

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TETRAZİN FONKSİYONLU POLİMERLERİN DOĞRUDAN
HAZIRLANMASI ve BU POLİMERLERİN YÜKSEK HIZLI
BİYOORTOGONAL REAKSİYONDA ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Sinem SİPAHİOĞLU KARA

DOKTORA TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ

Ağustos, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TETRAZİN FONKSİYONLU POLİMERLERİN DOĞRUDAN
HAZIRLANMASI ve BU POLİMERLERİN YÜKSEK HIZLI
BİYOORTOGONAL REAKSİYONLARDA ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Sinem SİPAHİOĞLU KARA tarafından hazırlanan tez çalışması 02/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ, Danışman
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nergis ARSU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL, Üye
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe A. CANPOLAT, Üye
Gebze Teknik Üniversitesi



Danışmanım Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Tetrazin Fonksiyonlu Polimerlerin Doğrudan Hazırlanması ve Bu Polimerlerin Yüksek Hızlı Biyoortogonal Reaksiyonlarda Etkinliğinin İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim

Sinem SİPAHİOĞLU KARA

İmza

Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'nın 214M175 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

babama,

TEŞEKKÜR

Öncelikle, beni de çalışma grubuna dâhil ederek her türlü imkânı sağlayan, doktora tez çalışmamın araştırması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi derinliği ile her zaman destek olan, titizlikle emek veren, bilimsel bakış açısı kazandıran, göstermiş olduğu sabır ve anlayışıyla bir pusula gibi yolumu bulmamı sağlayan, örnek aldığım değerli danışmanım sayın Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ'nin desteği olmadan asla doktora tezimi tamamlayamayacağımı belirterek kendisine teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Nergis ARSU ve Doç. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım Kahveci Araştırma Grubu'nun şuan aramızda olan ve olamayan üyelerinden Arş. Gör. Gözde DEVECİ, Mustafa Yasin ATEŞ, Ahmet ÇETİNKAYA ve Gülşah BAKIRDÖĞEN'e katkılarından, Elif KAHVECİ ve Sevinç GÜLYÜZ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatımda olduğu gibi doktora eğitimim süresince de evde uygun ders çalışma ortamını sağlamak için çaba sarf eden ve beni sürekli cesaretlendiren annem Suzan SİPAHİOĞLU'na, bazen her şeyi çokta kafaya takmayıp akışına bırakmak gerektiğini öğreten sevgili kardeşim Semih SİPAHİOĞLU'na teşekkür ederim.

Şartlar ne olursa olsun gelecek için umutlu olmamı sağlayan, yıllardır bitmeyen desteği ile hayallerimin peşinden koşarken benim yanımda olan sabırlı ve anlayışlı eşim Yusuf KARA'ya teşekkür ederim.

Sinem SİPAHİOĞLU KARA

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xxi
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	5
1.3 Hipotez	6
2 Teorik Kısım	9
2.1 Click Kimyası	9
2.1.1 Siklokatılma <i>Click</i> Reaksiyonları	11
2.1.2 Tiol Tabanlı Click Reaksiyonları	14
2.2 Diels-Alder Reaksiyonları	16
2.2.1 Diels-Alder Reaksiyonunun Avantajları	19
2.2.2 Diels-Alder Reaksiyonunun Farmasötik ve Biyomedikal Uygulamaları	20
2.3 Tetrazin Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder Reaksiyonu	22
2.3.1 Tetrazinler	22
2.3.2 İEDDA Reaksiyonunun Mekanizması	23
2.3.3 İEDDA Reaksiyonlarının Elektronik Özellikleri	24
2.3.4 Tetrazin Türevlerinin Sentezi	25
2.3.5 Biyolojik Sistemlerde İEDDA Reaksiyonunun Seçilmiş Uygulamaları	28
2.4 Biyoortogonal Yaklaşımlar	29
2.5 Polimerizasyon Yöntemleri	31
2.5.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu (FRP)	31
2.5.2 Serbest Radikal Polimerizasyonunun Basit Mekanizması	32
2.5.3 Kontrollü/ "Yaşayan" Radikal Polimerizasyonu (CLRP)	36
2.5.4 Nitroksit Aracılı Polimerizasyonu (NMP)	40
2.5.5 Tersinir Katılma-Ayrılma Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu	42
2.5.6 Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)	44
2.5.7 ATRP'nin Mekanizması	48
3 Gereç ve Yöntemler	52
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	52
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	52
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	53

3.2 Öncül Moleküllerin Sentezleri.....	54
3.2.1 <i>Tert</i> -bütil4-siyanobenzilkarbamat Sentezi.....	54
3.2.2 2-bromo- <i>N</i> -(4-siyanobenzil) bütanamide Sentezi.....	55
3.2.3 Poli(etilen glikol) (PEG)-Norbornen (NB) Sentezi	55
3.2.4 <i>Trans</i> -siklooktenol (TCO) ve Türevlerinin Sentezi	56
3.2.5 (E)-Sikookt-4-enil 2,5-diokso-1-pirolidinil karbonat (TCO-NHS) Sentezi.....	57
3.3 Polimer Sentezi ve Tetrazin ile Modifikasyonun Sentezi	58
3.3.1 ATRP Nitril Uç Gruplu Poli(poli(etilen glikol)metil eter metakrilat) (PoliPEGMA-CN) Sentezi	58
3.3.2 PPEGMA-CN'nin Uç Grubunun Tetrazine Dönüştürülmesi	60
3.3.3 ATRP ile Poli(metilmetakrilat-co-akrilonitril) [P(MMA ₈ -coAN ₂).....	61
3.3.4 P(MMA ₈ -co-AN ₂) Polimerinin Yan Nitril Gruplarının Tetrazine Dönüştürülmesi	62
3.3.5 Tetrazin Fonksiyonlu P(MMA ₉ -co-AN ₁ -co-TzBoc)	63
3.3.6 P(<i>N</i> -isopropilakrilamid-co-akrilonitril) Sentezi.....	64
3.3.7 P(NIPAAm-co-AN) Üzerine Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezi	64
3.3.8 ATRP ile P(poli(etilen glikol) metiletermetakrilat-co-akrilonitril) (P(PEGMA-co-AN)) Sentezi	65
3.3.9 P(PEGMA-co-AN) Üzerine Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezi	66
3.4 Polimerler Üzerindeki Tetrazinler ile İEDDA Reaksiyonu	67
3.5 Tetrazin Fonksiyonlu Polimerlerin Absorbans-Sıcaklık Değişimi..	70
4 Bulgular.....	71
4.1 Öncül Moleküllerin Sentezleri ve Karakterizasyonları	71
4.1.1 <i>Tert</i> -bütil4-siyanobenzilkarbamat Sentezi ve Karakterizasyonu.....	71
4.1.2 2-bromo- <i>N</i> -(4-siyanobenzil)bütanamid Sentezi ve Karakterizasyonu.....	72
4.1.3 Poli(etilen glikol)-Norbornen (PEG-NB) Sentezi ve Karakterizasyonu.....	72
4.2 <i>Trans</i> -siklookten (TCO) ve Türevleri Sentezi ve Karakterizasyonu	73
4.2.1 <i>Trans</i> -siklookten (TCO) Sentezi ve Karakterizasyonu	73
4.2.2 (E)-Sikookt-4-enil2,5-diokso-1-pirolidinilkarbonat (TCO-NHS) Sentezi ve Karakterizasyonu	74
4.3 Fonksiyonel Polimerlerin Sentezleri	75
4.3.1 Nitril Uç Gruplu Poli(poli(etilen glikol) metileter metakrilat) (PPEGMA-CN) Sentezi ve Karakterizasyonu	75
4.3.2 PPEGMA-CN'nin Uç Grubunda Direkt Tetrazin Sentezinin Araştırılması	78
4.3.3 Poli(metilmetakrilat-co-akrilonitril)P(MMA ₈ -co-AN ₂) Sentezi ve Karakterizasyonu	79

4.3.4 Tetrazin fonksiyonlu P(MMA-co-AN-co-TzCOOH) ve Tetrazin fonksiyonlu P(MMA-co-AN-co-TzBoc) Sentezi ve Karakterizasyonu	80
4.3.5 Poli(N-isopropilakrilamid-co-akrilonitril) Sentezi ve Karakterizasyonu	81
4.3.6 P(NIPAAm-co-AN) Üzerinde Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	82
4.3.7 ATRP ile P(PEGMA-co-AN) Sentezi ve Karakterizasyonu...	86
4.3.2 P(PEGMA-co-AN) Üzerinde Direkt Olarak Tetrazin Gruplarının Elde Edilmesi.....	87
4.4 Polimerler Üzerinde Tetrazinler ile İEDDA Reaksiyonu	89
4.5 Fonksiyonel p(NIPAAm-co-AN) Esaslı Polimerlerin Sıcaklık Değişimiyle Davranışlarının İncelenmesi.....	96
5 Sonuç ve Öneriler.....	97
Kaynakça	102
Tezden Üretilmiş Yayınlar.....	123

SİMGE LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	Gram
kDa	Kilodalton
M	Molarite
mg	Miligram
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
mm	milimetre
Mol	Mol
nm	Nanometre
ΔH^0	Entalpi değişimi

KISALTMA LİSTESİ

AGET	Elektron Transferi ile Üretilen Katalizörler
AIBN	2,2'-azo-bis-izobutironitril
AN	Akrilonitril
ARGET	Elektron Transferi ile Yeniden Üretilen Katalizörler
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
BPO	Benzoil peroksit
CH ₂ Cl ₂	Diklorometan
CLRP	Kontrollü /“Yaşayan” Radikal Polimerizasyonu
CSIRO	Commonwealth Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Organizasyonu
CTA	Zincir Transfer Ajanı
CuAAC	Bakır Katalizli Azid-Alkin Siklokatalizasyon Reaksiyonu
CuBr	Bakır (I) bromür
CuCl	Bakır (I) klorür
DA	Diels-Alder
DCC	N, N'-disikloheksilkarbodiimid
DCM	Diklorometan
DMAP	4-(dimetilamino) piridin
DMF	Dimetil formamid
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DSC	N,N'-disüksinimidil karbonat
EBP	Etil 2-bromopropionat
ECM	Hücre Dışı Matris
EDG	Elektron Verici Grup
EWG	Fronter Molekül Orbitali
FRP	Serbest Radikal Polimerizasyon
FTIR	Fouier Transform Infrared Spektroskopisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
N ₂ H ₄	Hidrazin monohidrat
HUMO	En Yüksek Dolu Molekül Orbitali

ICAR	Sürekli Aktivasyon Yenilemek için Başlatıcılar
iEDDA	Ters elektron gereksinimli Diels-Alder
CHCl ₃	Kloroform
LUMO	En Düşük Boş (Kullanılmayan) Molekül Orbitali
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MMA	Metil metakrilat
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
DMF	N,N-dimetilformamid
N ₂	Nitrojen
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NB	Norbornen
NIPAAm	N-izopropilakrilamid
Ni(OTf) ₂	Nikel trifloro metan sülfonat
NMP	Nitroksit Aracılı Polimerizasyonu
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCl ₅	Fosfor Pentaklorür
PDI	Polimerin Moleküler Ağırlık Dağılımı
PEG	Poli(etilen glikol)
PEGMA	Poli(etilen glikol) metil eter metakrilat
PLA	Poli(L-Laktid) asit
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -Penta metil dietilen triamin
PMMA	Poli(metil metakrilat)
PRE	Kalıcı Radikal Etkisi
Q-TOF	Uçuş zamanlı Kütle Spektroskopisi
RAFT	Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi Polimerizasyonu
rDA	Retro-Diels-Alder
RI	Kırılma İndisi
SG1	N-tert-butil-N- [1-dietilfosfono- (2,2-dimetilpropil)] nitroksit
S _N Ar	Nükleofilik Aromatik Sübstitüsyon
NaNO ₂	Sodyum nitrit
SPAAC	Gergin Halkalı Azid-Alkin Siklokatılma

TCO	<i>Trans</i> -Siklookten
TCO-NHS	<i>Trans</i> -5-hidroksi sikloostenin süksinimidil ester
TEMPO	2,2,6,6- tetrametilpiperidinil-1-oksi
THF	Tetrahidrofur
TIPNO	2,2,5-trimetil-4-fenil3-azaheksan-3-oksil nitroksit
Tz	Tetrazin
UV-Vis	Morötesi Görünür Bölge
Zn(OTf) ₂	Çinko trifloro metan sülfonat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Diels-Alder / Retro Diels-Alder reaksiyonlarının genel mekanizması.	1
Şekil 1.2	iEDDA reaksiyon şeması	2
Şekil 1.3	Lewis asidi katalizörlü asimetrik tetrazin sentezi ve bazı tetrazin molekülleri	3
Şekil 1.4	Tetrazin- <i>trans</i> -siklookten Diels-Alder reaksiyonu	6
Şekil 1.5	Karboksilikasit fonksiyonlu tetrazini hazırlamak için sentez yöntemi	7
Şekil 1.6	A. Yan gruplarında nitril grubu içeren polimerlerinin B. Nitril uç fonksiyonlu polimerlerin direkt polimer üzerinde tetrazin grupları sentezi.....	8
Şekil 2.1	Alken ve Azid arasındaki Huisgen 1,3-dipolar siklokatılma.....	11
Şekil 2.2	CuAAC <i>click</i> reaksiyonu	12
Şekil 2.3	SPAAC <i>click</i> reaksiyonu için bir örnek	13
Şekil 2.4	$h\nu$ ya da bir radikal başlatıcının varlığında bir C=C bağının hidrotiyollasyonu.....	16
Şekil 2.5	A) Normal elektron talepli Diels-Alder (DA) reaksiyonu, B) hetero-DA reaksiyonu ve C) ters elektron gereksinimli DA reaksiyonu	17
Şekil 2.6	Farmasötik ve biyomedikal mühendisliğinde DA reaksiyonunun bazı uygulamaları	21
Şekil 2.7	Normal Diels – Alder ve Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (iEDDA) reaksiyonlarının genel mekanizması.....	23
Şekil 2.8	Dienofil ve tetrazin arasındaki iEDDA reaksiyonun mekanizmasının şematik gösterimi	24
Şekil 2.9	Normal ve ters elektron gereksinimli Diels-Alder reaksiyonunun sınır molekülleri orbitali	25
Şekil 2.10	a) imidoesterler, b) nitriler, c) akilhidrazinler ve d) nükleofilik aromatik ikame kullanılarak tetrazinler için klasik sentez metotları	27
Şekil 2.11	Tetrazin- <i>trans</i> -siklookten reaksiyonlarının kullanıldığı örnek uygulamalar	29
Şekil 2.12	Serbest radikal polimerizasyonun genel mekanizması	32

Şekil 2.13 Sık kullanılan başlatıcıları türleri.....	33
Şekil 2.14 Zincir transferinin şematik gösterimi	35
Şekil 2.15 Rekombinasyon ile sonlanma	36
Şekil 2.16 Orantısız sonlanma.....	36
Şekil 2.17 CLRP ile elde edilen molekül yapılarının örnekleri	37
Şekil 2.18 Kimyanın farklı alanlarındaki ilerlemelerin birleştirilerek kontrollü radikal polimerizasyonun gelişimi	38
Şekil 2.19 CLRP genel mekanizması.....	39
Şekil 2.20 NMP’de aktivasyon deaktivasyon dengesi. İki bileşenli başlatma sistemi (a) ve tek bileşenli başlatma sistem (b)	41
Şekil 2.21 Tersinir katılma zincir transferin mekanizması (RAFT)	43
Şekil 2.22 RAFT ajanının yapısı	44
Şekil 2.23 ATRP’de kullanılan başlatıcılar	46
Şekil 2.24 ATRP’de ligand türleri	48
Şekil 2.25 ATRP’nin genel reaksiyon mekanizması.....	49
Şekil 3.1 <i>Tert</i> -bütil4-siyanobenzilkarbammat sentezi.....	54
Şekil 3.2 2-bromo- <i>N</i> -(4-siyanobenzil) bütanamide sentezi	55
Şekil 3.3 PEG-NB sentezi.....	55
Şekil 3.4 <i>Trans</i> -siklooktenol (TCO) sentezi	56
Şekil 3.5 <i>Trans</i> -5-hidroksisikloostensüksinimidilesterin (TCO-NHS) Sentezi.....	57
Şekil 3.6 ATRP ile nitril uç grubuna sahip PoliPEGMA-CN sentezi.....	58
Şekil 3.7 Polimer ucundaki nitril grubunun tetrazine dönüştürülmesi.....	60
Şekil 3.8 P(MMA-co-AN) kopolimerinin sentezinin reaksiyon şeması.....	61
Şekil 3.9 P(MMA ₈ -co-AN ₂) polimerlerinin yan nitril gruplarının tetrazine transformasyon reaksiyonu.....	62
Şekil 3.10 Tetrazin fonksiyonlu P(MMA ₉ -co-AN ₁ -co-TzBoc) reaksiyon.....	63
Şekil 3.11 P(<i>N</i> -isopropilakrilamid-co-akrilonitril) sentezi.....	64
Şekil 3.12 P(NIPAAm-co-AN) üzerine tetrazin gruplarının doğrudan sentezi .	64
Şekil 3.13 P(PEGMA-co-AN) sentezi.....	65
Şekil 3.14 P(PEGMA-co-AN) üzerinde tetrazin gruplarının doğrudan sentezi.	66
Şekil 3.15 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF’de) ve NB (0,029 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu	68

Şekil 3.16	Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF'de) ve PEG-NB (1,9 mg/mL THF'de) iEDDA reaksiyonu	68
Şekil 3.17	Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF'de) ve TCO (2 mg/mL THF'de) iEDDA reaksiyonu.....	68
Şekil 3.18	Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF'de) ve TCO-NHS (1 mg/mL THF'de) iEDDA reaksiyonu	69
Şekil 3.19	Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1mL, 5 mg/mL THF'de) ve TCO (0,066 mg/mL THF'de) iEDDA reaksiyonu	69
Şekil 3.20	Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1mL, 5 mg/mL THF'de) ve TCO-NHS (2,8 mg/mL THF'de) iEDDA reaksiyonu.....	70
Şekil 4.1	<i>Tert</i> -bütil4-siyanobenzilkarbamat ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	71
Şekil 4.2	2-bromo- <i>N</i> -(4-siyanobenzil) bütanamid ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	72
Şekil 4.3	PEG-NB'nin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	73
Şekil 4.4	TCO-polar'ın ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	74
Şekil 4.5	TCO-apolar'ın ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	74
Şekil 4.6	TCO-NHS'in ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	75
Şekil 4.7	Nitril uç grubuna sahip PPEGMA-CN'nin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	76
Şekil 4.8	Poli(PEGMA-co-AN)'nin uç grubunun tetrazine dönüştürülememesi	78
Şekil 4.9	PPEGMA uç grubunda direkt tetrazin sentezi amacıyla yapılan reaksiyon sonrasında metalik katalizörün etkisi ile amit bağının kırılması sonucu elde edilen amino uç gruplu PPEGMA.....	79
Şekil 4.10	P(MMA ₈ -co-AN ₂) ¹ H-NMR spektrumu analizi (CDCl ₃).....	79
Şekil 4.11	Elde edilen P(NIPAAm ₈ -co-AN ₂)	81
Şekil 4.12	P(NIPAAm-co-AN)'ın ¹ H-NMR spektrumu analizi (CDCl ₃)	82
Şekil 4.13	Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) polimerin metanole karşı A. diyaliz yapılırken B. diyaliz sonrası.....	83
Şekil 4.14	Tetrazin fonksiyonlu p(NIPAAm-co-AN) görüntüsü	83
Şekil 4.15	Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve P(NIPAAm-co-AN) ¹ H-NMR spektrumu analizi (CDCl ₃)	84

Şekil 4.16 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ¹ H-NMR spektrumu analizi (CDCl ₃)	85
Şekil 4.17 P(NIPAAm-co-AN) ve tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN)'ın FT-IR spektrumu analizi.....	86
Şekil 4.18 P(PEGMA-co-AN) ¹ H-NMR spektrum analizi.....	87
Şekil 4.19 Tetrazine fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) ¹ H-NMR spektrumu analizi	88
Şekil 4.20 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve iEDDA reaksiyon sonrası tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve TCO	90
Şekil 4.21 THF içerisinde çözülmüş çeşitli konsantrasyonlardaki <i>tert</i> -bütil(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)karbamat'ın UV-Vis spektrumu .	90
Şekil 4.22 THF içerisinde çözülmüş tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL) eklenen THF içerisinde çözülmüş TCO (2mg/mL)'nun UV-Vis spektrumu.....	91
Şekil 4.23 THF içerisinde çözülmüş tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL) eklenen THF içerisinde çözülmüş TCO (1 mg/mL)'nun UV-vis spektrumu	92
Şekil 4.24 Tetrazine fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL THF'de) eklenen NB (0,029 mg/mL THF'de) UV-Vis spektrumu	93
Şekil 4.25 Tetrazine fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL THF'de) eklenen PEG-NB (1,9 mg/mL THF'de) UV-Vis spektrumu.....	93
Şekil 4.26 Tetrazine fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1 mL, 5 mg/mL THF'de) eklenen TCO (0,066 mg/mL, THF'de) UV-Vis spektrumu	94
Şekil 4.27 (A) P(PEGMA-co-AN) ¹ H-NMR spektrumu, (B) tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN), (C) TCO ve (D) TCO-NHS ile reaksiyona girmiş tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN)'nın ¹ H-NMR spektrumu analizi	95
Şekil 4.28 Tetrazin fonksiyonlu polimerlerin 375 nm'deki absorbands-sıcaklık değişim grafiği.....	96
Şekil 5.1 Nitril yan grubu taşıyan polimerler üzerinde direkt olarak sentezlenmiş tetrazin gruplarına sahip polimerin TCO ile arasındaki iEDDA reaksiyonu.....	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Click reaksiyonlarının avantajları ve sınırlamaları	10
Tablo 2.2	NMP,RAFT ve ATRP süreçlerinin faydaları ve sınırlandırmaları.....	39
Tablo 2.3	ATRP çeşitleri faydaları ve sınırlamaları	51
Tablo 4.1	Farklı oranlarda PEGMA içeren polimerler sentezleri	77
Tablo 4.2	Farklı oranlarda AN içeren polimerler sentezleri	80
Tablo 4.3	PNIPAAm temelli polimerin fonksiyonel grup taşıma oranlar	85
Tablo 4.4	PEGMA temelli polimerlerin fonksiyonel grup taşıma oranları	89

Tetrazin Fonksiyonlu Polimerlerin Doğrudan Hazırlanması ve Bu Polimerlerin Yüksek Hızlı Biyoortogonal Reaksiyonlarda Etkinliğinin İncelenmesi

Sinem SİPAHİOĞLU KARA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ

Biyoortogonal reaksiyonlar, moleküler düzeyde canlı sistemlerdeki uygulamalarıyla son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Ters elektron gereksinimli Diels-Alder reaksiyonu (iEDDA), özellikle tetrazin biyoortogonal bağlanma reaksiyonu (ligasyonu), son derece hızlı kinetiği, biyoortogonalitesi ve yüksek özgünlüğünden dolayı görüntüleme, teşhis ve tedavi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tetrazin iEDDA ilk olarak 1957’de Carboni ve Lindsey tarafından rapor edilmiştir. Günümüzde ise, tetrazin iEDDA tekrardan popüler hale gelmiştir ve malzeme bilimine ve kimyasal biyolojiye yeni bir bakış açısı getirmiştir. Tetrazin siklokatılma, diğer konjugasyon türlerine göre daha avantajlı özellikleri ile yeni bir biyoortogonal reaksiyon olarak ortaya çıkmıştır. Klasik biyoortogonal reaksiyonları katalizöre ihtiyaç duyup ve genellikle düşük verimle sonuçlanırken, tetrazin reaksiyonları ise süper hızlı kinetiği ve seçiciliği nedeniyle oldukça etkili bir reaksiyon olarak bilinirler.

Bu tezde, polimer zincirleri üzerinde tetrazin gruplarının direkt sentezlenmesi için özgün bir yaklaşım geliştirilmiştir. Tezin amacı, bir polimerin yan zincirlerinde ya da uç grubunda tetrazin gruplarını direkt olarak sentezlemektir. Bu amaçla, herhangi bir polimer zincirindeki nitril grupları, bir katalizör ve hidrazin varlığında iki nitril grubunun birbirleriyle reaksiyona girmesini ve ardından oksidasyonunu içeren klasik tetrazin sentezi ile, direkt tetrazin halkalarına dönüşebileceği hipotezi kurulmuştur. Bu çalışmada, yan zincir veya uç grup olarak polimer üzerindeki nitril grupları birinci nitril ve küçük molekül ağırlıklı bir nitril türevi ise ikinci nitril olarak kullanılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, bu yaklaşım polimer zincirleri üzerinde tetrazin işlevsel gruplarının direkt sentezi için ilk örnektir.

Bu yeni yaklaşım, tetrazin fonksiyonlu polimerleri sentezlemek için önemli ölçüde katkı sağlayabilir. Bu tezdeki yaklaşım, poli(*N*-isopropilakrilamid) (PNIPAAm), poli(poli(etilen glikol) metil eter metakrilat) (PPEGMA) ve poli(metil metakrilat) (PMMA) içeren biyouyumlu polimerler üzerinden örneklenmiştir. Yan zincir olarak nitril grupları akrilonitrilin (AN'nin) uygun monomerler (NIPAAm, PEGMA veya MMA) ile kopolimerizasyonuyla bu polimer yapısına dahil edilmiştir. P(PEGMA-co-AN) ve P(MMA-co-AN) öncül polimerleri atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile sentezlenmiştir. Diğer öncül polimer P(NIPAAm-co-AN) ise serbest radikal polimerizasyonu (FRP) ile sentezlenmiştir. Nitril uç grup fonksiyonlu polimerler için siyano fonksiyonlu ATRP başlatıcısı sentezlenmiş ve PEGMA'nin ATRP'sinde kullanılmıştır. Polimerlerin yan zincirleri olarak tetrazin fonksiyonları metal katalizörlü tek-kap (*one-pot*) sentez yöntemi izlenerek elde edilmiştir. Polimer üzerindeki nitril yan grupları, direkt tetrazin halkasının oluşumunda kullanılmıştır. Tetrazin halkalarının oluşumu ile tetrazine has olan pembe renkli polimerler gözlemlenmiştir. Diğer yandan, nitril uç gruplarının tetrazine dönüştürülmesi ile yapılan reaksiyon sonucunda hedeflenen tetrazin uç fonksiyonlu polimer elde edilememiştir. Elde edilen bu sonuç için literatür taraması yapıldığında katalizörün ($\text{Ni}(\text{OTf})_2$), uç grup ile polimer omurgası arasındaki amid bağı kırabileceği anlaşılmaktadır. Yapılan NMR spektroskopisi analizleri sonucunda belirtilen amit bağının kırıldığı ve bulgunun önceki raporlar ile uyumluluk gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, tetrazin fonksiyonlu

polimerlerin sentezi için önerilen bu yaklaşım sadece yan zincir fonksiyonları için kullanışlıdır.

Tetrazin ligasyonu için substratlar arasından hızlı kinetiğe sahip olan *trans*-siklookten (TCO) ve norbornen (NB) seçilmiştir. Tetrazin fonksiyonlu polimerler ile TCO yada NB türevleri arasındaki iEDDA reaksiyonu kısa bir sürede (özellikle TCO için bir dakikadan kısa bir sürede) gerçekleşmiştir ve kolaylıkla çıplak gözle ve UV-Vis spektroskopisi ile izlenmiştir. Çünkü tetrazin halkasının karakteristik pembe rengi reaksiyon gerçekleşince bir anda kaybolmuştur. TCO türevi ile tetrazin fonksiyonlu polimerin konjugasyonu NMR ve UV-Vis spektroskopisi ile de iyi bir şekilde karakterize edilmiştir.

Bu tez kapsamında, polimer omurgası üzerinde tetrazin grubunun direkt sentezinin geliştirilmesi çaba, zaman ve maliyet açısından büyük bir potansiyele sahiptir. Araştırmalar, gelecekte tetrazin siklokatılmalar ile ilgili çalışmaların, ilaç salımı, çeşitli polimer mimarilerinin üretilmesi, protein-polimer konjugasyonu, sensör ve biyogörüntüleme sistemi gibi biyomedikal uygulamalarda birçok gelişmeye yol açabileceğini göstermiştir. Bu tezde geliştirilen yaklaşım da, benzer uygulamalarda potansiyele sahip olacaktır.

Anahtar kelimeler: Tetrazin, polimerlerin fonksiyonlandırılması, Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP), Diels–Alder Click, ters elektron gereksinimli Diels-Alder (iEDDA), post-polimerizasyon modifikasyonu.

Direct Synthesis of Tetrazine Functional Polymers and Investigation of Efficiency of These Polymers in Super Fast Bioorthogonal Reaction

Sinem SİPAHİOĞLU KARA

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ

Bioorthogonal reactions get great attention in the application of living system at the molecular level during recent years. Especially, tetrazine bioorthogonal ligation, which is known as Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction (iEDDA), is widely employed in imaging, diagnostics, and therapy fields due to bioorthogonality, extremely rapid kinetics and high specificity. Tetrazine iEDDA bioorthogonal reaction. While the classic bioorthogonal reactions require a catalyst and usually result in low yield, tetrazine reaction does not. Therefore, this approach is known as a highly efficient reaction due to its super fast kinetics and selectivity.

In this thesis, an original approach was developed for synthesis of tetrazine moieties directly on polymer chains. The aim of this thesis is to synthesize directly tetrazine functionalities as side chains or an end group of a polymer. For this purpose, we hypothesized that nitrile groups on polymer can be directly transformed into tetrazine rings by applying one of the usual synthetic route, in

which two nitrile groups are reacted to each other in the presence of a catalyst and hydrazine followed by oxidation. In this work, nitrile groups on polymers as side chain or end group were utilized as the first nitrile and a small nitrile derivative was utilized as the second one. To the best of our knowledge, this approach is the first example for direct synthesis of tetrazine moieties on polymer chains.

This new approach may contribute significantly to synthesis of tetrazine functional polymers. In the thesis, the approach was exemplified on biocompatible polymers including poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), poly(poly(ethylene glycol methacrylate) (PPEGMA), and poly(methyl methacrylate) (PMMA). The nitrile groups as side chains were incorporated into these polymers by copolymerization of acrylonitrile (AN) with corresponding monomers (NIPAAm, PEGMA or MMA). P(PEGMA-*co*-AN) and P(MMA-*co*-AN) precursor polymers were synthesized by atom transfer radical polymerization (ATRP). The other precursor polymer P(NIPAAm-*co*-AN) was synthesized by free radical polymerization (FRP). For end group nitrile functional polymers, a cyano functional ATRP initiator was synthesized and utilized in ATRP of PEGMA. Tetrazine functionalities as side chains of polymers were obtained by following metal catalyzed one-pot synthesis route. The nitrile group on the polymer was utilized to the formation of the tetrazine rings directly on the polymer backbone. The characteristic color of tetrazine rings was observed as pink. On the other hand, transformation of end nitrile groups into tetrazine was not achieved, since the catalyst (Ni(OTf)₂) cleaved off the amide bond between the end group and the polymer backbone.

The NMR spectrum of the resultant polymer and early reports prove this finding. Therefore, the proposed approach for synthesis of tetrazine functional polymers is useful for only side chain functionalities.

Among the substrates for tetrazine ligation are chosen *trans*-cyclooctene (TCO) and norbornene (NB) derivatives due to their fast kinetics. The iEDDA reaction between tetrazine functional polymers with TCO or NB derivatives achieved in a short period (especially for TCO less than a minute), and monitored easily by naked eye and UV-Vis spectroscopy. Because the characteristic pink color of

tetrazine ring vanishes at once. Conjugation of a TCO derivative to the tetrazine functional polymer was well characterized by NMR and UV-Vis spectroscopy.

Within the scope of the thesis, development of the direct synthesis of tetrazine group on polymer backbone have big potential with respect to effort, time and cost. Research has shown that future work with tetrazine cycloadditions will certainly lead to improvement in biomedical applications like drug delivery, fabrication of various polymer architecture, protein-polymer conjugate, sensor or bioimaging system. The developed approach in the thesis will have potential in similar applications.

Keywords: Tetrazine, functionalization of polymers, Atom transfer radical polymerization (ATRP), Diels–Alder click, Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction (IEDDA), post-polymerization modification.

1.1 Literatür Özeti

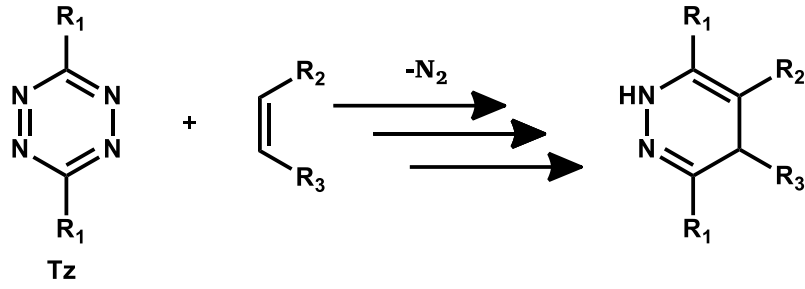
Organik kimyada sık kullanılan reaksiyonlardan biri olan Diels-Alder (DA) reaksiyonu, 1950 yılında Otto Diels ve Kurt Alder'in DA reaksiyonu keşfiyle Nobel Ödülü'nü kazanmışlardır. DA reaksiyonu Şekil 1.1'de gösterildiği gibi stabil bir sikloheksan eklentisi (adduct) oluşturmak için elektronca zengin bir dien (furan ve onun türevleri, 1,3 siklopenta dien ve onun türevleri, vb) ve elektronca fakir bir dienofil (maleik asit ve onun türevleri, vinil keton, vb.) arasında doğrudan bir [4+2] siklo katılma reaksiyonu olarak meydana gelir [1].



Şekil 1.1 Diels-Alder / Retro Diels-Alder reaksiyonlarının genel mekanizması

Click reaksiyonu polimer kimyasında homopolimerler, telekelik polimerler, blok kopolimerler, graft kopolimerleri, karmaşık moleküller mimarileri, dendrimer ve dendronize polimerler, çapraz bağlı polimerlerin sentezinde kullanılmalarının yanı sıra yaygın olarak da polimerlerin modifikasyonunda kullanılmıştır [1]. DA Click reaksiyonlarındaki bileşenlerin kolay sentezlenebilmesi, çözünürlükleri, reaksiyonun yüksek verime sahip olması, ilave bir katalizöre ihtiyaç duymaması ve reaksiyon dışı yan reaksiyonların olmaması gibi pek çok avantaja sahiptir.

Son yıllarda, gün geçtikçe önem kazanan 1,2,4,5-tetrazinler (s-tetrazin), olefinler ile yüksek hızlı ters elektron gereksinimli Diels-Alder katılma (iEDDA, Şekil 1.2) veya Carboni-Lindsey reaksiyonu olarak da adlandırılan reaksiyonu verirler [2].

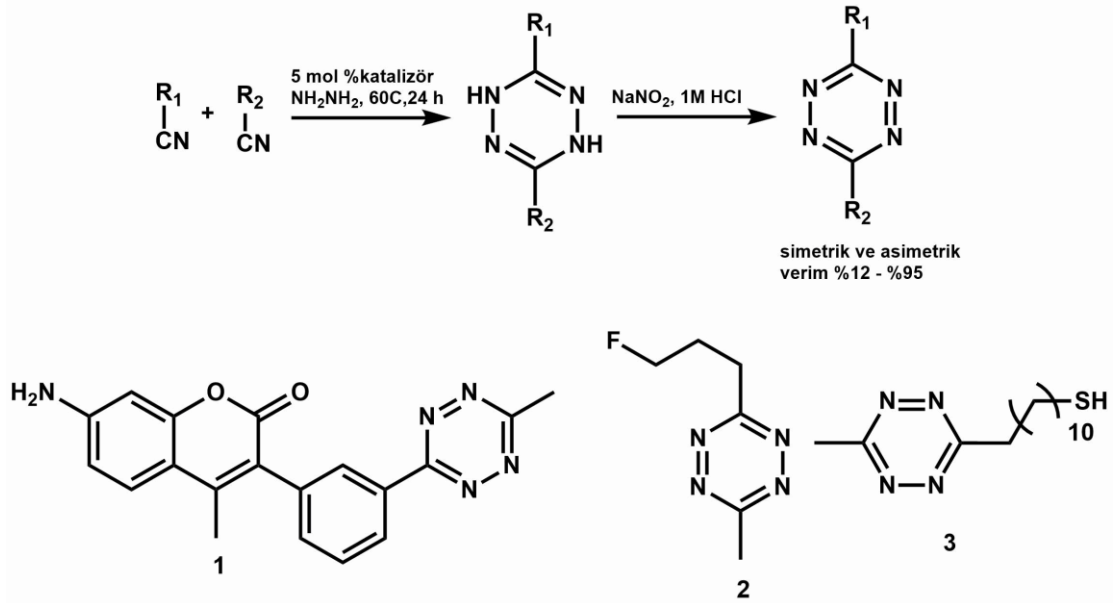


Şekil 1.2 iEDDA reaksiyon şeması

Tetrazinlerin (Tz), uygun dienofiller ile reaksiyonunda birinci adım, çift bağlı molekül ile tetrazinin ters elektron gereksinimli Diels-Alder [4+2] siklokatalıma reaksiyonudur (Şekil 1.2) [2, 3]. Bu reaksiyonda genellikle *s*-tetrazin ve gergin bir alken ya da alkin türevi, ilk aşamada ters elektron gereksinimli Diels-Alder siklokatalıma reaksiyonu ile dihidropiridazin ürünü vermekte ve daha sonra retro Diels Alder reaksiyonu ile molekülden N₂ yarılarak sonuç ürünü vermektedir. En önemlisi, reaksiyon bir katalizör kullanmaksızın sulu ortam içerisinde oda sıcaklığında hızlı olarak ilerlemekte olup, reaktif partnerleri biyolojik gruplar dâhil birçok fonksiyonel gruba karşı inerttir ve biyo-uyumludur. Örneğin biyomoleküler görüntülemeye oldukça kullanışlı ve uygulamaları kolaylaştıran tetrazin biyoortogonal reaksiyonları özellikle bazı fluoroforlarla konjuge edildiğinde fluorojenik özelliklere sahip olurlar. Bu sebepten dolayı, tetrazin biyoortogonal reaksiyonları biyomedikal teknolojileri arasında oldukça ilgi görmektedir [4].

