1,3 dipollerinin eklenmesi sonucu 5-üyel heterosiklik halkaların meydana gelme reaksiyonudur. Bu reaksiyonlar katalizörsüz veya bakır katalizörlü olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bakır katalizörlü azit-alkin siklokatılması (CuAAC) en yaygın olarak kullanılan “Click” reaksiyonudur (Şekil 2.5). Bunun sebebi reaksiyonun oda sıcaklığında, yüksek verimle ve makul koşullarda gerçekleştirilebilmesidir. CuAAC siklokatılma reaksiyonlarında alkin molekülü

taşıyan grup ile azit molekülü bağlı olan diğer grup, bakır katalizörlüğünde birbirine bağlanır [22, 23].



Şekil 2.5 : Bakır katalizörlü 1,3-dipolar Huisgen siklokatılma reaksiyonu.

Meydana gelen triazol halkasının yüksek kimyasal stabiliteye sahip olması ve hidrojen bağı kabul edebilir olması bu yapının biyolojik moleküller, organik ve inorganik yüzeyler ve malzemeler ile etkin bir şekilde etkileşime girebilmesine olanak sağlamaktadır [24].

CuAAC siklokatılma reaksiyonunda çeşitli katalizörler ve ligandlar kullanılmaktadır. Bakır, metal veya tuz formunda yani iyonik ya da kompleks olarak CuAAC reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bakır halojenür ve bakır sülfat sık kullanılan bakır katalizör çeşitlerindendir [25].

Bakır iyodür ve bakır bromür, bakır halojenür katalizörlerinden olup Cu(I)'in Cu(II) tuzlarıyla, diğer metal kompleksleriyle ya da iyonik sıvılarla bir araya gelmesiyle de etkili katalizör sistemleri oluşturulabilmektedir [25].

Bakır sülfat katalizörleri iki şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan birinde bakır sülfat sodyum askorbatla (NaAsc) birlikte kullanılırken diğerinde ise Cu(0) ile kullanılır. Bakır sülfat katalizörü kullanılarak birçok başarılı “Click” reaksiyonu yapılmıştır. Bunlardan biri Sharpless ve arkadaşlarının CuSO₄-NaAsc katalizör sistemi kullanılarak suda ve oda sıcaklığında gerçekleştirdiği “Click” reaksiyonudur [25].

Reaksiyon sonunda bakırı uzaklaştırmak için saflaştırma yapılmasının gerekiyor olması CuAAC reaksiyonunun en büyük dezavantajıdır. Bu sebeple özellikle biyolojik çalışmalarda foto-“Click” reaksiyonları tercih edilebilmektedir. Bu reaksiyonlarda herhangi bir metal katalizörü kullanılmadığı için daha az toksik özellik gösterirler. Foto-“Click” siklokatılma reaksiyonlarında ışık, reaktif oluşturmak için kullanılır ve daha sonra meydana gelen bu reaktifler biyolojik sistemde mevcut olan gruplarla etkileşime girerler [26].

“Click” reaksiyonları ile organik sentez, dendrimerlerin elde edilmesi ve fonksiyonlandırılması, çapraz bağlanma, yıldız ve graft polimerlerinin eldesi,

polimerlerin fonksiyonlandırılması, protein, oligonükleotit gibi biyolojik gruplar ile polimerlerin konjuge edilmesi gibi birçok uygulama yapılabilmektedir [24].

2.5 Polimer-Biyomakromolekül Konjugatları

Protein, peptid, nükleik asit gibi yapısal bileşenlerin sentetik polimerlerle bir araya getirilmesiyle oluşturulan konjugat yapılarının daha gelişmiş özellikler sergiledikleri ve ilaç, nanoteknoloji, biyoteknoloji, tıp gibi önemli alanlarda gün geçtikçe daha geniş kullanım alanı bulabilecekleri son zamanda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Polimerlerin ve biyomakromoleküllerin sentezlenen konjugat yapılarında hem kendilerine has özelliklerini sergileyebilmeleri hem de konjugasyon sayesinde kazandıkları özelliklerle farklı işlevler gösterebilmeleri bu sistemlerin en önemli avantajıdır [19].

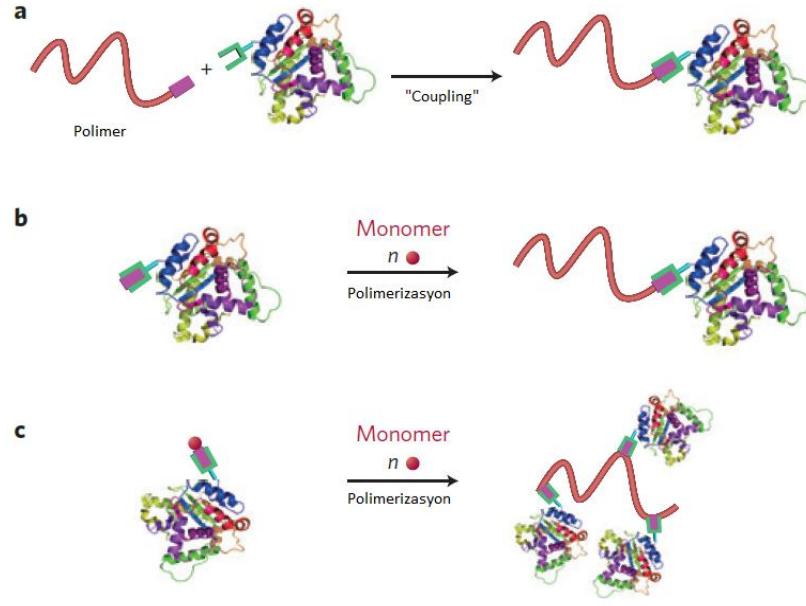
Bu konjugatların sentezlemek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar Şekil 2.6'da gösterildiği gibi *grafting to*, *grafting from* ve *grafting through* olmak üzere üç başlık altında toplanabilir [19].

Grafting to yöntemi en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde daha önceden sentezlenmiş fonksiyonel bir uç gruba sahip polimer ile biyomakromolekül üzerinde bulunan tamamlayıcı fonksiyonel grup uygun reaksiyon koşulları altında bağlanarak konjugat elde edilir [27].

Grafting from yönteminde biyomakromolekül üzerinde bulunan ve radikal oluşturabilen başlatıcı veya zincir transfer ajanı gibi belli bölgeler üzerinden polimerizasyon gerçekleştirilir [27].

Grafting through yöntemiyle ise üzerinde bulunan polimerleşmeye yatkın gruplar sayesinde bir monomer gibi davranan biyomakromolekül farklı türde monomerlerle polimerleşerek konjugat oluşturabilir [27].

Bu yöntemler kullanılarak DNA-polimer ve protein-polimer konjugatları sentezlenebilmektedir.



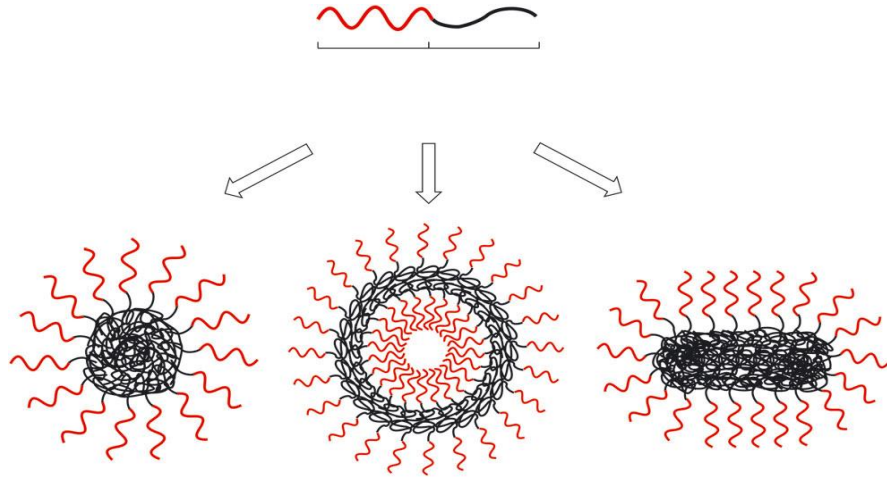
Şekil 2.6 : Polimer biyokonjugatlarının a) grafting to b) grafting from ve c) grafting through yöntemleriyle sentezi [19].

2.5.1 DNA-Polimer Konjugatları

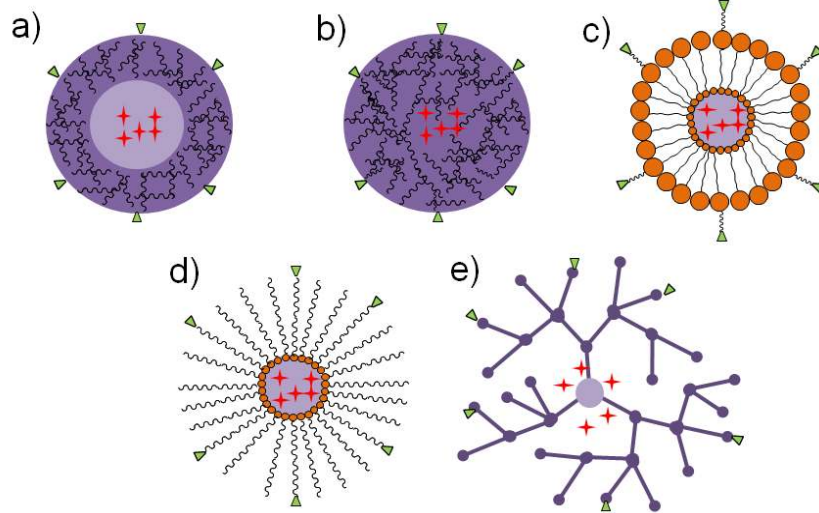
DNA-polimer hibrit malzemelerine ilişkin ilk çalışma 1980'lerin sonunda ortaya konmuştur [5]. Bu çalışmadan sonra DNA-polimer konjugat yapılarının ilaç veya gen taşıma amacıyla kullanılabileceğine yönelik farkındalığın artması, bu sistemlerle ilgili yapılan çalışmaların artmasına yol açmıştır.

DNA-polimer konjugatlarının sentezlenmesinde çeşitli parametreler göz önünde bulundurulur. Bu parametrelerden biri uygun polimerin seçilmesidir. Polimerlerin özellikleri istenildiği gibi ayarlanılarak sentezlenen konjugat sistemlerinin kontrol edilmesi mümkündür. Örneğin, seçilen polimerin hidrofobik olması ve hidrofilik olan oligonükleotit ile konjuge edilmesi sonucu amfifilik olarak adlandırılan yapılar elde edilir ve bu yapıların uygun çözücüler içinde kendiliğinden birleşme özelliğine sahip olması bu yapılar ile kolaylıkla nanoparçacık sentezlenmesine olanak sağlar. Elde edilen nanoparçacık, hidrofobik bir çekirdeğe ve hidrofilik bir koronaya sahip olup nanoparçacığın bu doğası, hidrofobik ilaç yüklenerek etkili ilaç taşıma sistemleri elde etmek için de kullanılabilmektedir [5].

Amfifilik DNA-polimer konjugatlarıyla çeşitli yapılar elde edilebilir. Bu yapılardan bazıları Şekil 2.7 ve 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 : DNA-polimer konjugatlarının kendiliğinden birleşme özellikleriyle oluşturduğu misel, vezikül ve tüp yapıları [4].



Şekil 2.8 : DNA-polimer konjugatlarının kendiliğinden birleşme özellikleriyle oluşturduğu a) nanokapsül, b) nanoküre, c) lipozom, d) polimerik misel ve e) dendrimer yapıları [28].

2.5.1.1 DNA-polimer konjugatlarının sentezi

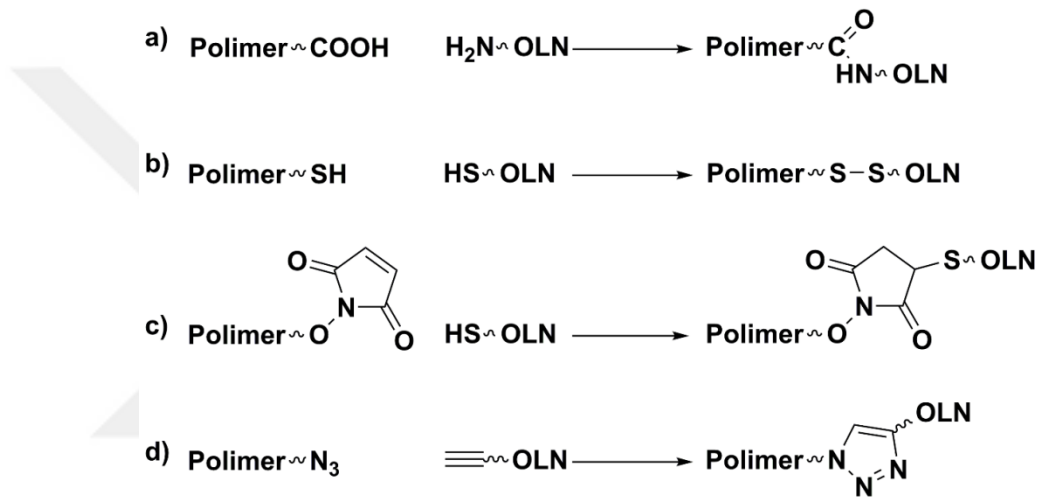
Konjugat sentezi katı fazda veya sıvı fazda gerçekleştirilebilir. Katı fazda DNA zinciri bir desteğe bağlıdır. Katı fazda konjugat sentezlenirken iki farklı yol izlenebilir. Bunlardan biri DNA zincirine polimerin eklenmesi diğeri ise DNA zincirine takılmış bir başlatıcı molekül üzerinden polimerizasyonun gerçekleştirilmesidir.

Konjugat sentezinde kullanılan en yaygın yöntem, DNA ve polimerin ayrı ayrı sentezlenip daha sonra çözelti fazında konjugasyonlarını sağlamaktır. Polimer; Halka

Açılma Polimerizasyonu (ROP), Atom Transfer Radikal Polimerizasyon (ATRP) gibi çeşitli yöntemlerle lineer ya da dallanmış olarak sentezlenebilir.

DNA ve polimer sentezlendikten sonra, konjugat oluşturmak için birçok kimyasal konjugasyon reaksiyonu kullanılarak ikisinin birleşmesi sağlanabilir. Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için iki önemli koşul vardır. Bunlar; reaksiyonların DNA'nın çözünmesi için gerekli olan polar çözücü ile uyumlu olması ve DNA'ya ya da polimere zarar verecek reaktiflerin kullanılmamasıdır [29].

Çözelti fazında konjugasyon için Şekil 2.9'da gösterildiği gibi dört temel yöntem vardır.



Şekil 2.9 : DNA-polimer konjugatı sentez yöntemleri: a) amid bağı oluşumuyla konjugasyon b) disülfid bağıyla bağlanma c) Michael katılması ve d) azit-alkin Huisgen siklokatılması.

Amid bağı oluşumuyla konjugasyon yönteminde; bileşenler bir peptit bağıyla bağlanır. Oligonükleotitlere bağlı amino gruplar, polimerin aktive edilmiş karboksil gruplarıyla reaksiyona girer.

Disülfid bağıyla bağlanma yönteminde ise her iki birimin de sülfidril (kovalent olarak birbirine bağlanmış S ve H atomları) gruplarıyla modifiye edilerek, ikisinden birinin aktive edilmesi gerekmektedir.

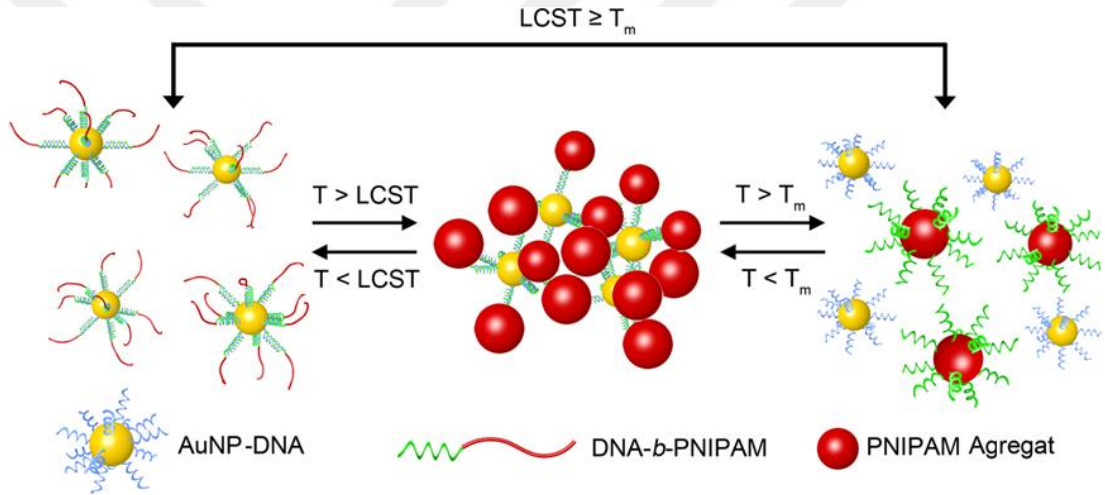
Michael katılması reaksiyonunda, oligonükleotitlere tiyol modifikasyonu da yapılması gerekir. Bağlanma, bir elektron eksik karbon atomuna tiyol grubunun eklenmesiyle gerçekleşir.

Azit-alkin siklokatılma reaksiyonu ile azitle sonlandırılmış polimer zinciri ile alkin fonksiyonlu oligonükleotitin uygun ortamda konjugasyonu gerçekleştirilir.

2.5.1.2 DNA-polimer konjugatlarının dış uyaranlara bağıl şekil değıştirme davranışları

DNA-polimer konjugatları hazırlanırken hidrofilik olan oligonükleotit bloğuna hidrofobik bir polimer bloğunun eklenmesiyle oluşan amfifilik yapısı sayesinde elde edilen nanoparçacıklar çeşitli çevresel faktörlerle şekil değıştirebilme özelliklerine sahiptirler. Sahip oldukları bu amfifilik yapı, konjugatların bir araya gelme ve dağılma davranışlarının kontrol edilebilmesine imkan sağlar. Bu yapı ve şekil değışikliklerine neden olabilen çevresel uyaranlardan bazıları; sıcaklık, enzim, pH ve polaritedir.