Klasik tetrazin sentezi yaklaşımı nitrillere hidrazin katılması ile 1,2-dihidrotetrazinin oluşması ve bunu takiben bu ara bileşiğin oksidasyonuna dayanmaktadır (Şekil 1.3). Yine de, bu yaklaşım aktif aromatik nitriller ile sınırlı olup, alkil tetrazinlerin hazırlanması için bu reaksiyon son derece düşük verimli gerçekleşir ve hatta bazen ürün vermeyebilir. Yakın zamanlarda, bir dizi tetrazin sentezi stratejisi geliştirilmiştir [4]. Bunlardan biri 2012 yılında Devaraj grubu tarafından geliştirilen dihidrotetrazinin Lewis asidi katalizörü yardımı ile tetrazine yükseltgendiği tek kapta tetrazin sentezi yöntemidir [5]. Bu yöntemde, iki başlangıç nitril molekülünün oranının ayarlanmasıyla asimetric tetrazinler sentezlenebilmektedir. Reaksiyon birçok fonksiyonel grupla ve heterosiklik yapılarla ortogonaldır (uyumludur) [4, 5]. Böylece, karmaşık yapılara sahip olan çeşitli tetrazin türevleri doğrudan ya da daha ileri fonksiyonlaştırma yollarıyla

elde edilebilir. Devaraj grubu, örneğin, son zamanlarda çeşitli 3-mesillenmiş etil tetrazin bloklarıyla alkil tetrazin türevlerinin sentezi için farklı bir strateji olarak bildirmişlerdir. Reaksiyon sonrası hafif bir ayırmadan sonra Heck kenetlenme reaksiyonu kullanılarak π -konjugasyonuyla fonksiyonlandırılmış tetrazin türevlerinin çeşitli dizilimleri elde edilmiştir (Şekil 1.3). Ayrıca klasik fluorofor iskeletleri, yüksek oranda florojenik problardan oluşan tetrazinler ile verimli bir şekilde konjuge edilebilir. Bu proplar, biyokimya ve biyomolekülü görüntüleme uygulamaları için en iyi alternatif oluşturarak biyoortogonal reaksiyonlardan sonra 100 kat daha fazla floresans özellik gösterir [4, 6, 7]. Son yıllarda yapılan benzer bir çalışma ise, tetrazin iskeleti üzerine Sonogashira ve Stille reaksiyonlarının kullanımını içermektedir [8].



Şekil 1.3 Lewis asidi katalizörlü asimetrik tetrazin sentezi ve bazı tetrazin molekülleri

Bu bilgiler ışığında iEDDA'nın son yıllarda yaygın olarak kullanılan biyoortogonal Click reaksiyonu olduğu anlaşılmaktadır. Başka bir ifade ile biyolojik ortamdaki tüm fonksiyonel gruplar ile uyumlu bir şekilde ilerleyen ve reaksiyonun hiç etkilenmediği bir reaksiyon türüdür. Diels-Alder reaksiyonuna dayalı biyoortogonal konjugasyon ailesi içindeki yaygın olarak kullanılan tetrazin ligasyonları 2008 yılında birbirlerinden bağımsız olarak iki araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir [4, 9, 10]. Bu reaksiyonların kinetikleri, *in vivo* olarak bulunan düşük konsantrasyonlarda bile etkili bir etiketleme sağlamaktadır [11].

Canlı hücre yüzeyine antijenlerin aşamalı olarak etiketlenmesi, küçük moleküllerin hücre içinde görüntülenmesi ve klinik teşhis için nanomalzemeler ile hücrelerin modifikasyonun yanı sıra *in vivo* görüntüleme uygulamaları iEDDA Click kimyası ileri biyomedikal uygulamalarını kapsamaktadır. Biyoortogonal olmasının yanında iEDDA'nın diğer önemli özellikleri reaksiyon hızları ve diğer Click reaksiyonları ile ortogonal olmasıdır [2].

Son on yıl içinde, tetrazin biyoortogonal kimyası (iEDDA Click Reaksiyonu), kimyasal biyolojinin farklı alanlarında defalarca uygulanmıştır [12]. Weissleder ve arkadaşları, çeşitli biyolojik etiketleme ve görüntüleme çalışmaları için tetrazin kimyasını mükemmel bir şekilde uygulamışlardır [13]. Diğer öncü gruplar ise tetrazin reaksiyonunun etkinliğini, çeşitli biyomoleküller için metabolik problemlerde gösterilmişlerdir [7, 14-16]. Chin ve diğerleri genetik kod genişletme stratejileri kullanılarak protein dinamikleri ve fonksiyonlarını kapsamlı bir şekilde tetrazine Click reaksiyonunu kullanarak incelemişlerdir [17-20]. Fox ise *in vivo* stabilitenin korunduğunu göstermiş ve oldukça yüksek hızda reaksiyon veren dienofil olarak *trans*-siklooktenin (TCO) geliştirilmesine yön vermiştir [21]. Bu kimyanın biyomalzeme oluşumu ve nanoparçacık dekorasyonunda potansiyele sahip olduğu da gösterilmiştir [22, 23]. Houk grubu tarafından yapılan tetrazin biyoortogonal reaksiyonlarının teorik hesapları, uygulamaların daha da genişlemesine yol açmıştır [24]. Biyoortogonal bağlanan ajanlar/etken maddeler olarak, 1,2,4,5-tetrazinin kullanımına ilgi hızlı olarak artmaktadır [9, 10]. Tetrazin siklokatılmalarının son yıllarda yapılan uygulamaları hücre içi molekül etiketleme, genetik olarak hedeflenen protein etiketleme, sentetik DNA etiketleme, nanoparçacığa dayanlı klinik teşhis ve *in vivo* görüntülemeyi de içermektedir [6, 22, 25].

Chen ve arkadaşları, yakın zamanda iEDDA reaksiyonunu eliminasyon yani bir kargo molekülünün salımı amacıyla kullanmıştır. Burada TCO ve tetrazin arasındaki ilk siklokatılma sonrasında istenilen molekülün eliminasyonuna neden olan bir dizi asimetrik tetrazinlerin tasarlanmasına ve test edilmesine öncülük etmişlerdir [26]. Lee ve arkadaşları, reaksiyonun farmokokinetiği optimize edildiği zaman hem hücresel hem de bütün hayvan seviyelerinde TCO-tetrazin siklokatılmasının etkili olduğunu göstermiştir [27].

TCO'ya ek olarak norbornenler de tetrazin içeren moleküller ile yüksek verimli reaksiyonlar vermektedir [28-30]. Dove ve arkadaşları, uygun kaynaklardan türetilen polimerlerin özelliklerini modifiye etmek amacıyla etkili ve ılıman bir yöntem olarak tetrazin-norbornen fonksiyonlu moleküller ile poli(L-laktid)lerin (PLA) post-modifikasyon yöntemlerini rapor etmişlerdir [31]. Joshi ve arkadaşları, aljinat polimer zincirlerine iEDDA reaksiyonu ile tetrazin ve norbornen grupları kullanarak hücrelere zarar vermeden kovalent bağlı Click aljinat hidrojellerini oluşturmuşlardır [32]. Görüldüğü gibi iEDDA reaksiyona artan ilgi ile birlikte tetrazin fonksiyonlu polimerlere olan ilgi ve ihtiyaç da her geçen gün artmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının konusu son yıllarda konjugasyon yöntemi olarak tekrar gündeme gelmiş olan ve şu an literatürde radikal reaksiyonlar haricinde bilinen en hızlı biyoortogonal konjugasyon yöntemi olan tetrazinin *trans*-siklookten ile verdiği ters elektron gereksinimli Diels-Alder (iEDDA) reaksiyonudur. Tercih edilen bu reaksiyonun çok hızlı kinetiğe sahip olması özelliği ile seçici bir bağlanma ile düşük konsantrasyon miktarında bile hastalıkların hızlı tanı ve teşhis kitleri için istenen kısa sürede sonuç verme özelliğine katkı sağlayabilme potansiyeli bulunmaktadır. Polimerlerin tetrazinler ile modifikasyonu ve iEDDA reaksiyonları, literatür örneklerinden çok basamaklı sentez yaklaşımları ile gerçekleştirildiği anlaşılmakta olup uzun zaman almakta ve daha fazla çaba sarf edilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında polimerler üzerinde tetrazin gruplarının doğrudan sentezleri için kolay bir sentez yönteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

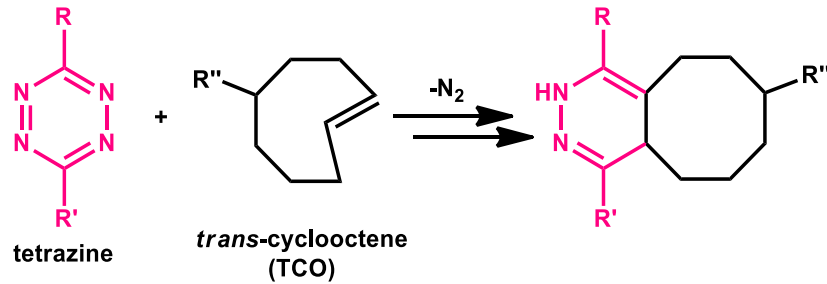
Öncelikle, biyolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılan biyouyumlu polimerik malzemelerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef kapsamında atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile yapısı iyi tanımlanmış ve polidispersitesi (PDI) düşük olan polimerler ve uygulaması kolay olan serbest radikal polimerizasyonu ile farklı polimerler elde edilmiştir. Seçilen biyouyumlu polimerlerin (PEGMA veya NIPAAm esaslı) sentezi için iki farklı yaklaşım planlanmıştır: İlk yaklaşımda yan zincirlerinde nitril gruplarına sahip öncül polimerlerin belirtilen polimerizasyon yöntemleri aracılığı ile akrilonitril ko-monomeri de kullanılarak elde edilmesi

amaçlanmıştır. İkinci yaklaşımda ise uç grubunda nitril grubu bulunan polimerlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra uç veya yan grubunda nitril fonksiyonlu öncül polimerlerin tetrazin fonksiyonlu polimerlere döndürülmesi amaçlanmıştır.

Daha sonra elde edilen tetrazin fonksiyonlu polimerlerin iEDDA reaksiyonundaki etkinliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

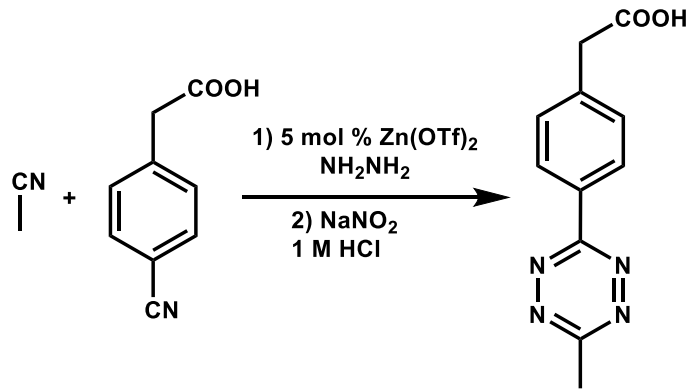
Tetrazin sentezleri 19.yy sonlarından beri literatürde yer almakla birlikte, bu eski kimya son yıllarda sentez kabiliyetlerinin gelişmesi, hızı ve seçiciliği nedeniyle yeniden bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Tetrazin iEDDA ilk olarak 1957'de Carboni ve Linsey tarafından rapor edilmiş ve daha sonra bir prototip siklokatılma reaksiyonu ile 1990'larda Sauer tarafından tekrar gösterilmiştir [33]. Fox [10] ve Hilderbrand [9], 2008 yılında sulu çözeltide tetrazin ile sırasıyla *trans*-siklookten (TCO) ve norbornen kullanarak bioyortogonal tetrazin reaksiyonlarının hızlı örneklerini göstermişlerdir ve bu çalışmalardan sonra bu reaksiyon oldukça fazla ilgi çekmeye başlamıştır. En reaktif partner molekülü olan TCO ile tetrazin arasındaki iEDDA reaksiyonu Şekil 1.4'te gösterilmiştir. Reaksiyon sonunda N₂ inert gazı ortama salınmakta ve iki molekül birbirine Diels-Alder Reaksiyonu sonucu bağlanmaktadır. TCO ile olan bu reaksiyon son derece hızlı ilerler ve ikinci dereceden hız sabiti 2000 M⁻¹.s⁻¹'e kadar yüksek bir değer alabilmektedir [34].



Şekil 1.4 Tetrazin-*trans*-siklookten Diels-Alder reaksiyonu

1,2,4,5-tetrazinlerin hazırlanması için kullanılan en yaygın sentez stratejilerinden birinde, iki nitril bileşiğinin hidrazin ile bir katalizör (kükürt veya Lewis asidi) varlığında reaksiyona girmesi sonucu dört azot atomu ile altı üyeli heterosiklik bir yapı olan dihidrotetrazin elde edilmektedir ve ardından dihidrotetrazin kuvvetli

bir oksitleyici ile tetrazine oksitlenmektedir. Son on yılda bir çok tetrazin sentez yöntemi geliştirilmiştir. 2012 yılında Devaraj ve diğerleri tarafından Lewis asit katalizörü yaklaşımı, yüksek verimliliği nedeniyle daha fazla dikkat çekmiştir [5]. Bu sentez yönteminde, katalizör koordinasyonu ile reaksiyona girme eğilimi zayıf olan nitril bileşenlerini aktive edilir, hidrazinin eklenmesi ve ardından yükseltgenmesi ile yüksek verimli tetrazin molekülü elde edilir. Birçok uygulama için tetrazin molekülü üzerinde karboksilik asit, amino, hidroksil, süksinimidil ester gibi bir grup sonraki aşamada ilgili molekülü fonksiyonelleştirmek amacıyla gereklidir. Karboksilik asit fonksiyonuna sahip tetrazin türevinin sentezi Şekil 1.5'te örnek olarak gösterilmiştir. Amaca bağlı olarak sonraki aşamada bu molekül ilgilenilen moleküle (protein, polimer vb.) karboksilik asit fonksiyonu üzerinden bağlanabilmektedir.

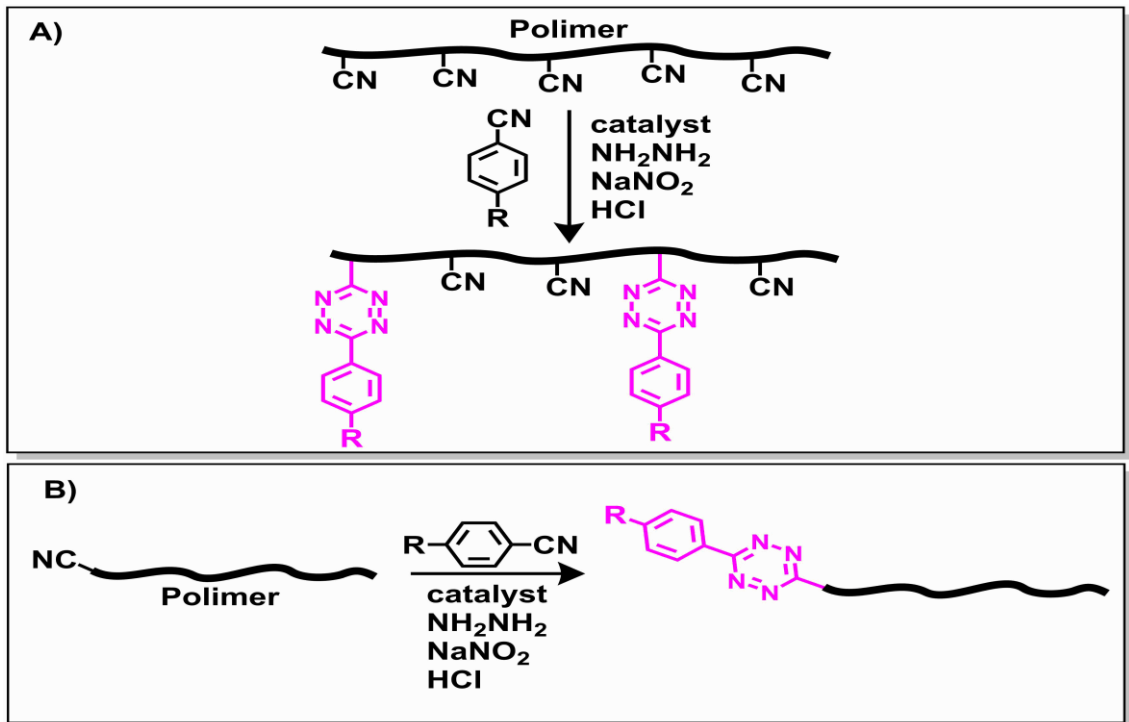


Şekil 1.5 Karboksilik asit fonksiyonlu tetrazini hazırlamak için sentez yöntemi

Fonksiyonel polimer elde edilmesi için en yaygın yöntem post-polimerizasyon modifikasyonlarıdır ve genellikle birden fazla basamağı içermektedirler. Tetrazin fonksiyonlu polimer sentezlenmesi için uygulanan yöntemlerde benzer şekilde iki ya da daha fazla basamaktan oluşmaktadırlar. Bu tez kapsamındaki yaklaşımda tetrazin fonksiyonlu polimerlerin doğrudan hazırlanması sayesinde daha kısa sürede basit ve etkili bir şekilde polimerlerin sentezlenebileceği önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında öncelikle, tetrazin fonksiyonlu polimer elde etmek amacıyla nitril yan grubuna veya uç grubuna sahip olan öncül polimerlerin serbest radikal polimerizasyonu ve/veya ATRP ile sentezlenmesi planlanmıştır. Tezde biyouyumlu olmalarından dolayı poli(poli(etilen glikol) metil eter metakrilat) (PPEGMA), poli(*N*-isopropilakrilamid) (PNIPAAm), poli(metil metakrilat)

(PMMA) gibi polimerler tercih edilmiştir. Uygun monomerlerin akrilonitril monomerinin kopolimerizasyonu ile nitril yan gruplarına sahip polimerler elde edilebilmektedir. Yine nitril fonksiyonuna sahip bir ATRP başlatıcı ile yapılacak polimerizasyonla uç grubunda nitril bulunan polimerler sentezlenebilir. Yan gruplarında nitril grubu içeren polimerlerinin [P(NIPAAm-co-AN), P(MMA-co-AN) veya P(PEGMA-co-AN) gibi] veya nitril uç fonksiyonlu polimerlerin nitril grupları klasik tetrazin sentezinde gerekli olan nitrillerden biri olarak kullanılabileceği düşünülmüş ve bu nitril ile reaksiyona girebilecek aromatik başka bir nitril ortama eklenerek direkt polimer üzerinde tetrazin grupları sentezlenebileceği önerilmiştir (Şekil 1.6). Tetrazin ile fonksiyonlandırılmış polimerlerin karakterizasyonundan sonra model iEDDA reaksiyonlarındaki etkinliklerinin gösterilmesi ile önerilen yaklaşım doğrulanabilecektir.



Şekil 1.6 A. Yan gruplarında nitril grubu içeren polimerlerinin **B.** Nitril uç fonksiyonlu polimerlerin direkt polimer üzerinde tetrazin grupları sentezi

2.1 Click Kimyası

Click kimyası, 2000'li yılların başından itibaren minimum çaba ile yan ürün oluşturmada iki ya da daha fazla molekülü bağlamak amacıyla kullanılan reaksiyonlar dizisini temsil etmekte olup sahip olduğu avantajlar nedeniyle günden güne önem kazanmıştır. Bu reaksiyonlar sadece organik kimyacılar tarafından değil artık birçok fonksiyonel malzemelere ihtiyaç duyan tüm disiplinler tarafından etkin bir şekilde kullanılması kaçınılmazdır. Örneğin biyoloji uygulamalarında konjugasyon reaksiyonları ismini alan bu reaksiyonlar herhangi iki molekülü birbirine bağlamada, yüzey fonksiyonlandırmada, hücre ve biyomolekül etiketlemede oldukça sık kullanılmaktadır.

Click kimyası kavramı ilk kez 2001 yılında Sharpless ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [35]. Sharpless, ilaç çalışmalarında etkili bir konjugasyon tekniği olarak tanımladığı *Click* kimyası kavramını polimer bilimi, nanoteknoloji, biyokonjugasyon ve sensör gibi kısacası organik moleküllerin kullanıldığı hemen hemen bütün araştırma ve teknolojik uygulamalarda kullanmıştır [36]. *Click* reaksiyonlarının hızlı bir şekilde yaygınlaşmasının nedeni sahip olduğu şu önemli özelliklerdir: Yüksek seçicilik sağlaması, su ve diğer protik çözücüler ile uyumlu olması, yüksek verimli olması ve reaktiflerin kolay olarak elde edilmesidir. Diğer bir deyişle, modüler, yüksek verimli, stereospesifik ve yan ürün oluşmayan veya güvenli yan ürün oluşan bu reaksiyonlar *Click* kimyası olarak sınıflandırılır [37]. Basit reaksiyon şartları altında etkili olabilen küçük birimlerden konjugat molekülleri üretebilen bir reaksiyon da, *Click* reaksiyonu olarak kabul edilir. Bu akılda kalıcı *Click* terimi, verimli, seçici, çok yönlü, tek ürün veren (yüksek verimli), tehlikesiz olarak gerçekleşen ve kromatografik saflaştırmaya ihtiyaç duymadan çözücülerini kolayca uzaklaştırılan modüler yaklaşım reaksiyonları olarak ifade edilir. *Click* denince ilk akla gelen yaygın kullanılmasıyla ve önemine atfen bakır katalizörü varlığında alkin ve azit grupları arasında gerçekleşen 1,3-dipolar Huisgen siklokatalizmasıdır (CuAAC). 1,3-dipolar Huisgen siklokatalizma

türünün kullanarak konjuge moleküllerdeki hidroksil, karboksil ve amino gibi grupları kolayca fonksiyonlandırılmıştır [36]. Ancak basit ortak bir reaksiyon yöntemi takip edilerek elde edilen farklı mekanizmalara sahip çeşitli *Click* reaksiyonları mevcuttur [35].

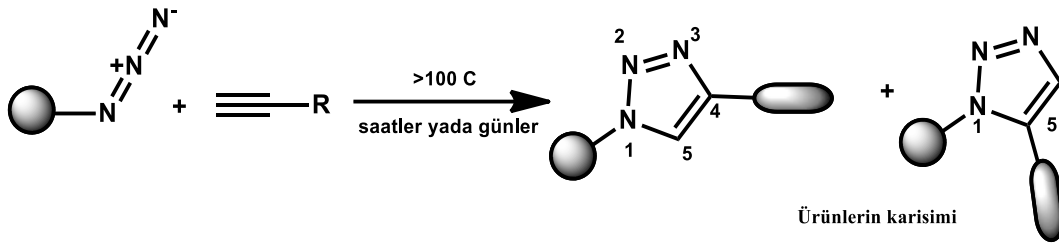
Tablo 2. 1 *Click* reaksiyonlarının avantajları ve sınırlamaları [38]

Click Reaksiyonları	Avantajları	Sınırlamaları	Yorumlar
<i>CuAAC click reaksiyonları</i>	Yüksek seçicilik, hız ve yüksek verimli dönüşümler, çeşitli organik çözücüler ve suya karşı tolerans, kararlı ortogonalite	(Toksik) metal katalizörü kullanma ihtiyacı Katalizörü uzaklaştırma zorluğu	Nano dolgular ve matrislerin etkili bir şekilde çiftleşmesi için uygundur. Ara yüzeyle uyumluluğun geliştirilmesini sağlar.
<i>Metalsiz azid-alkin click reaksiyonları</i>	Seçicilik, yüksek reaksiyon, biyoyumluluk ve stabilite (kararlılık)	Gergin siklooktenler gibi substratlar çok yaygın bulunmaz ve pahalı malzemelerdir.	Özellikle biyomedikal uygulamalarında toksikkatalizör sorunu için kullanımı uygundur.
<i>Diels-Alder reaksiyonları</i>	Isıtma ile aktivasyon (bazı durumlarda faydalı olabilir), çoğu zaman yan ürün oluşmaz. Reaksiyon geri dönüşümlüdür.	Isıtma gereksinimi (bazı durumlarda bir sonuç olabilir), reaksiyon süresi nispetten uzundur.	Nanodolgu yüzeyinde yıkıcı yüzey kimyasal işlemlerini çözen bir yüzey görevini görebilir. Geri dönüşümlü, doğal, kendi kendini iyileştirebilen malzemelerden faydalıdır.
<i>Tiyol-en ve tiyol-yne reaksiyonları</i>	Yüksek verimli, Uv veya ısıyla tetiklenen aktivasyon.	Tiyoller birçok yan reaksiyon oluşumuna eğilimlidir. Düşük stabilitiye sahiptirler. Özellikle uçucu tiyollerin hoş olmayan kokularına vardır.	Reaksiyon mekanizmasını daha homojen ağ oluşumu indükleyebilir ve ağ büzülmesini azaltabilir. Uv ile tetiklenen kaplama uygulamalarında kullanışlı olabilir.

2.1.1 Siklokatılma Click Reaksiyonları

2.1.1.1 Azid-Alkin Huisgen 1,3 Dipolar Siklokatılma

Alkin ve azidin arasında gerçekleşen reaksiyon, *Click* reaksiyonlarının en çok tercih edilen türüdür. Hem alkin hem de azid, fizyolojik koşullar altında reaksiyona girmez ancak sadece yüksek sıcaklıklarda ($>100^{\circ}\text{C}$) bir siklokatılma reaksiyonunu gerçekleştirirler.



Şekil 2.1 Alken ve azid arasındaki Huisgen 1,3-dipolar siklokatılma

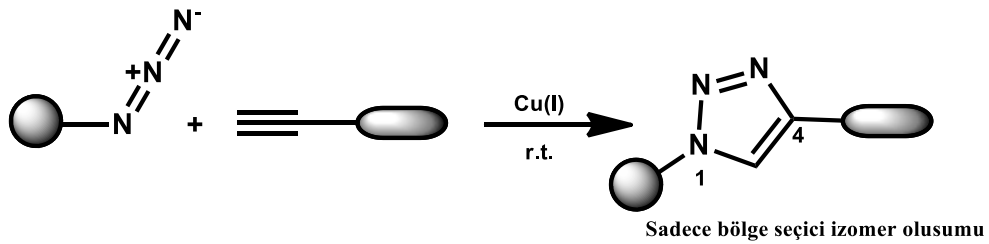
Azidlerin ve alkinlerin Huisgen 1,3-dipol siklokatılması özellikle organik sentezlerde önemli bir rol oynar ve son yıllarda tüm kimya disiplinlerinde kullanılan ortak bir prosedüre dönüşmüştür [37]. Azidlerin potansiyel olarak patlayıcı özelliğine sahip olması, azidlerin uzun bir süre kullanımını engellemiş olmasına rağmen, azid kısımların diğer fonksiyon gruplarına kıyasla dimerizasyona veya hidrolize karşı stabilite gibi mükemmel bir özelliğe sahiptir. Azidler ve alkinlerin 1,3-dipolar siklokatılma reaksiyonunun hızı, aynı zamanda stereospesifikliği sağlayan geçiş metal iyonları gibi uygun katalizörün varlığında büyük ölçüde artmıştır [35]. Bu reaksiyon türü daha çok bakır iyonları ve nitrojen tabanlı ligandların varlığında gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bakırın sitotoksikite özelliğinin olması nedeniyle oluşan endişeler diğer katalizör tiplerinin araştırılmasına neden olmuştur. Bu konuyla ilgili olarak, farklı ligand türleri (PMDETA, bipyridin türevleri, terpiridin türevleri ve Me_6Tren) ve diğer geçiş metalleri (Ru, Ni, Pd, Pt ve Fe) incelenmiştir [37].

Hem alkin hem de azid fonksiyonları substratların üzerine kolayca dâhil edilebilmesine rağmen, siklokatılma reaksiyonları egzotermiktir ($\Delta H^{\circ} = -50$ ve 65 kcal/mol arasındadır) ve 25 - 26 kcal/mol (metil azid ve propin için) gibi, yüksek bir aktivasyon enerji bariyerine sahiptir. Bu nedenle, kataliz edilmemiş

reaksiyonlar genellikle yavaş olup alan seçici değildir. Hem azid hem de alkinin HUMO-LUMO enerji seviyeleri arasındaki fark karşılaştırılmıştır, bu nedenle hem dipol hem de dipol LUMO yolları, 1,4 ve 1,5-triazol bölgesel izomerlerin karışımına yol açan bu reaksiyona etki etmiştir. Bu faktör etkili bir konjugasyon tekniğinin katalize olarak kullanılmasıyla Huisgen siklokatılmasının kullanımını sınırlamaktadır [36].

Son yıllarda, bakır katalizörlü azid-alkin arasında gerçekleşen bu reaksiyonlar, bütün *Click* reaksiyonların özelliklerini göstermiş olmasına rağmen, herhangi bir metal katalizörüne ihtiyaç duymaksızın gerçekleşen *Click* reaksiyonlarına önemli ölçüde ilgi artmıştır [36]. Azid-alkin Huisgen siklokatılması metal katalizörlerin yokluğundada gerçekleşebilirken, oda sıcaklığındaki düşük reaksiyon hızı bu tür *Click* reaksiyonların pratik uygulamalarını sınırlandırmıştır [39]. 2008 yılında, Lutz metal içermeyen azid-alkin siklokatılma reaksiyonları hakkında mükemmel bir bakış açısı sağlamıştır [40]. Bununla birlikte *Click* kimyası siklokatılmalar ile sınırlı değildir ayrıca nükleofilik sübstitusyon, radikal katılmalar, Michael katılmaları, Diels-Alder ve retro-Diels-Alder gibi yüksek verim ile gerçekleşen reaksiyonlar olarak da genişletilmiştir. Bu *Click* reaksiyon türlerinin avantajı ise metal katalizörü kullanılmadan ilerleyebilenmesidir.

2.1.1.2 Bakır Katalizörlü Azid-Alkin Siklokatılma (CuAAC) Click Reaksiyonu



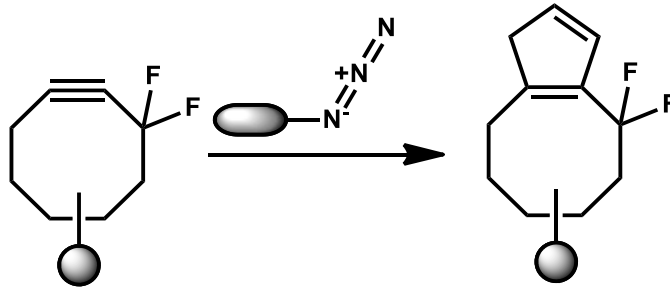
Şekil 2.2 CuAAC *Click* reaksiyonu

Azidler ve alkinler arasında gerçekleşen Cu(I) katalizörlü siklokatılma reaksiyonu *Click* reaksiyonunun bir çeşidi olup, katalizör kullanmaksızın ilerleyen *Click* reaksiyonlarına göre 10^7 kat daha hızlı olduğu Sharpless [41] ve Meldal [42] tarafından bağımsız olarak bildirilmiştir. Cu(I) ve uç alkinler arasındaki etkileşim, azidler ile reaksiyonun zenginleştirilerek daha iyi bir 1,3-dipolarfil (dipolarophile)

oluşturmaktadırlar. Bu Cu(I)-katalizörlü reaksiyon alan seçici hızlı olup oda sıcaklıklarında gerçekleşmektedir ve sadece 1,4-katılma bileşikleri oluşmaktadır.

Sharpless tarafından çözücüler içerisinde bulunan azid-alkin konjugasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmek için etkili bir katalizör olarak kullanılan askorbik asit ile bakır pentahidratın ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) indirgenmesiyle elde edilen *in situ* olarak üretilen Cu(I)'in kullanımının olasılığını bildirilmiştir [41]. Çözücü olarak su ve alkol karışımı kullanıldığında CuAAC *Click* reaksiyonun daha iyi çalıştığı görülmüştür. Çözücü olarak kullanılan karışım, metal tuzların çözünmesine izin vererek organik bileşenlerin konjuge olmasını sağlar. Melda ve arkadaşları tarafından, katı fazda bulunan backbone (omurga) peptidlerinin yan zincirleri boyunca konjuge edildiği bakır iyodürler ile katalizörlü azid-alkin siklokatılma reaksiyonun uygulamalarının kullanışlı olduğunu rapor etmişlerdir [42]. Bu iki reaksiyon örneğinde 1,4-iki ikameli, 1,2,3-triazollerin oluşumu için seçicidir ve her ikisi de *Click* reaksiyonları kavramında bir devrime yol açmıştır (Şekil 2.2) [36].

2.1.1.3 Gergin Halkalı Azid-Alkin Siklokatılma (SPAAC) Reaksiyonları



Şekil 2.3 SPAAC *Click* reaksiyonu için bir örnek

Triazol bağ ile sentezlenen ilaç moleküllerinin uygulamaları dışında, azid-alkin siklokatılma reaksiyonları spesifik protein/virüs modifikasyonları ve hücre yüzeylerinin fonksiyonlaştırılması gibi çeşitli biyolojik uygulamalar için de kullanılmıştır. Bu tür uygulamalarda geçiş metal katalizörlü reaksiyonlarda bulunan metal tuzların canlı hücrelere zarar verebileceği için kullanılması tavsiye edilmez. Bakırın yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik olması nedeniyle bakır tuzları oligonükleotid ipliklerini bozar. Bu durum metal katalizörlerin

kullanılmadan uygulanabileceği *Click* reaksiyonlarının araştırılmasına neden olmuştur [36].

Elektronca yetersiz olan alkinlerin kullanımı, katalizörsüz bir azid-alkin siklokatalizma reaksiyonunun hızını artırmak için tercih edilmiştir. 1960 yılında yüksek verimli triazol ürünü oluşturmak için düzenli bir siklookten ve daha az kararlı bir sikloalkin arasındaki hızlı siklokatalizma reaksiyonu rapor edilmiştir. Bu reaksiyon için siklooktin yaklaşık 18 kcal/mol'luk önemli bir halka geriliminin serbest bırakması itici bir güçtür [36]. Bertozzi ve arkadaşları, birleşme reaksiyon hızını artırmak için click reaksiyon türü olarak gergin halkalı azid-alkin siklokatalizma (SPAAC) reaksiyonunu geliştirmişlerdir. Bu click reaksiyonunun biyokonjugasyon uygulamalarında kullanıma olasılığını araştırmışlardır [43]. Buna ek olarak, diğer siklokatalizma reaksiyonlarına karşı reaktivitesini artırmak amacıyla siklooktin sistemi üzerindeki elektron çekici gruplarını (EWGs) tanıtmışlardır. Mono- ve diflorütleştirilmiş siklooktin türevleri, siklokatalizma reaksiyonlar için ikinci dereceden hız sabitlerinin değerlerinin artırmasını sağlayan düşük enerjili bir LUMO'ya sahip olacak şekilde hazırlanmıştır (Şekil 2.3) [36, 44]. Bununla birlikte siklooktin türevlerinin sentezlenmesi zor olduğu için SPAAC'nin kullanımını sınırlamıştır [39].

Boons ve arkadaşları ise farklı bir strateji uygulamışlardır. Buna göre benzil gruplarına bitişik alkin ile fonksiyonlandırılmış siklookten molekül halka gerginliği giderek artmıştır [36, 37, 45]. Boons ve arkadaşları azidler ile reaksiyonun meydana gelmesi için bu benzil grubu türevlerinin kullanılmasını başarmışlardır ve yaşayan hücrelerde glikonjugatları metabolik olarak etiketleyerek görselleştirmede bu strateji kullanılmıştır [45].

2.1.2 Tiol Tabanlı Click Reaksiyonları

Bir asırdan fazla süredir birçok farklı kimyasal reaksiyon türlerinde tiyoller kullanılmıştır [37]. Tiyoller farklı fonksiyonel gruplar ve çok çeşitli substratlar ile reaksiyona girebilirler. Bu reaksiyonun özellikleri ise yüksek verimli olup takip edilmesi kolaydır. Genel olarak, bu reaksiyonların çoğu tehlikesiz şartlar altında oluşmaktadır ve sıradan organik sentezlerde, polimerizasyonda ve yüzey fonksiyonlaştırılmasında kullanılmıştır. Tiyoller çeşitli reaktivite özelliklerine

sahip olması nedeniyle çok iyi bir konjugasyon aracı olarak kullanılmışlardır ancak bu durum tiyollerini birçok yan reaksiyona karşı daha duyarlı hale getirmiştir [36]. Bu özelliklerinin yanı sıra özellikle düşük moleköl ağırlığına sahip olan tiyollerin pis kokusu ve düşük kararlılığı gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak için çeşitli stabilizatör derişim miktarı ve monomer sentezi için yeni yöntemler geliştirilmiştir [36, 46]. Tiyoller ile ilgili olarak birçok reaksiyon yöntemi ve kinetiğı literatürde mevcuttur ve tiyol bileşiklerin çoğunu hazırlamak oldukça kolaydır [47]. Uygun substrat seçimi ve dikkatli kullanılması tiyollerin çoğı dezavantajını ortadan kaldırabilir, tiyoller click kimyasının araç kutusundaki etkili üyelerden biridir [36].

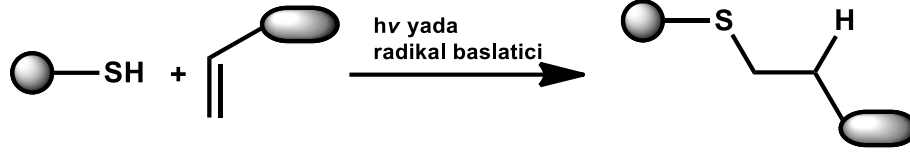
1893 yılında Goodyear tarafından doymamış polimerleri çapraz bağlamak için sülfür elementini kullanarak geliştirilmiş bu yönteme sertleşme (vulkanizasyon) adı verilmiştir [36]. 1893 tarihinden beri, sülfür ve tiyoller kullanımı kolay konjugat araçları olarak görölmüştür. Tiyollerin bu reaksiyonları, radikal reaksiyonlar ve nükleofilik reaksiyonlar olarak sınıflandırılabilir [36].

2.1.2.1 Tiyollerin Radikal Click Reaksiyonları

Tiyol reaksiyonları ışıık ya da radikal bir başlatıcının varlığında alkenler ve alkinlere göre daha kolay ilerler. Bu reaksiyon türleri katalizör olarak herhangi bir geçiş meteline ihtiyaç duymadan biyolojik uygulamalarda fonksiyonel moleküllerin hazırlanması sırasında bir konjugasyon yöntemi olarak sıklıkla tercih edilmiştir. Bu tür reaksiyonlar tarafından üretilen tiyoeter bağları, güçlü asitlere, güçlü bazlara ve indirgenmiş şartlara karşı daha kararlıdır.

İlk kez 1905'te Posner tarafından alkenler ile tiyollerin reaksiyonu ortaya atılmıştır [48]. Bu reaksiyonlarda ya radikal bir başlatıcı kullanarak ya da doğrudan bir 254 nm dalga boyuna sahip bir UV ışıık kaynağı kullanılarak tiyoller başlatılmıştır. Tiyollerin ışıınlanması, S-H bağının homolizini destekler, bu da bir tiyil (thiyl) radikalinin oluşmasını sağlar [49]. Cramer ve arkadaşları, düşük dalga boyuna sahip olan bir UV ışıık kaynağının kullanılmasıyla tiyollerin kendiliğinden radikal reaksiyonuna başladığını göstermişlerdir. Alken ile thiyl (tiyil) radikal reaksiyonları alan seçici olup çeşitli fonksiyon gruplarını tolere edebilirler. Reaksiyon koşulları ılıman olup su ve oksijen ile uyumludur. Bu özelliklerine ek

olarak, tiyollerin kendiliğinden başlama özelliği tiyol-ene reaksiyonunun çok kullanışlı bir click reaksiyonu statüsünde olmasını sağlamıştır. Bu reaksiyonlar genellikle bir alkenin hidro-tiyolasyonu olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.4) [36].



Şekil 2.4 $h\nu$ ya da bir radikal başlatıcının varlığında bir C=C bağının hidrotiyollasyonu

Bu tiyol-ene radikal reaksiyonları bazen radikalın rekombinasyon reaksiyonları yoluyla istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olabilir. Tiyollerin doğrudan ışıma yolu ile reaksiyonu başlatması bir avantaj olmasına rağmen, reaksiyon hızları, radikal oluşum hızının bir sonucu olarak oldukça yavaştır. Reaksiyon hızları, foto başlatıcı kullanılarak önemli ölçüde geliştirilmiştir. Başlangıçtaki çalışma ve uygulamalar, benzofenon gibi hidrojen koparan başlatıcılarının kullanımına dayanıyordu. Daha sonra, dimetoksifenilasetofenol (DMPA, ultraviyole başlatıcı için) ve fosfin oksit (görünür ışık başlatıcısı için) gibi Norrish tip 1-fotobaşlatıcılarının kullanımıyla bu reaksiyon hızlarının son derece arttığı tespit edilmiştir [36].

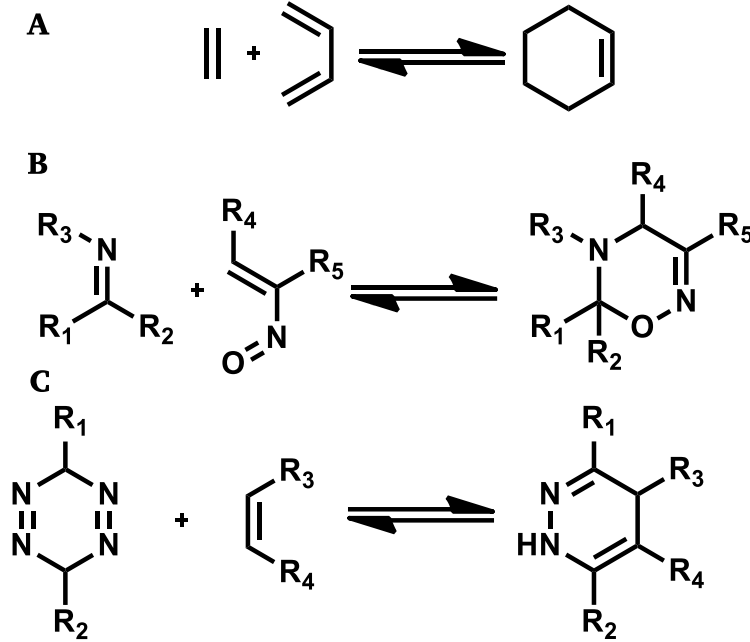
2.1.2.2 Tiyollerin Nükleofilik Katılma Click Reaksiyonları

Tiyoller ve tiyolat (thiolate) anyonları çok iyi birer nükleofildir. Çeşitli click reaksiyonları epoksiler, izosiyonatlar, halojenürler ve Michael alıcısı gibi elektrofilik substratlar üzerindeki tiyollerin nükleofilik atakları temel alınarak geliştirilmiştir. Bu tür reaksiyonlarda genellikle katalizör ya da foto başlatıcı olarak görev yapan fotolatent bazlar tarafından başlatılmıştır [50]. Reaksiyon hızı ise substrat, tiyol ve tiyolat iyonlarına bağlıdır [36].

2.2 Diels-Alder Reaksiyonları

Diels-Alder (DA) reaksiyonu organik kimyada en çok kullanılan click reaksiyon çeşitlerinden biri olup 1928 yılında Otto Diels ve Kurt Alder tarafından keşfedilmiştir [51]. Bu keşif ile 1950 yılında Diels ve Alder Nobel kimya ödülünü

almaya hak kazanmışlardır. DA reaksiyonunun tercih edilmesinin nedeni basit, hızlı, geniş alanlarda uygulanabilirliği ve ılıman reaksiyon şartlarında gerçekleşebilir olmasıdır [52]. DA reaksiyonları, karbon–karbon bağlarının eş zamanlı oluşumunu ve yıkımını kapsar [53-55].



Şekil 2.5 A) Normal elektron talepli Diels-Alder (DA) reaksiyonu, **B)** hetero-DA reaksiyonu ve **C)** ters elektron gereksinimli DA reaksiyonu

Dienin en yüksek dolu molekül orbitali (HOMO) ile dienofilin en düşük boş (kullanılmayan) molekül orbitalinin (LUMO) eşleştirilmesiyle DA reaksiyonunun etkinliğinin, elektronca zengin dienler ve elektronca fakir dienofiller kullanılarak arttığı bulunmuştur [52]. DA reaksiyonu, sabit bir siklohekzen ürünü elde etmek için elektronca zengin bir dien (furan ve onun türevleri, 1,3 siklopenta dien ve onun türevleri vb.) ve elektronca fakir dienofil (maleik aist ve onun türevleri, vinil keton vb.) arasında doğrudan bir [4+2] siklokatılma reaksiyonu olarak meydana gelir (Şekil 2.5A). Dien ve dienofil aynı molekülün bir parçasıysa, intramoleküler DA siklokatılma olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, DA reaksiyonlarından dien ya da dienofilden en az birinin heteroatom (azot, oksijen gibi) içerdiği bilinir; bu reaksiyonun tamamı hetero-DA reaksiyonları olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.5B) [39]. DA reaksiyon mekanizması bir diradikali kapsayan iki basamaklı bir mekanizma ya da tek basamaklı bir mekanizma ile gerçekleşip gerçekleşmediği DA reaksiyonun keşfinden beri tartışılmıştır. Bugün de geçerli olan görüş, DA

siklokatılmanın halkalı bir geçiş durumu içeren eş zamanlı bir reaksiyon olduğu şeklindedir [39, 56-60]. DA mekanizması, etilen ve 1,3-butadien reaksiyon partnerleri kullanılarak açıklanmıştır. Bununla birlikte, reaksiyon partnerleri içindeki ters elektron dağılımı nedeniyle yavaş reaksiyon kinetiğine sahiptir. Elektronca fakir dienofiller ile elektronca zengin dienler reaksiyona girmesiyle oluşan (Normal elektron talepli DA reaksiyonu), bu siklokatılma çok daha hızlı ilerler. Bu nedenle, tipik DA reaktanlarında “iyi” dienler alkil zincirleri gibi elektron veren grupları ikame eden, reaktif dienofiller ise karboniller, ketonlar, karboksiller, nitriller veya halojenler gibi elektron çeken grupları yapılarında bulundurlar. DA siklokatılmanın en büyük avantajı tahmin edilebilir stereokimyaya sahip olması [39] olup ayrıca ekonomik ve yüksek verimli olmasıdır; doymamış 6 üyeli halkaları sentezlemek için kullanılan en güçlü yöntemlerden biridir [55]. Genellikle elektronca zengin dienler ve elektronca fakir dienofiller normal elektron gereksinimli DA reaksiyonuna ek olarak, iki reaktant arasındaki elektron dağılımına alternatif bir reaksiyon olarak ters elektron gereksinimli DA (iEDDA) reaksiyonu tanımlanmıştır. iEDDA reaksiyon boyunca, altı üyeli bir halka elektronca fakir bir dien ve elektronca zengin bir dienofil arasında oluşmuştur (Şekil 2.5C) [39, 58, 61].

Geleneksel DA reaksiyonları gibi, iEDDA reaksiyonu da birçok uygulama alanında ciddi bir katkı sağlamıştır. iEDDA reaksiyonu yüksek verimli ve ılıman koşullar altında, hızlı ve basit olarak iki molekülü birleştirerek karmaşık moleküllerin sentezi, biyo-etiketleme, ilaç ve malzeme bilimi gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. 1949 yılında Bachmann ve Deno tarafından elektronca fakir bir dien ile elektronca zengin bir dienofil arasındaki iEDDA reaksiyonu keşfedilmiştir [62]. Frountier Molekül Orbitali (FMO) teorisi, dienlerin HOMO'su ile etkileşime giren dienofilin LUMO'suna karşılık gelir. 2008'de birbirlerinden bağımsız olarak hem Hilderbrand [9] hem de Fox [10] tarafından potansiyel bir click kimyası yöntemi olarak tanımlanmıştır ve 2008'den bu yana hem biyokimya hemde malzeme alanında geniş çaptaki kullanımı giderek artmıştır [52].

Diels-Alder reaksiyonu ve hetero-Diels-Alder reaksiyonları dâhil olmak üzere çeşitli siklokatılma reaksiyonları click reaksiyonu olarak kullanılmıştır. Bununla

birlikte, tüm bu reaksiyonlar arasında, konjugasyon metodları olarak kesinlikle uygulanamaz ya da sınırlı olarak uygulanabilir bir uygulama bulunmamıştır [36].

2.2.1 Diels-Alder Reaksiyonun Avantajları

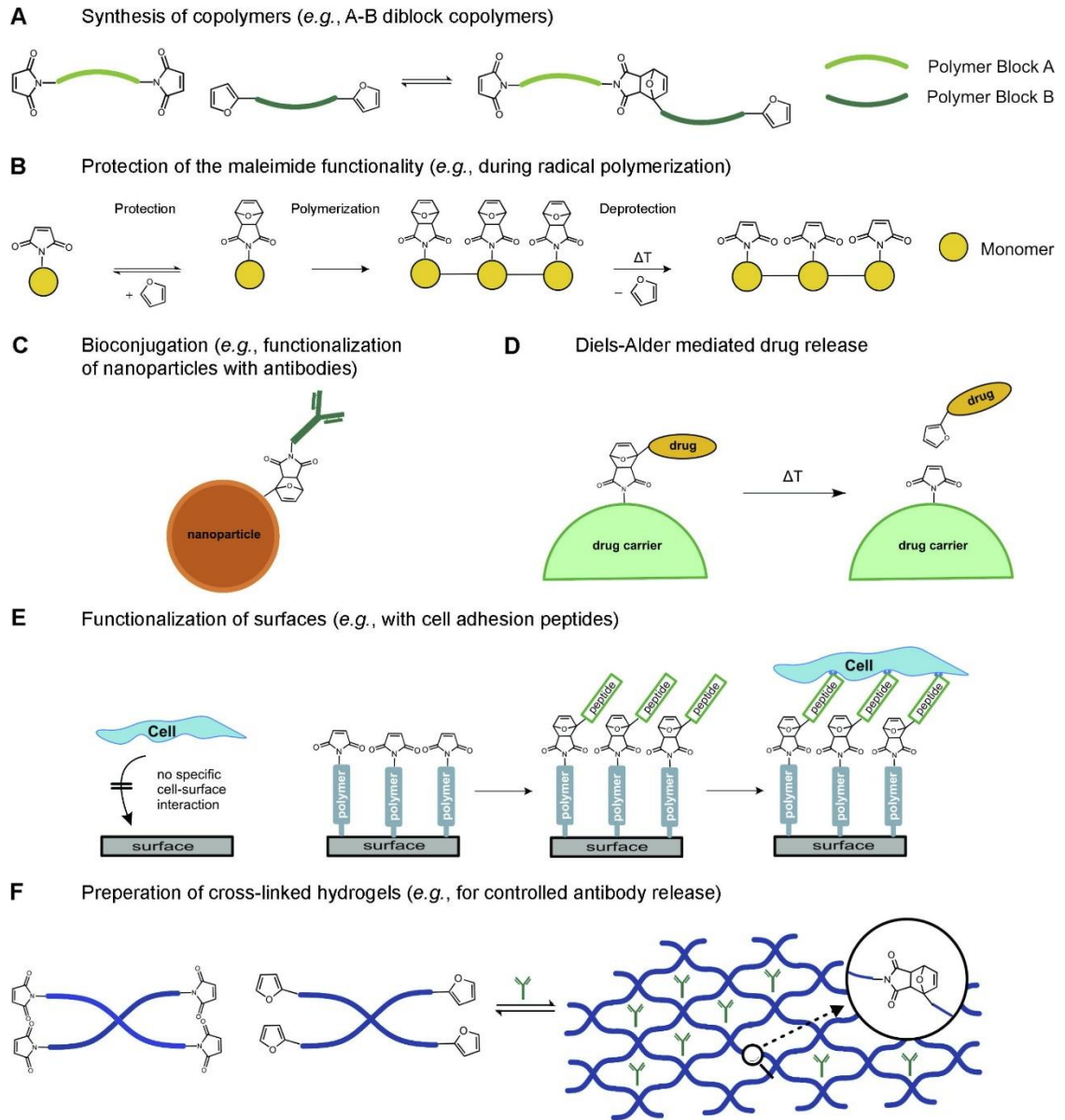
DA reaksiyonu organik kimyada önemli bir rol oynamıştır [55] ve farmasötik veya biyomedikal uygulamalar için gün geçtikçe giderek önemi artmıştır. Uygun dien-dienofil çiftleri (örnek: furan ve maleimit) kolayca elde edilebilir ve ilgili moleküller duyarlı (reaktif) parçalar ile kolayca fonksiyonel hale gelebilirler. DA reaksiyonu, suyun içerisinde kolaylıkla gerçekleşebiliyor olması, pahalı ve toksik çözücülere ihtiyaç duyulmaması gibi bir takım avantajlı özelliklere sahiptir. İlginç bir biçimde, hem aktifleştirilmiş komplekse hidrojen bağlanması ve hem de reaktantlar arasında kuvvetlendirilmiş hidrofobik etkileşimler nedeniyle su içinde büyük ölçüde hızlanmıştır [63-65]. Fakat en dikkat çekici özelliği, DA reaksiyonun, reaksiyon kinetiğinin ılıman reaksiyon koşulları altında yavaş olmasına rağmen oda sıcaklığında gerçekleşebilir olmasıdır [66-68]. Tıbbi ürünlerde ve cihazlarda, kullanılan malzemelerin saflığı ve güvenliği ön koşul olması nedeniyle DA reaksiyonu, polimer-ilaç konjugasyonlarının hazırlanmasında veya hedeflenen nanoparçacıkların geliştirilmesinde kullanışlı bir biyokonjugasyon reaksiyonudur. Bununla birlikte, hem denge dönüşümünün hem de reaksiyon hızının dien-dienofil çiftinin ikame modeline bağlı olduğu belirtilmiştir [69]. Çoğu durumda, katalizör veya başlatıcı kullanılmasına gerek olmadığı için ve yan ürün oluşmadığı için elde edilen ürünün saflaştırılması gerekli değildir. Özellikle polimerler, dendrimerler, proteinler veya nükleik asitler gibi makromoleküler reaksiyona dâhil olduğu zaman bu özellikleri önemlidir. Sulu ortamlarda ve katalizörsüz olarak oda sıcaklığında gerçekleşen DA reaksiyonu yan ürün oluşturmadığı için ilaç salımı ve doku mühendisliği için üretilen hidrojeller gibi *in situ* ile oluşan materyalleri hazırlamak için etkili bir çapraz bağlanma yöntemidir. Bu özelliklerin aksine, reaksiyonun tersinebilirliği hem avantaj hem de dezavantaj olarak düşünülmüştür. Örneğin, DA siklokatalma/retro DA (rDA) reaksiyonu fonksiyonel gruplarını korumak veya koruyucu grubu uzaklaştırmak için kullanılmıştır. DA/rDA dengesi kontrollü ilaç salım sistemlerinin tasarlanması ve parçalanabilir ya da kendi kendini onaran materyallerin hazırlanmasında

kullanılmıştır. Diğer bir yandan, eğer biyokonjugasyon reaksiyonları gibi kararlı bileşikler elde etmek gerekirse, DA reaksiyonun tersinebilirliği sorun oluşturabilir. İlginç bir biçimde, DA reaksiyonunun terslenebilirliği seçilmiş uygun dien-dienofil çifti ya da çözücü sisteminin değişimiyle kontrol edilebilir [39, 68, 69].

2.2.2 Diels-Alder Reaksiyonunun Farmasötik ve Biyomedikal Uygulamaları

DA reaksiyonun farmasötik ve biyomedikal alanındaki uygulama örnekleri, ilaç salımı ve doku mühendisliği için hidrojellerin oluşturulması, nanomalzemelerin montajı veya demontajı, biyokonjugatların sentezi, yüzeylerin fonksiyonlandırılması, dallanmış polimer ve dendrimerlerin sentezi, kopolimerlerin sentezi gibi dikkat çekici uygulamalara sahiptir.

Şekil 2.6'da DA reaksiyonunun farmasötik ve biyomedikal mühendisliğindeki bazı uygulamaları gösterilmiştir. Özelliklerinden dolayı, furan-maleimid çifti görselde örnek olarak kullanılmıştır. DA siklokatılması dendrimerlerin ve kopolimerlerin sentezi için kullanılan seçici ve etkili bir birleşme reaksiyonudur (Şekil 2.6(A)). Bu bağlamda furan ve maleimidin siklokatılması, örneğin radikal polimerizasyonu esnasında maleimid fonksiyonelliğini koruyabilir (Şekil 2.6(B)). Biyomedikal alanında, geleneksel DA reaksiyonu yanı sıra özellikle iEDDA reaksiyonu, biyokonjugasyonda uygulanabilir. Örneğin, DA siklokatılması peptitler, antikorlar veya optomerler gibi hedefleyici ligandlarla ilaç salım sistemlerinin fonksiyonlaştırılması için kullanılmıştır (Şekil 2.6(C)). İlaç salım sistemleri kapsamında, DA/rDA dengesi nanoparçacık taşıyıcıları veya hidrojellerden aktif bileşenlerin salımını hem kontrol etmek hem de sürdürmek için kullanılmıştır (Şekil 2.6(D)). Benzer stratejiler hücreye yapışan peptitler veya hücre dışı matris (ECM) proteinleri gibi biyomoleküller ile yüzeylerin fonksiyonlandırılması için uygulanmıştır (Şekil 2.6(E)).



Şekil 2.6 Farmasötik ve biyomedikal mühendisliğinde DA reaksiyonunun bazı uygulamaları [39]

En sonuncusu olan DA reaksiyonu, hidrojenlerin hazırlanması için çapraz bağlanma yöntemi olarak kullanılmıştır (Şekil 2.6(F)). Hidrojellerin bu türleri, biyofarmasötikler için kontrollü salım sistemleri olarak veya hücre transplantasyonu için üç boyutlu iskelet olarak görev yapabilirler [39].

2.3 Tetrazin Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder Reaksiyonu

2.3.1 Tetrazinler

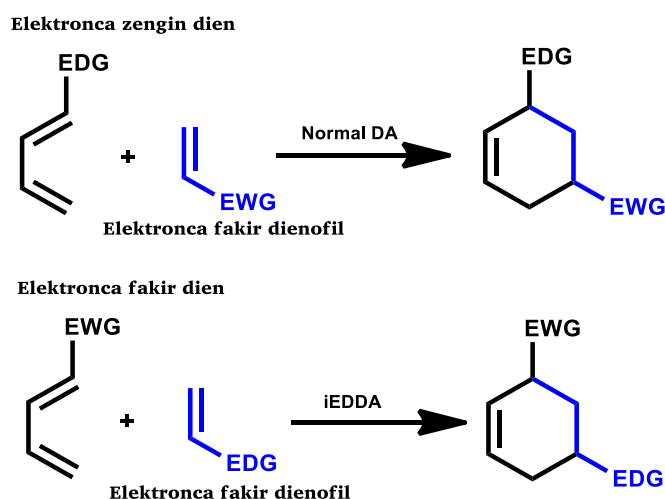
iEDDA reaksiyonu için istekli dienlerin en önemlisi olan tetrazin molekülü, dört azot atomu içeren altı-üyeli bir aromatik halkadan oluşup üç farklı izomere sahiptir. Bu izomerler arasında iEDAA reaksiyonu için en yaygın olarak kullanılanı 1,2,4,5-tetrazindir ve bazen s-tetrazin olarak da isimlendirilir. iEDDA tersinmez bir reaksiyondur ve biyo-etiketlemek için geleneksel Diels-Alder reaksiyonuna göre daha çok tercih edilmiştir [70].

Eski tarihli bir kimya olan tetrazin kimyası ilk defa Carboni ve Lindsey tarafından rapor edilmiş, son yıllarda ise yeni sentez yöntemlerinin geliştirilmesiyle ve biyoortogonalite kavramının ortaya çıkmasıyla tekrardan dikkat çekici hale gelmiştir [71]. İEDDA için önemli bir partner molekül olan *trans*-siklooktenin (TCO) 2008 yılında Fox ve diğerleri tarafından etkin sentezi için yeni bir fotokimyasal yaklaşım rapor edilmiş [10, 72] ve daha sonra 2012 yılında Devaraj ve diğerleri tarafından tetrazin sentezi için Lewis asit katalizörünü içeren etkili bir sentez yöntemi önerilmiştir [5]. Bu ve buna benzer çalışmalar eski bir kimya yöntemi olan tetrazinin tekrardan ilgi çekici hale gelmesine ve hatta biyo-organik kimyada yeni bir ufuk açan yöntem haline gelmesine neden olmuştur. Tetrazin ligasyonu moleküllerin görüntülenmesinde [9, 13, 30, 73, 74], hücreden hücreye bağlanmasında [75], çeşitli polimer mimarisinin üretiminde [76-80], hidrojel sentezlerinde [81], yüzey biçimlendirilmesinde [82], mikrodizilim teknolojilerinde [83, 84], protein-polimer konjugatlarında [85] ve diğer biyokimyasal uygulamalarda son derece başarılı olarak uygulanmıştır. Elektronik özelliklerinin yanı sıra, son yıllarda tetrazinin sterik etkileri de dikkat çekici olmuştur. iEDDA reaksiyonları çözücüsünün polaritesi veya iyonik gücünden az etkilenebilir. Bu reaksiyonun hidrofobik etkiler nedeniyle büyük ölçüde sulu ortamlarda hızlı olması dikkat çekicidir [86].

2.3.2 İEDDA Reaksiyonunun Mekanizması

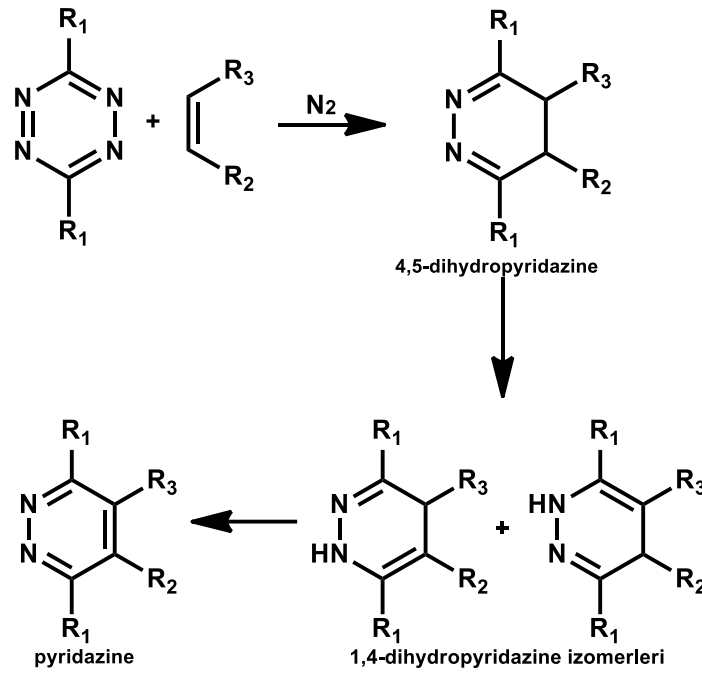
Diels–Alder [4+2] siklokatılması, dienofilin 2π -elektronları ile dienin 4π -elektronlarının arasındaki suprafacial (geometri izinli) etkileşimler ile bir $4\pi + 2\pi$ şeklinde 6-üyeli bir halka oluşturmak için bir dien (1,2,4,5-tetrazin) ve bir de dienofil (alken veya alkin) arasında gerçekleşen reaksiyon olarak tanımlanmıştır.

Elektronca zengin bir dien ile elektronca fakir bir dienofil arasında gerçekleşen reaksiyon normal elektron gereksinimli Diels–Alder reaksiyonu; elektronca zengin bir dienofil ile elektronca fakir bir dien arasında gerçekleşen reaksiyon ise ters elektron gereksinimli Diels – Alder (iEDDA) reaksiyonu olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Normal Diels – Alder ve Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (iEDDA) reaksiyonlarının genel mekanizması
(EDG: Elektron Verici Grup; EWG: Elektron Çekici Grup)

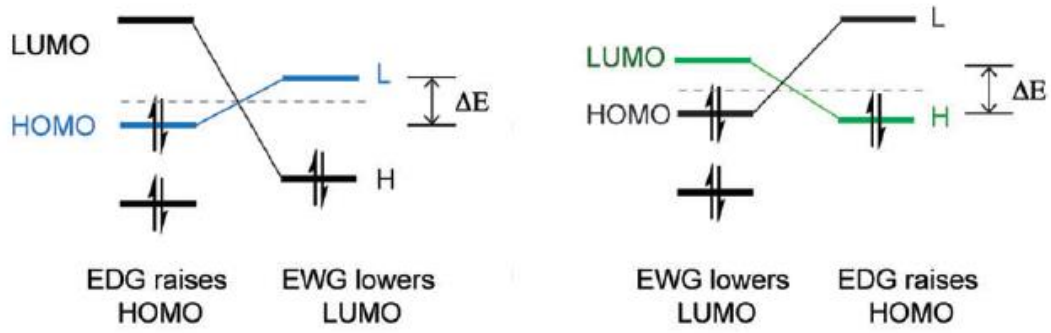
Lindsey ve ark. tarafından 1959 yılında ilk olarak tetrazinlerin, doymamış bileşenleri ile reaksiyona girebileceği ortaya atılmıştır [71]. Uygun bir alken, tetrazinin $-C=N-N=C-$ dien sistemine 1,4- katılmasıyla yüksek verimli DA reaksiyonu vererek gergin çift halkalı (bicyclic) bir ara ürün ortaya çıkarır. Gergin halkalı bu ara ürün kararsız olup molekülden önce nitrojenin (N_2) ayrılması sonucunda 4,5-dihidropiridazin, ardından izomerleşme ile 1,4-dihidropiridazin izomerlerine dönüşür ve son olarak oksitlenme ile piridazin ürünü oluşturur (Şekil 2.8) [12].



Şekil 2.8 Dienofil ve tetrazin arasındaki iEDDA reaksiyonun mekanizmasının şematik gösterimi

2.3.3 İEDDA Reaksiyonlarının Elektronik Özellikleri

Frointer Moleküler Orbital Teorisine (FMO) dayanarak, iEDDA reaksiyon kinetikleri, reaktantların HUMO ve LUMO arasında karşılık gelen enerji farklılıkları ile belirlenmektedir (Şekil 2.9). Özellikle, daha küçük bir $HUMO_{dienofil} - LUMO_{dien}$ arasında oluşan enerji farklılığı nedeniyle dien/dienofil çiftleri daha iyi iEDDA reaksiyonu vermektedir [12, 86]. Sauer ve Boger tarafından yapılan organik çözücülerdeki kinetik çalışmalar, sulu ortamda gerçekleşebilen hızlı iEDDA bioortogonal reaksiyonlarında kullanılmak üzere uygun reaktantları bulmak için çaba gösterilmiştir. Tetrazin ve dienofil çiftlerini oluştururken gösterilen özen sonucunda iEDDA reaksiyonlarının dikkat çekici bir şekilde hızlandığı gözlemlenmiştir ve biyoortogonalite özelliği ortaya konmuştur [12]. Bununla birlikte, iEDDA reaksiyonları FMO'ya uygun olarak, 3- veya 6-pozisyonlarında ya da her ikisinde elektron ikame edicilerin bir sonucu olarak düşük LUMO enerjilerine sahip olduklarında tetrazinlerin reaktivitesi artmıştır [86]. iEDDA kinetiklerine etki eden diğer faktörlerse, iEDDA partnerlerindeki sübstituentlerin elektronik etkileri, gerginlik etkisi, stereokimyasal etkisi, yapısal (sterik) etkisi, çözücü ve pH'nın etkisidir [12].



Şekil 2.9 Normal ve ters elektron gereksinimli Diels-Alder reaksiyonunun sınır molekülleri orbitali [12]
(EDG, HOMO'nun seviyesini artırırken; EWG, LUMO'nun seviyesini düşürür.)

Genel olarak, doymamış bileşik olarak gergin alkenler veya alkinler (örnek: norbornenler, siklooktenler, *trans*-siklooktenler (TCO) ve siklopropanlar) kullanılmıştır; bununla birlikte, son zamanlarda vinilboronik asitler, dienofiller için uygun olduğu rapor edilmiştir [86]. 1990'ların sonunda Sauer tarafından kinetik araştırmalar detaylandırılarak en hızlı iEDDA reaksiyonunun gergin 8-üyelî halka sistemli dienofiller tarafından verildiği gösterilmiştir [87].

2.3.4 Tetrazin Türevlerinin Sentezi

Geleneksel olarak tetrazinlerin sentezinde, hidrazinler ve uygun öncüller (örnek: aromatik/alifatik nitriller ve imido esterler) ile reaksiyona girerek dihidrotetrazinlerin elde edilmesi ve ardından bu ara bileşiğin oksidasyonu sonucu reaktif tetrazin çekirdeklerinin oluşması takip edilmektedir. Son yıllarda, karbon-karbon bağı oluşumuna dayanan yeni metotlar ile özellikle floresans boyalarla fonksiyonlaştırılan tetrazin türevlerinin üretilmesi için araştırılmıştır [12].

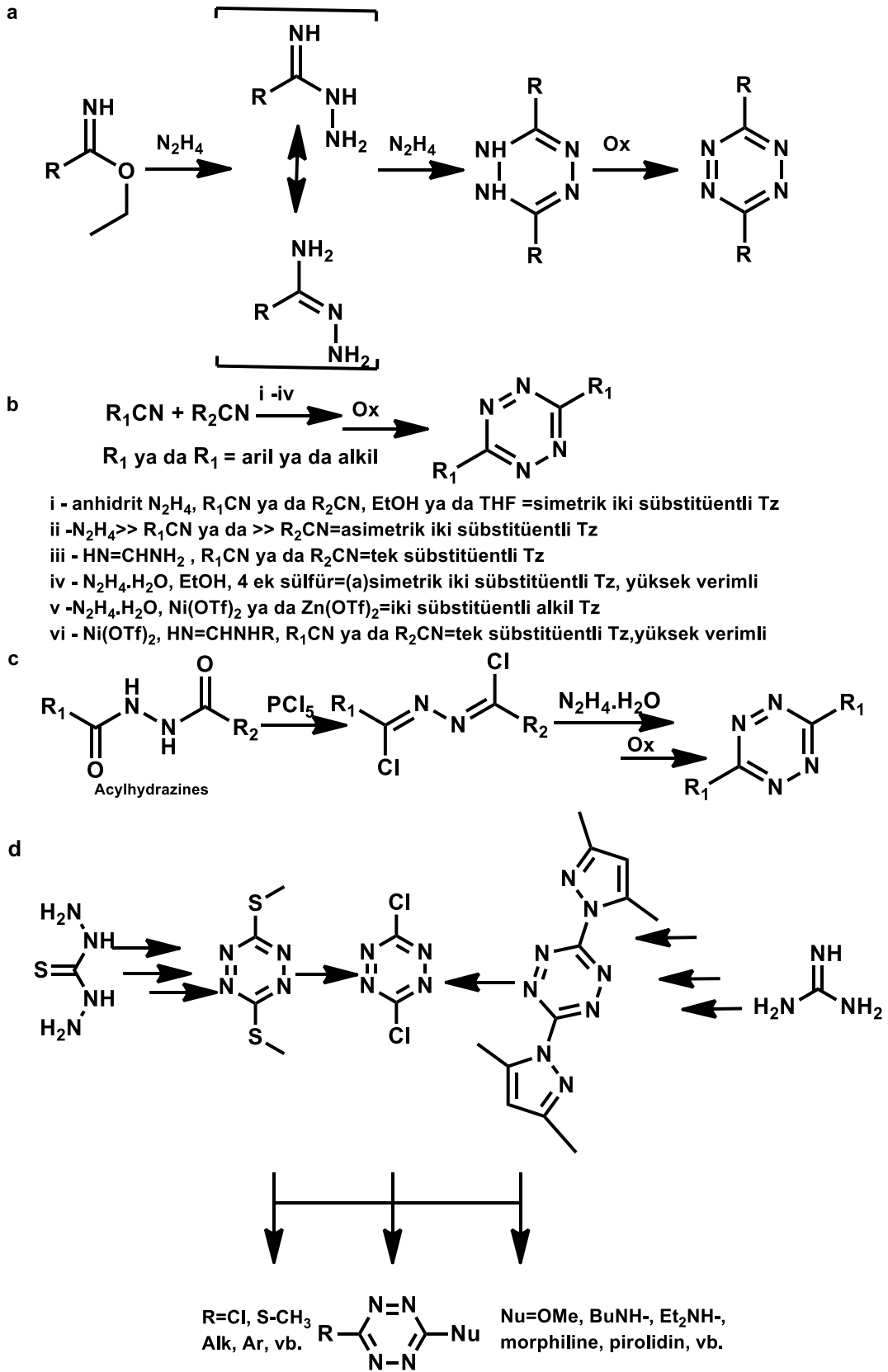
2.3.4.1 Tetrazinin Hazırlanması için Klasik Metotlar

İlk olarak, 1893 yılında Adolf Pinner tarafından tetrazinlerin sentezlenmesi için o güne kadar geliştirilmiş olan en iyi yöntem bildirilmiştir [88]. Pinner'e göre amidrazonara ürününün oluşumunu sağlayan hidrazin ile imido esterlerin reaksiyonu sonunda fazla kalan hidrazin ile reaksiyona girerek dihidrotetrazin oluşmaktadır ve ardından oksidasyon ile tetrazinler oluşmuştur (Şekil 2.10a) [88]. Bir diğer iyi tasarlanmış ve muhtemelen en sık kullanılan tetrazin sentezi yöntemi ise hidrazin içeren iki aromatik ya da alkil nitrillerin kondenzasyonudur

(Şekil 2.10b(i)). Başlangıç maddelerinin türüne bağlı olarak hidrazin, çoğu kez yardımcı çözücü olarak THF veya etanol ile birlikte hidrat (sulu bileşim) ya da süssüz (anhidrat) olarak kullanılmıştır. Bu yöntem yararlı olmasına rağmen, zor bir saflaştırma yöntemi gerektirir. Ayrıca, amaç iki sübstitüentli asimetrik tetrazinlerin hazırlanmasıysa bu nitril esaslı yöntem sınırlıdır (Şekil 2.10b(i)). Bileşenlerin birinin aşırı kullanılmasıyla, asimetrik tetrazinler düşük bir verimle (% 22) ve nispeten küçük ölçeklerde elde edilmiştir [89]. Ek olarak, bir nitril ve formamidin asetatının yoğunlaşma reaksiyonu tek sübstitüentli tetrazinlerin oluşumu ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.10b(iii)) [12].