Sıcaklığa bağıl şekil değıştirmeye Kim ve arkadaşlarının yaptığı Şekil 2.10'da şematize edilen çalışma örnek gösterilebilir [30].



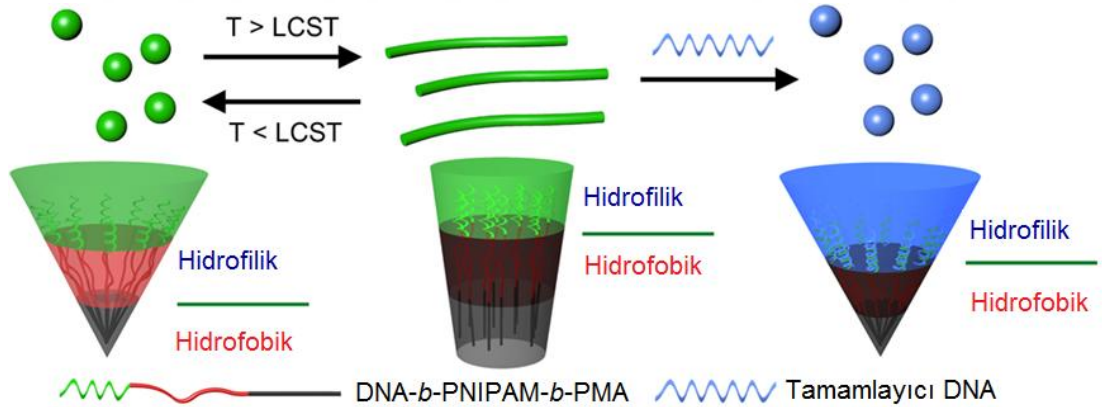
Şekil 2.10 : Altın nanoparçacıkla birleştirilmiş oligonükleotitler kullanılarak sentezlenen DNA-polimer konjugatının ısıya bağıl şekil değıştirme davranışını [30]. Bu çalışmada altın nanoparçacıkların (AuNP) çekirdek, oligonükleotit zincirlerinin köprü, poli(*N*-izopropilakrilamit) (PNIPAM) polimerinin koronayı oluşturduğu ısıya duyarlı bir parçacık sentezlenmiştir. DNA ve PNIPAM'in sıcaklıkla uyarılarak yapısal değışikliğe uğrayabilmesi ile üç boyutlu yapının kontrol edilebildiğı gösterilmiştir.

PNIPAM sıcaklığının düşük kritik çözelti sıcaklığının (LCST) üzerine çıkarılmasıyla PNIPAM koronası hidrofilik durumdan hidrofobik duruma geçer ve AuNP/DNA/PNIPAM parçacıkları, büyük bir nanoparçacık ve polimer ağı oluşturacak şekilde toplanırlar. Sıcaklıkla uyarılmış birleşme tersinirdir ve nanoparçacık/polimer agregatları sıcaklığı LCST'nin altına düşürerek dağıtılabılır.

Sıcaklığın DNA erime sıcaklığının üzerine çıkarılmasıyla da bu agregatlar DNA-modifiyeli nanoparçacıklar ve polimer miselleri olarak tekrar dağılır [30].

Aynı grubun gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise DNA-PNIPAM diblok kopolimerine poli(metil akrilat) hidrofobik bloğunun bağlanmasıyla DNA-b-PNIPAM-b-PMA triblok kopolimeri sentezlenmiştir [30]. Elde edilen bu konjugatın şekil değişimi, hem DNA-b-PNIPAM-b-PMA triblok kopolimerinin sıcaklığını değiştirerek hem de triblok kopolimere tamamlayıcı zincir eklenerek yapılmıştır (Şekil 2.11). Oda sıcaklığında, PNIPAM'in merkez bloğu hidrofiliktir ve hidrofilik bloğun (DNA ve PNIPAM) hacmi hidrofobik bloğun (PMA) hacminden büyük ölçüde fazladır. Bu nedenle oda sıcaklığında küçük miseller oluşmaktadır. Sıcaklık LCST'nin üzerine çıkarıldığında, PNIPAM hidrofobik hale geldikçe hidrofobik kısmın hacim oranı artmaktadır. Bu hidrofobikliğe bağlı hacim değişikliği silindirik miseller ya da veziküller gibi grupların oluşmasına yol açan morfoloji değişikliklerinin olmasına yol açmıştır.

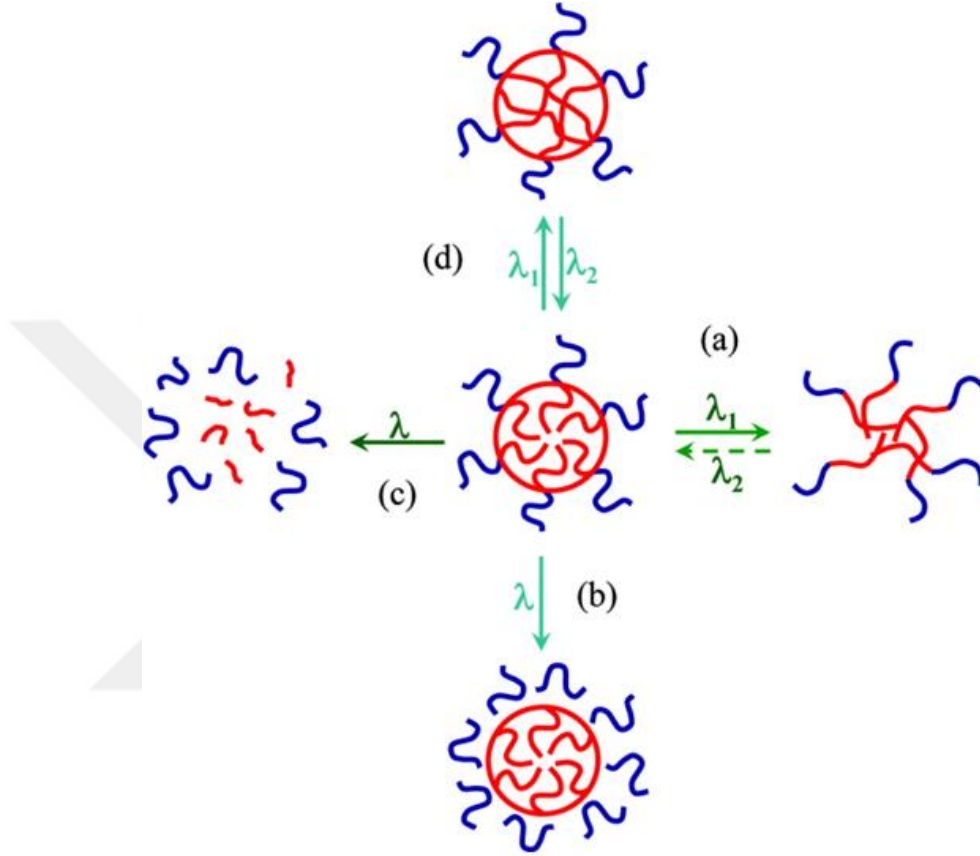
Şekil değişimi, triblok kopolimere tamamlayıcı DNA zincirinin eklenmesiyle de gözlemlenmiştir. Tamamlayıcı zincirin eklenmesiyle hidrofilik kısmın hacmi artmış ve bu da morfolojik yapının silindirden misele geçişini sağlamıştır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 : DNA-b-PNIPAM-b-PMA misellerinin sıcaklık değişimine ve tamamlayıcı DNA zinciri ile hibridizasyonuna bağlı olarak morfoloji değişimleri [30].

DNA-polimer konjugatlarının şekil değiştirmesine yol açan bir başka dış uyaran ışıktır. Şekil 2.12’de de DNA-polimer konjugatları ile elde edilen misellerin farklı dalga boylarında ışığa maruz kalmaya bağlı olarak gösterebilecekleri yapısal değişiklikler özetlenmiştir. Misel içindeki fotokimyasal reaksiyonun hidrofobik bloğun polaritesini artırması sonucu miselde dağılma meydana gelebilmektedir (a).

Fotoreaksiyon ile hidrofilik ve hidrofobik bloklar arasındaki bağlantı kesilerek misel yapısı bozulabilmektedir (b). Hidrofobik blok çevresinde ışıkla ayrılabilir birimlerin bulunması, ışıkla uyarılmış degradasyonun meydana gelmesine yol açmaktadır (c). Işığa bağlı tersinir çapraz bağlanma reaksiyonları da morfoloji değişikliği için alternatif bir yol olarak kullanılabilmektedir (d) [28].



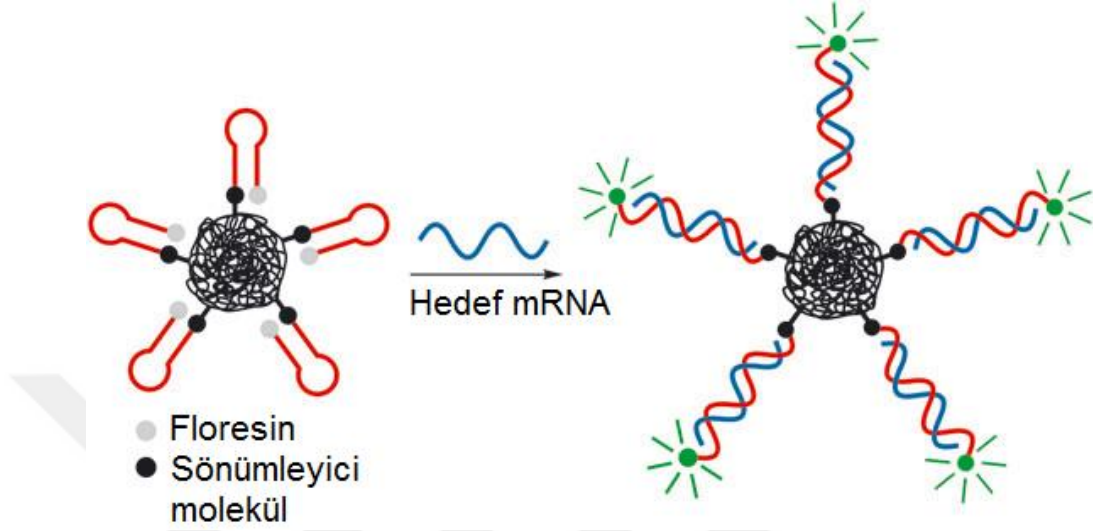
Şekil 2.12 : DNA-polimer konjugatları ile elde edilen ışığa duyarlı misellerin şekil değiştirme davranışları [28].

2.5.1.3 DNA-polimer konjugatları ile oluşturulan nanaoparçacıkların kullanım alanları

DNA-polimer konjugatları, hücresel görüntüleme ve ilaç taşıma gibi alanlarda kullanılabilmektedir.

Fotoaktif bir molekül içeren nanoparçacıklar hedefe bağlandıklarında bu molekülün sinyal verme özelliği sayesinde görüntüleme alanında kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Şekil 2.13'te bir mRNA dizisini hedef alarak bağlanma sonucunda sinyal vermek üzere fonksiyonlandırılmış DNA-polimer konjugatının çalışma mekanizması gösterilmektedir. Tan ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada bir ucunda floresans özellik gösteren bir molekül diğer ucunda ise sönmüleyici molekül taşıyan ve

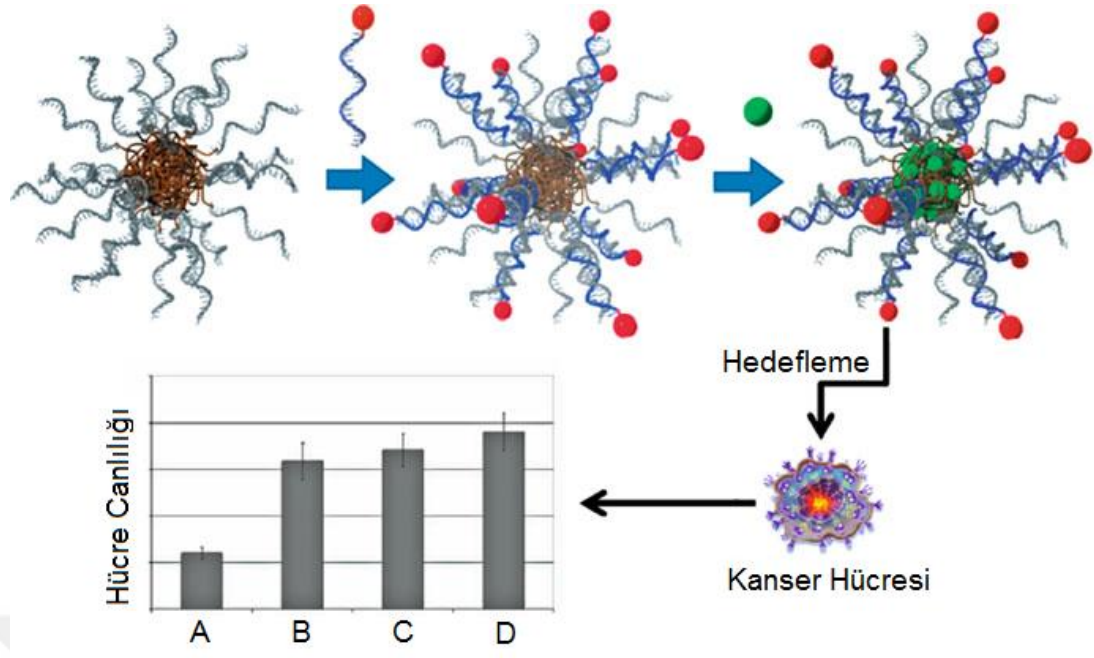
“hairpin” yapısına sahip DNA zinciri içeren konjugat sentezlenmiştir [4]. Bu konjugat DNA zincirinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA zincirine bağlandığında DNA zincirinin hairpin yapısı açılarak sönmüleyici molekül floresin molekülünden uzaklaşmış ve böylece sinyal oluşturulmuştur.



Şekil 2.13 : DNA-polimer konjugatı ile mRNA tespiti [4].

DNA-polimer konjugatları ile ilaç taşıma konjugatların en önemli kullanım alanı olarak sayılabilir. Özellikle amfifilik olarak tasarlanan konjugatlarla oluşturulan nanoparçacıklar ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere çok elverişli yapılardır. Genellikle hidrofobik doğaya sahip olan kanser ilaçları, nanoparçacıkların hidrofobik çekirdeğine hapsedilerek, bu nanoparçacığın hidrofilik koronası sayesinde de herhangi bir immün tepki görmeden canlı ortamda taşınabilmektedir [29].

Kedracki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [29], kendiliğinden birleşen yapıların hidrofobik çekirdeklerinin içine antikanser ilacı doksorubisin yüklenerek misellerin potansiyel uygulamaları gösterilmiştir. Bunun için tamamlayıcı DNA zincirinin 5' ucu folik asit birimleri ile modifiye edilerek bu zincirlerin DNA-polimer konjugatı ile hazırlanan misellerle hibridizasyonu sonucu miseller, insan kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörlere hedeflenmiştir. Bu misellerin hücresel alımı folik asit konjugasyonu ile önemli ölçüde artmış ve kanser hücrelerinin canlılığı büyük ölçüde azalmıştır. Bu da kendiliğinden birleşen DNA-polimer konjugatlarının, folik asit reseptörleri sunan kanser hücrelerini hedefleyen taşıma araçları olarak kullanılabildiği gösterilmiştir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 : Folik asit molekülleri ile fonksiyonlandırılmış DNA-polimer konjugatlarından elde edilen misellerin ilaç taşıma mekanizması ve farklı tasarlanmış misellerin hücre canlılığına olan etkisini gösteren grafik: (A) hedefleme birimleri (folik asitler) ile fonksiyonlandırılmış ilaç yüklü miseller (B) konjuge olmamış folik asitlerin varlığında ilaç yüklü miseller (C) herhangi bir hedefleme birimi taşımayan ilaç yüklü miseller (D) ilaç içermeyen folik asit konjugatlı miseller [29].

2.6 Protein-Polimer Konjugatları

Protein-polimer konjugatlarının hem sentetik polimerlerin hem de proteinlerin özelliklerini taşıması bu yapıları özellikle ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemler alanında ilgi çekici kılmaktadır. Protein-polimer konjugatlarının sentezinde de Şekil 2.6'da şematize edilen üç temel yöntem olan *grafting to*, *grafting from* ve *grafting through* yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerle konjugat sentezi için çeşitli fonksiyonlandırmalar yapılabilmektedir. Bu fonksiyonlandırmalara bağlı olarak konjugasyon prosedürleri değişmektedir. Amin ve tiyol gruplarıyla bağlanma, biyotin ve streptavidin bağlanması bu prosedürlerden bazılarıdır [19].

Aminler DNA-protein konjugatlarında olduğu gibi protein-polimer konjugatlarında da en fazla hedeflenen fonksiyonel gruplardır. Konjugasyon için amin grupları aktifleştirilmiş esterlerle reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucu oluşan amit bağları ile iki makromolekül birbirine bağlanmış olur [19].

Sıklıkla tercih edilen bir diğer yöntem tiyollerle bağlanma yöntemidir. Bu yöntemde sistein aminoasidinde bulunan tiyol grupları ile bağ kurulması amaçlanır. Bu bağ, iki tiyol arasında oksidasyon sonucu disülfid bağı oluşması ya da aktive edilmiş bir disülfid ile değişim yoluyla oluşturulur. Tiyoller alken ve alkinlerle katılma reaksiyonları vererek tiyoeter bağları da oluşturabilirler [19].

Biyotin ve avidin bağlanması gibi kovalent olmayan etkileşimler kullanılarak da konjugat sentezlenebilmektedir. Biyotinin avidin ve streptavidin proteinlerine güçlü ve stabil afinite göstermesi bu spesifik etkileşimin konjugasyon amacıyla kullanılmasını sağlamaktadır [19].

2.6.1 Albumin-polimer konjugatları

Polimerlerin albumin proteinine fiziksel ya da kimyasal yollarla bağlanması, albuminin stabilitesini artırır ancak konjuge edilen polimerin özelliklerine bağlı olarak proteinin çözünürlüğü ve biyouyumluluğunda değişiklikler olabilmektedir. Örneğin albuminin polietilenglikol (PEG) gibi fazlaca hidrofilik bir polimerle konjugasyonu sonucunda konjugatın doğal albumine göre kanda daha uzun süre dolaştığı ve immunojenisitenin de daha düşük olduğu yapılan bir çalışmayla kanıtlanmıştır [16].