Katalizör olarak sülfürün eklenmesi hem simetrik hem de asimetrik tetrazinlerin sentezi için geniş ölçüde araştırılmış olup reaksiyon veriminin iyileştirilmesine neden olmuştur (% 60-70, Şekil 2.10b(iv)) [90, 91]. Bu koşullar aromatik tetrazinlerin sentezinde başarıyla kullanılmış olmasına rağmen, alkil tetrazinlerin sentezlerinde ise çok düşük verim elde edilmiştir [12].

Son yıllarda, tetrazinlerin sentezi için yeni sentez yöntemleri araştırılmıştır. Devaraj ve diğerleri tarafından geliştirilen, hidrazinin nükleofilik katılımını artırmış ve aktif olmayan alkil nitriller de dâhil olmak üzere nitrilleri koordine etmiş, nitrillerin aktivasyonu için katalizör olarak Lewis asitlerin kullanımını rapor etmişlerdir. Nikel ve çinko trifatların yüksek verimli hem simetrik hem de asimetrik dialkil tetrazinlerinin tek kap sentezinin mümkün olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10b(v)) [5]. Daha sonra, Ni(OTf)₂ katalizörlü gram-skala ölçekli sentezi, yüksek verimde (%75) asimetrik tek ikameli tetrazinlerin elde edilmesinde kullanılmıştır (Şekil 2.10b(vi)), fakat sadece sülfür yükseltgenli reaksiyonunda %20'den düşük verimle elde edilmiştir [92]. Yüksek verim elde edilmesine rağmen, bu tek adım sentez yöntemi substratın tercihinde bazı sınırlamalara sahiptir. Hidrazin ve ısıtma koşulları ya nükleofilik katılma veya karboniller ve alkil halojenürler gibi indirgenmeye duyarlı birkaç fonksiyon gruplarıyla uyumlu değildirler. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için alkilhidrazinler PCl₅ ile muamele edilerek 1,2-diklorometilen hidrazin elde edilmiştir ve ardından hidrazin kondenzasyonu ve oksidasyonu yapılarak (a)simetrik ikameli tetrazinlerin sentezinde kullanılmıştır (Şekil 2.10c) [73].



Şekil 2.10 a) imidoesterler, b) nitriller, c) akillhidrazinler ve d) nükleofilik aromatik ikame kullanılarak tetrazinler için klasik sentez metotları [12]

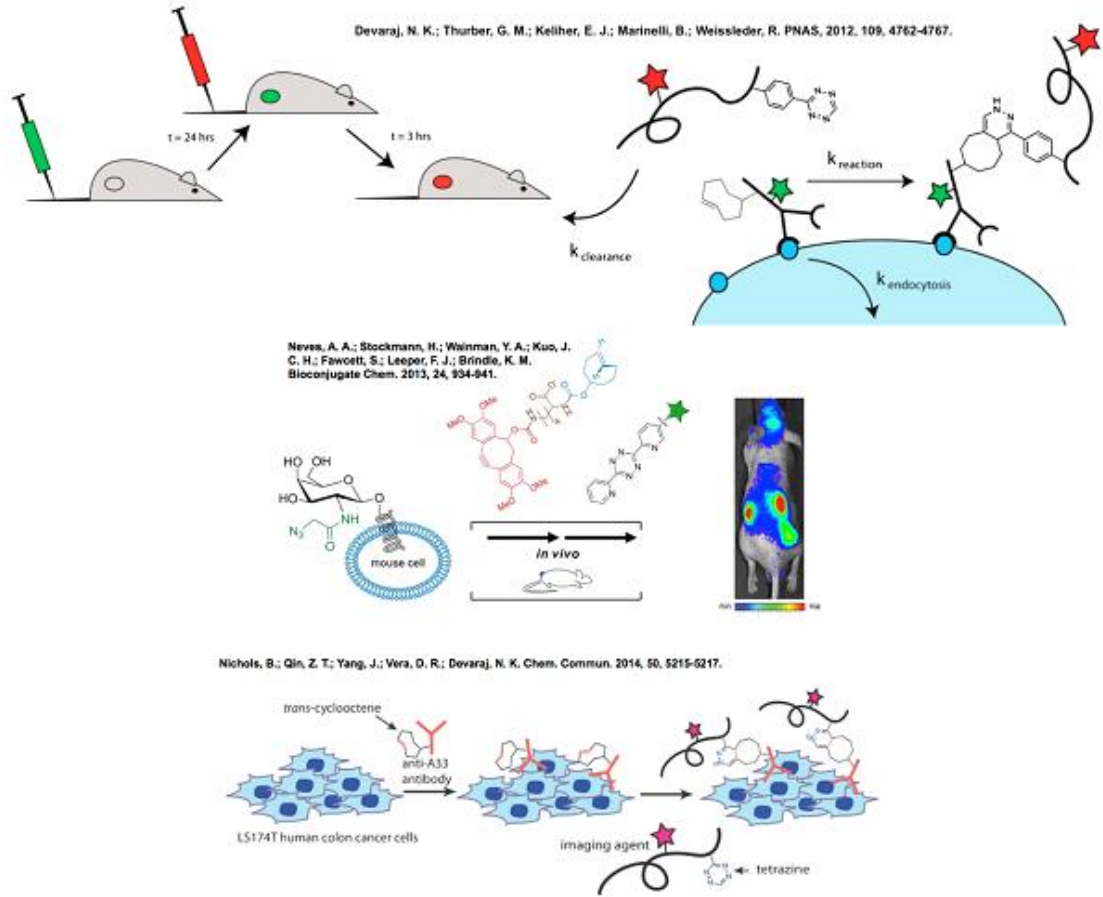
Bu genel yöntem ile elektron çekicici grupları (EWG) ve alifatik sübstitüent içeren hem simetrik hem de asimetrik tetrazinler, az bir verim ile sentezlenmiştir [93]. Mikrodalga ışımasının tetrazin oluşumunda reaksiyon süresini 5-6 saatten 30 dakikaya düşürerek verimi %10-20 arasında arttırdığını göstermiştir [94, 95]. Tetrazin sentezi için yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem ise ilgili öncüllerden başlayarak (örneğin, metiltiyo-1,2,4,5-tetrazin, 3,6-dikloro-1,2,4,5-tetrazin, 3,6- (3,5-dimetilpirazolil) -1,2,4,5-tetrazin) nükleofilik aromatik sübstitüsyondur (S_NAr) (Şekil 2.10d)[12, 96].

2.3.5 Biyolojik Sistemlerde İEDDA Reaksiyonunun Seçilmiş Uygulamaları

İEDDA ligasyonlarının biyoortogonal yaklaşımlarda kullanılması oldukça ilgi görmektedir. Böylece proteinler, antikorlar, nükleik asitler, yağlar, glikanlar veya biyoaktif küçük moleküller gibi biyomoleküllerin fonksiyon ve davranışlarını anlamak için kullanılmıştır. Örnek olarak, düşük konsantrasyonlu biyolojik ortamlarda yüksek hızlı kinetiğe sahip olan tetrazin-TCO ligasyonunun özellikle hızlı biyolojik süreçlerin izlenmesi ve görüntülenmesi için faydalı olmuştur [97, 98]. “Tetrazin ligasyonu” uygulamalarının süper çözünürlükte görüntülemek için yaşayan hücreler ile düşük miktarda proteinlerin floresans etiketlemesi [99], canlı hücrelerde biyoaktif küçük moleküllerin ve proteinlerin hedeflerinin belirlenmesi [100], canlı sistemlerde proteinin profilinin çizilmesi [101] ve DNA ve mRNA’nın diziye özgü tespit edilmesini [102] kapsar [12]. Son yıllarda oldukça etkin olarak kullanılan bu kimyanın sayısız örneğini görmek mümkündür.

Bir diğer örnekte Fox ve Hilderbrand, 2008’de *trans*-siklookten ve norbornen gibi gergin yapıda olan alkenler ile tetrazin bazlı siklokatalizma reaksiyonunu canlı hücre görüntülemeye kullanmıştır [103-105]. Bu reaksiyon yüksek hızı nedeniyle tanı ve teşhis sistemlerinde daha kısa sonuç alma avantajı sağlamaktadır. Özellikle tetrazin ve *trans*-siklookten arasında gerçekleşen İEDDA reaksiyonu ile tümörlü hücre ve PET görüntüleme, proteomiks gibi *in vitro* çalışmalarda ve *in vivo* görüntüleme gibi uygulamalarda oldukça fazla yer bulmaktadır [106-113]. Şekil 2.11’de bu hızlı reaksiyonların kullanıldığı *in vivo* çalışmalara örnekler verilmiştir.

Görüldüğü gibi canlı organizmalarda gerçekleşen reaksiyonlar ile hedefleme ve görüntüleme çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 2.7 Tetrazin-*trans*-siklookten reaksiyonlarının kullanıldığı örnek uygulamalar

2.4 Biyoortogonal Yaklaşımlar

Canlı sistemlerde biyolojik süreçler oldukça karmaşıktır fakat aynı zamanda biyolojik ve biyomedikal araştırmalarda bu süreçlerin aydınlanması oldukça önemlidir. Biyolojik süreçlerin moleküler düzeyde detaylı olarak araştırılması aktif biyolojik problemleri oluşturmak için çeşitli biyokonjugasyon stratejileri oluşturmak amacıyla geliştirilmiştir [114]. Biyoortogonal reaksiyonlar, bütün sisteme müdahale etmeden ya da biyomoleküller arasında herhangi bir etkileşim olmaksızın biyolojik sistemler içinde devam edebilen kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanmıştır [115, 116]. Biyoortogonal kimya, biyomoleküllerin yapısı ve

fonksiyonlarını ve canlı sistemler ile hücre manipölasyonlarını inceleyerek reaksiyonun gerçekleşmesini kolaylaştıran güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır [117]. Uygun şartlar altında seçici ve etkili olarak ilerleyebilen bir kısım biyoortogonal reaksiyonlar hızlı kinetiğe sahip, sulu ortamlara karşı toleranslı, yüksek seçicilik ve doğal olarak oluşan fonksiyon grupları ile uyumlu özelliklere sahiptir [34].

Biyootogonal reaksiyonların ideal tamamlayıcı bileşenleri, biyolojik sistemlere karşı inert (etkisiz) ve toksik olmamalıdır, ancak biyolojik ortamda bulunuklarında birbirleriyle seçici, biyouyumlu ve reaktif olmalıdır [34]. Bu özellikleri ile biyoortogonal reaksiyonları, biyomolekülleri kendi doğal konumlarında etiketlemede güçlü birer araçtır. Hedef biyomoleküllere (şeker, protein vb.) dâhil edilen işlevsel gruplar, biyoortogonal reaksiyonlar için seçici partner moleküller olarak kullanılarak iki adımlı tespit ve görüntülemede bu araçtan faydalanılmaktadır. Diğer bir yandan, biyoortogonal moleküllerin parçalanma (yarılma) reaksiyonları, hücre içi proteinlerin ve ön ilaçların zaman-mekânsal aktivasyonunun kontrol edilmesini sağlamıştır. Biyoortogonal reaksiyonları *in vivo* biyomoleküllerinin mekânsal ve zamansal olarak kontrol edilmesi [118], süper çözünürlükte görüntülenmesi [119], ve post-translasyon modifikasyonlarının [120] açıklanması için kullanılmıştır [12]. İdeal bir biyoortogonal reaksiyonunda yüksek modifikasyon verimliliğini sağlamak için biyomoleküllerde bulunan diğer potansiyel reaktif fonksiyonel grupları üzerinde seçici olmalı, sulu ortamlarda ilerleyebilmeli, fizyolojik pH'a yakın ve düşük reaktant konsantrasyonlarında gerçekleşebilmeli, oda sıcaklığında veya 37°C'ye kadar hızlı reaksiyon hızına sahip olmalıdır [12].

Biyokonjugasyon stratejileri ile biyoortogonal reaksiyonlarının kullanılması, geleneksel biyolojik stratejilerin sınırlamalarına değinerek çeşitli spesifik biyomoleküller üzerinde ayrıntılı inceleme yapılmasına olanak sağlayacaktır. Bu amaçla, Staudinger ligasyonu, click reaksiyonu, tetrazin ligasyonu ve foto-click reaksiyonu gibi farklı biyoortogonal reaksiyonlar geliştirilmiş ve biyo-etiketlemede yaygın olarak uygulanmıştır [116, 121, 122]. Tetrazin içeren ilk bioortogonal örnekler Weissleder ve Fox grupları tarafından hemen hemen eş zamanlı olarak sunulmuştur [9, 10]. Biyokonjugasyon kullanımlı bir biyoortogonal reaksiyon

tipik olarak iki aşamalı bir stratejiyi kapsar; birincisi, bir reaktif bileşenin bir biyomolekül ile (kimyasal veya biyokimyasal olarak) reaksiyona sokulması ve ardından fluoroforlar veya afinite etiketleri ile biyomolekül etiketlenmesi için biyoortogonal konjugasyonu takip eder [34].

2.5 Polimerizasyon Yöntemleri

Geçmişten günümüze zincir polimerizasyon yöntemlerini incelediğimiz zaman 1910 ve 1930 yılları arasında peroksi bileşikleri başlatıcı olarak kullanılarak serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile polimerler elde edilmiştir. 1940'lı yıllardan sonra redoks polimerizasyon yöntemi kullanılarak polimerler sentezlenmiştir. 1950'li yıllardaysa serbest radikal başlatıcısı olarak azo bileşiklerinin araştırılmasıyla polimerizasyon yöntemlerinin incelenmesine ve geliştirilmesine devam edilmiştir. Bu araştırmaların devamında 1960 ve 1980'e kadar geçen sürede C-C bağlarına sahip bileşiklerin ve parçalanabilir S-S bağlarına sahip olan başlatıcıların kullanılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Kullanılan bu başlatıcı çeşitleriyle gerçekleştirilen polimerizasyon yöntemlerinin hepsi Nitroksit Aracılı Polimerizasyon (NMP), Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi Polimerizasyonu (RAFT) ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) ile “yaşayan”/kontrollü radikal polimerizasyonlarının (CLRP) atası olarak tanımlanabilir [123].

2.5.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu (FRP)

Günümüzde üretilen plastiklerin yaklaşık %45'i ve sentetik kauçuklarınsa yaklaşık %40'ı serbest radikal polimerizasyonu yöntemi kullanılarak elde edilmektedir [123]. Serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile günlük hayatımızda sık olarak kullanıldığımız polimerler elde edilirken aynı zamanda özel amaçlar içinde kullandığımız polimerlerin sentezlenmesinde de bu yöntem kullanılmaktadır. Serbest radikal polimerizasyonu, radikal zincir süreci ile makromoleküllerin sentezinde genel olarak kullanılan bir yöntemdir ve birbirinden farklı vinil monomerin (ko)polimerizasyonu içinde kullanılmaktadır.

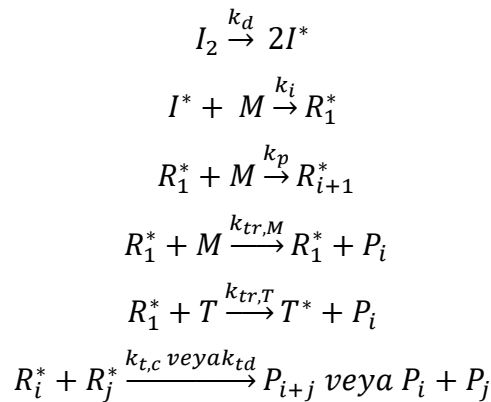
Serbest radikal polimerizasyonu, iyonik ve koordinasyon polimerizasyon yöntemlerine kıyasla birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar, basit deneysel şartlar

altında, polar çözücülerin içerisinde, eser halde kalan safsızlıklara (nem) karşı veya çözücülerini uzaklaştırmaya ihtiyaç duymaksızın yüksek molekül ağırlığına sahip olan polimerleri üretebilmektedir [124, 125]. Bu özellikler ile serbest radikal polimerizasyonu yöntemi, özgün özelliklere sahip olan birçok polimer ve kopolimer bileşiklerinin sentezlenmesiyle çok yönlü bir yöntem haline gelmiştir [125].

Serbest radikal polimerizasyon yönteminin en önemli bir diğer avantajıysa etilen, akrilat, stiren ve akrilonitril türevleri gibi kullanılabilecek olan çok sayıda monomer çeşitliliğidir. Kullanılabilecek olan bu monomerlerin hepsinin temel özellikleri ise bir C-C çift bağının varlığıdır. İkinci karbon atomu üzerindeki sübstientler, monomerin kinetik ve termodinamik özellikleri ile polimerleşmenin özelliğini belirleyecektir [125]. Bununla birlikte, serbest radikal polimerizasyonu ile ilgili temel sorun polimerizasyon sonucunda elde edilen polimerlerin, morfolojilerinin yanı sıra polidispersite (PDI), zincir mimarisi ve alana özgü fonksiyonelliğe sahip iyi tanımlanmış olan polimerlerin hazırlanmasını sağlayan işlemler üzerinde zayıf kontrolü olması olup elde edilen polimerin moleküler ağırlık dağılımının (PDI) tam olarak belirlenemeyişidir [126].

2.5.2 Serbest Radikal Polimerizasyonunun Basit Mekanizması

Serbest radikal polimerizasyonunun temel mekanizması sırasıyla ayrışma, başlama, çoğalma, zincir transfer ve sonlanma basamaklarını içermektedir (Şekil 2.12) [125, 127-129].



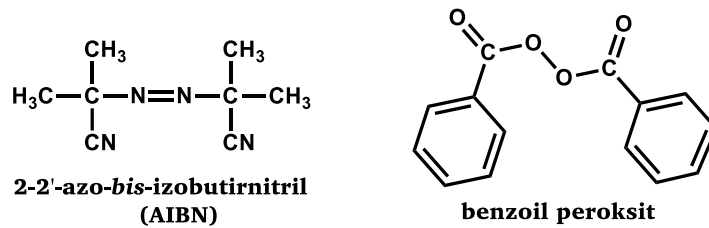
Şekil 2.8 Serbest radikal polimerizasyonun genel mekanizması

Şekil 2.12’de gösterilen I_2 başlatıcı, M monomer, R_1^* ’i uzunluğunda büyüyen bir radikal, T polimer zincir transfer ajanı veya çözücü olabilir. k_d başlatıcının ayrışması için gerekli hız sabiti olup, k_i başlama reaksiyonunun hız sabiti ve k_p ise çoğalma reaksiyonunun hız sabitidir. $k_{tr,M}$ ve $k_{tr,T}$ ise sırasıyla M ve T transfer reaksiyonları için transfer hız sabitidir.

Serbest radikal polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan basamaklardan birincisi başlatıcının iki ayrı parçaya ayrılmasıyla başlamıştır. Ayrılan bu iki parça ise büyüyen zinciri başlatacak olan bir monomere (M) eklenmiştir. Gerçekleşen bu basamağın ardından, her bir monomer birimi bu çoğalma zincirine ardışık olarak eklenmiştir ve böylece bir makro radikal elde edilmiştir. Bu makro zincir sonlanması iki makroradikalin bir zincir uzunluklu polimer ile sırasıyla ya birleştirici radikallerin zincirinin uzunluklarının toplamına denk gelmesi ya da iki polimer zincirlerin orijinal zincir uzunlukları ile denk gelmesiyle meydana gelmiştir. Sonlanma, iki makroradikalin birleşmesi ya da orantısızlaştırılması gerçekleşene kadar polimerin büyümesi devam etmiştir [125, 128].

2.5.2.1 Başlama

Başlama reaksiyonu basamağı sırasıyla bir monomerin, karbon-karbon çift bağı ile reaksiyona girecek olan aktif merkezi oluşturulmasıyla meydana gelmiştir. Bu reaksiyonun oluşumu için en çok tercih edilen başlatıcılar (I) benzoil peroksit (BPO) ve 2,2’-azo-bis-izobutironitril (AIBN)’dir.



Şekil 2.13 Sık kullanılan başlatıcı türleri

Genel olarak radikaller, peroksitlerin veya azo bileşiklerinin fotobaşlatıcısı ya da sıcaklık gibi dış etkilere maruz bırakılarak geleneksel radikal başlatıcıların ayrışmasıyla elde edilmiştir. Bu ayrışma yöntemi, fotokimyasal veya sıcaklık yoluyla kovalent bağların, homolitik bölünmesiyle veya redoks reaksiyon yöntemi sonucunda meydana gelmektedir. Yeniden birleşme (rekombinasyon) sonucunda

inert (etkisiz) moleküllerin oluşumu meydana geldiği için başlatıcı moleküllerin ayrışmasıyla oluşan bütün radikaller zincir büyüme sürecini başlatamazlar. Oluşan başlatıcı radikalle, çoğalan radikale bir monomer eklenmesiyle zincir-büyümesi başlamaktadır. Genel olarak oluşan radikalın bir monomer birimine eklenmesi, başlatıcı moleküllerin ayrışmasından çok daha hızlı olması nedeniyle başlatıcı hızı, başlatıcının ayrışma hızı ile belirlenmiştir. Böylece önemli bir özellik olan geleneksel radikal başlatıcının konsantrasyonunun yarıya inmesi için geçen zaman olarak tanımlanan yarı ömürdür [130, 131]. Başlatıcının tamamının parçalanmasına rağmen başlatma etkisi daha az olmaktadır çünkü meydana gelen radikallerin bazıları çözücünün etkisiyle bulunduğu yerden daha uzağa difüze olamadığı için birbirleriyle tepkimeye girmektedirler. Başlatıcıların parçalama miktarı ortamda bulunan aktif merkezler tarafından parçalanarak zarara uğramasına ve çözücünün türüne bağlıdır [132].

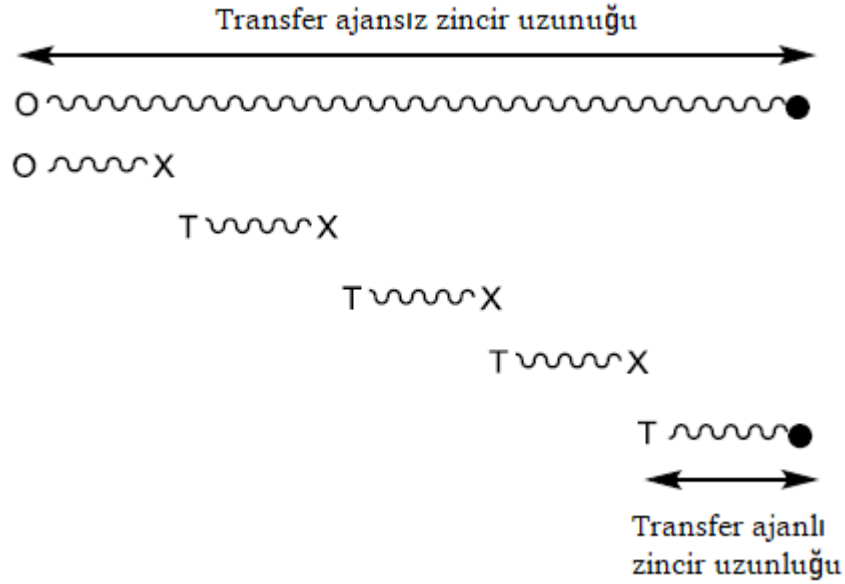
2.5.2.2 Çoğalma

Çoğalma basamağı serbest radikal polimerizasyonu (FRP) için en önemli süreç olup bir monomer biriminin karbon-karbon çift bağına tekrar tekrar eklenmesiyle meydana gelir. Gerçekleşen her ekleme, bir monomer birimi ile daha büyük yeni bir radikalın oluşması ile sonuçlanmaktadır. Polimerizasyon sonucu yüksek molekül ağırlığına sahip bir polimer zinciri oluşturmak üzere bu sürecin transfer ve sonlanma reaksiyonları ile rekabet edebilmesi için daha hızlı olması gerekmektedir. Çoğalma genellikle monomer yapısında baş-kuyruk geometrisi ile meydana gelmektedir. Bir vinil monomerin başı, $\text{CH}_2=\text{CHX}$, X süstitüentini içeren kısmı olarak tanımlanmıştır. Bu karbon-karbon çift bağının α ve β pozisyonuna ve çoğalma radikalının kimyasal yapısına bağlıdır [130, 131, 133].

2.5.2.3 Zincir Transfer Reaksiyonları

Bir zincir transfer reaksiyonu büyüyen bir polimer zincirinin radikal merkezinden makromolekül olmayan başka bir yapıya transferini kapsamaktadır ve serbest radikal konsantrasyonunu değiştirmeksizin ölü bir polimer zincirinin oluşmasıyla son bulmaktadır. Bu makro molekül olmayan monomer, başlatıcı, çözücü veya bir zincir transfer ajanı olabilmektedir. Bu transfer reaksiyonlarının ortalama molekül

ağırlıkları değerleri başlama, çoğalma ve sonlanma süreçleri için hesaplanarak tahmin edilenden daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 2.14'te zincir uzunluğuna eşlik eden azalma ve bir zincir transfer fragmentlerinin son grupları olarak nasıl dâhil edildiği gösterilmiştir [130, 131, 133].

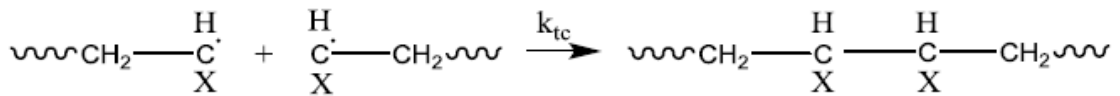


Şekil 2.14 Zincir transferinin şematik gösterimi

Bir polimer molekülünün transferinin gerçekleşmesinde olasıdır ve bir polimer zinciri üzerinde bir radikal alanının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Yeni bir radikal alanına monomerin katılmasıyla, dallanmış bir makromolekülün oluşmasına yol açmıştır. Bu tür zincir transfer reaksiyonu, dönüşümün arttığı, polimerlerin uygulama alanları ve fiziksel özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu daha belirgin hale gelmiştir. Bu polimerizasyon basamağı sonunda elde edilen bir polimer kısa zincir dallarına ve uzun zincir dallarına sahip olabilir. Zincir transferi reaksiyonları genellikle istenmeyen reaksiyonlar olup polimerin yapısında ve kinetiğinde kontrolün kaybedilmesine ve molekül ağırlığı dağılımının artmasına sebep olur. Bu nedenle kontrollü/yaşayan polimerizasyon yöntemleri gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

2.5.2.4 Sonlanma

FRP'nin sonlanma basamağında, bimoleköl reaksiyonu gerçekleşerek iki çoğalma radikalinin birbirleriyle karşılaşmasıyla daha fazla yayılamayan (büyümeyen) “ölü” polimerin oluşumu gözlenir. Sonlanma basamağı rekombinasyon (Şekil 2.15) yada orantısızlaşma (disproporsiyonasyon) (Şekil 2.16) olarak iki farklı yolla gerçekleşebilir. Rekombinasyon ile sonlanma, ayrı ayrı iki radikal zincirinin rekombine olması sonucunda iki zincirin toplam uzunluğunda ölü bir polimer molekülü oluşması ile sonuçlanır. Orantısız sonlanma (disproporsiyonasyon) ise bir radikalın ve uç zincirlerinden bir hidrojenin diğer radikale transfer edilmesiyle; moleküllerinden birinin doymamış bir uç grup içeren iki ölü polimer oluşumu ile sonuçlanır. Oluşan ölü polimer zincirleri, başlangıçtaki makro radikaller ile eşit zincir uzunluklarına sahiptir. Genellikle her iki sonlanma mekanizmasına da rastlanılmaktadır ve bu sonlanma basamaklarının göreceli oranı, monomerin yapılarından ve az bir derecede de sıcaklık, basınç ve çözücünden etkilenmektedirler.



Şekil 2.15 Rekombinasyon ile sonlanma

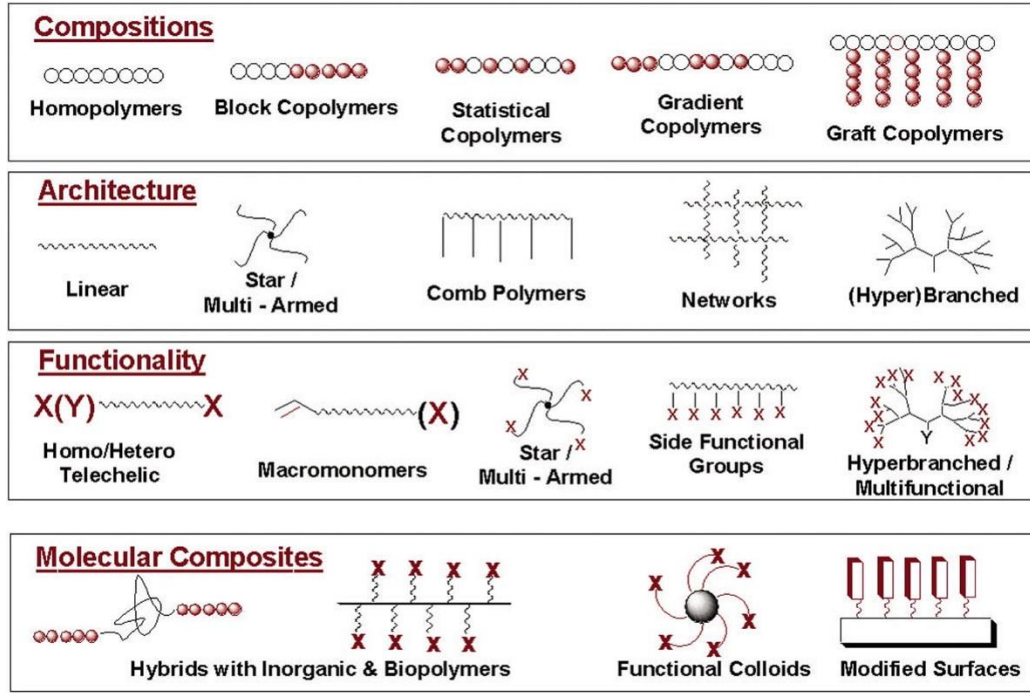


Şekil 2.16 Orantısız sonlanma

2.5.3 Kontrollü/ “Yaşayan” Radikal Polimerizasyonu (CLRP)

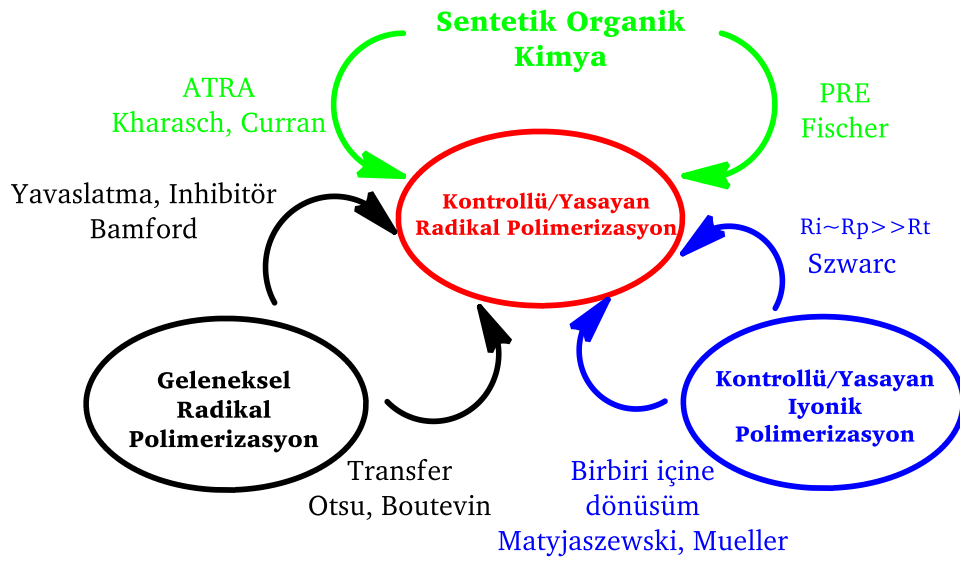
Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonu (CLRP) yapısı iyi tanımlanmış polimerlerin geliştirilmesi, polimerizasyonun kinetiğinin kontrol edilmesi ve dolayısıyla fonksiyonel ve/veya farklı mimarideki polimerlerin elde edilmesi noktasında önemli bir araç olmuştur [126]. Dolayısıyla gerek malzeme bilminde gerek biyolojik uygulamalarda organik ve inorganik kompozitlerin, biyokonjugatların ve yüzeye bağlı kopolimer malzemelerin tasarımında eşsiz bir

imkân sağlamıştır. CLRP teknikleri gradiyent [134], blok [135], alana özgü fonksiyon polimerler [136], üç veya çok kollu yıldız kopolimer [137], graft kopolimerler [138, 139] dâhil olmak üzere yeni birçok (ko)polimerin hazırlanmasında kullanılmıştır [126]. Bunlara ek olarak, inorganik malzemeler, doğal ürünler, nanokompozitleri sentetik polimerler ile birleştirerek hibrit malzemelerin hazırlanmasında da kullanılmaktadır [140, 141] [126] (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 CLRP ile elde edilen molekül yapılarının örnekleri [126]

Serbest radikal polimerizasyonun sınırlamaları nedeniyle 1950'lerden günümüze CLRP'nin gelişmesi için polimer bilimi alanındaki birçok çalışma Şekil 2.17'da özetlenmiştir. Bu gelişmeler arasında en önemlilerden biri Michael Szwarc tarafından keşfedilen yaşayan polimerizasyon yöntemi olmuştur [142-144]. Szwarc'ın yapmış olduğu çalışmaların temelinde, zincir büyüme polimerizasyonunun aşamalarından olan transfer ve sonlandırma reaksiyonlarını gidermesi amaçlanmıştır. Bu zincir kırma sürecinden, polar olmayan vinil monomerlerin anyonik polimerizasyonunun gerçekleştirilmesi esnasında, ortamdaki nem ve havayı en aza indirmek için (<1 ppm) özel vakum teknikleri geliştirmiştir [142, 144]. Michael Szwarc sadece anyonik polimerizasyonun gelişmesinde rol oynamamıştır aynı zamanda radikal süreçler üzerinde de çalışmalar yapmıştır [144-148].