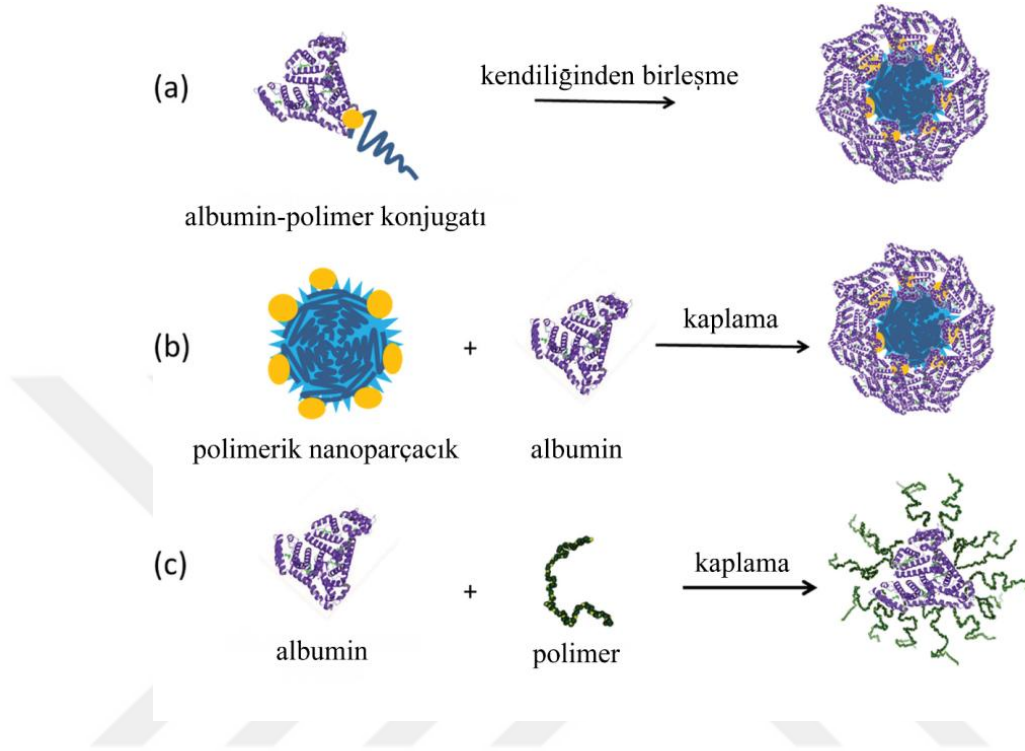
Albuminin yüzeyinde bulunan tiyol, amino ve karboksil gibi fonksiyonel gruplar sayesinde bu proteinin polimerlerle konjugasyonu kolaylıkla yapılabilir. Genellikle albuminin lizin ve sistein aminoasitleri polimerlerle konjugasyon için hedef olarak seçilmektedir. Lizin aminoasitinin albumin yüzeyindeki amino grupları *N*-hidroksisüksinimid (NHS) gibi aktifleştirilmiş esterlerle, karboksilik asitler, aldehitler gibi yapılarla reaksiyona girerek konjugasyon yapılabilir [16].

Albuminin sahip olduğu 585 aminoasidin 35'i sistein olup bunlardan 34'ü arasında 17 disülfid bağı bulunurken bir tane serbest tiyol grubu vardır. Dolayısıyla bu serbest tiyol grubuna sahip olan Sistein-34, konjugat sentezinde kullanılmak üzere etkin olarak kullanılabilir. Maleimit ve aktif disülfid grupları albuminin serbest tiyol grubuyla etkileşime girmesi için kullanılan fonksiyonel gruplardan bazılarıdır [16].

2.6.2 Protein-polimer konjugatları ile oluşturulan nanoparçacıklar

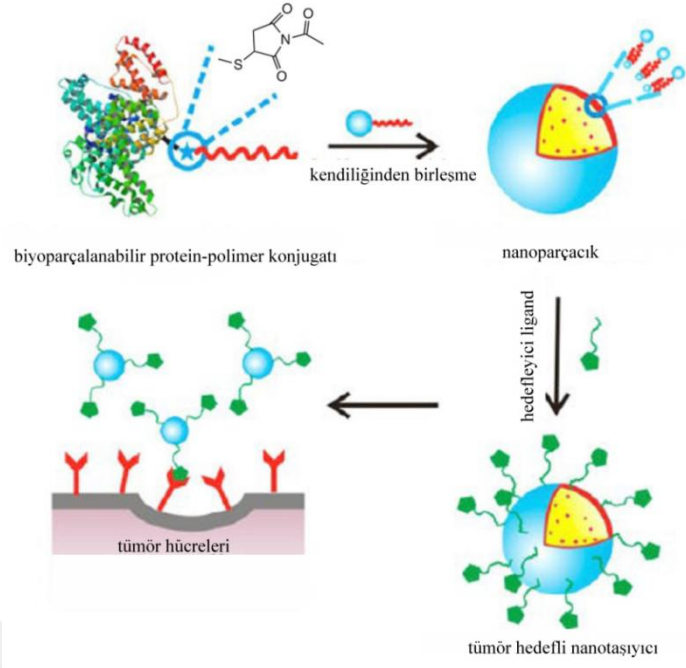
Amfifilik protein-polimer konjugatları kullanılarak farklı yapıda nanoparçacıklar sentezlenebilmektedir. Şekil 2.15'te gösterildiği gibi albumin proteini ile hidrofobik

bir polimerin bir araya getirilmesi yoluyla elde edilen konjugatın uygun çözücü içerisinde kendiliğinden birleşme özelliği sayesinde polimer çekirdek ve protein koronadan oluşan nanoparçacıklar elde edilebilirken albumin veya polimerin yüzeyi kapladığı nanoparçacıklar da oluşturulabilmektedir [16].



Şekil 2.15 : a) Büyük amfifilik yapılardan elde edilen albumin-polimer nanoparçacıkları, b) albumin korona ile kaplanmış polimerik nanoparçacıklar ve c) polimer ile kaplanmış albumin (doğal veya denatüre olmuş) veya albumin parçacıkları.

Protein-polimer konjugatlarından elde edilen nanoparçacıklar ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada [31] anti-kanser ilacın hastalıklı bölgeye daha etkin bir şekilde taşınması amacıyla albumin-polimer konjugatının kendiliğinden birleşmesi ile elde edilen nanoparçacıkların içerisine kanser ilacı yüklenmiş ve yüzeyi de tümör bölgesine uygun ligandlarla hedeflendirilmiştir (Şekil 2.16) [31].



Şekil 2.16 : Albumin-polimer konjugatından sentezlenen nanoparçacıklarla ilaç taşıma [31].

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Malzemeler

4-Metilumbelliferon (%99, Aldrich), trietilamin (TEA, ≥ 99 , Aldrich), metakriloil klorür (%97, Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH, %98-100.5, Aldrich), 2-bromoetanol (%95, Aldrich), sodyum azit (NaN₃, BDH), bakır bromür (CuBr, %98, Alfa Aesar), sodyum karbonat (Na₂CO₃, Aldrich), sodyum bikarbonat (NaHCO₃, VWR Chemicals), *N,N,N',N'',N'''*-pentametildietilentriamin (PMDETA, Merck), L-sodyum askorbat (NaAsc, %99, Acros Organics), *N,N'*-disikloheksilkarbodiimid (DCC, Alfa Aesar), sodyum sülfat (Na₂SO₄, Merck), magnezyum sülfat (MgSO₄, %97, Acros), sodyum klorür (NaCl, Merck), 4-pentinoik asit (%98, Alfa Aesar), *N*-hidroksisüksinimid (%98, Aldrich), nötral alümina (58 Å, Alfa Aesar), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Aldrich), silika jel 60 (0.063-0.200mm, Merck), bakır (II) sülfat pentahidrat (CuSO₄.5H₂O, Merck), tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin (TentaGel™ TBTA, Aldrich), bovin serum albumin (BSA, Cell Signaling Technology), aseton (Merck), n-hekzan (Emplura), etil asetat (Merck), tetrahidrofuran (Merck), dietileter (Chem-Lab), 1,4-dioksan (Merck), dimetilsülfoksit (DMSO, Carlo Erba) hiçbir saflaştırma prosedürü uygulanmadan kullanılmıştır. Oligonükleotit (TAACCTGATTAGGAGAGCGACG, (Sentromer DNA Teknolojileri) HPLC ile saflaştırılmış halde satın alınarak kullanılmıştır. Diklorometan (DCM, Merck) CaH₂ ile kurutulup distillenerek kullanılmıştır. *N,N*-Dimetilformamit (DMF, %99.8, Alfa Aesar) 4 Å moleküler sieve ile kurutulup kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Cihazlar

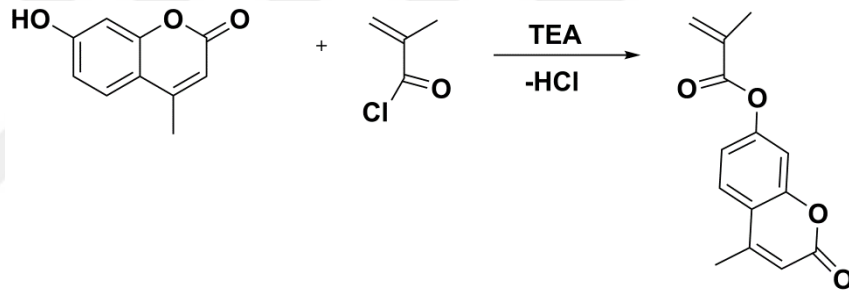
Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumları platin-ATR aksesuarı ile (ZnSe kristali) ALPHA Bruker spektrometresinde kaydedilmiştir. ¹H NMR ve ¹³C NMR ölçümleri, 500 Mhz'lik Bruker NMR cihazında CDCl₃ çözücüsü kullanılarak alınmıştır. UV-Vis absorpsiyon spektrumları Hitachi marka U-2900 UV-Vis spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Floresans emisyon spektrumu ölçümleri Hitachi

marka F-2700 spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri, bir pompa ve Viscotek VE 3580 refraktif indeks (RI) dedektöründen oluşan Viscotek GPCmax VE 2001 Autosampler sistemi kullanılarak yapılmıştır. Seri olarak bağlanmış üç Viscotek GPC kolonu (T3000, LT4000L ve LT5000L) (iç çap 7.8 mm, 300 mm uzunluk) ve bir Viscotek guard kolonu (CLM3008, iç çap 4.6 mm, 10 mm uzunluk) kullanılmıştır. Ölçümler 35 °C'de 1.0 mL/dakika akış hızında yapılmıştır ve çözücü olarak THF kullanılmıştır. Dedektör, dar moleküler ağırlığı dağılımına sahip PS standartlarıyla kalibre edilmiş ve veriler Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. DSC ölçümleri, TA marka Discovery DSC 250 cihazında 25°C ile 250°C aralığında, 10°C/dk ısıtma hızında ve azot atmosferi altında yapılmıştır. Misellerin oluşturulması sırasında enjeksiyonlar 19.23 mm çaplı şırıngalar kullanılarak Sujipuli Technology NE-1600 6 kanallı programlanabilir şırınga pompasında 1 mL/dk enjeksiyon hızıyla yapılmıştır. Misellerin ortalama partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımları, 633 nm dalga boyunda ve 25°C'de bir Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi cihazı kullanılarak distile H₂O içerisinde 173°'lik ölçüm açısı ile belirlenmiştir. Misellerin aydınlatılma çalışmaları için 350 nm'de ışık yayan 12 adet lambalı Kerman marka bir fotoreaktör kullanılmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), 1xTris glisin SDS (pH 8.3) yürütme tamponu ve bir poliakrilamid jeli (%10 ayırma jeli ve %5 istifleme jeli içeren) kullanılarak 120 V'ta gerçekleştirilmiştir. Yükleme örnekleri 7.5 µL ölçülen çözeltinin (0.5 mg/mL) 7.5 µL yükleme tamponu ile karıştırılmasıyla hazırlanmış ve birkaç saniye vortekslenmiştir. Moleküler ağırlık standartları olarak sekiz protein (6.5–200 K; Bio-Rad) karışımı kullanılmıştır. Numuneler ve protein moleküler ağırlık markeri, indirgeyici bir madde ile önceden hazırlanmış bir Laemmli numune tamponu ile seyreltilmiş ve daha sonra proteini denatüre etmek için 5 dakika 95°C'de ısıtılmıştır. Numuneler 2 saat boyunca Coomassie Mavi R-250 Boyama Çözeltisi (Bio-Rad) kullanılarak boyanmış ve önceden karıştırılmış eluent (etanol/su/asetik asit= 5:4:1 (hacim/hacim/hacim)) ile yıkanmıştır. Jel görüntüleri bir Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme sistemi kullanılarak kaydedilmiştir. BSA da kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3 Deneysel Kısım

3.3.1 Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin sentezi

4-Metilumbelliferon (5 g, 0.028 mol) üzerine 100 mL DCM eklendikten sonra 0°C’de TEA (4.74 mL, 0.034 mol) yavaşça damlatıldı. Bir damlatma hunisinin içine 10 mL DCM ve metakrilil klorür (3.32 mL, 0.034 mol) konulup karışımın üzerine yavaşça damlatıldı. Oda sıcaklığında, azot ortamında ve ışık alması engellenerek 1 gece karıştırıldı. Daha sonra sırasıyla 100’er mL distile suyla ve 100’er mL NaOH çözeltisiyle 3’er kere ekstraksiyon yapıldı. Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra çözücü tamamen uçuruldu. Elde edilen katı madde metanolden kristallendirilerek yüksek basınç altında kurutuldu. Sonuç ürün % 29 verimle beyaz bir katı olarak elde edildi. Monomerin karakterizasyonu floresans spektroskopisi, DSC, FTIR ve ¹H NMR ile gerçekleştirildi. Şekil 3.1’de KMA monomerinin kimyasal sentez reaksiyonu ve yapısı gösterilmektedir.



Şekil 3.1 : Kumarin metakrilat monomerinin sentezi.

3.3.2 2-Azidoetanol sentezi

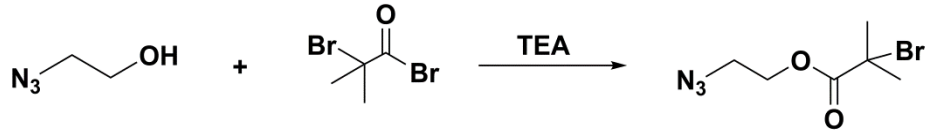
2-Bromoetanol (4 g, 32 mmol) ve NaN₃ (3.12 g, 48 mmol) üzerine 90 mL aseton ve 15 mL distile su eklenerek 60 °C’de 12 saat karıştırıldı. Aseton tamamen uçurulduktan sonra üzerine 80 mL distile su eklendi ve 100’er mL dietil eter ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra çözücü yüksek basınç altında uçuruldu. Ürün verimi % 30 olarak bulundu. Sonuç ürün FTIR ve ¹H NMR ile karakterize edildi. Azidoetanolün sentezi ve kimyasal yapısı Şekil 3.2’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.2 : 2-Azidoetanolün sentezi.

3.3.3 2-Azidoetil 2-bromoizobütirat (AEBI) sentezi

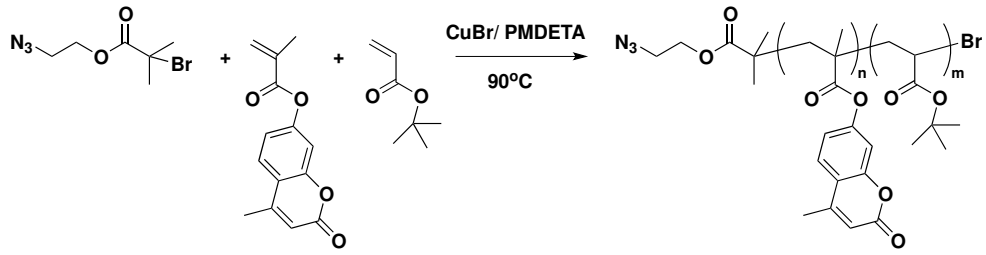
2-Azidoetanol (1.19 g, 0.014 mol), TEA (2.29 mL, 0.016 mol) ve 40 mL dietil eter 0 °C'de karıştırılırken üzerine 15 mL dietil eter içinde α -bromoizobütiril bromür (1.98 mL, 0.016 mol) yaklaşık 30 dakikada damlatıldı. 1 gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Sırasıyla 100'er mL sulu NaHCO₃ çözeltisi ile 3 kere ve distile suyla 1 kere ekstraksiyon yapılarak Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra çözücü uçuruldu. Sarımsı yağ gibi bir sıvı elde edildi. FTIR, ¹H NMR, ve ¹³C NMR sonuçlarına göre karakterizasyonu yapıldı.



Şekil 3.3 : 2-Azidoetil 2-bromoizobütirat sentezi ve kimyasal yapısı.

3.3.4 Poli(kumarin metakrilat-ko-ter-bütıl akrilat) (PKMA_tBA) sentezi

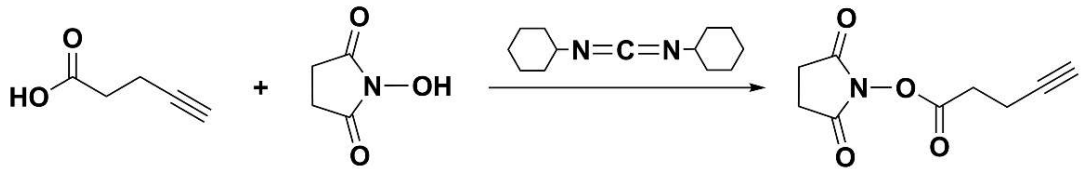
Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile poli(kumarin metakrilat-ko-ter-bütıl akrilat) polimeri sentezlenirken, Monomer/Başlatıcı/CuBr/PMDETA için 100/1/1/1 oranı kullanılarak toplam monomer molü 0.034 olmak üzere *t*-BA (4.44 mL, 0.0306 mol), KMA (0.83 g, 0.0034 mol), AEBI (0.08 g, 3.4x10⁻⁴ mol), CuBr (0.049 g, 3.4 x 10⁻⁴ mol), PMDETA (0.071 mL, 3.4 x 10⁻⁴ mol) bir Schlenk tüpü içerisinde karıştırılıp, 3 kere donma-vakum-çözme (freze-pump-thaw) döngüsü tekrarlandı. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenerek 90°C'de yağ banyosunda belli süre karıştırıldı. Sarı-yeşil renkteki karışımın üzerine bir miktar THF eklenerek sıvı azotla soğutulmuş *n*-hekzan çözücüsünde çöktürüldü. Çözücü tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kalan katı maddenin üzerine tekrar bir miktar THF eklenerek çözünmesi sağlandı. Karışım, bakırın uzaklaştırılması için nötral alümina kolonundan geçirildi. THF uçurularak tekrar *n*-hekzanda çöktürme işlemi yapıldı. Daha sonra 40°C'de vakum etüvünde tamamen kurutuldu. Elde edilen polimer FT-IR, ¹H NMR, UV, GPC ve DSC ile karakterize edildi. Şekil 3.4'te reaksiyon şeması gösterilmiştir.