Şekil 2.18 Kimyanın farklı alanlarındaki ilerlemelerin birleştirilerek kontrollü radikal polimerizasyonun gelişimi [142, 149-156]

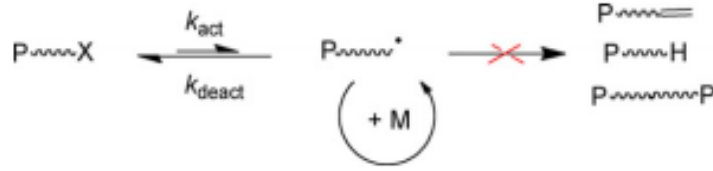
Yaşayan polimerizasyon yöntemi ile hem sentetik polimer kimyası hem de polimer fiziğine büyük bir katkı sağlanmıştır. Bu yöntem ile daha önceleri elde edilen kontrolsüz ve geniş polidispersiteye sahip olan polimerlerin oluşması engellenerek, mimarileri ve morfolojileri tam olarak tasarlanmış olan aynı zamanda hedeflenen özelliklerini kesin olarak sağlayan polimerler üretilmiştir [144, 157-159].

İdeal CLRP'nin Özellikleri

İdeal bir yaşayan polimerizasyon tekniğinde, polimerizasyon zincirlerinin tamamı aynı anda başlamalıdır ve bütün monomerler tükenene kadar aynı hızda büyümesini sürdürerek sonra istenen süreye kadar canlı kalması sağlanarak büyümesi devam etmektedir. Bu durum, büyüme sürecinde zincir sonlandırma basamağının olmadığını göstermiştir. Ek olarak, ekzotermik polimerizasyon reaksiyonu kontrolden çıkmayacak şekilde, polimerizasyonu hızının yavaş olması gerekmektedir [160].

Bu mekanizmanın kilit özelliği, son derece düşük seviyedeki tersinmez sonlandırma reaksiyonlarının oluşmasını en aza indirmek için polimerizasyon süresi boyunca çoğalan radikallerin $[P^*]$ ve çeşitli dormant türlerin (yani, ucu kapatılmış, bu nedenle çoğalamaz) arasında meydana gelen dinamik bir denge kurulmuştur. Oluşan bu denge (Şekil 2.19), fotokimyasal, termal, kimyasal

uyarıcılar ile tetiklenerek yönetilmiştir. Böyle bir yaklaşımın başarısı için, bir polimer zinciri hareketsiz (dormant) halindeyken zamanın büyük bir kısmı harcanmıştır [161].



Şekil 2.19 CLRP genel mekanizması [161]

Büyüyen zincirler ve dormant türleri arasında kurulmuş olan bu denge genel polimerizasyon hızının azalmasına izin vermiştir, böylece reaksiyon süresi mili saniyeden dakikaya ya da saatlere yükselmiş olup çoğalan zincirlerin yayılması ve düşük molekül ağırlıklı polimerlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Dormant ve aktif türler arasındaki hızlı ve ayarlanabilir bir dengeye sahip olması nedeniyle birçok kontrollü/yaşayan polimerizasyon sisteminin gelişmesine neden olmuştur [144]. Birçok farklı monomer ile uygulanabilen CLRP teknikleri arasında nitroksit aracılı polimerizasyonu (NMP), tersinir katılma-bölüşme zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu ve metal katalizörlü atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) gibi yöntemler en sık tercih edilen ve uygulanması en kolay olanlardır.

Tablo 2.2 NMP,RAFT ve ATRP süreçlerinin faydaları ve sınırlandırmaları

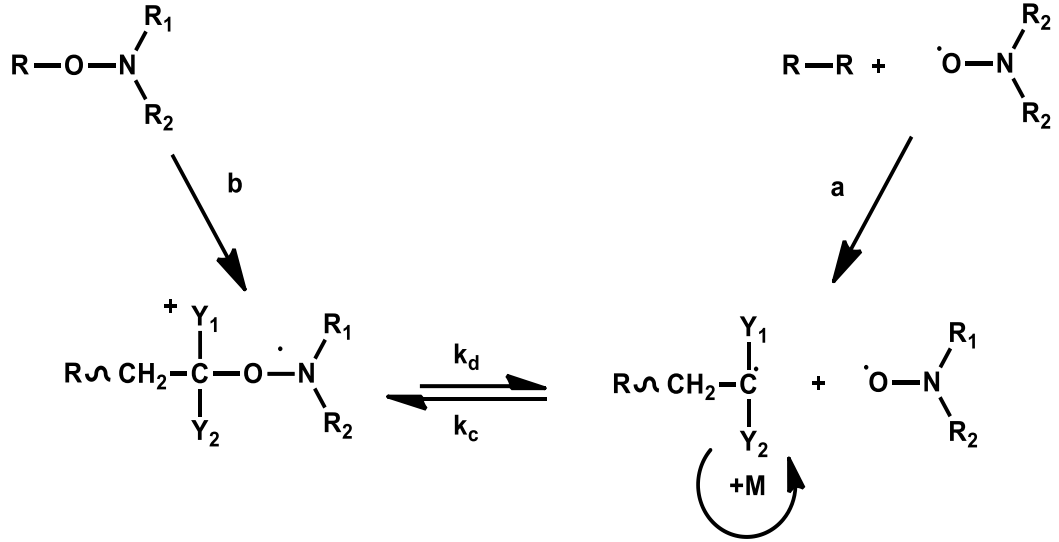
	Faydaları	Sınırlandırmaları
NMP	Geçiş metalleri kullanılmamaktadır. Koku ve renk değişimi için düşük potansiyele sahiptir.	Çok yönlülüğü en az olandır.
RAFT	Çok yönlüdür. Geçiş metallerinin kullanılmaz. Monomer çeşitliliği fazladır.	Koku ve renk değişikliği için yüksek potansiyele sahiptir. (Özellikle düşük molekül ağırlığı için)
ATRP	Çok yönlüdür. Özel ihtiyaçlar durumunda katalizörü uyarma becerisi mevcuttur.	Geçiş metal kullanılmaktadır. Polimerlerin özellikliğini değiştiren birçok değişikene sahiptir.

2.5.4 Nitroksit Aracılı Polimerizasyonu (NMP)

Polimerlerin molekül mimarisi üzerinde mükemmel kontrol yeteneğine sahip olan CLRP, 1980'lerin başlarında polimer bilimi için yeni bir araştırma dalı oluşturmuştur. Polimer alanındaki öncü çalışmaların rehberliğinde birçok CLRP yöntemi geliştirilmiştir. En eski CLRP çeşitlerinden biri nitroksit aracılı polimerizasyonudur. NMP, büyüyen zincirlerin istenilen miktarda ve iyi tanımlanmış polimerlerin elde edilmesini sağlamıştır. Özellikle, herhangi bir geçiş metali kullanılmadan ilerlemesi nedeniyle zincirlerin uçlarındaki nitroksil foksiyon gruplarını taşıyan herhangi bir geçiş metali safsızlığı içermeyen polimerlerin elde edilmesi bu polimerizasyon yöntemi ile sağlanmıştır [162].

NMP'de kararlı bir nitroksit radikalının kullanımı büyüyen/çoğalan serbest radikallerin polimerizasyonunu "kontrol" etmek içindir [163]. NMP için yaygın olarak kullanılan nitroksitler 2,2,6,6- tetrametilpiperidinil-1-oksi (TEMPO), N-tert-butil-N- [1-dietilfosfono- (2,2-dimetilpropil)] nitroksit (SG1) ve 2,2,5-trimetil-4-fenil-3-azaheksan-3-oksil nitroksittir (TIPNO). SG1 ve TIPNO stirenikler, alkil akrilatlar, akrilik asit, akrilamidler ve dienlerin kontrollü polimerizasyonunda kullanılması için uygunken TEMPO kontrollü stirenikleri kontrol etmek için daha uygundur [161].

NMP'ü iki yaklaşımla gerçekleştirilebilmektedir. İlk yaklaşımda, bir alkoksi amin bileşiği başlatıcı olarak davranır ve sıcaklıkla birlikte çoğalma aşamasındaki radikali ve tersinir bir sonlanma için gerekli olan nitroksit radikalini oluşturur. Burada kullanılan başlatıcı aynı zamanda dormant molekül olup polimerizasyonun kontrollü yürümesini sağlamaktadır. Oluşan radikal monomere katılarak polimerizasyonun çoğalma aşamasında aktif rol oynarken nitroksit radikali ise tersinir terminasyonu sağlar. İkinci yaklaşımda ise reaksiyon bir inert nitroksit radikali ve bir radikal kaynağı başlatıcı ile başlatılır. Başlatıcının homolitik kırılması sonucu oluşan aktif radikal monomer katılmasını sağlar ve ortamda bulunan nitroksit tersinir sonlanmayı sağlar. Böylece her iki yaklaşımda da dormant ve aktif türler arasındaki, yani aktivasyon-deaktivasyon dengesi olarak bir denge kurulmuştur (Şekil 2.20) [161].



Şekil 2.20 NMP’de aktivasyon deaktivasyon dengesi. İki bileşenli başlatma sistemi (a) ve tek bileşenli başlatma sistem (b) [161]

Bu denge, ne bir katalizör ne de bir bimoleküler değişimine ihtiyaç duymadan tamamen termal bir süreç olma avantajı sunmuştur. Bu polimerizasyon kinetiği, aktivasyon-deaktivasyon dengesi ($K=k_d/k_c$ ile aktivasyon-deaktivasyon sabiti) ve kalıcı radikal etkisi (PRE) tarafından yönetilmiştir [151, 162, 164, 165].

Genel olarak, 100 °C’den yüksek sıcaklıklarda temiz koşullar altında alkoksiamin başlatıcısı ile gerçekleştirilmiştir. NMP, polimerizasyon işlemi süresince elde edilen bir polimerik alkoksiamin, tersinir C-ON bağı ile ilerlemiştir. Uygun sıcaklıkta bir alkoksiamin başlatıcısı içerisindeki, bu C-ON bağının termolizi ile bir nitroksit ve bir de geçici C radikali üretilmiştir. Bu monomer, alken gruplarındaki ikinci türlerin eklenmesinden sonra nitroksit radikali ile kombinasyon oluşturması nitroksit ve yeni bir polimer radikalinin üretilmesiyle termolize maruz kalarak, büyüyen zincir ile polimerik alkoksiamin üretilmiştir. Genellikle, bu C radikali, nitroksit tarafından yakalanmadan önce birden fazla monomere eklenmiştir. Serbest nitroksit/polimerik radikal ve polimerik alkoksiamin arasındaki denge kapalı kabuk polimerik alkoksiamin alanına uzakta olduğu için serbest radikal konsantrasyonu, tüm polimerizasyon işlemi boyunca düşük tutulmuştur ve böylece sonlandırma reaksiyonlarını baskılamıştır. Buna bağlı olarak, polimerizasyonun kontrollü polimerik alkoksiamin ve makroradikal/nitroksit arasındaki denge sabiti k ’ya bağlıdır. k denge sabitinin, iç H-bağı, sterik, elektronik ve polar etkiler gibi nitroksitin yapısal özellikleri tarafından güçlü bir şekilde

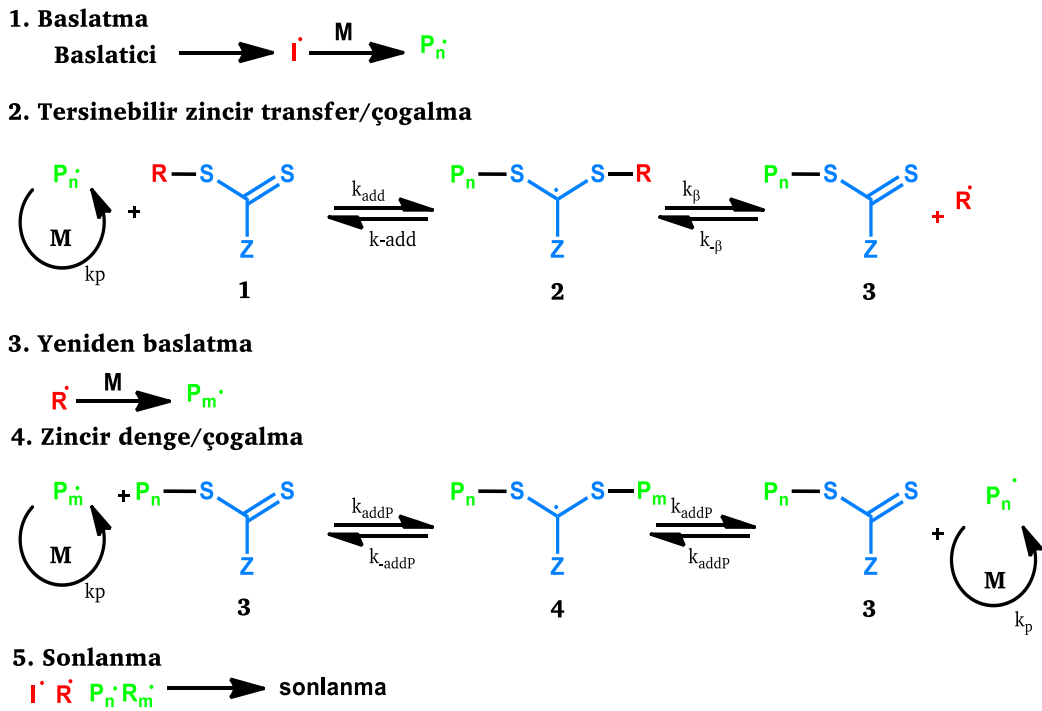
etkilendiği bilinmektedir [166]. Bir nitroksitin yapısı, sonuçta elde edilen makromoleküllerin hem polimerizasyon hızını hem de polidispersitesini etkilemektedir [162].

2.5.5 Tersinir Katılma–Ayrılma Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu

CSIRO'daki (Avustralya) araştırmacılar tarafından 1998 yılında ilk kez rapor edilmiş olan tersinir katılma zincir transferi (RAFT), en popüler tersinir deaktivasyon radikal polimerizasyon yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Günümüzde en geniş çapta kullanılan polimerizasyon tekniklerinden biri olup yaşayan/kontrollü polimerizasyon süreçlerinden yararlanarak, çeşitli fonksiyonları olan düşük dispersiyonlu, kontrollü molekül ağırlıklı, karmaşık mimarileri olan ve geniş bir kullanım alanına sahip polimer malzemeler elde edilmiştir [167, 168]. Farklı birçok türden monomerler ve çözücüler içerisinde gerçekleşebilir olması, çok bloklu kopolimer ve karmaşık mimarilere sahip polimerlerin üretilmesi nedeniyle oldukça kıymetli bir yöntemdir. Bu avantajların yanı sıra dezavantajı ise sülfür içerikli bileşenler kullanılması nedeniyle kötü kokusudur [167].

RAFT polimerizasyon yöntemindeki başlama, zincir çoğalma ve zincir sonlanma basamakları tıpkı geleneksel radikal polimerizasyon basamaklarında olduğu gibi gerçekleşmektedir (Şekil 2.21). RAFT polimerizasyon sürecinin birinci basamağında, geleneksel radikal polimerizasyonda olduğu gibi standart bir başlangıç aşaması ile başlamaktadır, başlatıcıdan gelen radikal (I) normal bir radikal başlatıcının homolitik bağ ayrılması ile iki reaktif birincil serbest radikalın (I^*) oluşumuna neden olmuştur [169] ve çoğalan bir (P_n) verecek şekilde monomerler ile reaksiyona girmiştir. Ardından, bu çoğalan radikal (P_n), RAFT ajanından (1) (zincir transfer ajanı, CTA) gelen C=S grubu eklenerek bir ara radikal (2) üretilmiştir. Ara radikal (2) ortaya çıkışı çoğalma arasındaki tersinmez sonlandırma reaksiyonunu sınırlamıştır ve ara radikal C=S grubu aktivitesinden faydalanarak iki farklı fragmentasyon vermiştir. Ara radikal (2), yeni bir radikal (R^*) ve bir dormant zincire (polimerik tiyokarboniltio bileşiği) (3) parçalanabilirken, orta dereceli bir radikal (P_n) ve RAFT ajanı elde etmek için

başlangıç durumuna geri dönmesi mümkündür. Daha sonra, üçüncü basamak olarak yine çoğalma radikali ($P_n^\cdot$), yeni oluşan bir radikal ($R^\cdot$) tarafından monomer polimerizasyonundan yeniden başlatıldıktan sonra oluşmuştur. Bu durumda, dormant türleri (3) ve aktif çoğalma radikalleri ($P_n^\cdot$) ve ($P_m^\cdot$) arasında (2. ve 4. basamaklar) polimerizasyonun benzer bir yolla gerçekleşmesiyle büyümek için eşit şansa sahip zincirlerin tamamına olanak sağlayan bir hız denklemi oluşmuştur. 5. basamak olan sonlanma reaksiyonu ise radikal bir polimerizasyon sisteminin kaçınılmaz sonunu oluşturmuştur (Şekil 2.21). RAFT ajanı olarak, RAFT polimerizasyonuna katılmayı sağlayan polimerik zincirlerin tiyokarboniltiyo uç grubunun varlığı nedeniyle sonlandırma reaksiyonu minimum olmaktadır [167].



Şekil 2.9 Tersinir katılma zincir transferin mekanizması (RAFT)

Şekil 2.21'den görüldüğü gibi, RAFT ajanında bulunan C=S grubunun aktivitesi polimerizasyon sürecinin düzenlenmesinde ve kontrol edilmesinde rol oynamıştır. Buradaki polimerizasyon yönteminde genellikle tercih edilen RAFT ajanlarının yapıları Şekil 2.22'de gösterilmiştir. Burada bulunan Z grubu, C=S bağının aktivitesini düzenlemektedir ve ara radikali kararlı hale getirmektedir. RAFT'ın

polimer uyumluluğunun çok yönlü olması nedeniyle Z-gruplarının farklı çeşitleri, farklı reaktiviteye sahip monomerler polimerleştirme için tercih edilmiştir. Ayrıca, RAFT ajanı C=S bağı çoğalan radikalın katılmasına maruz kaldığı zaman, ikinci R-grubu mükemmel bir ayırma grubu olmalıdır ki hızlı ve etkili olarak polimerizasyonu tekrardan başlatabilmelidir. Diğer bir deyişle, ayrılan R-grubu, başlatıcı ve monomer radikal ile aynı fonksiyonlu ve verimli olması gerekmektedir. Özetle, uygun bir RAFT ajanı, ideal bir RAFT polimerizasyonunun kontrollü ve yaşayan süreçte gerçekleşebilmesi için oldukça önemlidir. RAFT ajanları, aromatik ditiyoester, tritiyokarbontlar, ditiyokarbamatlar ve ksantatlar olarak dört temel kategoride incelenmiştir [167].



Şekil 2.22 RAFT ajanının yapısı

RAFT polimerizasyon sürecindeki bir diğer önemli faktör ise radikaldır. Radikalın temel maddesi olan başlatıcıların konsantrasyona, polimerizasyonun hızına ve ölü zincirin miktarına bağlıdır [170-172]. Yapılan kinetik araştırmalara göre, yaşayan zincirlerin maksimum sayısını göstermiştir ve yüksek polimerizasyon hızı, başlatıcıların düşük konsantrasyonunda bile gerçekleşmiştir [167].

2.5.6 Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)

Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon yöntemleri arasında yer alan ATRP, 1995 yılında Matyjaszewski'nin [173, 174] keşfettiği ve Sawamoto'nun [175] katkıda bulunmasıyla bugünkü polimerlerin molekül ağırlığının ve hedeflenen mimarilerinin kontrol edilmesine olanak sağlayan önemli bir yöntem olmuştur. Bu yöntemin uygulanmasının kolay olması, ticari olarak mevcut olan ve kolay ulaşılabilen katalizörlerin ve başlatıcıların kullanılması nedeniyle en çok dikkat çeken yöntemdir. ATRP, akrilonitril, (met)akrilatlar, stiren ve dienler gibi çok

çeşitli vinil monomerler için kontrollü bir polimerizasyon yöntemi sağlamada çok yönlü ve etkili olduğunu ispatlamıştır [176]. Geleneksel radikal polimerizasyonundan farklı olarak, ATRP, çoğalan polimer zincir ucuna eklenen monomerin oranını belirlemek için metal bir kompleks kullanmıştır. ATRP uygulamasındaki prosedürde, çözücüye eklenen başlatıcı, katalizör, monomer, ligand bileşenler olup reaksiyon süresi ve sıcaklık parametrelerine bağlıdır.

2.5.6.1 Monomerler

ATRP'de çoğalma radikallerini stabilize edebilen sübstient içeren stirenler, (met)akrilatlar, (met)akrilamitler ve akrilonitriller gibi çeşitli monomerler başarıyla polimerize edilmiştir [176].

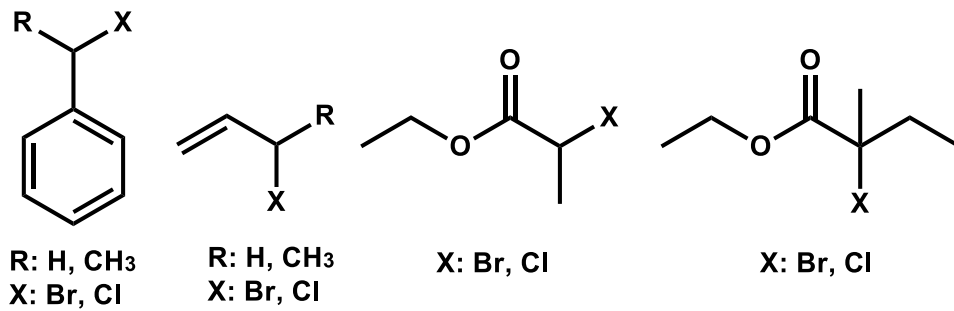
Aynı koşullar altında ve katalizör kullanılarak gerçekleşen polimerizasyonlarda her monomer, aktif ve dormant türleri için eşsiz bir atom transfer dengesi sabitine sahiptir. Denge sabiti ($K_{eq} = k_{act}/k_{deact}$), orantısızlaştırma ve birleştirme ile radikal sonlandırma dışında herhangi bir yan reaksiyonun olmaması durumunda polimerizasyon hızını belirlemiştir. Denge sabitinin değerinin küçük olması durumunda ise ATRP ya çok yavaş gerçekleşmiştir ya da hiç gerçekleşmemiştir. Buna karşılık olarak, çok büyük değere sahip bir denge sabitinin yüksek radikal konsantrasyonu nedeniyle büyük bir sonlandırma miktarına neden olmuştur. Ardından dormant türleri yönünden dengeye kayarak, etkisiz yüksek oksidasyon durumuna sahip olan metal kompleksinin büyük bir miktarı ile birlikte olmuştur. Bu durum yavaş polimerizasyona neden olabilir [177]. ATRP'de kullanılan her monomer, kendine özgü bir radikal çoğalma hızına sahiptir. Böylece, spesifik bir monomerin radikal deaktivasyon hızı ve çoğalan radikallerin konsantrasyonu, polimerizasyon kontrolünü sağlamak için düzenlenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, ATRP katalizöre bağlı bir süreç olduğundan, dengenin tüm konumu sadece radikal (monomer) ve dormant türlere bağlı olmayıp, aynı zamanda eklenen geçiş metali katalizörün miktarı ve reaktivitesinde bağlıdır [176].

2.5.6.2 Başlatıcılar

Başlatıcıların temel rolü, büyüyen polimer zincirlerinin sayısını belirlemektir. ATRP ile elde edilen bir polimerin ortalama molekül ağırlığı M_n , monomerin dönüşümüne ve monomerin başlatıcıya olan oranına bağlıdır.

$$M_n = ([M]_0 / [RX]_0) \times \text{Conv} \times \text{MW}(M) \quad (2.1)$$

Dar bir molekül ağırlığına sahip ve mimarisi iyi tanımlanmış olan bir polimeri elde etmek için, halojenür grubu X, geçiş metal kompleksi ve büyüyen zincir arasında gerçekleşen göç, hızlı ve seçici olmuştur. En iyi şekilde molekül ağırlığını kontrol etmek için X olarak brom veya klor kullanılmıştır. İyot bakır katalizli akrilat polimerizasyonunda çalışırken stiren için kontrol ancak rutenyum katalizörü ile sağlanır. Flor kullanımı ise tercih edilmemektedir, çünkü C-F bağı homolitik kırılmaya maruz kalmayacak kadar güçlüdür. Bazı psödohalojenler, özellikle akrilatların ve stirenlerin, tiyosiyanatlar ve tiyokarbamotlar polimerizasyonunda kullanımları başarı ile sonuçlanmıştır [176]. Kullanılan başlatıcının yapısına ve halojen atomlarının sayısına bağlı olarak hazırlanan polimerlerin mimarisi başlatıcıların tek halojen atomu olan alkil halojenürlerin kullanılmasıyla lineer, çok halojen atomlarının kullanılmasıyla da yıldız ya da fırça benzeri gibi çeşitlilik göstermiştir.



Şekil 2.10 ATRP’de kullanılan başlatıcılar

2.5.6.3 Katalizör

Kontrolü bir şekilde monomerin büyümesi ve düşük molekül ağırlığına sahip polimerin elde edilebilmesi metal bazlı katalizöre bağlıdır. ATRP için en önemli bileşenlerden biri olan katalizör, dormant ve aktif türler arasındaki değişim dinamiklerini ve atom transfer dengesinin konumunun belirlenmesi için yan

reaksiyonun ve istenmeyen sonlanmanın olmasını engelleyen katalizörler ATRP yöntemi için çok önemlidir [176]. ATRP’de kullanılan birçok geçiş metali (Fe, Co gibi) arasında en sık kullanılan katalizör bakır(I) bileşikleridir.

2.5.6.4 Çözücüler

ATRP, yığın halde, çözeltide, emisyon yada süspansiyon olarak heterojen bir sistemde gerçekleştirilmektedir. ATRP reaksiyonu gerçekleşirken farklı monomerler için çeşitli çözücüler (aseton, dimetil formamid, etilen karbonat, alkol, su, benzen, tolüen, anisoli difenil eter, etil asetat, karbondioksit ve diperler) kullanılmıştır. Özellikle ATRP yöntemi ile elde edilen polimerler, monomerinde çözünmediğinde (örneğin poliakrilonitril) bir çözücü kullanılması gerekmektedir. ATRP’de kullanılacak olan çözücü sistemi tercih edilirken çözücüde zincir transferi minimum düzeyde olmalı, çözücü ve katalizör sistem arasındaki etkileşimler göz önünde bulundurulmalı ve katalizöre bağlanmamalıdır [176].

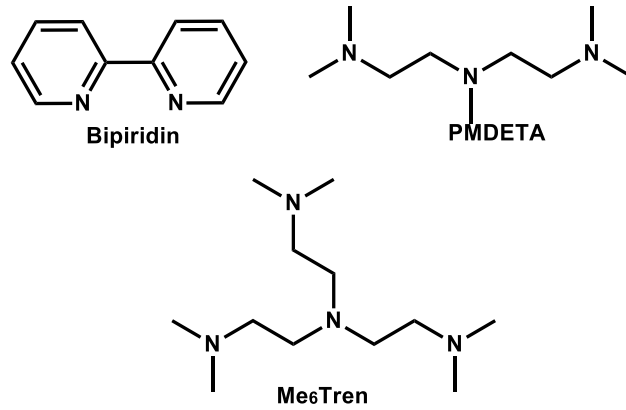
2.5.6.5 Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Atom transfer denge sabitinin ve radikal çoğalma hız sabitinin artışı, ATRP süresince polimerizasyonun hızı ve sıcaklığına bağlı olarak artmıştır. Radikal çoğalması için radikal sonlandırma yüksek aktivasyon enerjisinin bir sonucu olarak daha iyi kontrollü/yaşayan polimerizasyonu için yüksek kp/kt oranlarında ve yüksek sıcaklıklarda gözlemlenmiştir. Ancak, zincir transferi ve diğer yan reaksiyonlar yüksek sıcaklıklarda daha belirgin hale gelmiştir [178]. Katalizörün çözünürlüğü yüksek sıcaklıklarda artmıştır. Bununla birlikte, katalizör ayrışma sıcaklık artışı ile de meydana gelir [179, 180]. ATRP reaksiyonları gerçekleşirken tercih edilen sıcaklık 25-150°C arasında değişkenlik göstermektedir. Reaksiyon için tercih edilen uygun sıcaklık, kullanılan monomer ve katalizör türüne aynı zamanda da hedeflenen moleküler ağırlığına bağlıdır. Yüksek monomer dönüşümlerinde ise çoğalmanın hızı dikkat çekecek şekilde yavaşlamıştır ancak herhangi bir yan reaksiyonu hızı önemli ölçüde değişmemiştir, çünkü yan reaksiyonların çoğu monomerin konsantrasyonundan bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Monomer dönüşümünü tamamlamak için uzun reaksiyon süreleri nihai polimerin polidispersitesi artırmamıştır, fakat bu durum uç

gruplarının kaybolmasına neden olmuştur. Dolayısıyla, yüksek uç grup fonksiyonlu polimerlerin elde edilebilmesi, blok kopolimerler sentezlenmesi ve uç grup kaybını engellemek için dönüşüm %95'i aşmamalıdır [176].

2.5.6.6 Ligandlar

ATRP'de ligandın kullanımının amacı organik ortamdaki geçiş metal tuzunu çözünür hale getirilmesi, uygun reaktivitenin sağlanması ve atom transferi için dinamiklerin metal merkezinin redoks potansiyelinin ayarlanmasıdır. Ligand seçimi, katalizörlerin spesifik polimerizasyon reaksiyonunun etkinliğini büyük ölçüde etkilemiştir. Ligandın görevi, katalizör sistemlerinin çözünürlüğünü sağlamak ve metali kararlı hale getirerek reaktiviteyi düşürmek için kullanılmaktadır. ATRP'de kullanılan ligandlar ikiden fazla azot içeren organik moleküllerdir.

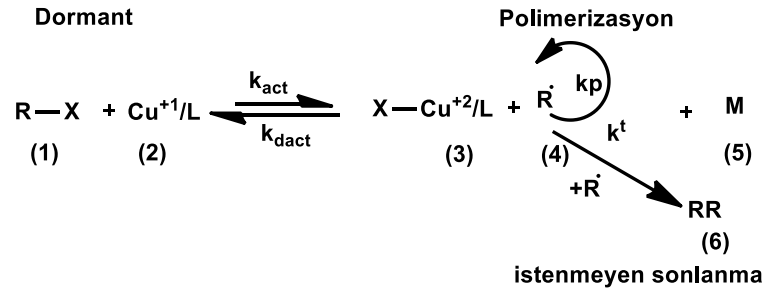


Şekil 2.23 ATRP'de ligand türleri

2.5.7 ATRP'nin Mekanizması

ATRP, birbirinden farklı iki oksidasyon durumuna sahip olabilen bir geçiş metali (M_I) kompleksin kullanıldığı bir katalizlenme sürecidir. Düşük oksidasyon basamağına sahip olan bir metal kompleksi (M^{z+}/L), (burada L bir ligandı temsil etmektedir.) " k_{act} " hız sabiti ile ilerleyen, aktivasyon olarak adlandırılan bir süreç olup, bir R^* radikali ve koordineli bir halojenür anyonu ile karşılık gelen yüksek oksidasyon basamaklı metal kompleksi $X-M^{z+1}/L$ üretmek için ATRP başlatıcısı olan alkil halojenür (RX) ile reaksiyona girmektedir. Ardından gelen bileşik, alkil halojenür ve düşük oksidasyon basamaklı bir metal kompleksini tekrardan

üretmek halojen atomunu yeniden radikale geri aktarmıştır. Bu radikaller, monomerler (çoğalmanın hız sabiti k_p ile polimer üretilmesi) ile birbirleriyle (hız sabiti k_t ile sonlanma) veya $X-Mt^{z+1}/L$ (k_{deact} , hız sabiti ile deaktivasyon) ile reaksiyona girebilirler. Geleneksel radikal polimerizasyonu ile ATRP'yi birbirinden ayıran son aşama ise Mt^z/L ile tekrar reaksiyona girebilmesi ve halojen uçlu polimerik dormant halinde ürün vermesidir. Eğer bu deaktivasyon süreci verimliyse yani k_{deact} yüksek değerliyse ve tüm polimer zincirleri alkil halojenür başlatıcısının uygun seçimi ile kısa bir süre içerisinde başlatılmışsa, sonuçta elde edilen polimer dar bir molekül ağırlığı ile karakterize edilmiştir. Ek olarak, hızlı bir polimerizasyonun gerçekleşmesi için, ATRP denge sabiti olan k_x terimi olarak adlandırılan k_{act}/k_{deact} oranının yüksek değerli aktif bir katalizör kullanılması tercih edilmektedir. k_{act} ve k_{deact} hız sabitleri hem geçiş metale ve hem de liganda bağlıdır [181, 182].



Şekil 2.25 ATRP'nin genel reaksiyon mekanizması

Şekil 2.25'te gösterilen ATRP'nin genel reaksiyon mekanizması, dormant başlatıcıyı $R-X$ (1), ligand (L) ile bir geçiş metali Cu 'dan oluşan katalizör (2), oksitlenmiş katalizör (3), aktif radikali veya aktif başlatıcıyı $R^{\cdot}$ (4) ve monomeri (M) (5) ve sonlandırılmış polimeri (6) içermektedir. ATRP reaksiyonunun hız sabiti (k_x), aktifleşmenin hızını k_{act} , deaktivasyon hızını k_{deact} , monomer ekleme hızını k_p ve sonlandırma hızını k_t hız sabitleri belirlenir. Oluşan bu denge üzerindeki kontrol ise yüksek oranda katalizör seçimine bağlıdır.

ATRP yönteminde farklı reaksiyon ortamları ve farklı monomerleri için birçok katalizör türü mevcuttur. Metallerin birçoğu ama en sık da bakır esaslı katalizörler olup özellikle iki oksidasyon durumuna sahip olan Cu^I ve Cu^{II} 'lerdir ve ayrıca azot içeren ligandlarda katalizör olarak başarıyla kullanılmıştır. Klasik ATRP'nin dezavantajlarından en önemlisi katalizör miktarının yüksek oranda

kullanılmasıdır [174]. Elde edilen polimerler, molekül ağırlığı dağılımı ve zincir uç fonksiyonları açısından iyi tanımlanmış olup ancak katalizörü uzaklaştırmak için zahmetli saflaştırma işlemlerinin uygulanmasını gerektirmektedir. Katalizörü uzaklaştırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmesine rağmen bu ekstra saflaştırma adımı saf ürünü elde etmek için gerekli süreyi uzatmıştır ve hazırlanmak istenen polimerin maliyetini artırmıştır [181, 183].

Oksijene duyarlı olan katalizörün miktarını azaltmak için ATRP'nin birkaç çeşidi geliştirilmiştir. Reaksiyon başlatıcısında havaya duyarlı katalizör üretmek için ATRP'nin yeni çeşitleri geliştirilmiştir [181]. ATRP'nin bu çeşitleri; sürekli aktivasyon yenilemek için başlatıcılar (ICAR), elektron transferi ile üretilen katalizörler (AGET), elektron transferi ile yeniden üretilen katalizörler (ARGET) ve ters ATRP'dir.

Geleneksel ATRP yöntemi, yüksek seviyeli Cu kalıntıları gibi ağır metallerden oluşan toksisiteleri en aza indirmek ya da ortadan kaldırmak için gerekmektedir. ICAR, AGET ve ARGET polimerizasyon boyunca düşük seviyede Cu ile çalışmaktadır ve böylece katalizörü uzaklaştırmak için minimum çaba harcanarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmektedir. ATRP nin bu yeni türleri, bu yüksek değerli uygulamalar için iyi tanımlanmış kopolimerler hazırlanmasını sağlamıştır.

Tablo 2.3 ATRP çeşitleri faydaları ve sınırlamaları

Polimerizasyon	Faydaları	Sınırlamaları
Normal ATRP	Çok yönlü	Yüksek oranda Cu içermektedir, kararsız katalizör öncüsü
ICAR	Düşük Cu içermektedir, katalizör öncüleri daha kararlıdır.	AIBN yan reaksiyonlara neden olmaktadır.
AGET	Düşük Cu içermektedir. Katalizör öncüleri daha kararlıdır.	Yüksek Sn içermektedir. (FDA onaylı)
ARGET	Düşük Cu içermektedir. Katalizör öncüleri daha kararlıdır.	Yüksek Sn içermektedir. (FDA onaylı)
Ters ATRP	Basit katalizör öncüsü daha kararlıdır.	Son grup fonksiyonlu sınırlı olup; sadece lineerdir. Mw hedeflemek zordur.
Eş zamanlı ters ve normal ATRP	Katalizör öncüsü daha kararlıdır.	AIBN yan reaksiyona neden olmaktadır.

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

3.1.1.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

NMR spektroskopisi analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinde bulunan Ultrashield Plus™ mıknatısa sahip olan 1,74 Tesla manyetik alanı gücündeki Bruker Avance III 500 MHz Spektrometresi ile yapılmıştır. Ölçümler, otomatik örnekleyici B-ACS 60 ünitesi yardımı ile ICON-NMR ve Top Spin v2.7 yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

3.1.1.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Jel geçirgenlik kromatografi analizleri pompa, otomatik örnekleyici ve Viskotek VE 3580 kırılma indisi (RI) dedektöründen oluşan Viskotek GPC_{max} VE 2001 cihazı ile yapılmıştır. İç çapı 7,8 mm, uzunluğu 300 mm olan üç viskotek kolonu (T3000, LT4000L ve T5000L) ve bir de viskotek koruma kolonu (CLM 3008, iç çapı:4,6 mm, uzunluğu: 10 mm) serisi kullanılmıştır. 35°C'de 1,0 mL dk⁻¹ akış hızı olan tetrahidrofuran (THF) eluent olarak kullanılmıştır. Dedektör dar molekül ağırlığına sahip olan polistiren standartları ile kalibre edilmiştir. Veriler Viskotek OmniSEC 4.7,0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.1.1.3 Morötesi Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde bulunan UV-1800 Shimadzu UV-Vis Spektrofotometresinde uygun dalgaboylarında analizler yapılmıştır.

3.1.1.4 Fouier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

FT-IR spektrumu, Perkin Elmer Spektrum One FTIR (ATR örnekleme aksesuarı) spektrometresi ile kaydedilmiştir ve elektronik spektrum oda sıcaklığında 1 cm boyundaki küvet kullanılarak Scinco S-3100 spektrofotometresi üzerinden elde edilmiştir. Bu analizler İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.1.5 Uçuş zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC-MS Q-TOF)

Bu organik moleküllerin yapısal analizleri Agilent LC MS Q-TOF kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler Yıldız Teknik Üniversitesi, merkez labaratuvarında yapılmıştır

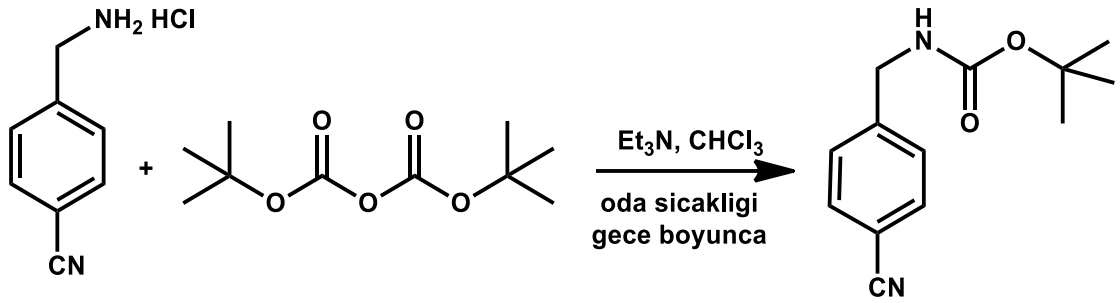
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

4-(Aminometil)benzonitrile hidroklorid (Sigma-Aldrich, %97), trietilamin (Merck) , di-*tert*-butil dikarbonat, sodyum bikarbonat (Merck, %99,7), magnezyum sülfat (susuz, Sigma-Aldrich, %99,5), *N*-izopropil akrilamid (Tokyo Kimya Endüstrisi, >%98,0), akrilonitril (AN) (Aldrich, ≥%99), *N,N*-dimetilformamid (Merck, %99,8), poli(etilen glikol) monometil eter metakrilat (PEGMA) ($M_n=300$ g/mol) (Alfa Aesar), Poli(etilen glikol) metil eter ($M_n=2000$ g/mol) (Sigma-Aldrich), benzoil peroksit (Sigma, %70), *N,N,N',N',N''*-penta metil dietilenetri amin (PMDETA) (Merck), etil 2-bromopropionat (EBP) (Aldrich), piridin (Merck), *cis*-5-norbornen-endo-2,3-dikarboksilik anhidrit (Sigma- Aldrich), *N,N'*-disikloheksilkarbodiimid %99 (DCC) (Acros organics), 4-(dimetilamino) piridin (DMAP) (Aldrich), metil metakrilat (Sigma,%99), nikel trifloro metan sülfonat ($Ni(OTf)_2$) (Alfa Aesar, %96), bakır (I)bromür (CuBr) (Alfa Aesar), 4-siyanofenilasetik asit (Sigma-Aldrich), çinko trifloro metan sülfonat ($Zn(OTf)_2$) (Sigma-Aldrich, %98), hidrazin monohidrat (Sigma-Aldrich, %98), sodyum nitrit (Merck), *N,N*-dimetilformamid (Merck, %99,8), 5-hidroksi-1-siklookten (Carbosynth), metil benzoat (Sigma-Aldrich, 99%), kloroform (Sigma-Aldrich ≥%99,5), HCl, dikloromethan (DCM), dietil ether (Merck), tetrahidrofuran (THF), dimetil formamid (DMF), gümüş nitrat (Sigma-Aldrich,

$\geq 99\%$), amonyum hidroksit, N,N'-disüksinimidil karbonat (DSC), etil asetat (Merck), hekzan ve diğer kimyasallar satın alınarak kullanılmıştır.

3.2 Öncül Moleküllerin Sentezleri

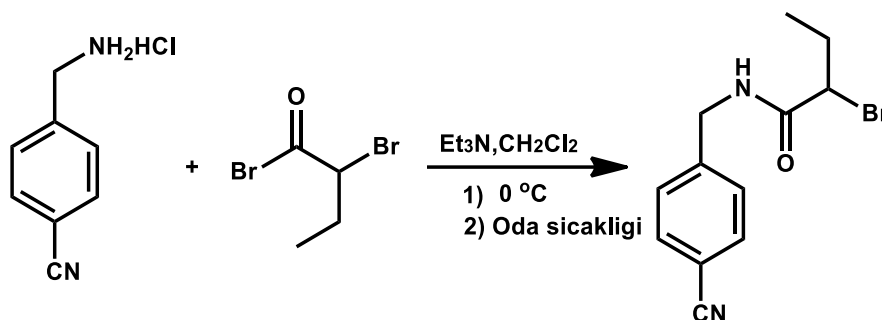
3.2.1 Tert-bütıl4-siyanobenzilkarbamat Sentezi



Şekil 3.1 Tert-bütıl4-siyanobenzilkarbamat sentezi

Trietilamin (2 mL, $14,23 \times 10^{-3}$ mol), 4-(aminometil)benzonitril hidroklorür (2 g, $11,86 \times 10^{-3}$ mol) ve kloroform (40 mL) argon gazı altında reaksiyon karışımına eklenerek çözünmesi sağlandı. Hazırlanmış olan bu reaksiyon karışımı içine di-tert-butil dikarbonat (2,848 g, $14,83 \times 10^{-3}$ mol) ilave edilerek oda sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı diklorometan ile seyreltilerek, seyreltik hidroklorik asit (HCl) (10 mL) çözeltisine eklendikten sonra reaksiyon sonlandırıldı. İlk olarak asit ardından sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (10 mL) ve tuzlu su (10 mL) çözeltisi ile ekstraksiyon yapıldı. Ardından toplanan organik faz ise magnezyum sülfat (MgSO₄) ile kurutuldu ve bu karışım süzgeç (filtre) kâğıdı ile süzüldü. Son olarak, çözücü döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldı ve ürün, yüksek vakum altında kurutulduktan sonra elde edildi. Elde edilen ürün başka saflaştırma işlemine tabi tutulmadan NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.

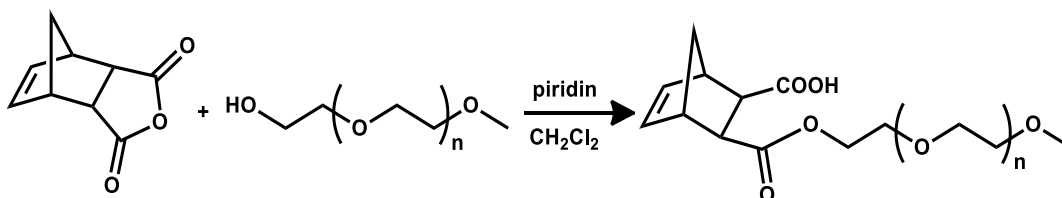
3.2.2 2-bromo-N-(4-siyanobenzil) bütanamide Sentezi



Şekil 3.2 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil) bütanamide sentezi

Trietilamin (3,30 mL, $2,37 \times 10^{-3}$ mol), 4-aminometil benzonitril hidroklorür (2 mL, $1,18 \times 10^{-3}$ mol) ve diklorometan (15 mL) içerisinde buz banyosu altında (0°C 'de) karıştırılırken yaklaşık 20 dakika boyunca argon gazı geçirildi. Daha sonra reaksiyon karışımına 2-bromobütil bromür (1,57 mL, $1,30 \times 10^{-3}$ mol) damla damla eklendi. Ardından buz banyosu uzaklaştırıldı ve argon gazı kapatıldı. Sistem 23°C 'de gece boyunca karışmaya devam ettirildi ve reaksiyon sonucu elde edilen ham karışıma 30 mL distile su, 30 mL tuzlusu, 25 mL sodyumbikarbonat su çözeltileri ile toplam 100 mL diklorometan ile 3 kez ekstraksiyon yapıldı. Ardından organik faz magnezyum sülfat (MgSO_4) ile kurutuldu ve sonra süzgeç (filitre) kâğıdı ile süzüldü. 2-bromo-*N*-(4-siyanobenil)bütanamid kolondan silika jel ile (hekzan:etil asetat=2:3) saflaştırdı. Elde edilen ürün NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.

3.2.3 Poli(etilen glikol) (PEG)-Norbornen (NB) Sentezi



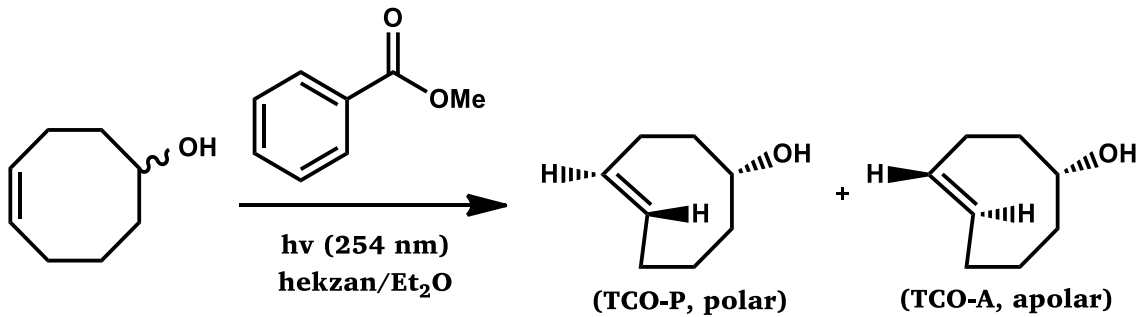
Şekil 3.3 PEG-NB sentezi

Poli(etilen glikol) metil eter ($M_n=2$ kDa) (61×10^{-2} g, 3×10^{-4} mol) ve piridin (1 mL) süssüz 3 mL diklorometan içinde çözüldü. *cis*-5-norbornen-endo-2,3-dikarboksilik anhidrit (15×10^{-2} g, 9×10^{-4} mol), N, N'-disikloheksilkarbodiimid (DCC) (92×10^{-3} g, $4,5 \times 10^{-4}$ mol) ve 4-(dimetilamino) piridin (DMAP) (54×10^{-3} g, 45×10^{-4} mol)

çözelti içerisine eklendi. Bu karışım azot atmosferi altında 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. 12 saatin sonunda çözelti vakum altında kurutuldu. PEG-NB soğuk dietil eterde çöktürüldü. Bu ham ürün DCM içerisinde çözöldü ve sonra ikinci kez soğuk dietil eter içinde çöktürüldü. Üçüncü kez ham ürün tetrahidrofuran içerisinde çözöldü ve hekzan içerisinde santrifüjlendi. Çöken polimer oda sıcaklığında gece boyunca vakum altında kurutuldu.

3.2.4 *Trans*-siklooktenol (TCO) ve Türevlerinin Sentezi

3.2.4.1 *Trans*-5-siklooktenol (TCO) Sentezi



Şekil 3.4 *Trans*-siklooktenol (TCO) sentezi

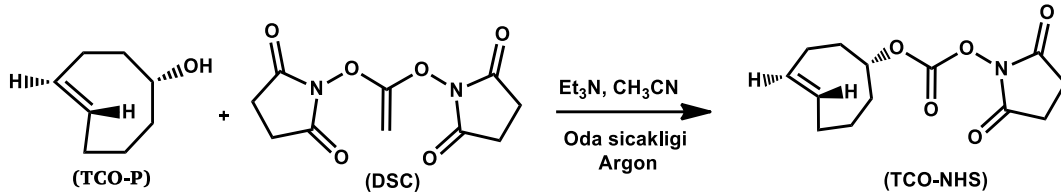
Trans-5-hidroksisiklookten (TCO) daha önceki çalışmalar takip edilerek bazı modifikasyonlar ile sentezlendi [72]. Kısaca, 5-hidroksisiklookten (0,5 g, $3,96 \times 10^{-3}$ mol) ve metilbenzoat (0,55 g, $4,03 \times 10^{-3}$ mol) kuvarz tüpü içerisinde 50 mL dietileter/hekzan (hacimce 9:1) ile çözöldü. Tüp kapatıldı ve iki saat boyunca lambalar ($12 \times 8\text{W}$) ile donatılmış silindirik bir fotoreaktör içerisinde 254 nm dalgaboyunda aydınlatılmıştır. Bu reaksiyon karışımı, gümüş nitrat (% 10 w/w) dolgulu silica jel kolonundan geçirilmiş ve eluent (yıkama solventi) tekrar kuvarz tüpünde toplandı. Sonra eluent tekrar 254 nm de aydınlatıldı ve aynı kolondan geçirildi. Bu aydınlatılma- kolondan geçirme döngüsü 24 kez tekrarlandı. Bütün ışığa zamanın 48 saatlik sürecinden sonra, ürün, TCO, kolonun üzerindeki gümüş iyonları üzerine adsorbe olmakta, fakat *cis*-izomeri ise bu gümüş-silika desteğine tutunmamaktadır. Kolon 200 mL dietileter ile yıkanarak fiziksel tutunan *cis*-izomeri uzaklaştırıldı, kolon içeriği 50 mL'lik amonyum hidroksitin içerisine boşaltıldı ve bu karışım 10 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra 30 mL dietil eter bu karışıma eklendi ve 10 dakika daha karıştırıldı. İki farklı izomeri içeren

ürünler dietileter (3×30 mL) ile ekstraksiyon edildi. Organik tabakalar birleştirildi, MgSO₄ ile kurutuldu ve buharlaştırıldı. Elde edilen bu isomer polar ve apolar *trans*-izomerler ürünü silika kolonu (hekzan:dietil eter=4:1) ile ayrıldı. Ürün NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.

Gümüş Nitrat Dolgulu Kolonun Hazırlanması

Silica jel 60 (18 g, Merck, 0,040-0,063 mm) 100 mL'lik balonun içerisine 45 mL distile su süspanse edilmiştir. Balon aliminyum folyo ile kaplandı ve su (4 mL) içerisinde gümüş nitrat (2 g) çözülerek eklendi. Bu heterojen karışım karıştırıldı. Su düşük basınç altında rotary buharlaştırıcı ile buharlaştırıldı. Suyun kalıntılarını uzaklaştırmak için toluene (2 x 25 mL) eklendi ve ardından buharlaştırıldı. Gümüş nitrat dolgulu silika jel oda sıcaklığında gece boyunca vakum altında kurutuldu. Kolonun paketlenmesi için, birinci saf silika jel, kolonun tabanına konulmuştur ve 10 g gümüş nitrat dolgulu silika jel saf silikanın üstüne eklenmiştir. Kolona yerli miktarda dietil eter geçirilerek ıslatıldı.

3.2.4.2 (E)-Sikookt-4-enil 2,5-diokso-1-pirolidinil karbonat (TCO-NHS) Sentezi

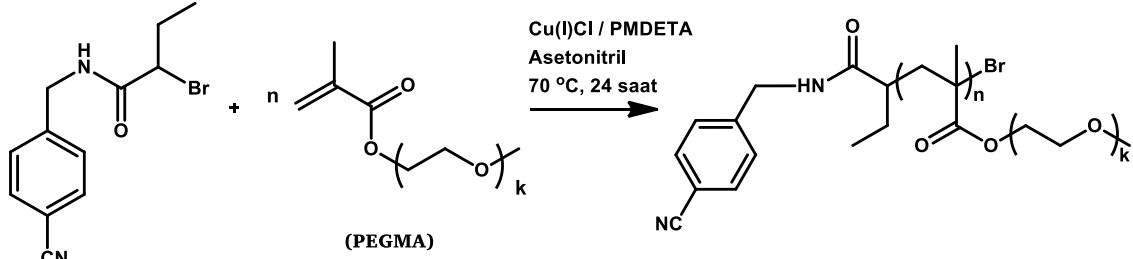


Şekil 3.5 *Trans*-5-hidroksisikloosten süksinimidil esterin (TCO-NHS) Sentezi

Polar TCO (0,100 g, 7,92x10⁻⁴ mol) ve trietilamin (0,240 g) 0°C'de 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü. Bu karışıma argon atmosferinin altında *N,N'*-disüksinimidil karbonat (DSC) (0,608 g, 2,376x10⁻³ mol) eklendi. Bu reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonrasında, su eklendi ve ürün etilasetat (3×30 mL) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik yüzeyler birleştirildi ve bir kez doymuş sodyum klorür çözeltisi (20 mL) ile bir kez yıkandı. Organik çözücü MgSO₄ kullanılarak kurutuldu ve beyaz toz ürün döner buharlaştırıcı ile buharlaştırıldı. Ürün etilasetat/hekzan (2:1 v/v) kullanılarak silika kolonu ile saflaştırıldı. Ürün NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.

3.3 Polimer Sentezi ve Tetrazin ile Modifikasyonun Sentezi

3.3.1 ATRP Nitrit Uç Gruplu Poli(poli(etilen glikol)metil eter metakrilat) (PoliPEGMA-CN) Sentezi



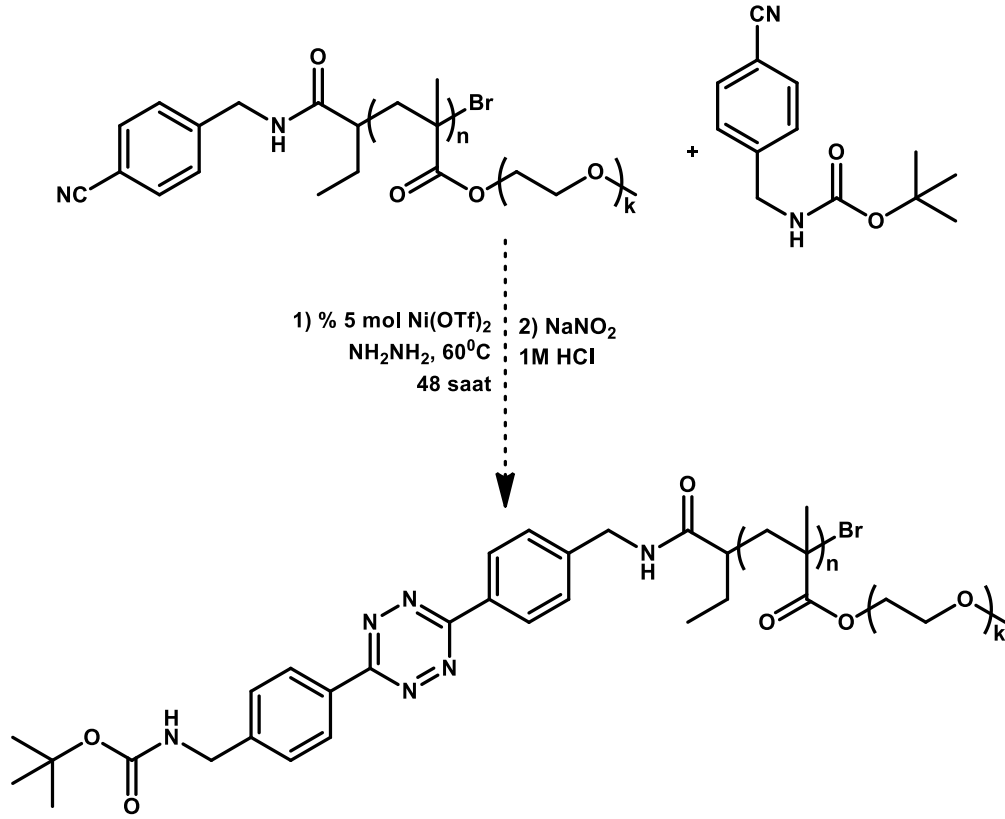
Şekil 3.6 ATRP ile nitrit uç grubuna sahip PoliPEGMA-CN sentezi

Poli(etilen glikol) metil eter metakrilat (PEGMA) (7×10^{-3} mol, 2 mL) monomeri, ligand olarak *N,N,N',N'',N'''*-pentametildietilentriamin (PMDETA) ($1,68 \times 10^{-4}$ mol, $3,6 \times 10^{-2}$ mL), ardından katalizör olarak bakır (I) klorür (CuCl) ($1,4 \times 10^{-4}$ mol, $13,8 \times 10^{-3}$ g) ve başlatıcı olarak 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil) bütanamid ($1,4 \times 10^{-4}$ mol, $39,3 \times 10^{-3}$ mL), asetonitril (2 mL) çözücüsünde oda sıcaklığında Schlenk tüpü içerisinde çözüldü. Kullanılan bileşiklerin molca oranları sırasıyla başlatıcı : PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 50 : 1,2 : 1 şeklindedir. Reaksiyon karışımına üç kere sıvı azot içinde dondurma-vakum-eritme işlemi uygulanarak çözelti içindeki çözünmüş halde olan gazlar uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığına getirilen tüpün içerisi argon gazı ile doyuruldu. Schlenk tüpü önceden 70 °C'ye ısıtılmış yağ banyosuna daldırılarak polimerizasyon başlatıldı ve yaklaşık 24 saatlik sürenin sonunda reaksiyon ortamı hava atmosferine açılarak polimerizasyon işlemi sonlandırıldı. Daha sonra elde edilen viskoz malzeme 4 mL asetonitrilde çözülerek safsızlıklardan kurtulmak amacıyla, 5 gün boyunca distile suya karşı diyaliz (membran MWCO 3,5 kDa) yapılarak saflaştırıldı. Diyaliz işlemi sonlandırıldıktan sonra polimer 24 saat boyunca liyofilizatöre koyuldu. Aynı prosedür ile molca oranları sırasıyla başlatıcı : PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 20 : 1,2 : 1 (SS030) ; başlatıcı: PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 10 : 1,2 : 1 (SS031) ; başlatıcı: PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 10 : 1,2 : 1 (SS032) ve başlatıcı: PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 10 : 1,2 : 1 (SS036) olan beş ayrı polimer daha sentezlendi. SS031, SS032

ve SS036 kodlu polimerler aynı oranda sentezlendi fakat polimerizasyon süresi sırasıyla 24 saat, 3,5 saat ve 1 saat sürdü.

Bir başka sentezde ise PEGMA ($22,6 \times 10^{-5}$ mol, 2 mL) monomeri, PMDETA ($1,68 \times 10^{-4}$ mol, $3,6 \times 10^{-2}$ mL), bakır (I) klorür (CuCl) ($2,4 \times 10^{-4}$ mol, $2,37 \times 10^{-2}$ g) ve başlatıcı olarak 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil) bütanamid ($2,4 \times 10^{-4}$ mol, $6,5 \times 10^{-2}$ g), metanol (2 mL) çözücüsünde oda sıcaklığında Schlenk tüpü içerisinde çözüldü. Kullanılan bileşiklerin molca oranları sırasıyla başlatıcı: PEGMA : PMDETA : CuCl = 1 : 30 : 1,2 : 1 şeklindedir. Reaksiyon karışımına üç kere sıvı azot içinde dondurma-vakum-çözme işlemi uygulanarak çözelti içindeki çözünmüş halde olan gazlar uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığına getirilen tüp argon gazı ile doyuruldu. Schlenk tüpü önceden 70°C'ye ısıtılmış yağ banyosuna daldırılarak polimerizasyon başlatıldı ve yaklaşık 4 saatlik sürenin sonunda reaksiyon ortamı hava atmosferine açılarak polimerizasyon işlemi sonlandırıldı. Daha sonra polimer dietil eterde çöktürüldü ve safsızlıklardan kurtulmak amacıyla, 2 gün boyunca distile suya karşı diyaliz (membran MWCO 3,5 kDa) yapılarak saflaştırıldı. Diyaliz işlemi sonlandırıldıktan sonra polimer 24 saat boyunca liyofilizatöre koyuldu.

3.3.2 PPEGMA-CN'nin Uç Grubunun Tetrazine Dönüştürülmesi

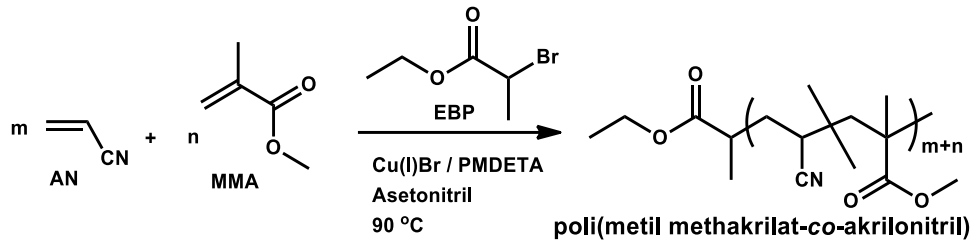


Şekil 3.7 Polimer ucundaki nitril grubunun tetrazine dönüştürülmesi

Asetonitril ($1,962 \times 10^{-3}$ mol, 0,102 mL), nikel triflorometansülfonat ($\text{Ni}(\text{OTf})_2$) ($1,962 \times 10^{-4}$ mol, 7×10^{-2} g) ve hidrazin monohidrat ($9,811 \times 10^{-3}$ mol, 0,475 mL) içeren reaksiyon karışımı 10 mL'lik bir Schlenk tüpünde hazırlandı. Dimetil formamid (DMF) ile öncül polimer ($9,811 \times 10^{-5}$ mol, 39×10^{-2} g) ise ayrı bir yerde çözüldükten sonra enjektör yardımıyla Schlenk tüpü içerisine damla damla eklendi ve ardından önceden 60°C 'ye ısıtılmış olan silikon yağı banyosu içine daldırıldı ve yaklaşık 48 saat boyunca karıştırıldı. 48 saatin sonunda reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilerek sodyum nitrit (NaNO_2) ($3,924 \times 10^{-3}$ mol, 27×10^{-2} g) çözeltisi damla damla eklendi. Ardından 1 M hidroklorik (HCl) çözeltisi damla damla çözeltinin rengi parlak pembe hale gelene ve pH değeri 3 olana kadar ilave edildi. (Bu sırada zehirli nitrojen oksit gazı açığa çıkacağı için iyi havalandırma sağlanmalıdır.) Elde edilen ham ürün diklorometan (60 mL) ile dört kez ekstrakte edildi. Toplanan organik faza magnezyum sülfat (MgSO_4) eklenerek kurutuldu ve filtre kâğıdında süzildükten sonra döner buharlaştırıcıda buharlaştırıldı.

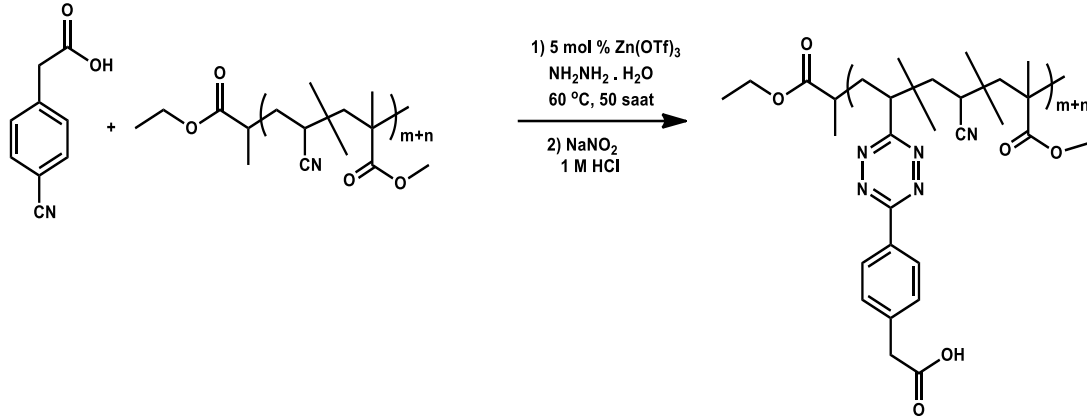
safsızlıklardan kurtulmak amacıyla, 1 gün boyunca metanole karşı diyaliz (membran MWCO 3,5 kDa) yapılarak saflaştırıldı. Diyaliz işlemi sonlandırıldıktan sonra elde edilen polimer tetrahidrofuran (THF) ile çözüldü ve ardından nikel tuzu kalıntılarından kurtulmak için nötral alimuna kolonundan THF yardımı ile geçirildikten sonra fazla THF döner buharlaştırıcı ile uçuruldu. Elde edilen polimer $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisiyle analiz edildi.

3.3.3 ATRP ile Poli(metilmetakrilat-co-akrilonitril)[P(MMA₈-co-AN₂)]



Metil metakrilat (MMA) ve akrilonitril (AN) [P(MMA-co-AN)] kopolimeri ATRP ile elde edildi. Metil metakrilat (MMA) ($1,66 \times 10^{-2}$ mol, $1,77 \times 10^{-4}$ mL) ve akrilonitril (AN) ($4,155 \times 10^{-3}$ mol, $273,56 \times 10^{-4}$ mL), pentametildietilentriamin (PMDETA) ($2,49 \times 10^{-4}$ mol, $5,2 \times 10^{-3}$ mL), bakır(I)bromür (CuBr) ($2,07 \times 10^{-4}$ mol, $20,57 \times 10^{-3}$ g), etil 2-bromopropionat (EBP) ($2,07 \times 10^{-4}$ mol, $26,98 \times 10^{-3}$ mL) ve asetonitril (0,5mL) 10 mL'lik bir Schlenk tüpün içerisine koyuldu. MMA:AN:EBP:CuBr:PMDETA'nın molar oranı 80:20:1:1:1,2 olarak ayarlandı. Reaksiyon karışımı üç kere sıvı azot içinde dondurma-vakum-eritme işlemi uygulanarak çözelti içindeki çözünmüş halde olan gazlar uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığına getirilen çözeltiden argon gazı geçirildi. Schlenk tüpü önceden 90°C 'ye ısıtılmış yağ banyosuna daldırılarak polimerizasyon başlatıldı ve yaklaşık 18 saatlik sürenin sonunda reaksiyon ortamı hava atmosferine açılarak polimerizasyon işlemi sonlandırıldı. Daha sonra elde edilen viskoz madde 7 mL THF ile çözüldü ve ardından bakırdan kurtulmak için nötral alimuna kolonundan geçirildikten sonra THF ile yıkandı ve ardından fazla THF döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra elde edilen viskoz malzeme soğuk metanolde (150 mL) çöktürüldü. Krozede süzüldü ve ardından vakum altında kurutuldu.

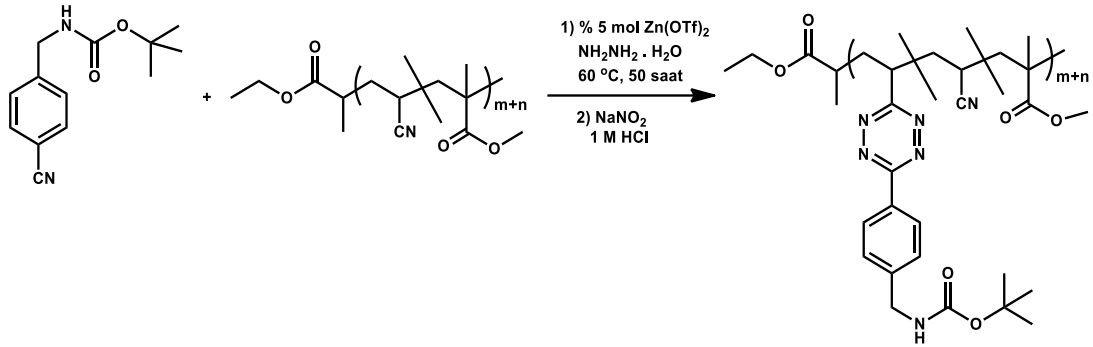
3.3.4 P(MMA₈-co-AN₂) Polimerinin Yan Nitril Gruplarının Tetrazine Dönüştürülmesi



Şekil 3.9 P(MMA₈-co-AN₂) polimerlerinin yan nitril gruplarının tetrazine transformasyon reaksiyonu

4-siyanofenilasetik asit ($4,38 \times 10^{-3}$ mol, 0,508 g), çinko triflorometansülfonat ($\text{Zn}(\text{OTf})_2$) ($8,76 \times 10^{-4}$ mol, 318 mg) ve hidrazin monohidrat ($4,3 \times 10^{-3}$ mol, 2,12 mL) içeren reaksiyon karışımı 10 mL'lik bir Schlenk tüpünde hazırlandı. Dimetil formamid (DMF) (8 mL) ile P(MMA-co-AN) ($8,761 \times 10^{-5}$ mol, 0,5 g) öncül polimeri ise ayrı bir yerde çözüldükten sonra enjektör yardımıyla Schlenk tüpü içerisine damla damla eklendi ve ardından önceden 60 °C'ye ısıtılmış olan silikon yağı banyosu içine daldırıldı ve yaklaşık 48 saat boyunca karıştırıldı. 48 saatin sonunda reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilerek sodyum nitrit (NaNO_2) ($4,3 \times 10^{-3}$ mol, 3,02 g) çözeltisi damla damla eklendi. Ardından 1,5 M hidroklorik (HCl) asit çözeltisi damla damla çözeltinin rengi parlak pembe hale gelene ve pH değeri 3 olana kadar ilave edildi. (Bu sırada zehirli nitrojen oksit gazı açığa çıkacağı için iyi havalandırma sağlanmalıdır.) Elde edilen ham ürün diklorometan (60 mL) ile dört kez ekstrakte edildi. Toplanan organik faza magnezyum sülfat (MgSO_4) eklenerek kurutuldu ve filtre kâğıdında süzülükten sonra döner buharlaştırıcıda buharlaştırıldı ve ¹H-NMR ile analiz edildi.

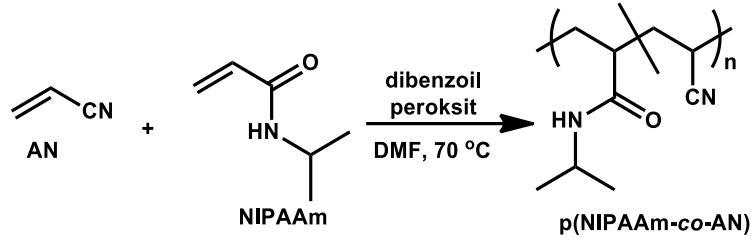
3.3.5 Tetrazin Fonksiyonlu P(MMA₉-co-AN₁-co-TzBoc)



Şekil 3.10 Tetrazin fonksiyonlu P(MMA₉-co-AN₁-co-TzBoc) reaksiyon

Tert-bütil4-siyanobenzilkarbamat ($4,05 \times 10^{-3}$ mol, 0,941 g), Zn(OTf)₂ ($4,05 \times 10^{-4}$ mol, 0,147 g) ve hidrazin monohidrat ($8,1 \times 10^{-3}$ mol, 4mL) içeren reaksiyon karışımı 10 mL'lik bir Schlenk tüpünde hazırlandı. DMF ile p(MMA₉-co-AN₁) ($8,1 \times 10^{-5}$ mol, 0,5 g) öncül polimeri ise ayrı bir yerde çözüldükten sonra enjektör yardımıyla Schlenk tüpüne damla damla eklendi ve ardından önceden 60 °C'ye ısıtılmış olan silikon yağı içerisine daldırıldı ve yaklaşık 48 saat boyunca karıştırıldı. Ardından reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilerek sodyum nitrit (NaNO₂) ($8,1 \times 10^{-3}$ mol, 5,58 g) çözeltisi damla damla eklendi. Ardından 1,5 M hidroklorik (HCl) çözeltisi damla damla çözeltinin rengi parlak pembe hale gelene ve pH değeri 3 olana kadar ilave edildi. (Bu sırada zehirli nitrojen oksit gazı açığa çıkacağı için iyi havalandırma sağlanmalıdır.) Elde edilen ham ürün diklorometan (60 mL) ile üç kez ekstraksiyon yapıldı. Toplanan organik faza magnezyum sülfat (MgSO₄) eklenerek kurutuldu ve filtre kâğıdında süzüldükten sonra rotaryde buharlaştırıldı. Pembe renkli ürün oluşmadı.