Şekil 3.4 : PKMatBA polimerinin ATRP ile sentezlenmesi.

3.3.5 *N*-(4-Pentinoiloksi)süksinimit sentezi

4-Pentinoik asit (0.5 g, 5.1 mmol) ve *N*-hidroksisüksinimit (0.6 g, 5.1 mmol) bir balona konulduktan sonra üzerlerine 60 mL 1:1 etil asetat:dioksan çözücü karışımı eklendi. Daha sonra bu karışımın üzerine DCC (1.05 g, 5.1 mmol) eklendi. 1 gece oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra karışım filtre kağıdından süzülde ve etil asetat hacmi 200 mL'ye tamamlanacak şekilde etil asetat eklendi. 50'şer mL %5'lik NaHCO₃ sulu çözeltisiyle 2 kere, 50 mL distile suyla 1 kere, 50 mL doymuş NaCl sulu çözeltisi ile de bir kere ekstraksiyon yapıldı. Organik fazlar toplanıp Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra etil asetat uçuruldu. Daha sonra organik kolon hazırlanarak madde DCM ile yıkanan silika jelde yürütüldü ve maddeler toplandı. Sonuç olarak %71 verimle beyaz bir katı elde edildi. FT-IR ve ¹H NMR ile karakterizasyonu yapıldı. *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit bileşiğinin kimyasal yapısı aşağıdaki Şekil 3.5'te gösterildiği gibidir.

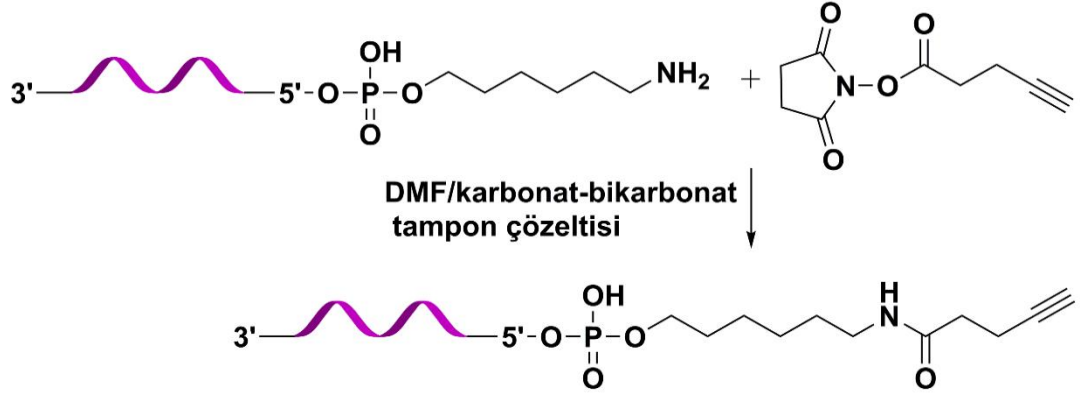


Şekil 3.5 : *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit bileşiğinin sentezi.

3.3.6 Oligonükleotit-poli(kumarin metakrilat-ko-ter-bütil akrilat (OLN-PKMatBA) sentezi

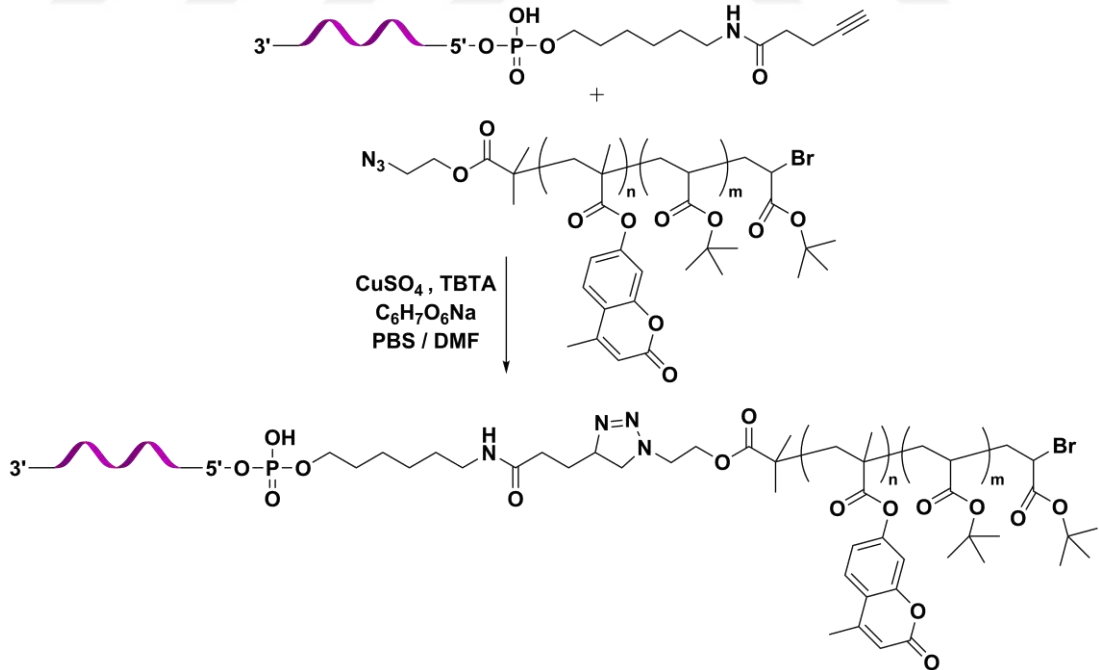
Na₂CO₃-NaHCO₃ tampon çözeltisi (105 µL, pH 9.9) içerisinde çözülmüş oligonükleotit (TAACCTGATTAGGAGAGCGACG, 24 nmol) karışımı içine *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit (0.07 mg, 360 nmol) eklenerek oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen maddenin üzerine fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (0.6 mL) eklendi. Karakterizasyonu için DLS, FT-IR, UV ve floresans spektroskopi ölçümleri yapıldı.

OLN-*N*-(4-pentinoiloksi)süksinimitin sentezi ve kimyasal yapısı Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.6 : OLN- *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimid sentezi.

PKMATBA polimeri (0.229 mg, 28.8 nmol) 229 μ L dimetilformamid (DMF) çözücüsü içinde çözülerek oligonükleotit çözeltisi içine eklendi. CuSO_4 (0.0072 mg, 28.8 nmol), TBTA (0.017 mg, 31.7 nmol) ve NaAsc (0.023 mg, 115.2 nmol) 24 μ L DMSO/ H_2O (1/1) çözücüsü içinde çözülerek oligonükleotit çözeltisi içine eklenerek karıştırıldı. Daha sonra elde edilen bu çözelti suya karşı diyaliz edildi ve liyofilizatörde kurutuldu. %50 verimle 0.2 mg beyaz bir katı elde edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 : OLN-PKMATBA konjugatının sentez reaksiyonu ve kimyasal yapısı.

3.3.7 BSA-*N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit sentezi

Bovin serum albumin (BSA, 40 mg, 6.06×10^{-7} mol) 3 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) çözüldükten sonra bu çözelti 0.6 mL DMSO içinde çözünmüş *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit (2.4 mg, 12.12×10^{-6} mol) çözeltisine eklendi. Oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra suya karşı diyaliz uygulandı. 39.9 mg beyaz bir katı olarak elde edildi. FT-IR ile karakterizasyonu yapıldı.

3.3.8 BSA-PKMA_tBA sentezi

PKMA_tBA (50 mg, 6.06×10^{-6} mol) 2 mL DMF içinde çözülerek BSA-*N*-(4-pentinoiloksi) süksinimit (20 mg, 3.03×10^{-7} mol), CuSO₄ (1.5 mg, 6.06×10^{-6} mol), NaAsc (4.8 mg, 24.024×10^{-6} mol) ve TBTA (3.5 mg, 6.67×10^{-6} mol) 4 mL PBS içinde çözülerek hazırlanan çözeltinin üzerine eklendi. Azot geçirilerek 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

Aynı yöntemle BSA-*N*-(4-pentinoiloksi) süksinimit/PKMA_tBA oranı molce 10:1 olacak şekilde bir konjugat daha sentezlendi. Sırasıyla bu konjugatlar BSA-PKMA_tBA-1 ve BSA-PKMA_tBA-2 olarak adlandırıldı.

Daha sonra suya karşı diyaliz yapıp liyofilizasyon ile kurutuldu ve beyaz bir katı elde edildi. UV-vis, floresans spektroskopisi, SDS-PAGE, FT-IR ve DSC ile karakterizasyonu yapıldı.

3.3.9 BSA-PKMA_tBA misellerinin oluşturulması

10 mg BSA-PKMA_tBA konjugatı 1 mL kuru DMF içinde çözülerek şırınga pompası ile içine 10 mL distile su 1 mL/dk hızla enjekte edildi ve 6-8 kDa cut off diyaliz membran kullanılarak diyaliz gerçekleştirildi.

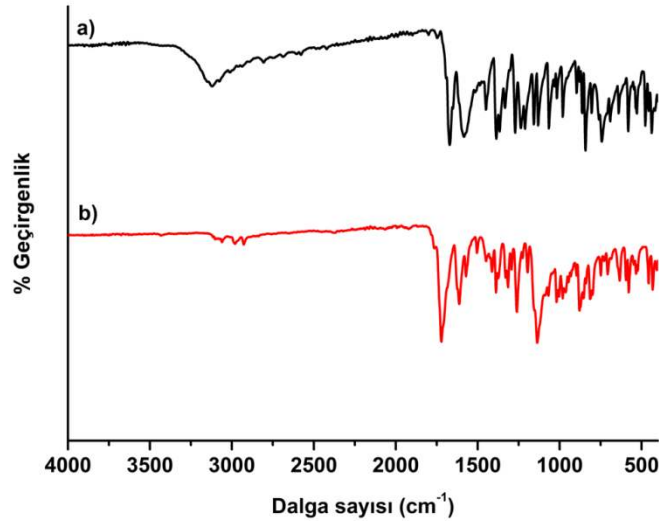
DLS ölçümleri yapıldıktan sonra 350 nm dalga boyundaki lambalarla 1 saat aydınlatılarak tekrar DLS ölçümü yapıldı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tezin ana amacı, Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) ve “click” reaksiyonunu kullanarak ışığa-duyarlı DNA-polimer ve protein-polimer konjugatlarının sentezlenmesidir. Bu doğrultuda öncelikle ışığa duyarlı kopolimerin sentezlenmesi için kumarin fonksiyonlu bir monomer (KMA) ile ATRP ve “click” reaksiyonu için uygun olan bir başlatıcı sentezlenmiştir. Sonraki aşamalarda kopolimer sentezlenmiş ve uygun biyomoleküller ile “click” reaksiyonu vasıtasıyla konjugat oluşturulmuştur.

4.1 Kumarin Metakrilat (KMA) Monomerinin Karakterizasyonu

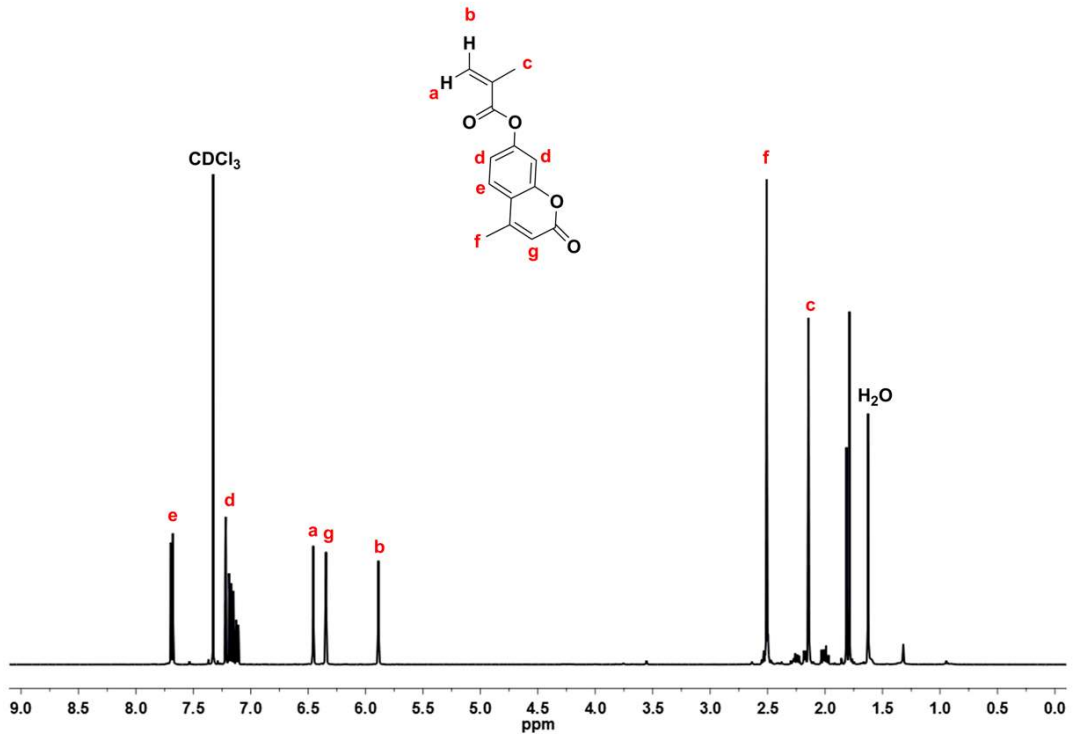
İlk olarak, sentezlenmesi hedeflenen polimerin ışığa-duyarlı kısmını oluşturacak olan kumarin metakrilat monomeri daha önce literatürde [32] belirtilen şekilde sentezlenerek FT-IR, ^1H NMR, UV-vis, floresans spektroskopi ve DSC ile karakterize edildi.



Şekil 4.1 : a) 4-Metilumbelliferon ve b) kumarin metakrilat (KMA) monomerine ait FT-IR spektrumları.

Şekil 4.1’de kumarin metakrilat (KMA) monomerinin ve başlangıç bileşiği 4-metilumbelliferonun FT-IR spektrumları verilmiştir. 4-Metilumbelliferon bileşiğinin 3119 cm^{-1} ’de gözlenen geniş –OH bandı KMA’ın FT-IR spektrumunda kaybolmuştur.

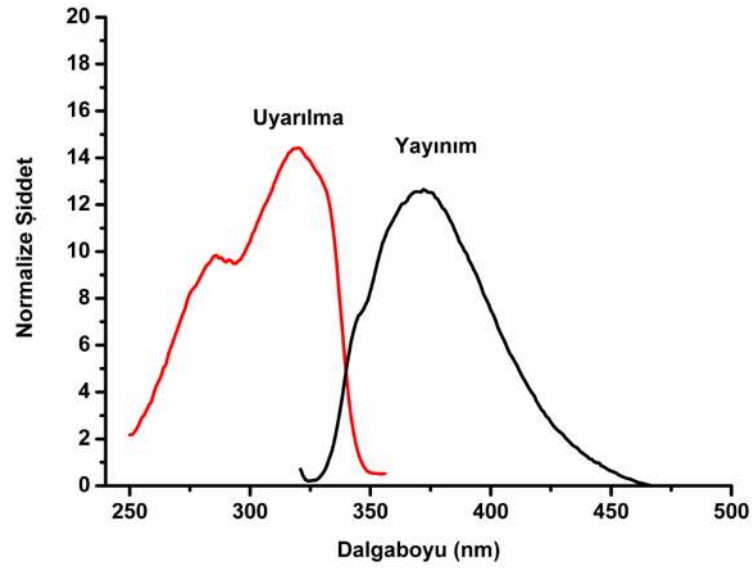
KMA’ın ^1H NMR spektrumundan (Şekil 4.2) görüldüğü gibi kumarinin aromatik protonları 7.7, 7.3 ve 6.4 ppm’de, kumarin halkasında bulunan –CH₃ protonları 2.5 ppm’de ve metakrilat grubunun protonları 6.5, 5.9 ve 2.2 ppm’de gözlemlendi.



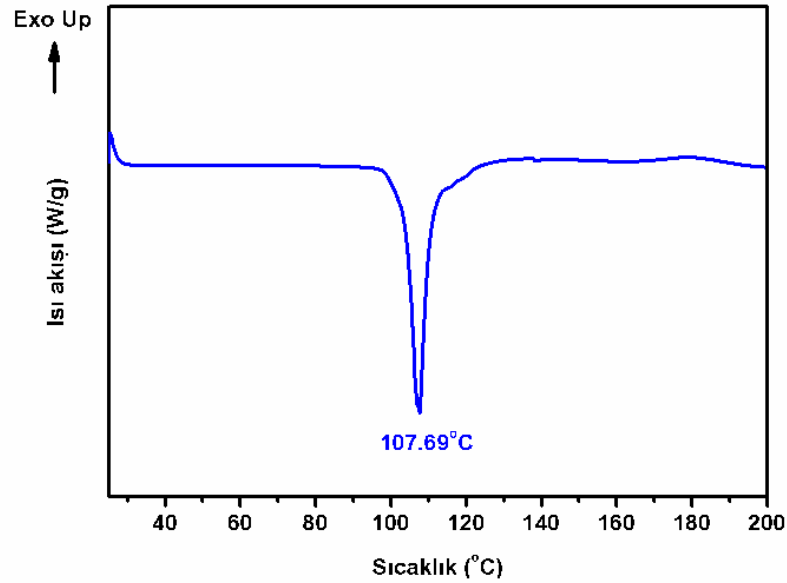
Şekil 4.2 : Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin CDCl_3 içindeki ^1H NMR spektrumu.

KMA’ın 4.5×10^{-5} M DCM içindeki floresans ölçümleri, uyarma dalga boyu 310 nm seçilerek gerçekleştirildi (Şekil 4.3). Floresans yayılım spektrumunun absorpsiyon spektrumuna benzer olduğu görüldü.