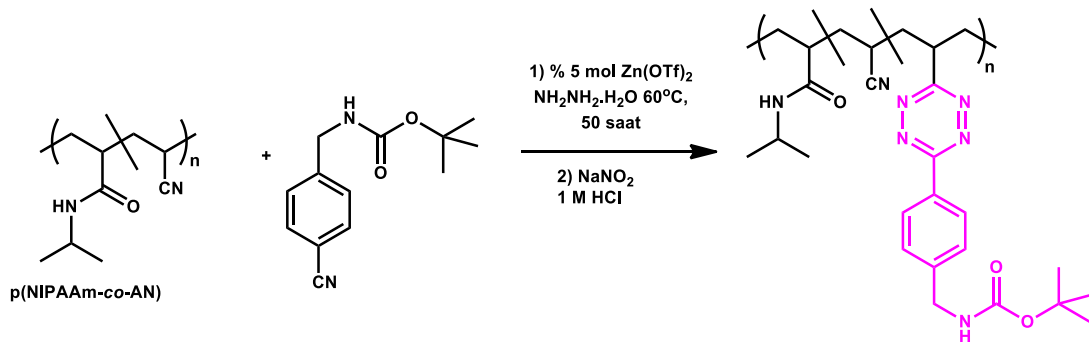
3.3.6 P(N-isopropilakrilamid-co-akrilonitril) Sentezi



Şekil 3.11 P(N-isopropilakrilamid-co-akrilonitril) sentezi

P(N-isopropilakrilamid-co-akrilonitril) [P(NIPAAm-co-AN)] serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. Kısaca, N-isopropilakrilamid (NIPAAm) ($16,0 \times 10^{-3}$ mol, 1,81 g) ve akrilonitril (AN) ($4,0 \times 10^{-3}$ mol, 263 μ L) Schlenk tüpü içerine oda sıcaklığında argon atmosferinde N,N-dimethyl formamide (DMF) (5 mL) içerisinde çözüldü. Dibenzoil peroksit ($2,0 \times 10^{-5}$ mol, 48×10^{-3} g) çözeltinin içerisine eklendi. Son olarak, çözelti 10 dakika boyunca argon geçirilerek, kapatıldı ve önceden ısıtılmış 70 °C'lik yağ banyosuna daldırıldı. Bu reaksiyon karışımı 21 saat boyunca karıştırdı. 21 saatin sonunda polimerizasyon çözeltisi oda sıcaklığına minimum miktarda DMF ile seyreltildi ve elde edilen polimer üç gün boyunca distile suya karşı diyaliz (MWCO 3,5 kDa) yapılarak saflaştırıldı.

3.3.7 P(NIPAAm-co-AN) Üzerine Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezi

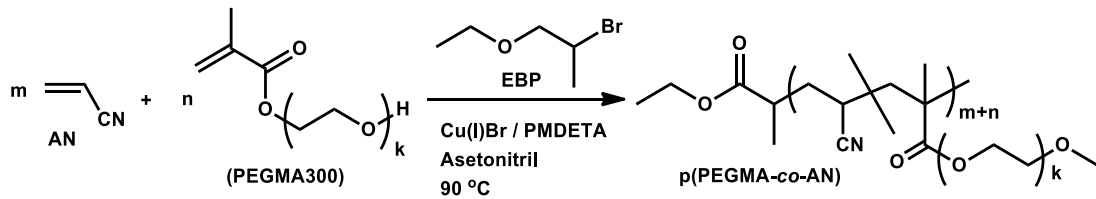


Şekil 3.12 P(NIPAAm-co-AN) üzerine tetrazin gruplarının doğrudan sentezi

10 mL'lik bir Schlenk tüpüne, 0,179 g Zn(OTf)_2 ($4,95 \times 10^{-4}$ mol), 0,459 g tert-butyl 4-siyanobenzilkarbamat ($1,98 \times 10^{-3}$ mol), 2,40 mL hidrazin monohidrat (% 64-65, $3,22 \times 10^{-2}$ mol) ve 1.5 mL of DMF eklendi. DMF (3,0 mL) ile çözülen p(NIPAAm-

co-AN) ($2,77 \times 10^{-5}$ mol, 0,500 g) çözeltinin içerisine enjektör yardımıyla yavaş yavaş eklendi. Schlenk tüpü kapatıldı ve karışım önceden 60 °C'ye ısıtılmış yağ banyosuna daldırıldı ve 48 saat boyunca karıştırıldı. Ardından 48 saatin sonunda oda sıcaklığında soğutuldu ve büyük bir balona transfer edildi. 17 mL suyun içerisinde sodyum nitrit ($9,89 \times 10^{-3}$ mol, 6,82 g) çözülerek yavaşça reaksiyon çözeltisine eklendi. Ardında çözeltiye 1 M HCl yavaşça eklendi ve çözelti parlak kırmızı bir renk aldı ve gaz çıkışı oldu. HCl'in eklenmesi gaz çıkışı duruncaya kadar ve pH değeri 3 oluncaya kadar devam etti. Polimer methanol karşı diyaliz edilerek (MWCO 3,5 kDa) saflaştırıldı. Yüksek vakum altında çözücünün uzaklaştırılmasından sonra tetrazin grubunun karakteristik rengi olan pembe renkli polimer elde edildi.

3.3.8 ATRP ile P(poli(etilen glikol) metiletermetakrilat-co-akrilonitril) (P(PEGMA-co-AN)) Sentezi

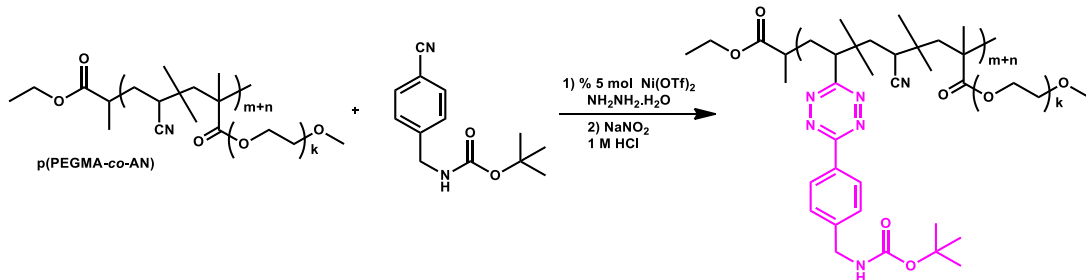


Şekil 3.13 P(PEGMA-co-AN) sentezi

Poli(etilen glikol) metil eter metakrilat (PEGMA) and akrilonitril (AN) [P(PEGMA-co-AN)] kopolimeri ATRP ile elde edildi. Poli(etilen glikol) metil eter metakrilat (PEGMA ($M_n=300$ g/mol)) ($14,0 \times 10^{-3}$ mol, 4,0 mL), AN ($1,56 \times 10^{-3}$ mol, 102 μ L), N,N,N',N'',N'''-Pentametildietilentriamin (PMDETA) ($3,41 \times 10^{-4}$ mol, 71 μ L) ve bakır (I)bromid (CuBr) ($3,1 \times 10^{-4}$ mol, $4,44 \times 10^{-2}$ g) 10 mL'lik bir Schlenk tüpün içerisine koyuldu. Reaksiyon karışımı dört kez sıvı azot içinde dondurma-vakum-eritme işlemi uygulandı, Schlenk tüpü argon gazı ile dolduruldu ve başlatıcı olarak EBP ($1,55 \times 10^{-4}$ mol, 20,1 μ L) argon atmosferi altında eklendi. PEGMA:AN:EBP:CuBr:PMDETA'nın molar oranı 90:10:1:2:2,2 olarak ayarlandı. Polimerizasyon, Schlenk tüpünün önceden 90 °C'ye ısıtılmış olan yağ banyosu içerisine yerleştirildi. Polimerizasyonun 18. saatinin sonunda polimerizasyonu sonlandırmak için çözelti hava atmosferine açıldı. Ardından viskoz çözücü THF ile

seyreltildi ve soğuk dietil eterde çöktürüldü. Daha sonra çöktürülmüş polimer su içerisinde çözöldü ve üç gece boyunca suya karşı diyaliz (MWCO 3,5 kDa) ile saflaştırıldı. Sonunda, elde edilen p(PEGMA-co-AN) liyofilizatör ile kurutuldu.

3.3.9 P(PEGMA-co-AN) Üzerine Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezi



Şekil 3.14 P(PEGMA-co-AN) üzerinde tetrazin gruplarının doğrudan sentezi

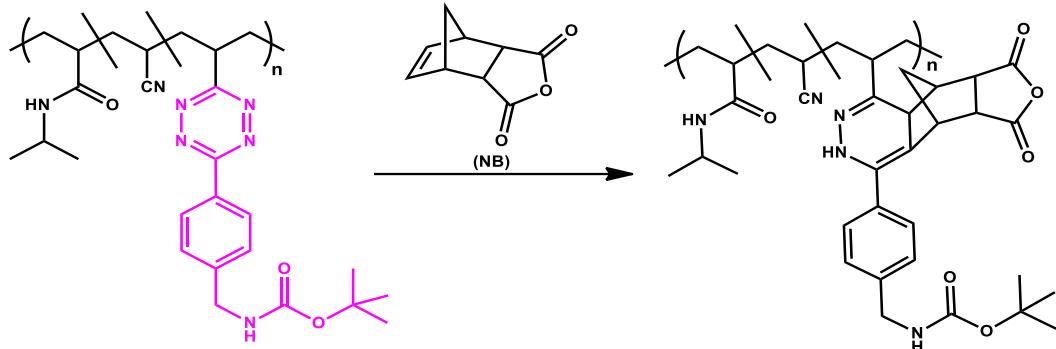
10 mL'lik Schlenk tüpün içeşisine, 33 mg nikel triflorometansülfonat ($\text{Ni}(\text{OTf})_2$) (9×10^{-5} mol), 0,209 g *tert*-butil 4-siyanobenzilkarbammat (9×10^{-4} mol), 131 μL hidrazin monohidrat (% 64-65, $1,76 \times 10^{-3}$ mol) eklendi. Öncöl polimer p(PEGMA-co-AN) (PEGMA:AN=9:1) (4×10^{-5} mol, 0,5 g) DMF ile çözöldü, bu çözelti enjektör vasıtasıyla Schlenk tüpü içeşisine eklendi. Schlenk tüpü kapatıldı ve bu karışım 24 saat boyunca 60°C'deki yağ banyosu içeşisinde karıştırıldı. 24 saatin sonunda bu reaksiyon çözeltisi oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve Schlenk tüpünden çıkarılarak büyük bir balona transfer edildi.

5 mL saf suyun içeşisinde sodyum nitrit ($1,8 \times 10^{-2}$ mol, 1,242 g) çözölerek yavaşça reaksiyon çözeltisine eklendi. Ardında çözeltiye 1 M HCl yavaşça eklendi ve çözelti parlak kırmızı bir renk aldı ve gaz çıkışı oldu. HCl 'in eklenmesi gaz çıkışı duruncaya kadar ve pH değeri 3 oluncaya kadar devam etti. Polimer metanole karşı diyaliz edilerek (MWCO 3,5 kDa) saflaştırıldı. Yüksek vakum altında çözöcünün uzaklaştırılmasından sonra pembe renkli polimer elde edildi.

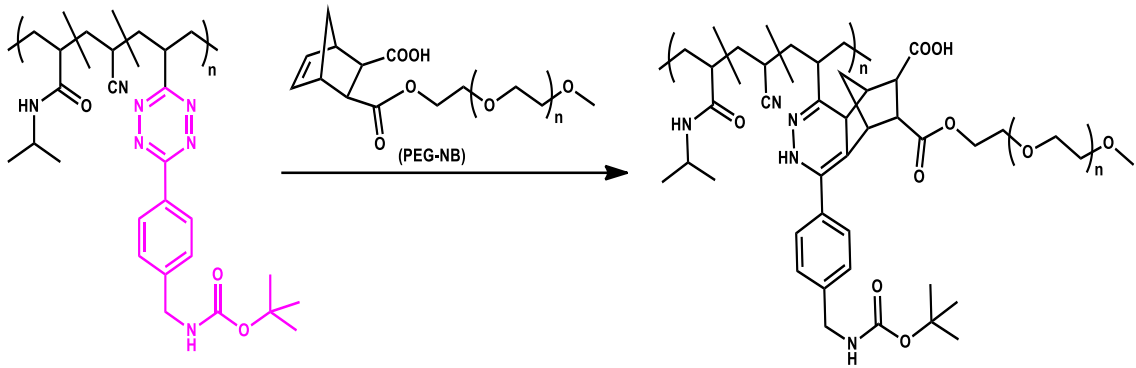
3.4 Polimerler Üzerindeki Tetrazinler ile iEDDA Reaksiyonu

Farklı TCO ve NB türevli moleküler ile tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) üzerindeki tetrazin grupları arasındaki iEDDA reaksiyonu UV-Vis spektroskopisi kullanılarak izlenmiştir. Bunun için farklı kaplarda tetrazin fonksiyonlu polimer (20 mg/mL), TCO (2 mg/mL), TCO-NHS (1 mg/mL), PEG-NB (1,9 mg/mL) ve *cis*-5-norbornen-*endo*-2,3-dikarboksilik anhidritin (NB) (0,029 mg/mL) THF içerisinde çözeltileri hazırlanmıştır. Tetrazin fonksiyonlu polimer çözeltisine küçük miktarlarda tetrazin partner molekülü olan moleküllerin çözeltileri küçük miktarlarda eklenerek UV-Vis absorbansları ölçülmüştür. TCO türevi içeren çözeltilerde ilaveden sonra 1 dakika beklenerek ölçümler yapılmıştır.

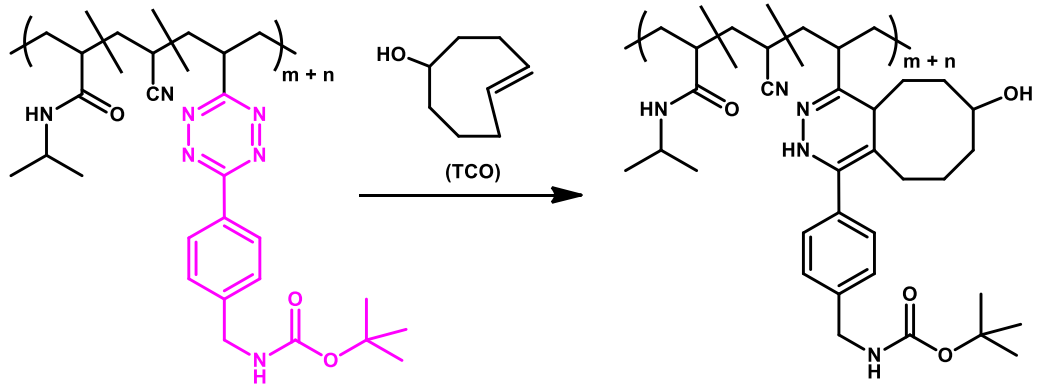
NB çözeltisi ile yapılan deneylerde ise farklı ekivalende NB içeren çözeltiler tetrazin fonksiyonlu polimer çözeltisine eklendikten sonra 1 saat beklenerek UV-Vis absorbans (250-800 nm) ölçümleri yapılmıştır. PEG-NB ile yapılan deneylerde ise ölçümler eklemekten 2 saat sonra yapılmıştır.



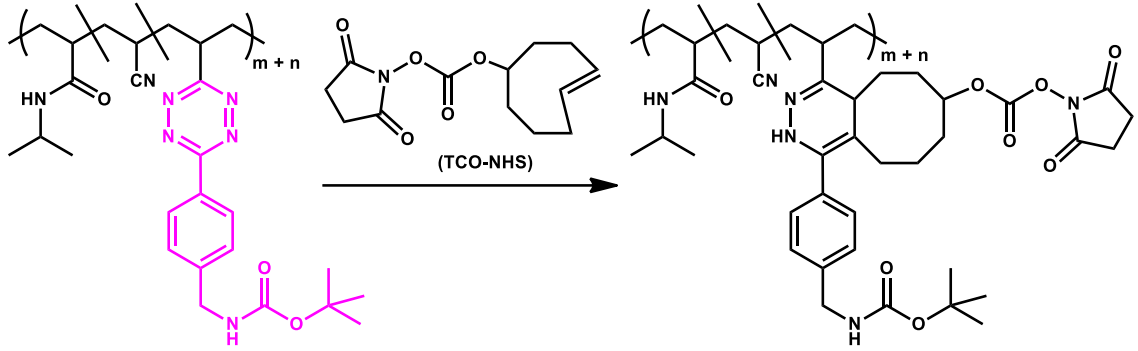
Şekil 3.15 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF’de) ve NB (0,029 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu



Şekil 3.16 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF’de) ve PEG-NB (1,9 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu

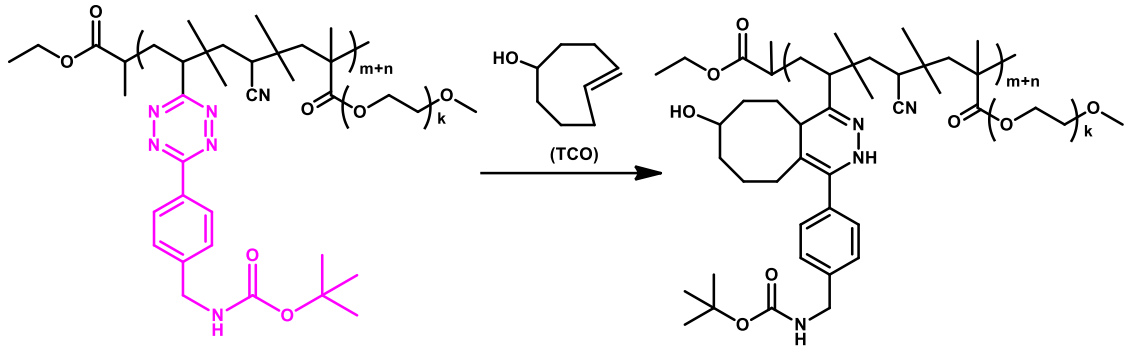


Şekil 3.17 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF’de) ve TCO (2 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu

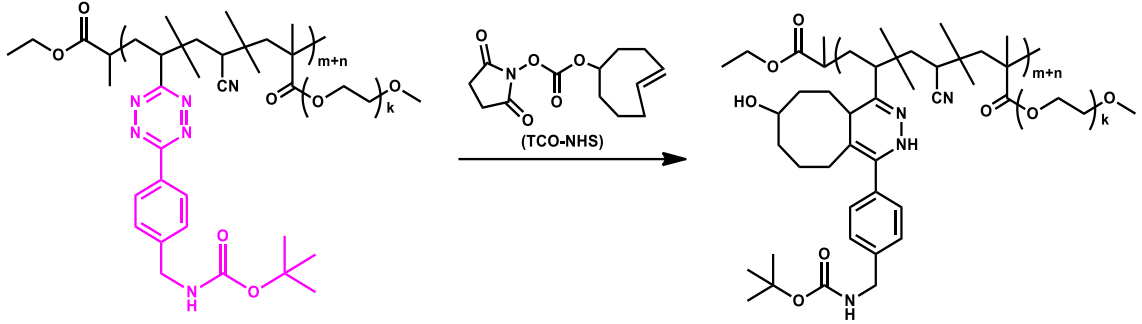


Şekil 3.18 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1mL, 20 mg/mL THF’de) ve TCO-NHS (1 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu

Benzer olarak, tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1 mL, 5 mg/mL THF’de), TCO (0,066 mg/mL THF’de) ve TCO-NHS (2,8 mg/mL THF’de) az miktarda karıştırılarak bir dakika gibi kısa bir sürede iEDDA reaksiyonu gerçekleşmiştir ve UV-Vis spektroskopisinde izlenmiştir. Son kısmın (toplam 198 μg TCO’ya karşılık gelen) eklenmesinden sonra, polimer metanole karşı diyaliz edildi (MWCO 3500) ve ^1H -NMR spektroskopisiyle analiz edilmiştir. TCO-NHS (50 μL , 2,8 mg/mL) ve tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1 mL, 5 mg/mL THF’de) arasındaki reaksiyon ^1H -NMR ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.19 Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1mL, 5 mg/mL THF’de) ve TCO (0,066 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu



Şekil 3.20 Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1mL, 5 mg/mL THF’de) ve TCO-NHS (2,8 mg/mL THF’de) iEDDA reaksiyonu

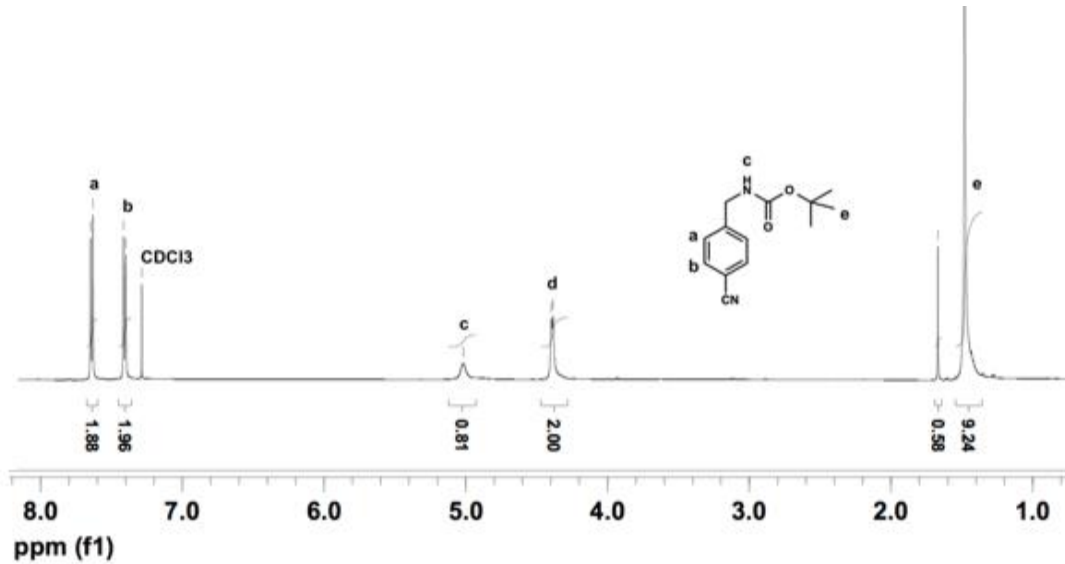
3.5 Tetrazin Fonksiyonlu Polimerlerin Absorbans-Sıcaklık Değişimi

Su içinde tetrazin fonksiyonlu polimer ($3,17 \times 10^{-5}$ mmol, 2 mg), tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ($3,17 \times 10^{-4}$ mmol, 20 mg) ve PEG-NB ($9,51 \times 10^{-4}$ mmol, 1,90 mg), tetrazin fonksiyonlu polimer ($3,17 \times 10^{-4}$ mmol, 20 mg) ve Nb ($1,58 \times 10^{-5}$ mol, 1 mg) miktarlarda ters elektron gereksinimli Diels Alder (iEDDA) reaksiyonu prensibine göre karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra polimerin UV-Vis absorbansı farklı sıcaklıklarda ölçüldü. Sıcaklıkla PNIPAAm’ın faz geçiş davranışı 375 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin sıcaklıkla değişimi takip edilerek analiz edilmiştir.

4.1 Öncül Moleküllerin Sentezleri ve Karakterizasyonları

4.1.1 *Tert*-bütil4-siyanobenzilkarbamat Sentezi ve Karakterizasyonu

Tetrazin sentezinde kullanılacak olan amin fonksiyonlu bu nitril türevi yan ürün oluşumunun engellenmesi amacıyla Boc grubu ile korunmuştur. Koruma grubunun bağlanması için yapılan reaksiyonda ürün %90 verimle 2,467 g olarak elde edildi. Şekil 4.1’de verilen ^1H -NMR spektrumu molekülün karakteristik piklerini taşımaktadır. Bu piklere göre elde edilen *tert*-bütil 4-siyanobenzilkarbamatın saf bir şekilde başarılı bir şekilde sentezlendiği anlaşılmaktadır. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1,48 (s, 3H, C-(CH_3)₃), 4,39 (d, 2H, -Ar-H- CH_2 -NH-), 5,02(t, H, - CH_2 -NH-), 7,40(d,H, Ar-H), 7,64 (d,H, Ar-H).



Şekil 4.1 *Tert*-bütil4-siyanobenzilkarbamat ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

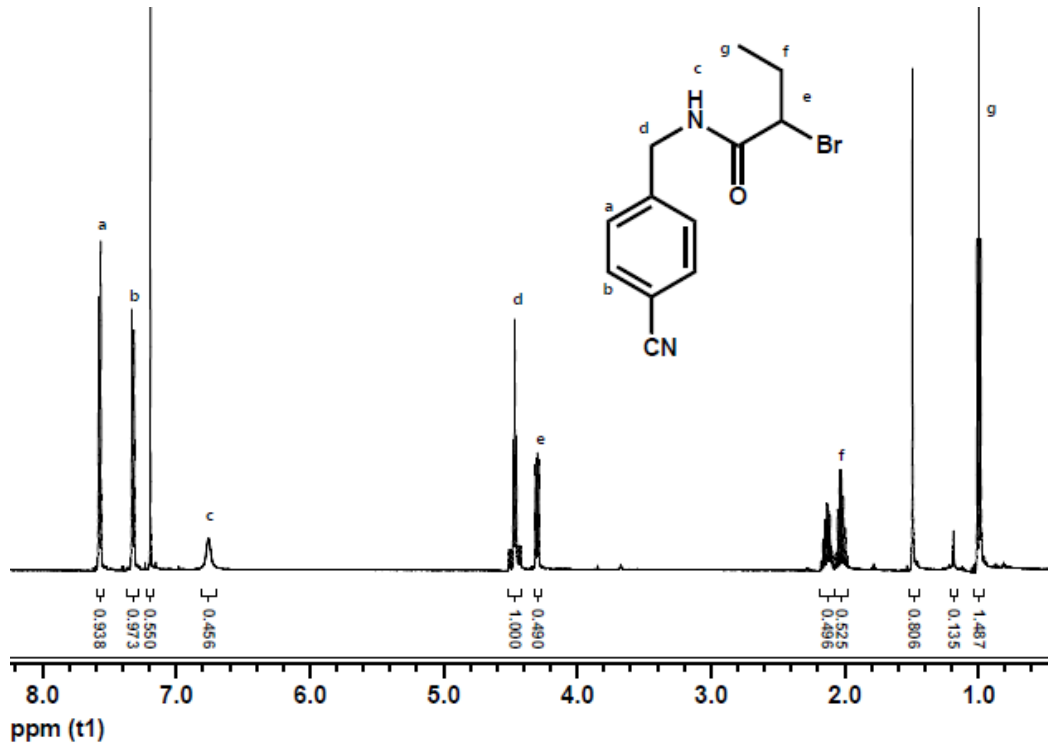
4.1.2 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil)bütanamid

Sentezi

ve

Karakterizasyonu

Uç gruplu tetrazin fonksiyonlu polimerlerin öncüllerinin ATRP ile sentezi için başlatıcı olarak kullanılacak olan 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil) bütanamid yaygın amitleşme reaksiyonu ile hazırlanmıştır. Silika jel kolon ile saflaştırılan beyaz renkli saf ürün % 73,72 verimle elde edildi. Şekil 4.2 verilen ürüne ait ^1H -NMR spektrumu molekülün karakteristik proton piklerini taşımaktadır. Elde edilen bu saf bileşik, daha sonra ATRP'de fonksiyonel başlatıcı olarak kullanılmıştır.



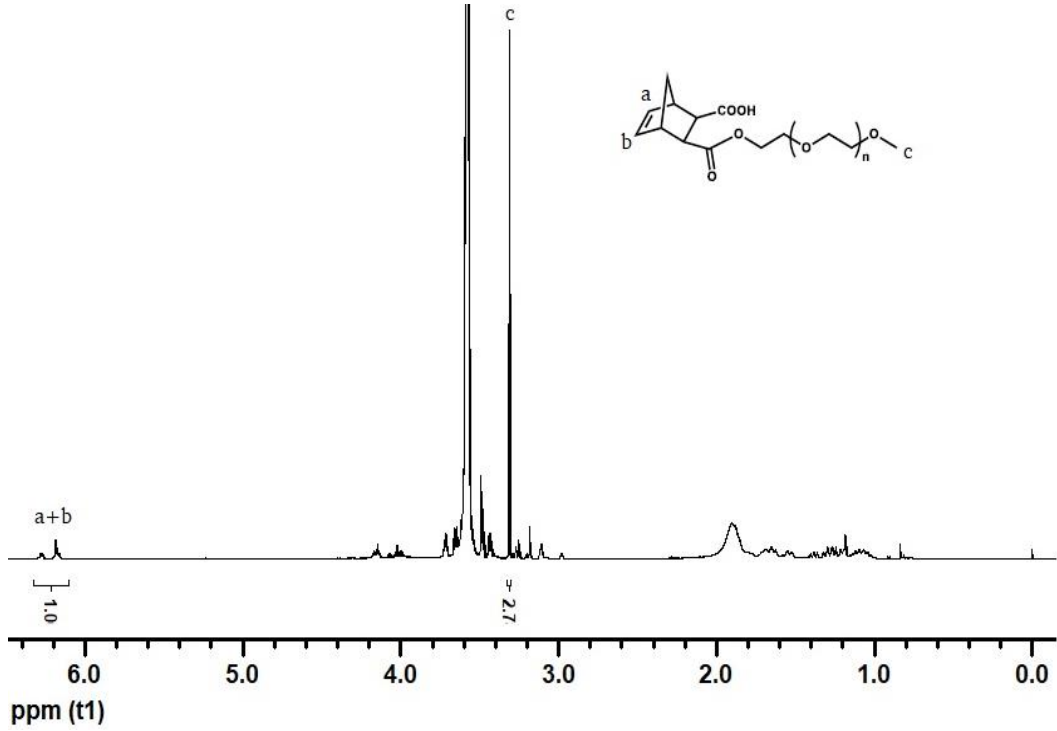
Şekil 4.2 2-bromo-*N*-(4-siyanobenzil) bütanamid ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

4.1.3 Poli(etilen glikol) - Norbornen (PEG-NB)

Sentezi ve

Karakterizasyonu

İEDDA reaksiyonunda kullanılacak olan PEG-NB, % 70 verim ile 680 mg elde edilmiştir. PEG-NB'ye ait ^1H -NMR spektrumuna ait karakteristik pikler, Şekil 4.3'de görünmektedir. Bu pikler, elde edilen ürünün başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.3 PEG-NB'nin ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

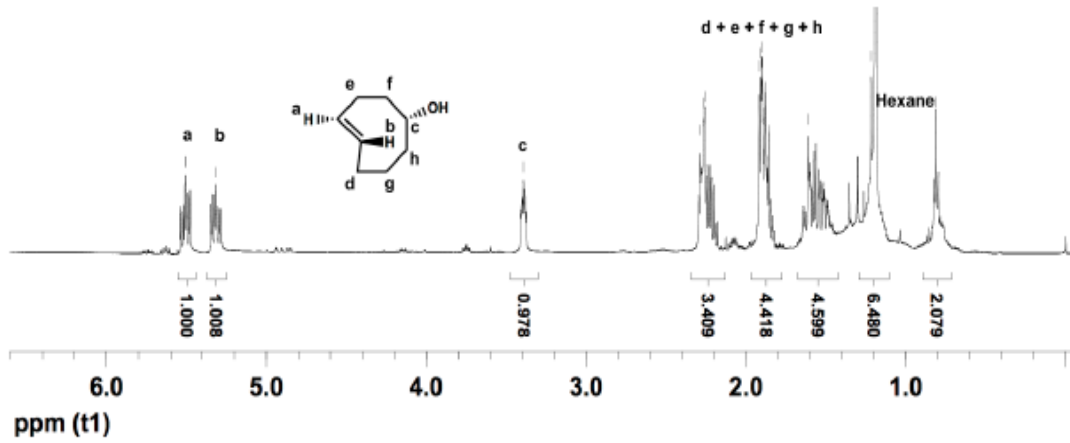
4.2 *Trans*-siklookten (TCO) ve Türevleri Sentezi ve Karakterizasyonu

4.2.1 *Trans*-siklookten (TCO) Sentezi ve Karakterizasyonu

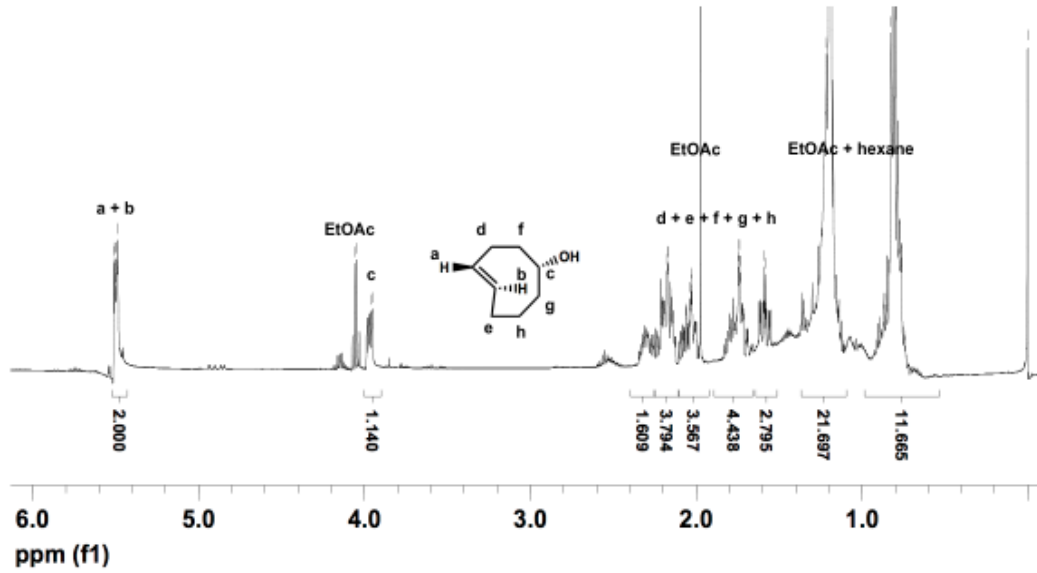
TCO'lar yüksek hızları nedeniyle iEDDA reaksiyonunda tetrazin molekülünün en önemli substratı olarak kullanılmıştır. Bunun için literatürde önerilen fotoizomerizasyon yaklaşımı uygulanmıştır [72]. Elde edilen polar (245 mg) ve apolar (250 mg) *trans*-izomerler izomer karışımı silika kolon (hekzan:dietil eter=4:1) ile ayrılmıştır. İEDDA'de, daha yüksek hızından dolayı daha fazla polar izomeri tercih edilmiştir. Her iki izomerin NMR spektrumları (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) izomerlere ait karakteristik pikleri içermektedir.

TCO, polar; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1,20-2,26 (m, 10H, $-\text{CH}_2-$), 3.39 (m, 1H, HO-CH-) 5.31 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5,50 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$)

TCO, apolar; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1,20-2,17 (m, 10H, $-\text{CH}_2-$), 3,96 (m, 1H, HO-CH-) 5,50 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$)



Şekil 4.4 TCO-polar'ın ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)



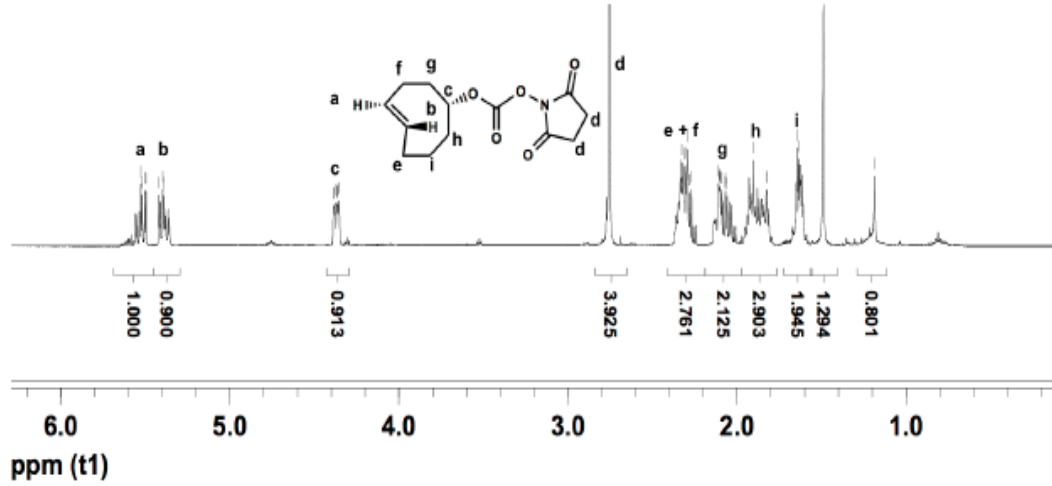
Şekil 4.5 TCO-apolar'ın ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)

4.2.2 (E)-Sikookt-4-enil2,5-diokso-1-pirolidinilkarbonat (TCO-NHS) Sentezi ve Karakterizasyonu

Biyokonjugasyonda yaygın bir şekilde kullanılan TCO'nun süksinimidil ester (TCO-NHS) türevinin de iEDDA reaksiyon etkinliği tez kapsamında gösterilmiştir [184, 185]. Bu nedenle sentezlenen TCO-NHS % 38 verim ile 81 mg olarak elde edilmiştir. Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 4.6) süksinimidil estere ait proton piklerini (2,78 ppm) ve TCO'nun olefin proton piklerini (5,30 - 5,52 ppm) göstermektedir. Bu sonuca göre, ürün başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Ek olarak

Q-TOF ESI MS ile molekül ağırlığı 267,1109 g/mol bulunmuştur (Hedef molekül ağırlığı: 267,1109 g/mol).