DSC ölçümü sonucunda monomerin erime sıcaklığının 107.69 $^{\circ}\text{C}$ olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4).



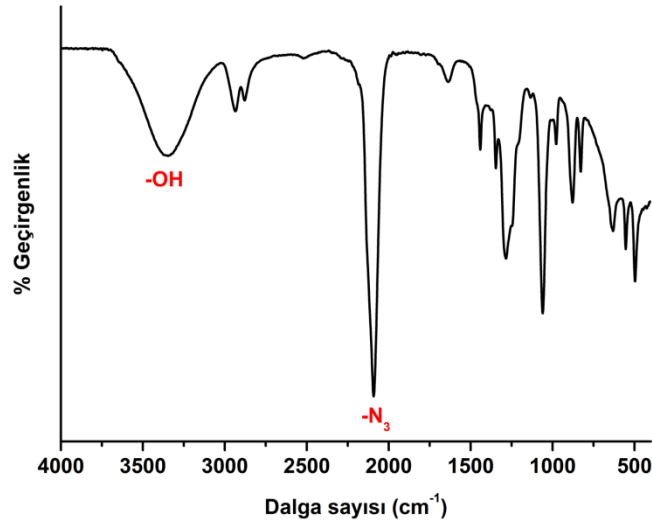
Şekil 4.3 : Kumarin metakrilat (KMA) monomerinin $[4.5 \times 10^{-5} \text{ M}]$ DCM içindeki floresans spektrumu ($\lambda_{\text{uyarılma}} = 310 \text{ nm}$).



Şekil 4.4 : KMA monomerinin DSC grafiği.

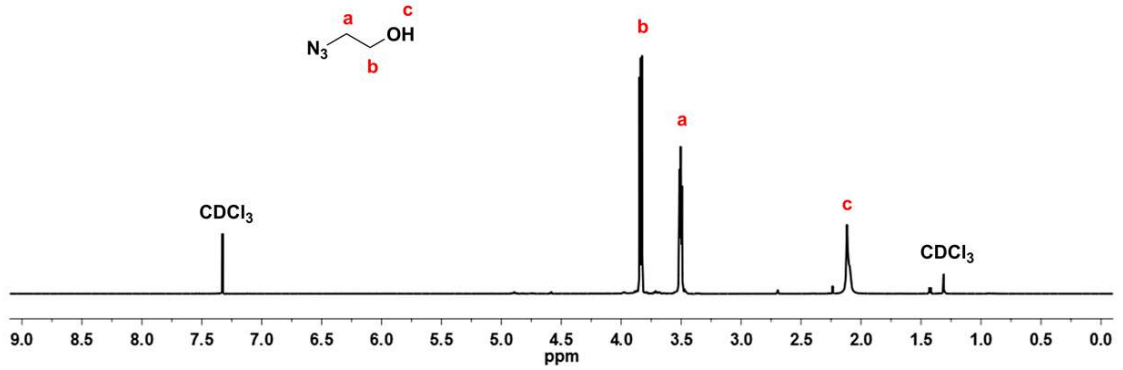
4.2 2-Azidoetanol Karakterizasyonu

2-Azidoetanolün karakterizasyonu ^1H NMR ve FT-IR spektroskopisi ile yapılmıştır. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi $-\text{OH}$ gerilme bandı 3346 cm^{-1} 'de yayvan bir pik olarak ve $-\text{N}_3$ gerilme titreşimi 2092 cm^{-1} 'de keskin bir pik olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.5 : 2-Azidoetanölün FT-IR spektrumu.

Şekil 4.6’da 2-azidoetanölün CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR verilmiştir. Azit grubuna bağlı $-\text{CH}_2-$ protonları 3.5 ve hidroksil grubuna bağlı $-\text{CH}_2-$ protonları 3.8 ppm’de gözlenmiştir. Hidroksil grubuna ait proton ise 2.1 ppm civarındadır. Gerek FT-IR gerekse ^1H NMR sonuçları yapının başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

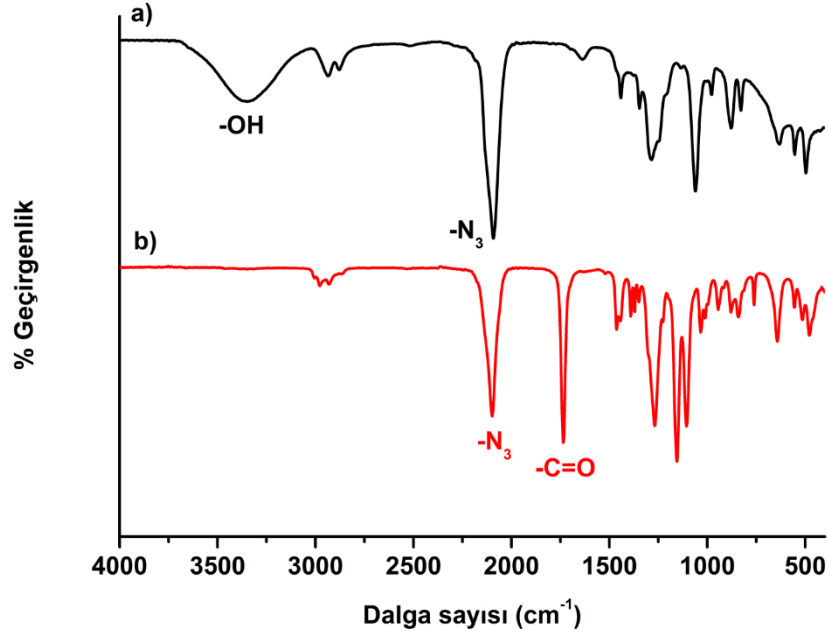


Şekil 4.6 : 2-Azidoetanölün CDCl_3 içerisinde çekilen ^1H NMR spektrumu.

4.3 2-Azidoetil 2-Bromoizobütiratın (AEBI) Karakterizasyonu

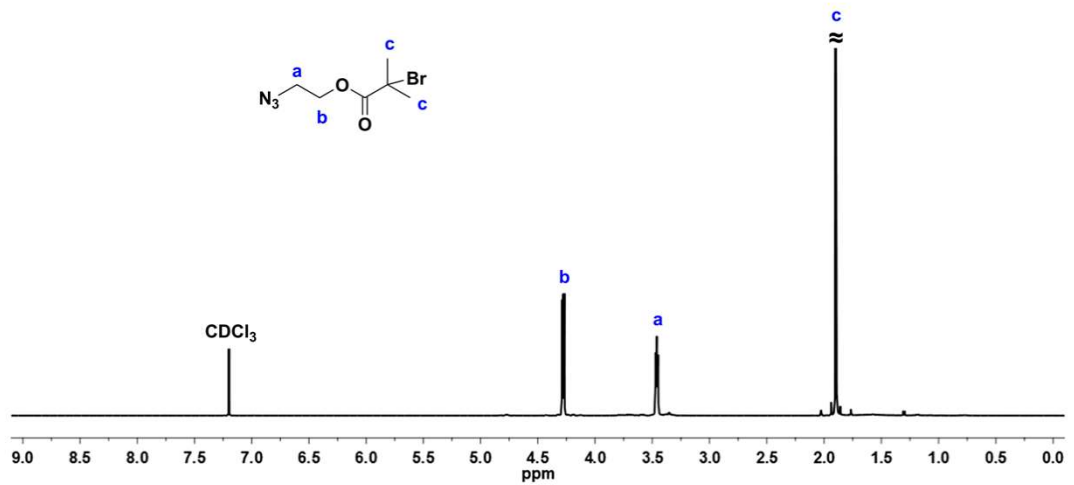
Azit fonksiyonlu ATRP başlatıcısının sentezlenme basamağı daha önce literatürde [33] belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen sonuç ürün FT-IR, ^1H NMR ve ^{13}C NMR ile karakterize edildi. 2-Azidoetanölün FT-IR spektrumunda görülen geniş $-\text{OH}$ bandının (3346 cm^{-1}) AEBI’ya ait spektrumda görülmemesi, 2099 cm^{-1} ’de

gözlenen azit pikinin aynı şekilde gözlenmesi ve 1735 cm^{-1} 'de karbonil pikinin ortaya çıkması azidoetanol ile α -bromoizobütiril bromürün tamamen bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.7).

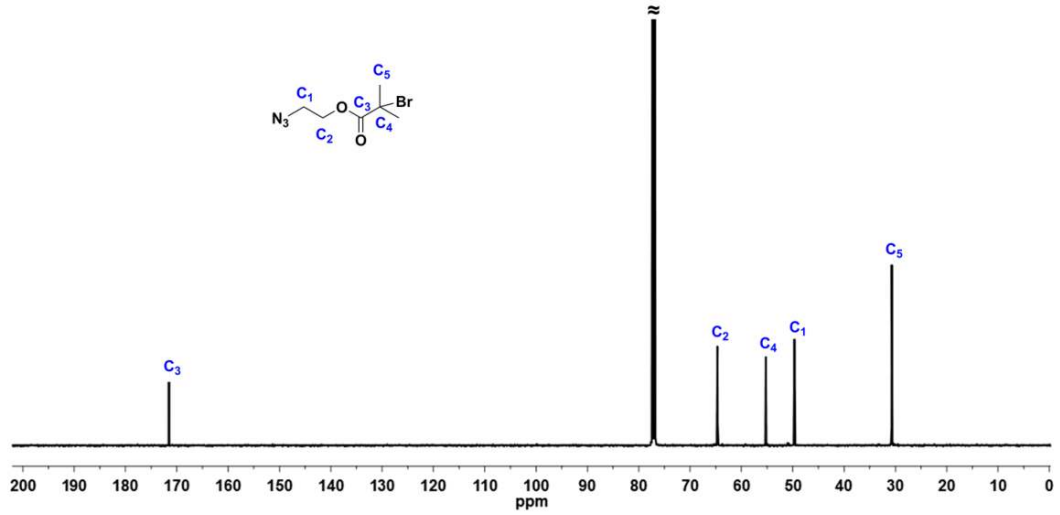


Şekil 4.7 : a) 2-Azidoetanol ve b) 2-azidoetil 2-bromoizobütirat (AEBI) bileşiklerinin FT-IR spektrumları.

Şekil 4.8 ve 4.9’da sırasıyla AEBI’nın ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları verilmiştir. Her iki spektrum da hedeflenen yapının başarılı bir şekilde sentezlendiğini açıkça göstermektedir.



Şekil 4.8 : 2-Azidoetil 2-bromoizobütiratın (AEBI) CDCl_3 içinde çekilmiş ^1H NMR spektrumu.



Şekil 4.9 : 2-Azidoetil 2-bromoizobütiratın (AEBI) CDCl_3 içinde çekilmiş ^{13}C NMR spektrumu.

4.4 Poli(kumarin metakrilat-*ko-ter*-bütil akrilat) (PKMA_tBA) Karakterizasyonu

Önceki aşamada sentezlenip karakterize edilen AEBI, KMA ile *ter*-bütil akrilat monomerlerinin kopolimerizasyonu için ATRP başlatıcısı olarak kullanıldı. Kopolimerizasyon 5 ve 24 saat olmak üzere iki farklı sürede gerçekleştirildi ve farklı molekül ağırlıklarında polimerler elde edildi. Elde edilen polimerlerin molekül ağırlıkları Tablo 4.1’de gösterildiği şekildedir.

Tablo 4.1 : Farklı sürelerde sentezlenen PKMA_tBA-1 ve PKMA_tBA-2 polimerlerinin karşılaştırılması.

Polimer	Süre (saat)	$M_{n,th}$	$M_{n,GPC}$	M_w	PDI	% Dönüşüm
PKMA _t BA-1	5	2330	2732	3256	1.19	% 14.6
PKMA _t BA-2	24	4430	7950	9363	1.18	% 30.3

$[M]_0:[I]_0:[CuBr]_0:[PMDETA]_0 = 100:1:1:1$
KMA:tBA = 1:9
Polimerizasyon 90°C’de gerçekleştirildi

Tablo 4.1’de görüldüğü üzere 24 saatlik polimerizasyon sonucu elde edilen PKMA_tBA-2 polimerinin GPC ile belirlenen molekül ağırlığının PKMA_tBA-1 polimerine kıyasla daha yüksek olduğu ayrıca PKMA_tBA-2 polimerinin hem PDI değerinin hem % dönüşümünün 5 saatte elde edilen polimere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre polimerizasyon süresi arttırıldığında daha yüksek molekül ağırlıklı, polidispersitesi daha düşük ve % dönüşümü daha fazla olan

polimerler elde edilmiştir. Teorik molekül ağırlığı ($M_{n,th}$) eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\overline{M}_{n,th} = \frac{[M_o]}{[I_o]} (\overline{M}_w) (\text{dönüşüm}) + M_1 \quad (4.1)$$

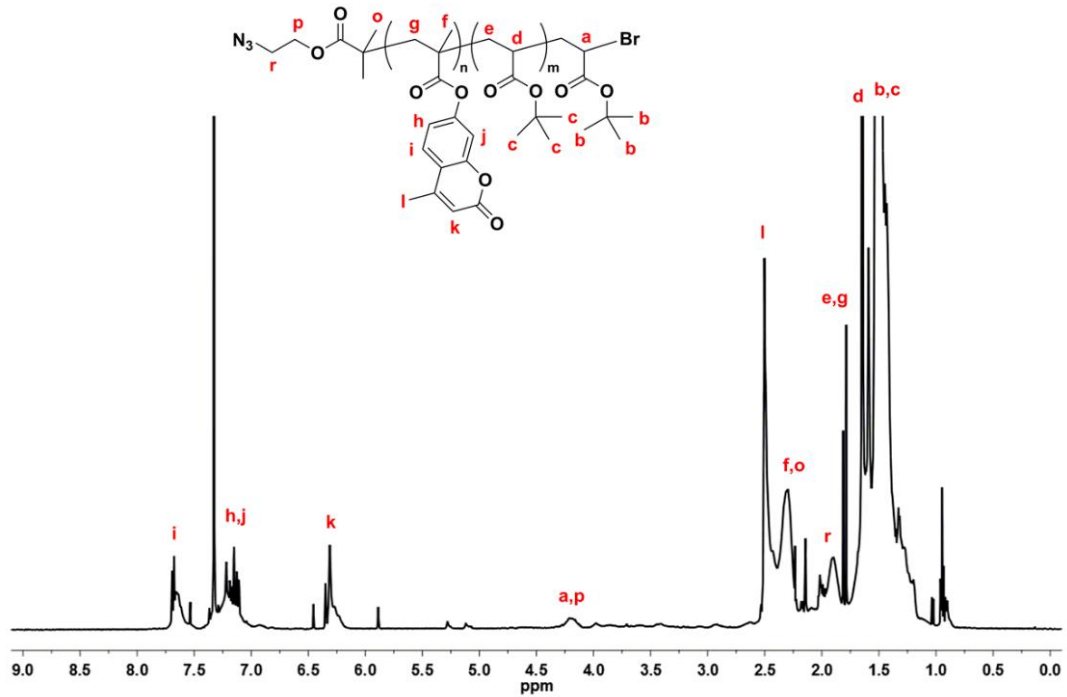
$[M_o]$: Monomer konsantrasyonu

$[I_o]$: Başlatıcı konsantrasyonu

M_w : Monomerin molekül ağırlığı

M_1 : Başlatıcının molekül ağırlığı

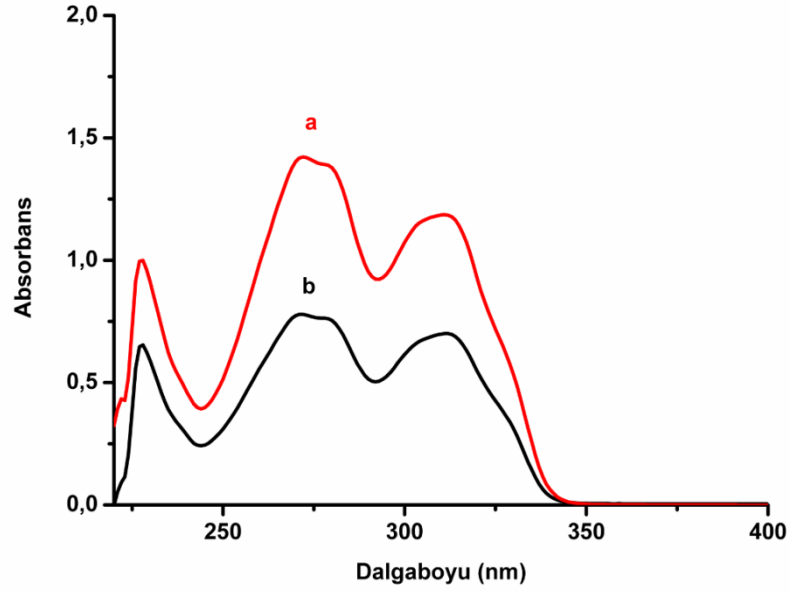
GPC'den elde edilen kromatogramlar yan reaksiyonların oluşmadığını göstermiştir. Örneklerin 1H NMR spektrumlarında da sadece kopolimere ait spesifik sinyaller değil aynı zamanda başlatıcıya ait sinyaller de görülmektedir (Şekil 4.10).



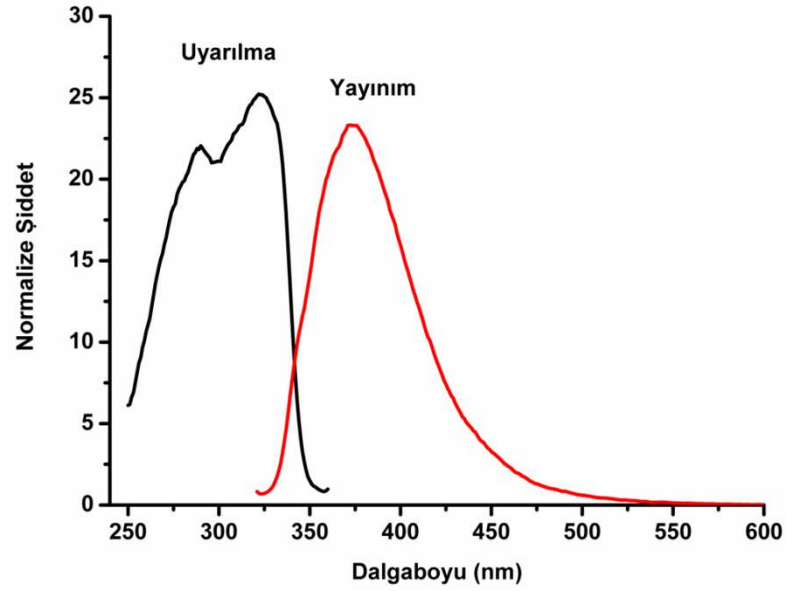
Şekil 4.10 : PKMAAtBA-2 kopolimerinin $CDCl_3$ içinde alınan 1H NMR spektrumu.

Molekül ağırlığı açısından sonraki aşamalarda kullanılmak üzere PKMAAtBA-2 kopolimeri seçildi. Bu kopolimerin UV ve floresans spektrumları çekilerek kumarin ile karşılaştırıldı. DCM içerisinde çekilen UV spektrumunun kumarine benzer bir absorpsiyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.11). PKMAAtBA-2 kopolimerinin 1.4×10^{-8} M DCM içindeki floresans ölçümleri, uyarma dalga boyu 310 nm seçilerek

gerçekleştirildi (Şekil 4.12). Floresans yayılım spektrumunun absorpsiyon spektrumuna benzer olduğu görüldü.

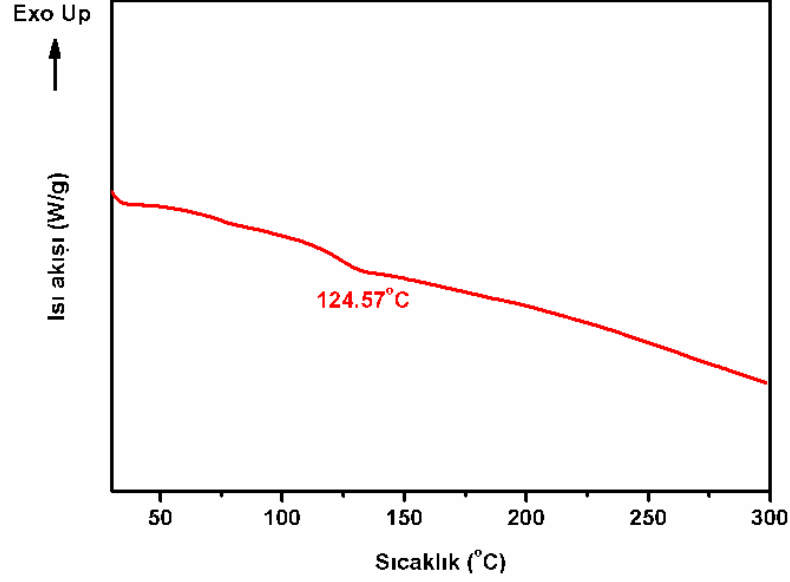


Şekil 4.11 : a) PKMAAtBA-2 [1.4×10^{-8} M] ve b) KMA monomerinin [4.5×10^{-5} M] DCM içindeki UV spektrumu.



Şekil 4.12 : PKMAAtBA-2 [1.4×10^{-8} M] kopolimerinin DCM içindeki floresans spektrumu.

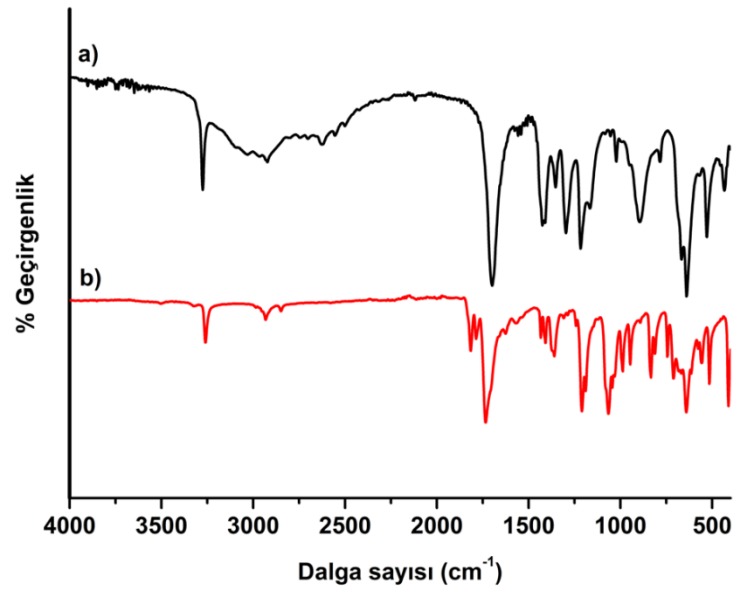
Elde edilen kopolimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) DSC ölçümü sonucunda 124.57°C olarak belirlendi (Şekil 4.13).



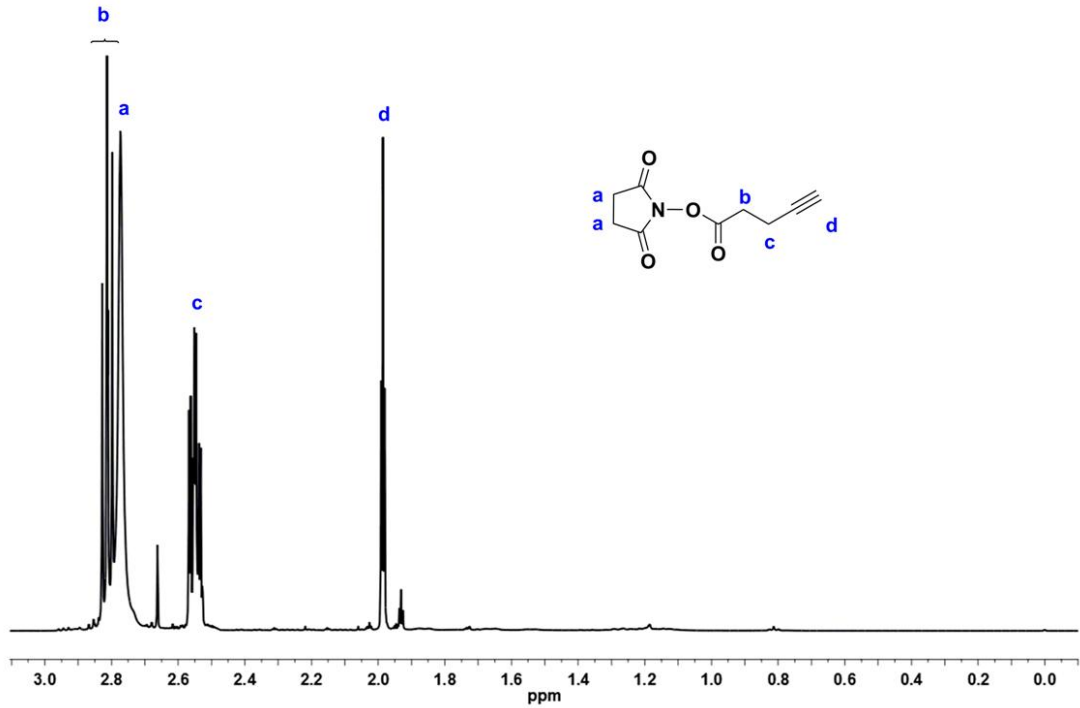
Şekil 4.13 : PKMAAtBA-2 kopolimerine ait DSC termogramı.

4.5 *N*-(4-Pentinoiloksi)süksinimit (PSIm) Karakterizasyonu

DNA ve protein gibi biyomoleküllerin “click” reaksiyonu vasıtasıyla elde edilen kopolimer ile konjugasyonu için süksinimitle fonksiyonlandırılması planlandı. Süksinimit fonksiyonel grubunun diğer ucunun “click” reaksiyonuna uygun olarak alkin içermesi için *N*-hidroksisüksinimit 4-pentinoik asit ile reaksiyona sokuldu [33]. Bu reaksiyon sonucunda elde edilen *N*-(4-Pentinoiloksi)süksinimit (PSIm) bileşiği yine FT-IR ve ^1H NMR ile karakterize edildi. Şekil 4.14’te PSIm’in FT-IR spektrumu başlangıç bileşiği 4-pentinoik asit ile karşılaştırıldı. 3260 cm^{-1} ’de gözlenen $\text{-C}\equiv\text{C-H}$ gerilim titreşim bandı ve 1800 cm^{-1} ’de gözlenen süksinimit karbonillerine ait bantlar PSIm bileşiğinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini gösterdi. Benzer şekilde ^1H NMR spektrumu da sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini destekledi (Şekil 4.15). Alkin ucundaki proton 2 ppm’de gözlenirken alkine komşu $\text{-CH}_2\text{-}$ protonları 2.55 ppm’de, karbonile komşu $\text{-CH}_2\text{-}$ protonları 2.82 ppm’de ve süksinimit protonları 2.76 ppm’de gözlemlendi.



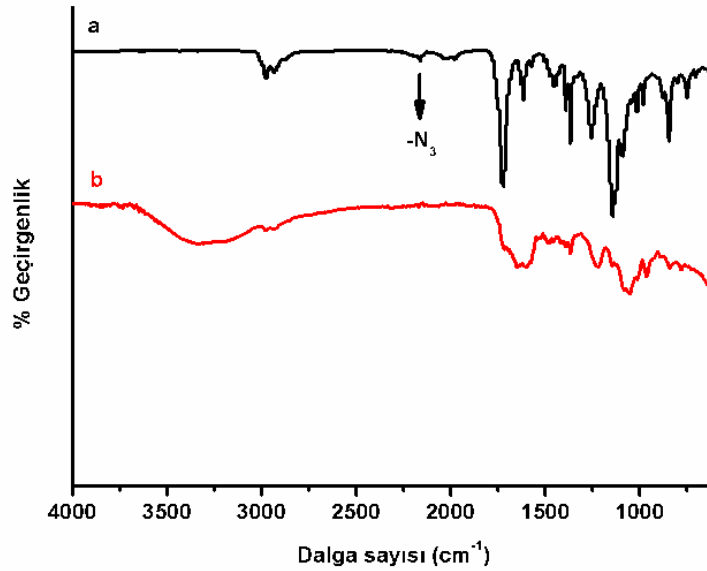
Şekil 4.14 : a) 4-Pentinoik asit ve b) *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimite (PSIm) ait FT-IR spektrumları.



Şekil 4.15 : *N*-(4-Pentinoiloksi)süksinimitin (PSIm) CDCl₃ içinde alınan ¹H NMR spektrumu.

4.6 OLN-PKMA_tBA Konjugatının Karakterizasyonu

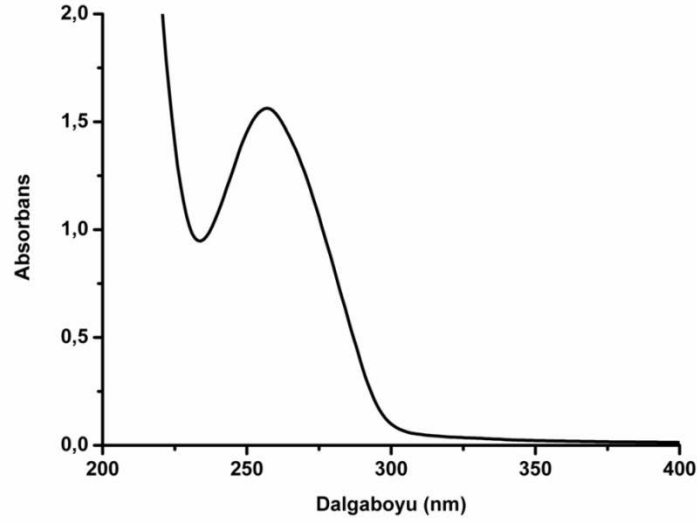
Çok az miktarda temin edilebilen oligonükleotit, öncelikle *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit ile reaksiyona sokuldu. Akabinde CuSO₄.5H₂O ve NaAsc kullanılarak PKMA_tBA kopolimeri ile “click” reaksiyonu gerçekleştirilerek elde edilen konjugat liyofilizatörde kurutuldu. Başlangıçta kullanılan oligonükleotit miktarının azlığından dolayı karakterizasyon zorlukla yapıldı. Elde edilen OLN-PKMA_tBA konjugatı öncelikle FT-IR ile karakterize edildi (Şekil 4.16). PKMA_tBA kopolimerinin ucunda bulunan -N₃ fonksiyonu zayıf da olsa FT-IR spektrumunda 2100 cm⁻¹ civarında gözlemlendi. Konjugasyon sonrasında azit pikinin kaybolması konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi.



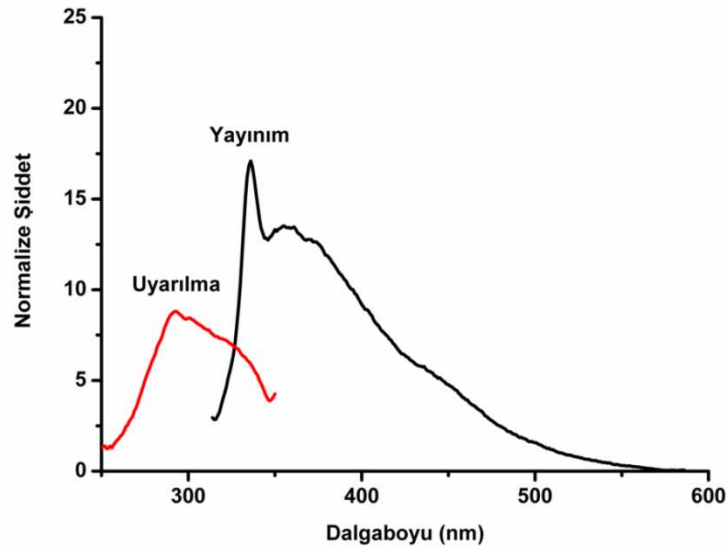
Şekil 4.16 : a) PKMA_tBA kopolimerinin ve b) OLN-PKMA_tBA konjugatının FT-IR spektrumu.

Liyofilizatörde kurutulduktan sonra elde edilen konjugat diyaliz membran kullanılarak misel oluşturuldu ve kopolimerde bulunan kumarin yan gruplarının UV ve floresans özellikleri kullanılarak elde edilen misellerin spektroskopik özellikleri değerlendirildi. Distile su içerisinde çekilen UV spektrumunda görüldüğü gibi (Şekil 4.17) 255 nm’de maksimum absorpsiyon gözlemlendi. Oligonükleotit miktarının çok az olması nedeniyle tam bir değerlendirme yapılamamış olsa da 300-350 nm arasında gözlenen kuyruk absorpsiyonunun PKMA_tBA kopolimerinde bulunan kumarin yan gruplarından olduğu düşünüldü. Bir diğer spektroskopik tanımlama floresans ölçümü

ile gerçekleştirildi (Şekil 4.18). UV spektrumuna göre daha belirgin bir sonuç gözlemlendi. Distile su içindeki floresans ölçümleri, uyarma dalga boyu 310 nm seçilerek gerçekleştirildi ve floresans yayılım spektrumunun absorpsiyon spektrumuna benzer olduğu görüldü. KMA monomerinin floresans spektrumu (Şekil 4.3) ile benzerlik göstermesi yapının kumarin içermekte olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi.

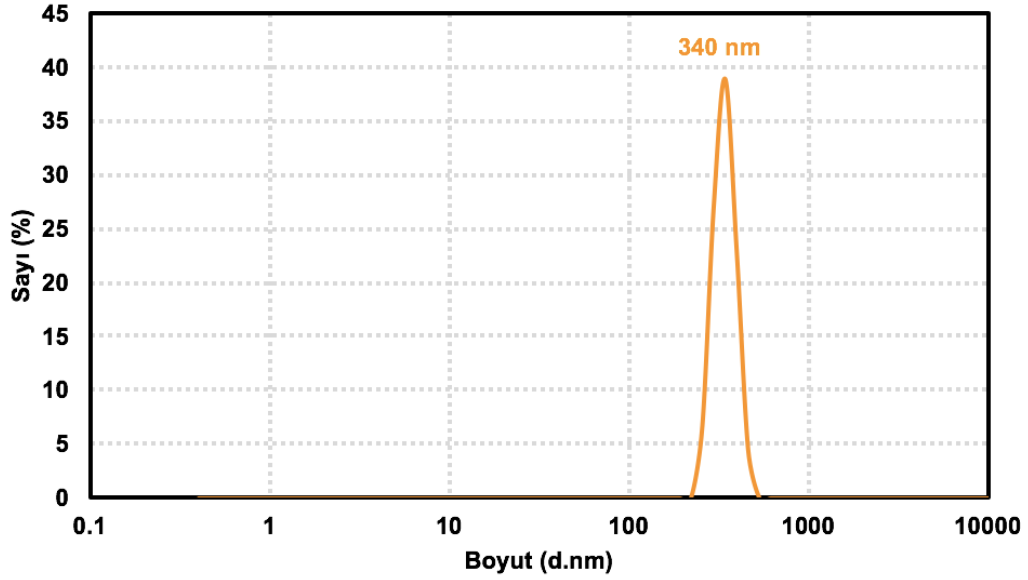


Şekil 4.17 : OLN-PKMAAtBA [0.1 mg/mL] konjugatının su içindeki UV spektrumu.



Şekil 4.18 : OLN-PKMAAtBA [0.1 mg/mL] konjugatının su içindeki floresans spektrumu.

Son olarak elde edilen misellerin partikül boyutları DLS ile ölçüldü (Şekil 4.19). Ortalama partikül boyutu 340 nm olarak bulunan OLN-PKMA_tBA konjugatının literatürde bulunan benzer çalışmalardaki [34] sonuçlara göre daha büyük olmasının kullanılan kopolimerin hidrofobik özelliğinin fazla olmasından kaynaklandığı düşünüldü.



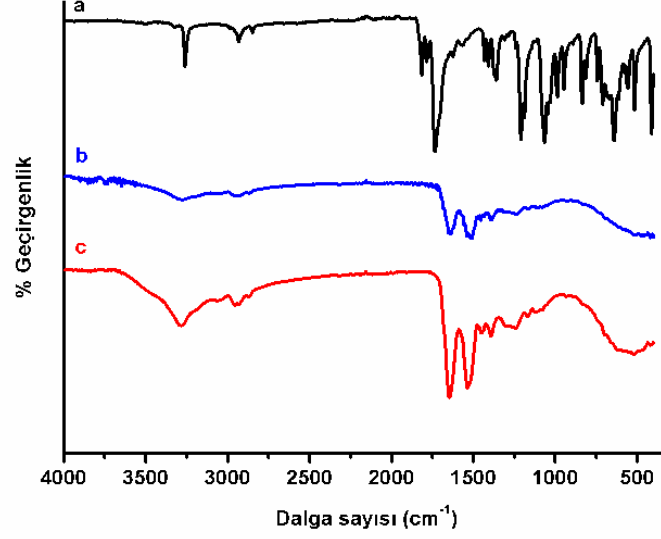
Şekil 4.19 : OLN-PKMA_tBA konjugatı ile oluşturulan miselin DLS grafiği.

4.7 BSA-PKMA_tBA Konjugatının Karakterizasyonu

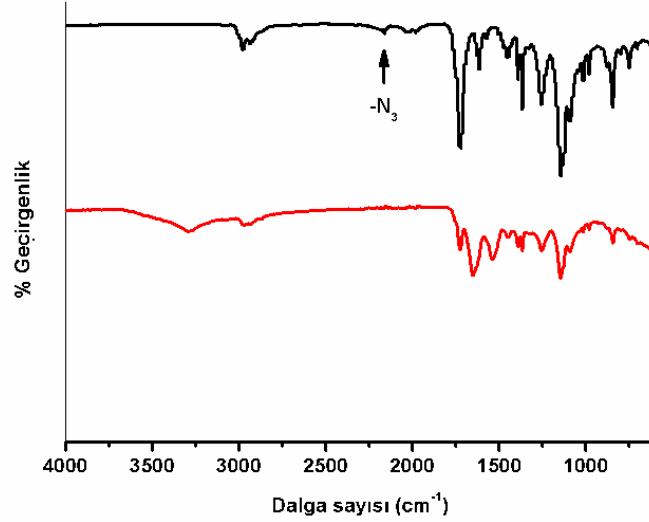
Çalışmanın bu kısmında, temin edilmesi daha kolay olan bir protein (sığır serum albumini (BSA)) kullanılarak benzer şekilde konjugasyon yapıldı. Öncelikle BSA *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit ile reaksiyona sokuldu ve sonrasında PKMA_tBA kopolimeri “click” reaksiyonu vasıtasıyla BSA’ya konjuge edildi.

Şekil 4.20’de *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit, BSA ve BSA-*N*-(4-pentinoiloksi)süksinimitin FT-IR spektrumları karşılaştırıldı. *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit ile fonksiyonlandırılmış BSA’nın FT-IR spektrumundan görüldüğü üzere 1800 cm⁻¹’de gözlenen süksinimit karbonillerine ait bant ortadan kaybolmakta ve 3300 cm⁻¹’de yeni oluşan amit bağlarının –NH gerilim titreşimleri ortaya çıkmaktadır. Şekil 4.21’de ise BSA-PKMA_tBA konjugatının FT-IR spektrumu başlangıç PKMA_tBA kopolimeri ile karşılaştırıldı. PKMA_tBA kopolimerinin ucunda bulunan -N₃ fonksiyonu zayıf da olsa FT-IR spektrumunda 2100 cm⁻¹ civarında gözlemlendi. Konjugasyon sonrasında azit pikinin kaybolması ve

3300 cm^{-1} 'de gözlenen amit bağlarından kaynaklanan $-\text{NH}$ gerilim titreşimleri konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi.



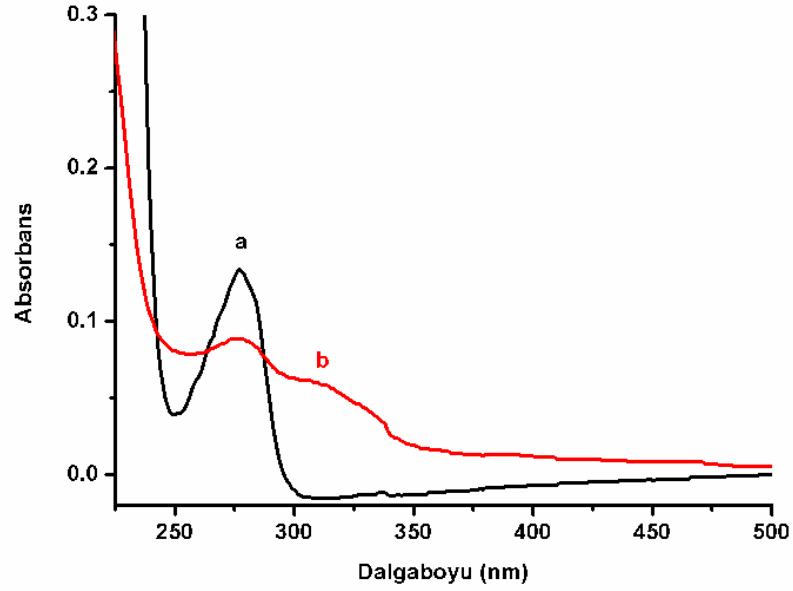
Şekil 4.20 : a) *N*-(4-pentinoiloksi)süksinimit, b) BSA ve c) BSA-*N*-(4-pentinoiloksi)süksinimitin FT-IR spektrumları.



Şekil 4.21 : a) PKMATBA kopolimerinin ve b) BSA-PKMATBA konjugatının FT-IR spektrumları.

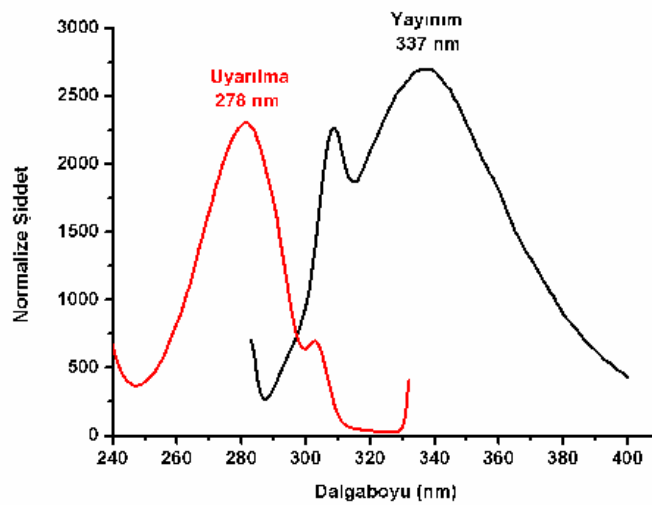
BSA-PKMATBA konjugasyonu UV ve floresans spektroskopisi ile de tespit edilmeye çalışıldı. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi BSA-PKMATBA konjugatının suda çekilmiş olan UV spektrumunda kumarine ait olan absorpsiyon 300-350 nm arasında belirgin bir şekilde gözlemlendi. OLN ile gerçekleştirilen konjugata oranla çok daha iyi bir sonuç

elde edilmesinin nedeni BSA'da çok sayıda lizin (-N uç grubu) olması ve dolayısıyla kopolimer ile farklı oranlarda konjugasyon yapılmasıdır.

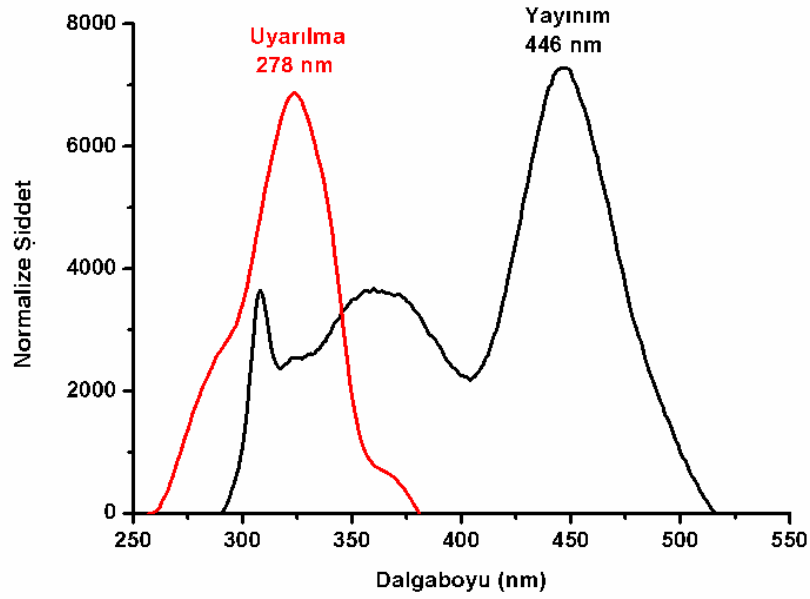


Şekil 4.22 : a) BSA [0.5 mg/mL] ve b) BSA-PKMAAtBA [0.5 mg/mL] su içindeki UV spektrumu.

BSA'nın ve BSA-PKMAAtBA konjugatının su içerisinde çekilmiş floresans spektrumları karşılaştırıldığında 278 nm dalga boyunda uyarıldığında konjugatın kumarin yan gruplarından kaynaklı bir floresans spektrumu verdiği ve 446 nm'de yayılım verdiği gözlemlendi (Şekil 4.23 ve 4.24).

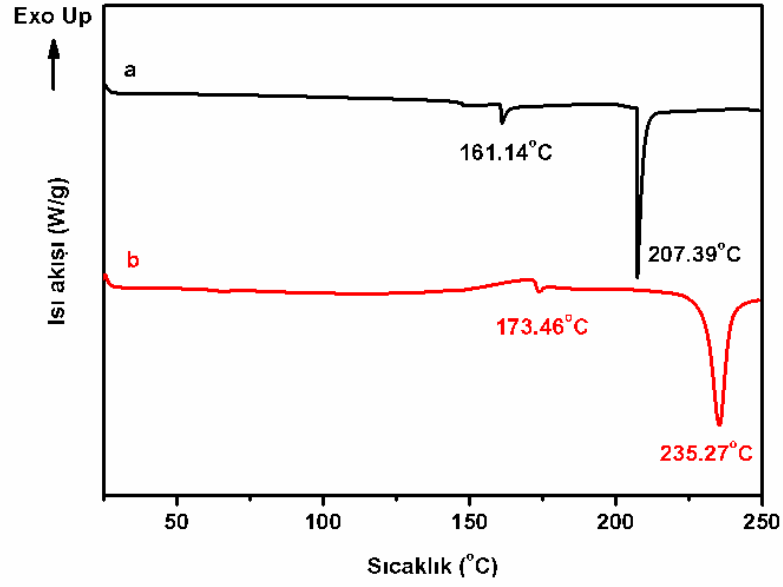


Şekil 4.23 : BSA'nın [0.005 mg/mL] su içindeki floresans spektrumu.

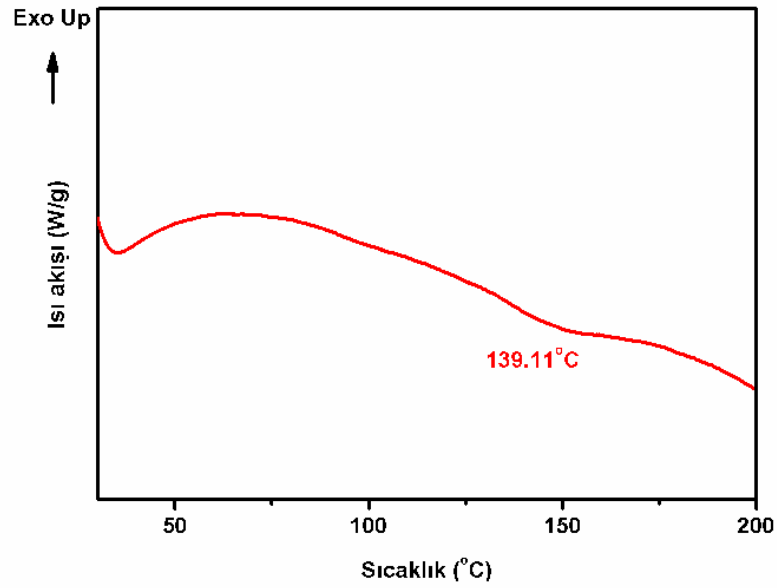


Şekil 4.24 : BSA-PKMAAtBA [0.005 mg/mL] konjugatının su içindeki floresans spektrumu.

Elde edilen BSA-PKMAAtBA konjugatlarının termal davranışları diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile araştırıldı ve BSA ile karşılaştırıldı (Şekil 4.25-4.28). BSA'nın camısı geçiş sıcaklığı (T_g) 161.14 °C ve erime sıcaklığı (T_m) 207.39 °C olarak ölçüldü [35]. BSA ile PKMAAtBA kopolimerinin konjugasyonu sonucunda T_g 'nin 173.46 °C'ye ve T_m 'in 235.27 °C'ye kaydığı gözlemlendi. İkinci ısıtmada BSA-PKMAAtBA konjugatının T_m gözlenmezken 139.11 °C'de konjugata ait T_g ölçülmüştür (Şekil 4.26).

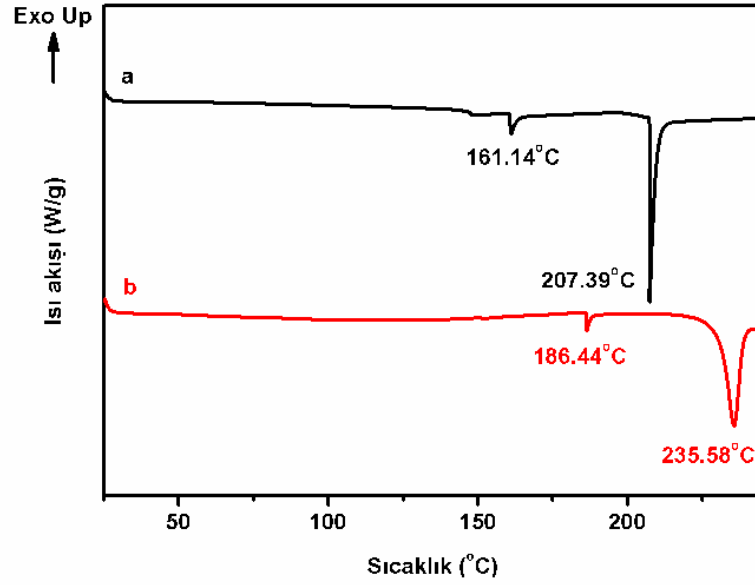


Şekil 4.25 : a) BSA ve b) BSA-PKMAAtBA (BSA: PKMAAtBA= 1:20) konjugatının DSC termogramı.

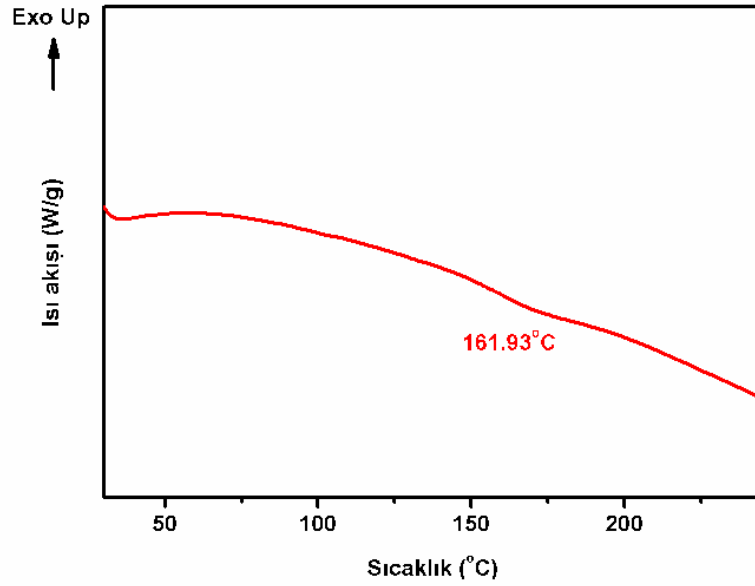


Şekil 4.26 : BSA-PKMAAtBA (BSA: PKMAAtBA= 1:20) konjugatının ikinci ısıtma sonucunda elde edilen DSC termogramı.

Benzer şekilde BSA ile PKMAAtBA kopolimerinin BSA: PKMAAtBA= 1:10 oranında konjugasyonu sonucunda T_g ve T_m 'in sırasıyla 186.44°C ve 235.58°C 'ye kaydığı gözlemlendi (Şekil 4.27). İkinci ısıtmada T_m gözlenmezken 161.93°C 'de konjugata ait T_g ölçülmüştür (Şekil 4.28).



Şekil 4.27 : a) BSA ve b) BSA-PKMAAtBA (BSA: PKMAAtBA= 1:10) konjugatının DSC termogramı.

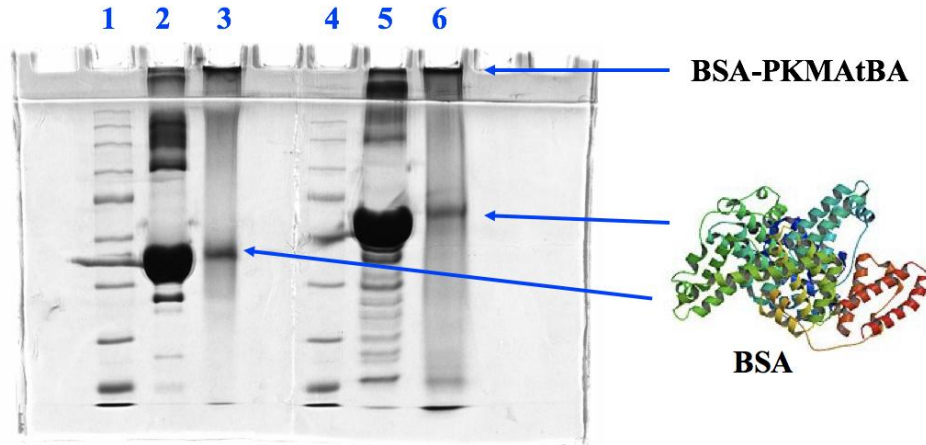


Şekil 4.28 : BSA-PKMAAtBA (BSA: PKMAAtBA= 1:10) konjugatının ikinci ısıtma sonucunda elde edilen DSC termogramı.

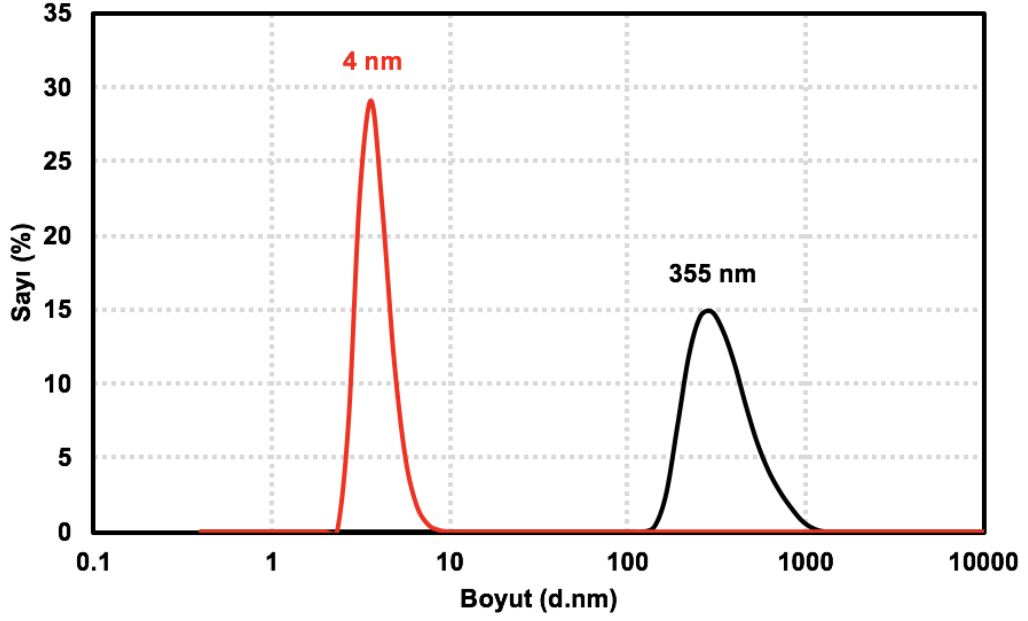
Daha sonra, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile BSA-PKMAAtBA konjugatlarının oluşumu araştırıldı (Şekil 4.29). BSA-PKMAAtB konjugatının amfifilitesinin miselin difüzyonunu önlediği ve dolayısı ile sadece kuyuda görüldüğü tespit edildi. Daha önce hidrofobik polimerlerle oluşturulan BSA

konjugatlarının jel elektroforez çalışmalarında benzer sonuçlar olduğu literatür verileri ile desteklenmektedir [36]. Şerit 3 ve 6'daki kalan BSA bandının aynı şeritlerin başlangıç BSA bantları ile yoğunluğu karşılaştırıldığında, BSA'nın yaklaşık %60'ının PKMatBA kopolimerine konjuge edildiği düşünülmektedir.

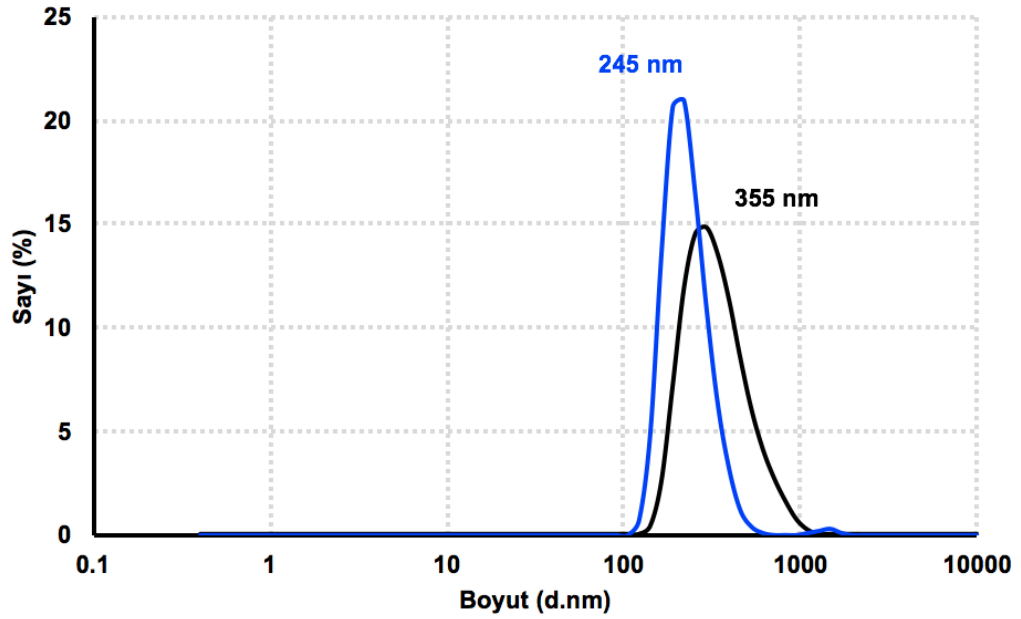
Elde edilen BSA-PKMatBA konjugatının partikül boyutu DLS ile ölçülerek BSA'nın partikül boyutu ile karşılaştırıldı (Şekil 4.30). BSA: PKMatBA= 1:20 oranında yapılan konjugasyon sonucunda elde edilen konjugat ile oluşturulan miselin partikül boyutu 355 nm olarak ölçüldü. Literatürde bulunan hidrofobik polimerler ve BSA ile oluşturulan konjugatlarda yine benzer sonuçlar bulunduğu tespit edildi [37]. Kullanılan BSA: PKMatBA= 1:20 oranı 1:10 olarak değiştirildiğinde hidrofobik grupların azalması sonucunda elde edilen miselin partikül boyutunun da azalarak 245 nm'ye düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.29 : Coomassie mavi boyaması ile görselleştirilen SDS-PAGE (şerit 1: protein işaretleyici; şerit 2: BSA indirgeyici olmayan koşullar; şerit 3: BSA-PKMatBA konjugat indirgeyici olmayan koşullar; şerit 4: protein işaretleyici, şerit 5: BSA indirgeyici koşullar, şerit 6: BSA-PKMatBA konjugat indirgeyici koşullar.



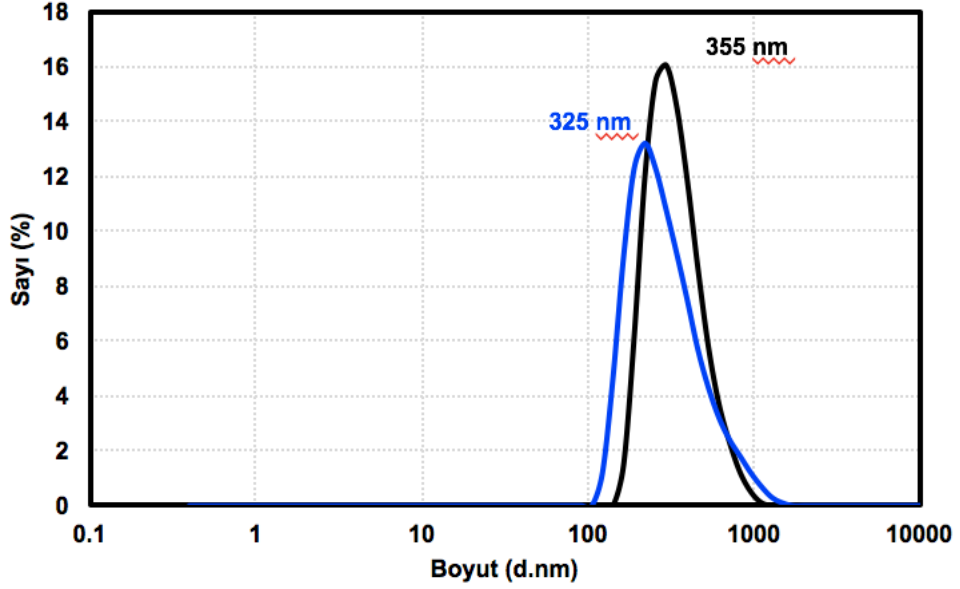
Şekil 4.30 : BSA (—) ve BSA-PKMA_tBA-1 (—) misellerinin DLS ölçümleri.



Şekil 4.31 : BSA: PKMA_tBA= 1:20 (—) ve 1:10 (—) oranında oluşturulan BSA-PKMA_tBA konjugatları ile hazırlanan misellerin DLS ölçümleri.

Son olarak, BSA: PKMA_tBA= 1:20 oranı ile oluşturulan BSA-PKMA_tBA konjugatı kullanılarak elde edilen miselin DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımının ışığa-duyarlı özelliği vasıtasıyla aydınlatılması sonucunda değişip değişmediği incelendi (Şekil 4.32). 350 nm’de 1 saat aydınlatılan miselin partikül boyutunun 355 nm’den

325 nm'ye düştüğü gözlemlendi. Partikül boyutu dağılımında görülen bu az miktardaki farkın, kopolimerdeki kumarin yan gruplarının tBA gruplarına oranla düşük olmasından (1:9) kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.32 : BSA- PKMA_tBA (BSA: PKMA_tBA= 1:20) konjugatı ile oluşturulan miselin (—) ve 350 nm'de 1 saat aydınlatılmış miselin (—) DLS ölçümleri.

BSA, BSA: PKMA_tBA= 1:20 ve 1:10 oranı ile oluşturulan BSA-PKMA_tBA konjugatlarının zeta potansiyelleri de karşılaştırıldı (Tablo 4.2). Elde edilen sonuçlara göre BSA: PKMA_tBA= 1:10 oranı ile oluşturulan BSA-PKMA_tBA konjugatının zeta potansiyelinin BSA: PKMA_tBA= 1:20 oranı ile oluşturulan konjugatınkine göre azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun, polimerin konjugat içerisindeki oranının azalması ile zeta potansiyelinin serbest BSA'nın zeta potansiyeline yaklaşmasından kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.2 : BSA, BSA-PKMA_tBA (1:20) ve BSA-PKMA_tBA (1:10) zeta potansiyelleri.

Örnek	Zeta Potansiyel
BSA	-39,7
BSA-PKMA _t BA (1:20)	-23,2
BSA-PKMA _t BA (1:10)	-29,2

5. SONUÇ

Sonuç olarak, kumarin içeren KMA monomeri başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve ATRP yöntemiyle t-BA monomeri ile kopolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kopolimer GPC ile karakterize edilmiş, ¹H NMR ile de yapıları aydınlatılmıştır. Polimerin fotoaktif bir grup olan kumarin içermesinden kaynaklanan ışığa-duyarlılık özelliği yapılan UV ve floresans ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

“Click” reaksiyonu kullanılarak, elde edilen PKMA_tBA polimerinin daha önce fonksiyonlandırılmış olan oligonükleotit zinciri ve BSA proteini ile konjugasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu konjugatların fotofiziksel özellikleri UV ve floresans spektroskopileri ile incelenmiştir. DSC ile polimerin ve BSA-PKMA_tBA konjugatının termokimyasal davranışları belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen konjugatların yapıları FT-IR yöntemi ile karakterize edilmiştir.

BSA-PKMA_tBA konjugatlarının miselleri diyaliz membran yöntemiyle oluşturulmuş ve bu misellerin boyutları DLS ile ölçülmüştür. Misellerin 350 nm dalga boyundaki UV ışık altında aydınlatılması sonucu parçacık boyutları tekrar ölçülerek boyutlardaki değişiklikler incelenmiştir.

Bu çalışma ile sentezlenen ışığa-duyarlı konjugatların içerisine hidrofobik kanser ilaçları yüklenerek akıllı ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulabileceği ve etkilerinin *in vitro* çalışmalarla incelenebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Edwardson, T. G., Carneiro, K. M., Serpell, C. J. ve Sleiman, H. F.** (2014). An efficient and modular route to sequence-defined polymers appended to DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(18), 4567-4571.
- [2] **Jones, M.-C. ve Leroux, J.-C.** (1999). Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 48(2), 101-111.
- [3] **Torchilin, V. P.** (2007). Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24(1), 1.
- [4] **Peterson, A. M. ve Heemstra, J. M.** (2015). Controlling self-assembly of DNA-polymer conjugates for applications in imaging and drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(3), 282-297.
- [5] **Schnitzler, T. ve Herrmann, A.** (2012). DNA block copolymers: functional materials for nanoscience and biomedicine. *Accounts of chemical research*, 45(9), 1419-1430.
- [6] **Zhao, W., Liu, F., Chen, Y., Bai, J. ve Gao, W.** (2015). Synthesis of well-defined protein–polymer conjugates for biomedicine. *Polymer*, 66, A1-A10.
- [7] **Ito, Y., Kawabata, S., Niwa, M., Okamura, S., Ranby, B., Sakurada, Y., ve ark.** (2012). *Macromolecular concept and strategy for humanity in science, technology and industry*. Springer Science & Business Media.
- [8] **Bovey, F.** (2012). *Chain structure and conformation of macromolecules*. Elsevier.
- [9] **Gordon, M.** (1978). *Macromolecules*, volume 1, structure and properties; volume 2, synthesis and materials: HG Elias (Trsl. JW Stafford) Plenum Press, New York and London, 1977, 1121 pp. \$47.40. Elsevier; s.
- [10] **Ghosh, P.** (2001). *Polymer Science and Technology: Plastics, Rubbers, Blends and Composites*. Tata McGraw-Hill.
- [11] **Cascone, M. G., Sim, B. ve Sandra, D.** (1995). Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials*, 16(7), 569-574.
- [12] **D'Souza, M. J.** (2015). *Nanoparticulate Vaccine Delivery Systems*. Pan Stanford Publishing.
- [13] **John, M. J., Thomas, S. ve Chemistry, R. S. o.** (2012). *Natural Polymers: Composites*. Royal Society of Chemistry.
- [14] **Wilks, T. R. ve Chemistry, U. o. W. D. o.** (2013). *Synthesis of DNA-polymer Conjugates Using RAFT Polymerisation*. University of Warwick.

- [15] **Kurreck, J.** (2008). *Therapeutic Oligonucleotides*. Royal Society of Chemistry.
- [16] **Jiang, Y. ve Stenzel, M.** (2016). Drug delivery vehicles based on albumin–polymer conjugates. *Macromolecular bioscience*, 16(6), 791-802.
- [17] **Su, W. F.** (2013). *Principles of Polymer Design and Synthesis*. Springer Berlin Heidelberg.
- [18] **Mishra, V. ve Kumar, R.** (2012). Living radical polymerization: A review. *J Sci Res*, 56, 141-176.
- [19] **Cobo, I., Li, M., Sumerlin, B. S. ve Perrier, S.** (2015). Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. *Nature materials*, 14(2), 143.
- [20] **Arseneault, M., Wafer, C. ve Morin, J.-F.** (2015). Recent advances in click chemistry applied to dendrimer synthesis. *Molecules*, 20(5), 9263-9294.
- [21] **Lowe, A. B.** (2010). Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry*, 1(1), 17-36.
- [22] **Adzima, B. J., Tao, Y., Kloxin, C. J., DeForest, C. A., Anseth, K. S. ve Bowman, C. N.** (2011). Spatial and temporal control of the alkyne–azide cycloaddition by photoinitiated Cu (II) reduction. *Nature Chemistry*, 3(3), 256-259.
- [23] **Tasdelen, M. A. ve Yagci, Y.** (2010). Light-induced copper (I)-catalyzed click chemistry. *Tetrahedron Letters*, 51(52), 6945-6947.
- [24] **Hein, J. E. ve Fokin, V. V.** (2010). Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1302-1315.
- [25] **Singh, M. S., Chowdhury, S. ve Koley, S.** (2016). Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron*, 72(35), 5257-5283.
- [26] **Herner, A. ve Lin, Q.** (2016). Photo-triggered click chemistry for biological applications. *Topics in Current Chemistry*, 374(1), 1.
- [27] **Grover, G. N. ve Maynard, H. D.** (2010). Protein–polymer conjugates: synthetic approaches by controlled radical polymerizations and interesting applications. *Current opinion in chemical biology*, 14(6), 818-827.
- [28] **Franco García, M. L., Valle Mendoza, L. J. d. ve Puiggali Bellalta, J.** (2016). Smart systems related to polypeptide sequences. *AIMS Materials Science*, 3(1), 289-323.
- [29] **Kedracki, D., Safir, I., Gour, N., Ngo, K. X. ve Vebert-Nardin, C.** (2012). DNA–polymer conjugates: from synthesis, through complex formation and self-assembly to applications. *Bio-synthetic Polymer Conjugates* ss. 115-149): Springer.
- [30] **Kim, C.-J., Hu, X. ve Park, S.-J.** (2016). Multimodal Shape Transformation of Dual-Responsive DNA Block Copolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 138(45), 14941-14947.
- [31] **An, F.-F. ve Zhang, X.-H.** (2017). Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. *Theranostics*, 7(15), 3667.
- [32] **Venkatesan, S., Ranjithkumar, B., Shanmugam, R. ve Basha, K.** (2014). *Synthesis, characterization, thermal stability and antibacterial activity of coumarin based methacrylate copolymers*.

- [33] **Pan, P., Fujita, M., Ooi, W.-Y., Sudesh, K., Takarada, T., Goto, A., ve ark.** (2011). DNA-functionalized thermoresponsive bioconjugates synthesized via ATRP and click chemistry. *Polymer*, 52(4), 895-900.
- [34] **Choi, K.-m., Kwon, I. C. ve Ahn, H. J.** (2013). Self-assembled amphiphilic DNA-cholesterol/DNA-peptide hybrid duplexes with liposome-like structure for doxorubicin delivery. *Biomaterials*, 34(16), 4183-4190.
- [35] **Hsieh, S.-R., Reddy, M. P., Chang, C.-J., Kumar, A., Wu, W.-C. ve Lin, H.-Y.** (2016). Exploring the Behavior of Bovine Serum Albumin in Response to Changes in the Chemical Composition of Responsive Polymers: Experimental and Simulation Studies. *Polymers*, 8(6).
- [36] **Jiang, Y., Lu, H., Dag, A., Hart-Smith, G. ve Stenzel, M. H.** (2016). Albumin-polymer conjugate nanoparticles and their interactions with prostate cancer cells in 2D and 3D culture: comparison between PMMA and PCL. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(11), 2017-2027.
- [37] **Liu, Z., Dong, C., Wang, X., Wang, H., Li, W., Tan, J., ve ark.** (2014). Self-Assembled Biodegradable Protein-Polymer Vesicle as a Tumor-Targeted Nanocarrier. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(4), 2393-2400.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : İrem Akar
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.10.1991-Fatih
E-posta : irem.akarr@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Akar I., Temel BA., "Synthesis, Characterization and Micelle Formation Behavior of Light-Responsive DNA-Polymer Conjugates", *European Biotechnology Congress 2018*, Atina, Yunanistan, 26-28 Nisan 2018.