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1,64 (m, 2H, -O-CH-CH₂-CH₂-), 1,80-1,95 (m, 3H -CH₂-), 2,05-2,15 (m, 2H, -CH₂-), 2,28-2,35 (m, 3H, -CH₂-), 2,75 (s, 4H, -COCH₂-), 4,37 (m, H, HO-CH-), 5,39 (m, H, -CH₂-CH=CH-), 5,51 (m, H, -CH₂-CH=CH-)



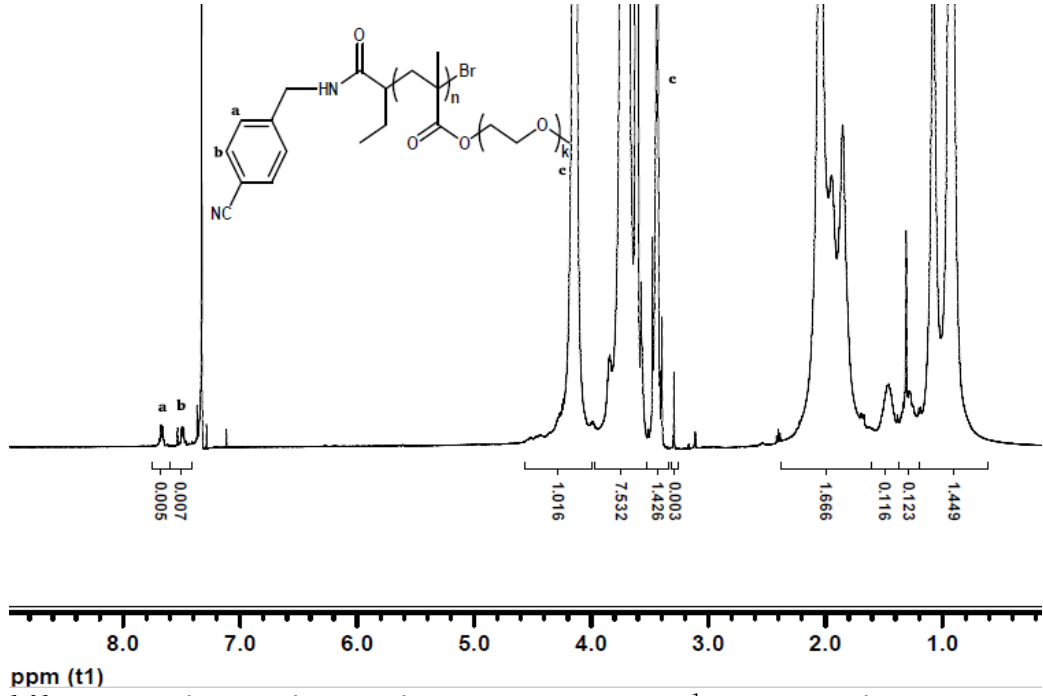
Şekil 4.6 TCO-NHS'in ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

4.3 Fonksiyonel Polimerlerin Sentezleri

Tez kapsamında uç grubu veya yan grubu tetrazin fonksiyonlu polimerlerin sentezleri hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda uç veya yan grubu nitril fonksiyonlu öncül polimerler elde edilmiştir. Yaklaşımın etkinliğini göstermek amacıyla farklı polimerizasyon teknikleri (serbest radikal ve ATRP) ile farklı polimer türleri (NIPAAm, PEGMA MMA esaslı kopolimerler) hazırlanmıştır.

4.3.1 Nitril Uç Gruplu Poli(poli(etilen glikol) metileter metakrilat) (PPEGMA-CN) Sentezi ve Karakterizasyonu

ATRP ile nitril uç gruplu poli(poli(etilen glikol)metil eter metakrilat) (PPEGMA-CN) sentezlenmiş ve elde edilen polimerdeki tekrar eden birim sayısı (n) NMR spektroskopisi yardımı ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.7 Nitril uç grubuna sahip PPEGMA-CN'nin ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

Aromatik nitril uç grubuna ait protonların 7,4 – 7,7 ppm civarında gözlemlenen piklerinin integrali ile PEGMA'nın uç metil gruplarına ait protonların 3,5 - 3,9 ppm arasında gözlenen piklerinin integral oranı kullanılarak “n” değeri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$n = \frac{[\text{PEGMA}]}{[\text{Ar-CN}]} = \frac{1,426/3}{0,012/4} = 158,44 \quad (4.1)$$

ATRP yöntemi ile farklı molekül ağırlıklarına sahip nitril uç gruplu PPEGMA-CN polimerleri farklı kombinasyonlarda 70 °C'de sentezlenmiştir. Öncelikle her iki sentez 24 saat sonra sonlandırılarak mol oranlarına göre başlatıcı:PEGMA:PMDETA:CuCl sırasıyla 1:50:1,2:1 ve 1:20:1,2:1 olarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmiş olan bu polimerlerin ^1H -NMR spektrumu analizine göre hesaplarında elde edilen “n” değerleri ve GPC sonuçları Tablo 4.1'de karşılaştırılmıştır. Ardından, benzer bir reaksiyon olarak kullanılan bileşiklerin molca oranları sırasıyla başlatıcı:PEGMA:PMDETA:CuCl sırasıyla 1:10:1,2:1 şeklinde üç ayrı reaksiyon önceden 70 °C'ye ısıtılmış olan yağ banyosuna daldırılarak farklı sentez sürelerinin (24 saat, 3,5 saat ve 1 saat)

polimerizasyona olan etkisi ^1H -NMR spektrumu ve GPC sonuçlarına Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Farklı oranlarda PEGMA içeren polimerler sentezleri

Polimer	Süre (Saat)	Dön. %	M_n , GPC (g/mol)	M_w , GPC (g/mol)	PDI	“n” ^a	M_n , NMR (g/mol)
SS027 (başlatıcı: PEGMA: PMDETA: CuCl =1: 50 :1.2:1)	24	89	15640	30600	1,96	158	47810
SS030 (başlatıcı: PEGMA: PMDETA:CuCl =1: 20 :1.2:1)	24	29	9890	14340	1,45	108	32710
SS031 (başlatıcı: PEGMA: PMDETA:CuCl =1: 10 :1.2:1)	24	63	12550	20170	1,69	208	62720
SS032 (başlatıcı: PEGMA: PMDETA:CuCl =1: 10 :1.2:1)	3,5	56	-	-	-	58	17730
SS036 (başlatıcı: PEGMA: PMDETA:CuCl =1: 10 :1.2:1)	1	12,5	8540	11690	1,37	37	11290

^a NMR’dan aromatik nitril uç grubuna ait protonların 7,4 – 7,7 ppm civarında gözlemlenen piklerinin integrali ile PEGMA’nın uç metil gruplarına ait protonların 3,5 - 3,9 ppm arasında gözlenen piklerinin integral oranı kullanılarak hesaplanmıştır.

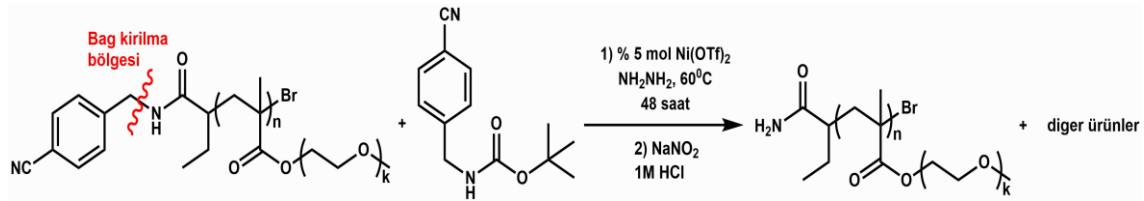
Tablo 4.1’de gösterilen gerek GPC gerekse NMR analizlerinden elde edilen molekül ağırlıkları değerlerinin beklenenden oldukça yüksek çıkmıştır. Fuente J. ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar gözlemlemiştir [186]. İlgili literatür çalışmasında bu durumun polimerizasyon esnasında çözücü olarak kullanılan asetonitrilden kaynaklandığını belirtilmektedir. Bu nedenle ilgili

reaksiyonlar asetonitril yerine metanol çözücüsünde yeniden gerçekleştirilmiştir [187].

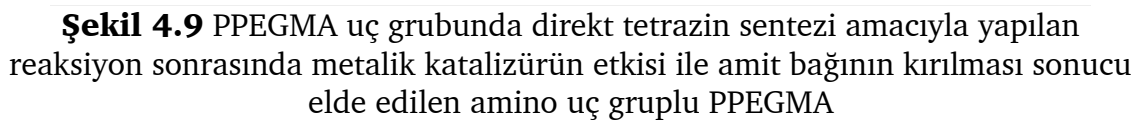
Çözücü olarak metanolun kullanılmasıyla oluşan polimer % 24,3 verimle 0,486 gram elde edildi. $^1\text{H-NMR}$ sonucuna göre $M_n=3978$ g/mol olarak hesaplandı. ($M_{n,\text{GPC}}=7430$ g/mol, $M_{w,\text{GPC}}=12650$ g/mol ve $\text{PDI}=1,70$) Elde edilen bu nitril uç gruplu polimerin uç grubu klasik Lewis asit katalizli yaklaşım ile tetrazine modifikasyonu incelenmiştir.

4.3.2 PPEGMA-CN'nin Uç Grubunda Direkt Tetrazin Sentezinin Araştırılması

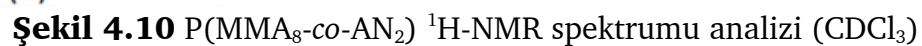
PPEGMA-CN'nin uç grubundaki nitril grubunun tetrazine dönüştürülmesi amacıyla ikinci bir nitril bileşiği olan *tert*-bütil4-siyanobenzilkarbamat ile $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ ve hidrazin monohidrat varlığında reaksiyona sokulmuş ve ardından asidik ortamda sodyum nitrit ile oksidayona tabii tutulmuştur. Reaksiyon sonunda polimerin NMR spektrumu incelendiğinde herhangi bir aromatik protona veya tetrazin grubu protonlarına ait bir pik gözlemlenememiştir. Bu sonuç polimerin uç kısmında bulunan aromatik nitril grubunun polimerden hidroliz sonucu ayrıldığını ortaya koymaktadır. Amit bağının Lewis asidi ($\text{Ni}(\text{OTf})_2$) ile hidroliz olabileceği literatürde daha önce rapor edilmiştir [188, 189].



Şekil 4.8 Poli(PEGMA-co-AN)'nin uç grubunun tetrazine dönüştürülememesi



P(MMA₈-co-AN₂) sentezinde bileşiklerin mol oranları MMA : AN : EBP : CuBr : PMDETA = 80: 20: 1: 1: 1,2 şeklinde kullanılmış olup polimerizasyon sonucunda gravimetrik olarak monomer dönüşüm oranı % 63 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu polimerin ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.10'de gösterilmiştir.



Reaksiyona giren ve polimer yapısında bulunan MMA ve AN oranları $^1\text{H-NMR}$ grafiğinden hesaplanmıştır. Bunun için $^1\text{H-NMR}$ spekturumundaki karakterizasyondan 2,5 ppm ve 2,3 ppm'de gözlenen AN'e ait proton piklerinin alanları kullanılmıştır. MMA için ise 3,52 ppm ve 3,61 ppm arasında gözlemlenen MMA'nın oksijen komşusu uç metil gruplarına ait pikin alanı kullanılmıştır. Buna göre $\text{p(MMA}_8\text{-co-AN}_2\text{)}$ için bu oran (n/m) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\frac{[\text{MMA}]}{[\text{AN}]} = \frac{n}{m} = \frac{1/3}{0,061} = 5,46 \quad (4.2)$$

Benzer polimerizasyonlar ise Tablo 4.2'de gösterilen farklı oranlarda AN içeren polimerler sentezlenmiştir ve deneysel olarak oluşan polimerlerdeki komonomer oranları $^1\text{H-NMR}$ ile belirlenmiştir.

Tablo 4.2 Farklı oranlarda AN içeren polimerler sentezleri

Kod	Formülasyondaki Komonomer Oranları		Dönüşüm (%)	Deneysel Komonomer Oranı	
	[MMA] (ek)	[AN] (ek)		[MMA]	[AN]
P(MMA₉-co-AN₁)	9	1	61	1	7,75
P(MMA₈-co-AN₂)	8	2	63	1	5,46
P(MMA₇-co-AN₃)	7	3	72	1	4,45

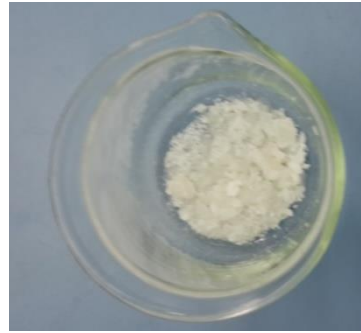
4.3.4 Tetrazin Fonksiyonlu P(MMA-co-AN-co-TzCOOH) ve Tetrazi Fonksiyonlu P(MMA-co-AN-co-TzBoc) Sentezi ve Karakterizasyonu

PMMA yan zincirlerinde direkt olarak tetrazin sentezinde hidrazin monohirat varlığında Zn(OTf)_2 katalizli yaklaşım kullanılmıştır. Reaksiyon farklı aromatik nitril türevleri (4-siyanofenilasetik asit ve *tert*-butil (4-siyanobenzil)karbamat)) ile gerçekleştirilmiştir. Ancak tepkenlerin hidrofilik özellik taşıması ve polimerin

hidrofobik özellikte olması reaksiyon karışımının oldukça heterojen olmasına neden olmuştur. Bu nedenle reaksiyon sırasında olması gerekenden yüksek miktarda DMF kullanılmış ve reaksiyon seyreltik koşullarda gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak reaksiyon sonunda tetrazinin varlığını gösteren klasik pembe renk gözlemlenmemiş ve yapılan spektroskopik analizler sonucunda tetrazin gruplarının oluşmadığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda önerilen yaklaşımın daha hidrofilik özellik taşıyan polimerler ile araştırılmasına karar verilmiştir.

4.3.5 Poli(*N*-isopropilakrilamid-co-akrilonitril) Sentezi ve Karakterizasyonu

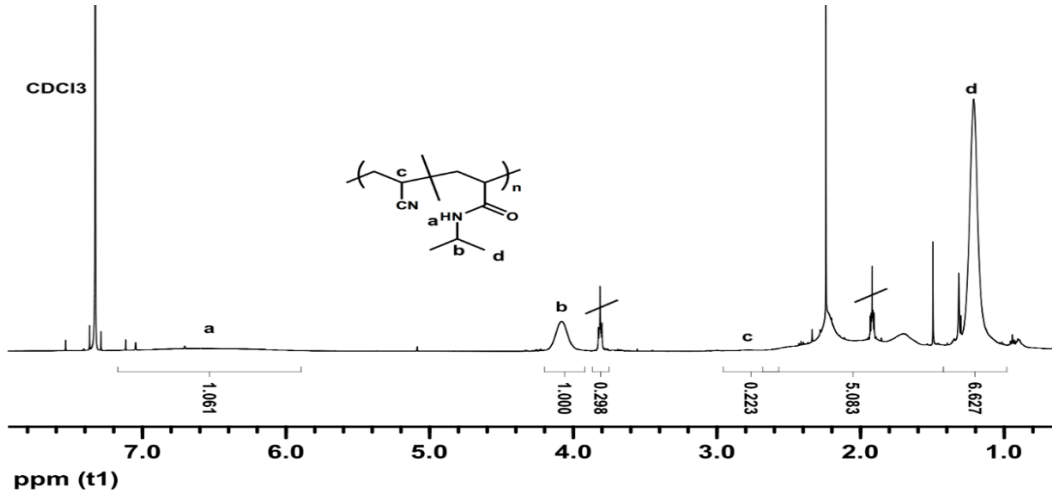
Dibenzoil peroksit başlatıcısı kullanılarak, NIPAAm ve nitril yan grupları taşıyan akrilonitrilin (AN) serbest radikal polimerizasyonu (besleme oranı NIPAAm:AN=4:1) P(NIPAAm-co-AN) kopolimeri % 58 verim ile 1,172 g ($M_{n, GPC} = 18,350$ g/mol, PDI = 3,72) olarak elde edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Elde edilen P(NIPAAm₈-co-AN₂)

Elde edilen P(NIPAAm-co-AN) öncül polimerin kimyasal yapı analizinde, ¹H-NMR spektrumunun (Şekil 4.12) bu polimere ait karakteristik pikleri taşıdığı gözlemlenmiştir. Örneğin, amid protonu 6,00 - 7,00 ppm civarında geniş bir pike sahiptir. NIPAAm'ın yan grup protonları 4,08 ppm (-NH-**CH**-(CH₃)₂) ve 1.21 ppm'de (-NH-CH-(**CH**₃)₂) görülmüştür. Bu polimerin anazincir pikleri 1,20-2,80 ppm aralığında gözlemlenmiştir. AN proton piki (Şekil 4.12,c) ve NIPAAm'ın metilen proton pikinin (Şekil 4.12,b) integrallerinin oranı alınarak AN'nin

bağlanma (birleşmesi) oranı 1:4,5 olarak hesaplandı (nitrilin bağlanma oranı= %18,2). Bu sonuç AN:NIPAAm=1:4 besleme oranı ile tutarlıdır.



Şekil 4.12 P(NIPAAm-co-AN)'ın ^1H -NMR spektrumu analizi (CDCl_3)

4.3.6 P(NIPAAm-co-AN) Üzerinde Tetrazin Gruplarının Doğrudan Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

P(NIPAAm-co-AN) polimerinin nitril grupları yaygın olarak kullanılan bir sentez yöntemi ile tetrazin gruplarına dönüştürülmüştür. Özellikle, *tert*-butil (4-siyanobenzil)karbamat, hidrazin ve çinko triflate [$\text{Zn}(\text{OTf})_2$]'in varlığında polimer iskeletinin üzerindeki alifatik nitril grupları ile heterosiklik halka oluşturan aromatik nitril bileşeni olarak kullanılmıştır ve ardından asidik bir ortam içinde sodyum nitril ile oksidasyonu sonucu tetrazin elde edilmiştir. Reaksiyon sırasında, renksiz olan çözelti tetrazin grupları için karakteristik olan koyu pembe renge dönüşmüştür. Bu spesifik tetrazin sentezinde, hem homo hem de hetero bağlanma olasılığı nedeniyle safzılığa neden olan *tert*-bütil(4-siyanobenzil)karbamatin homo bağlanma ürünlerini gidermek amacıyla için metonole karşı polimere diyaliz (MWCO 3,5 kDa) yapılmıştır (Şekil 4.13).



A.

B.

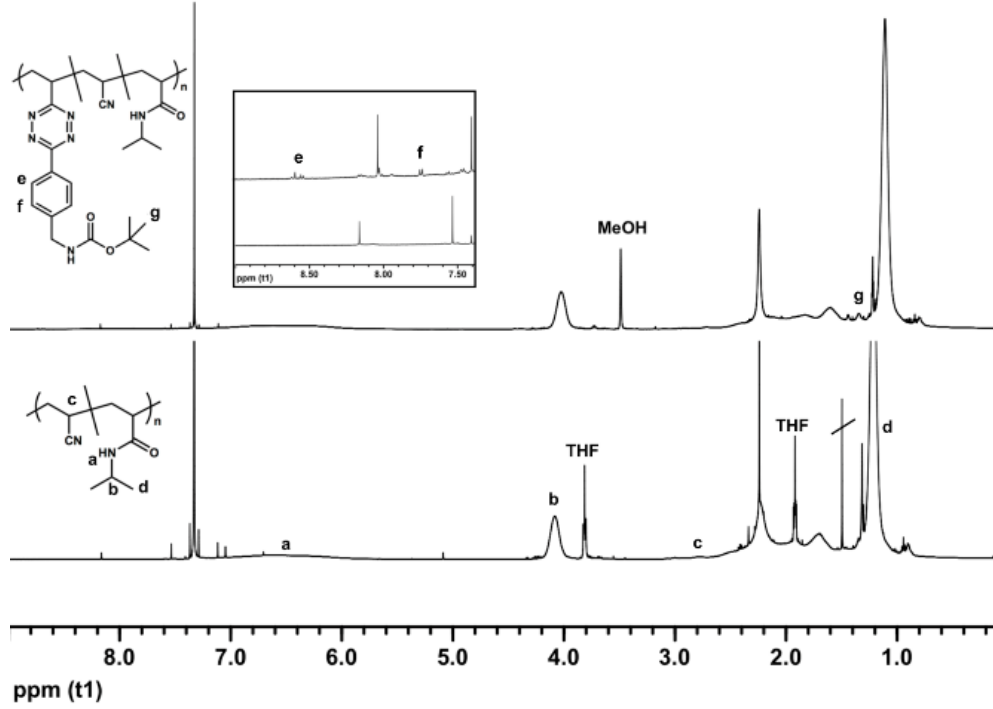
Şekil 4.13 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) polimerin metanole karşı
A. diyaliz yapılırken B. diyaliz sonrası

Diyalizden sonra, açık pembe renkli bir polimer elde edilmiştir (Şekil 4.14) ($M_{n, GPC} = 11,810$ g/mol, $M_{w, GPC} = 63,030$ g/mol, PDI = 5,34).



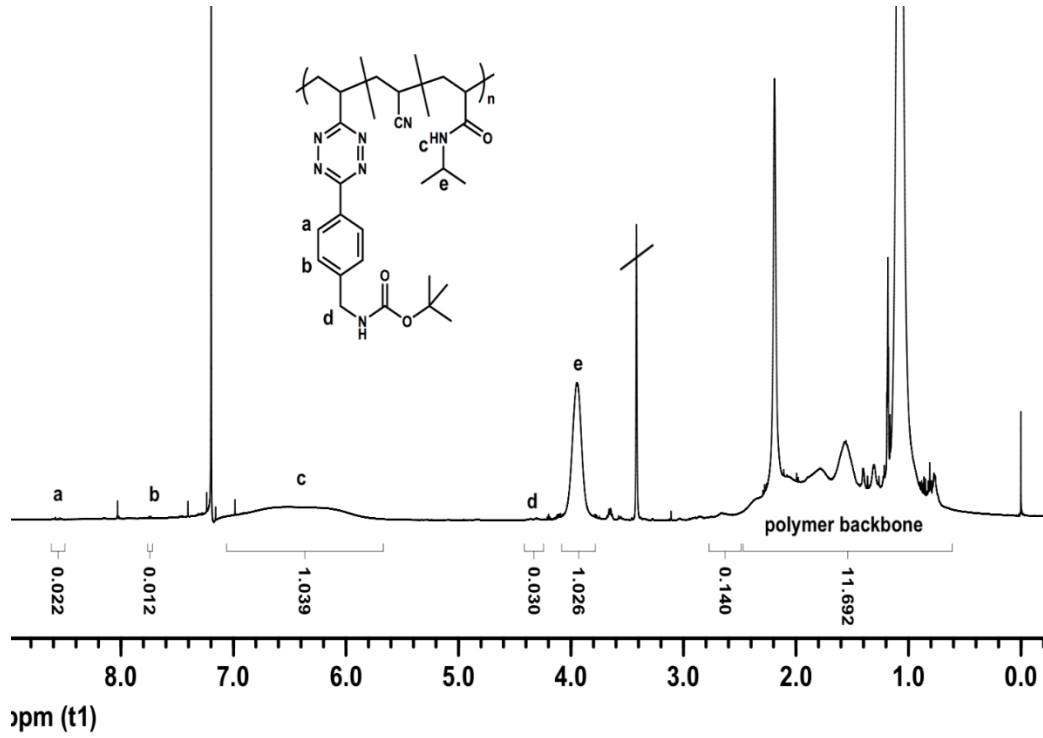
Şekil 4.14 Tetrazin fonksiyonlu p(NIPAAm-co-AN) görüntüsü

Şekil 4.15’de P(NIPAAm-co-AN)’in tetrazin sentezi öncesi ve sonrası $^1\text{H-NMR}$ spektrumu gösterilmektedir. P(NIPAAm-co-AN) tetrazin fonksiyonlu polimere dönüşümden sonra, 7,75 ppm (f) ve 8,65 ppm (e)’de yeni aromatik proton pikleri ayrıca yan zincir olarak polimer üzerindeki tetrazin parçalarının oluşumunu destekleyen 1,35 ppm (g) civarındaki alifatik proton pikleri oluşmuştur.



Şekil 4.15 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve P(NIPAAm-co-AN) ¹H-NMR spektrumu analizi (CDCl₃)

Tetrazinin metilen proton pikleri (Şekil 4.16, d) NIPAAm'ın metin proton piklerinin (Şekil 4.16, e) integrallerinin oranı 1:68,4 olarak hesaplandı ve dolayısıyla polimer üzerinde tetrazinin oluşum oranı % 1,4 olarak belirlendi. Sonuç olarak, %18,2 nitril (NIPAAm:AN = 4,48) grubu içeren bu polimer NIPAAm'a göre %7,9 dönüşüm verimi ile %1,4 tetrazin içeren polimere dönüşmüştür. Tetrazin sentez verimi (%7,9) literatürde rapor edilen küçük tetrazin moleküllerinin sentezindeki reaksiyon verimleri (%12-59) ile karşılaştırıldığında makul bir değer olduğu anlaşılmaktadır [5]. Bu nedenle geliştirilen yaklaşımın nispeten düşük verimli olduğu görünse de büyük etkilere sahip bir makromolekül üzerindeki tetrazin sentezi için uygundur.



Şekil 4.16 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ^1H -NMR spektrumu analizi (CDCl_3)

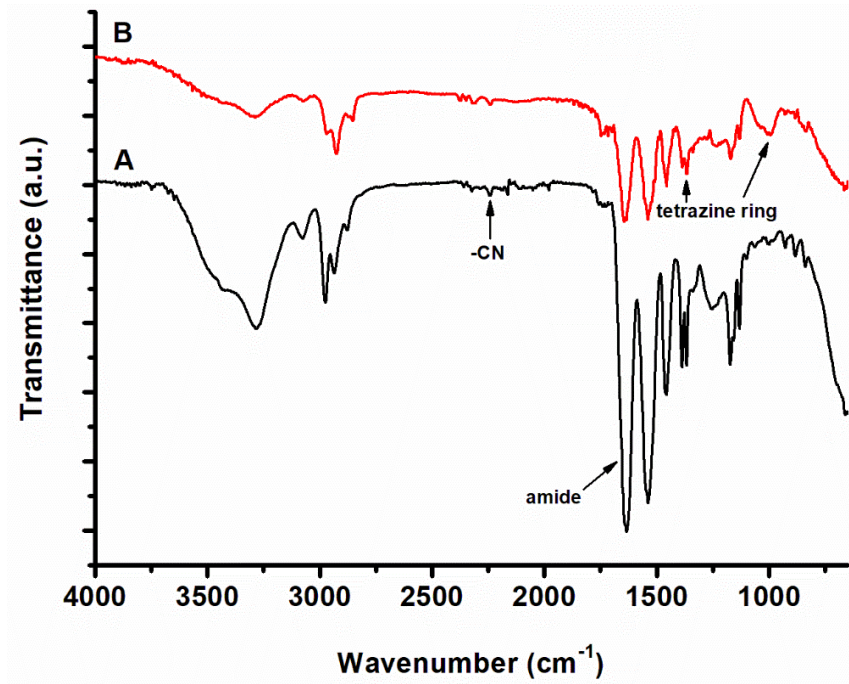
Tablo 4.3 PNIPAAm temelli polimerin fonksiyonel grup taşıma oranlar

	Proton	NIPAAm:R ^c (besleme)	δ (ppm)	NIPAAm:R ^c (NMR)	Fonksiyonel grup oranı (%)
SS024^a	NC-CH-	2	2,80	1	18,2
	NH-CH- (CH ₃) ₂	8	4,08	4,48	
SS025^b	Ar-CH ₂ - NH-	2	4,40	0,030	1,45
	NH-CH- (CH ₃) ₂	8	3,94	1,026	

^aSS024: P(NIPAAm-co-AN); ^bSS025: Tz fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN);

^cR: -CN SS024 için, R: tetrazin SS025 için

Modifiye ve modifiye olmamış polimerlerin FT-IR spektrumu Şekil 4.17’de gösterilmiştir. pNIPAAm ve tetrazin halka gruplarının 1367 cm^{-1} ve 991 cm^{-1} ’de karakteristik bantları görülmektedir [190].



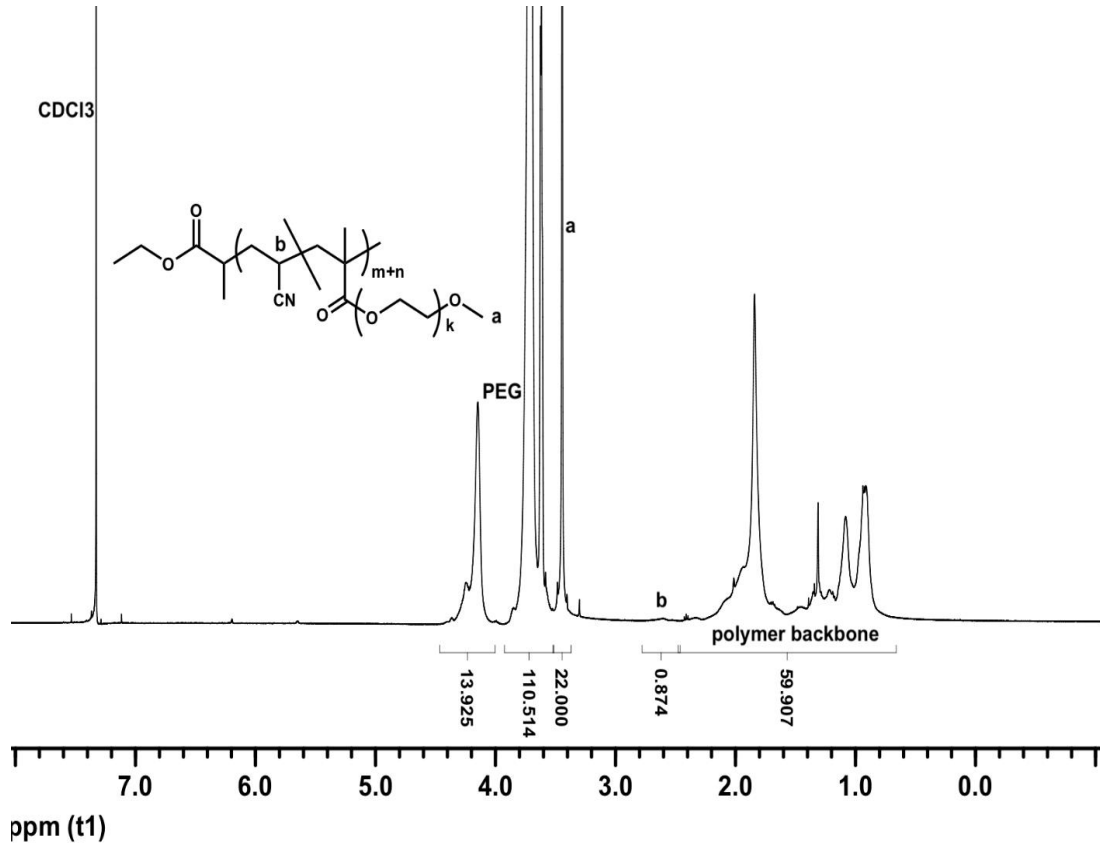
Şekil 4.17 P(NIPAAm-co-AN) ve tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN)'ın FT-IR spektrumu analizi

4.3.7 ATRP ile P(PEGMA-co-AN) Sentezi ve Karakterizasyonu

P(PEGMA-co-AN) kontrollü/yaşayan polimerizasyonu türü olan ATRP ile sentezlenmiştir (Verim = 0,601 g; monomer dönüşümü = % 35, M_n = 10640 g/mol, PDI = 1,38). Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) sentezinin benzer yöntemi kullanılarak elde edilen P(PEGMA-co-AN) polimer zincirleri üzerine tetrazin fonksiyonlarının doğrudan sentezinde kullanılmıştır.

Modifiye edilmemiş P(PEGMA-co-AN)'nın NMR spektrumu polimerin sadece karakteristik piklerini içermektedir. Polimerin ana omurga protonlarına ait pikler 0,9-2,20 ppm aralığında görünmektedir (Şekil 4.18).

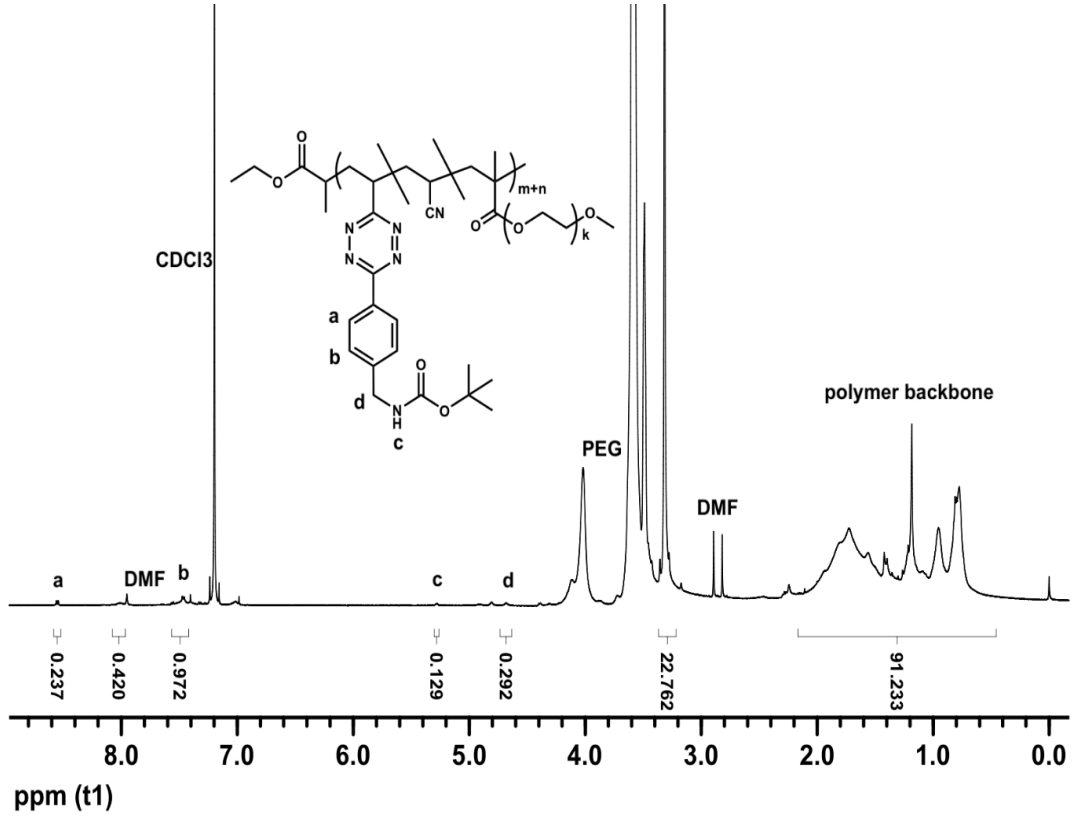
PEG ana zincirinin karakteristik metilen proton pikleri (3,40-4,40 ppm civarında), uç metil piki (PEG-O-CH₃) (3,44 ppm) ve AN ana zincir protonları (2,46-2,78 ppm) polimerin spektrumunda gözlemlendi. PEG'in uç metil protonları ve AN ana zincir protonunun integral alan oranları (Şekil 4.18) AN'nin bağlanma oranının 1:8,4 olduğunu gösterilmiştir. Besleme oranıyla (AN:PEGMA= 1:9) uyumluluk gösteren bu sonuca göre polimer %10,6 (molce) nitrile yan grupları içermektedir.



Şekil 4.18 P(PEGMA-co-AN) ^1H -NMR spektrum analizi

4.3.8 P(PEGMA-co-AN) Üzerinde Direkt Olarak Tetrazin Gruplarının Elde Edilmesi

P(PEGMA-co-AN) polimerinin tetrazin oluşturmaya yönelik modifikasyonundan sonra ^1H -NMR spektrumunda tetrazinin aromatik protonlarına ait pikler 7,47 ppm (b) ve 8,56 ppm'de (a) ortaya çıkmıştır. Ayrıca tetrazinin *tert*-bütoksit grubundaki metil protonları (1,42 ppm), amide protonu (5,29 ppm, c) ve tetrazinin metilen protonları da (4,68 ppm, d) NMR spektrumunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Tetrazine fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) ^1H -NMR spektrumu analizi

Nitrilden tetrazine dönüşen tetrazin fonksiyonlu polimerin ^1H -NMR spektrumunda metilen protonları ($\text{Ar-CH}_2\text{-NH-CO-}$) piki 4,68 ppm'de ortaya çıkmıştır (Şekil 4.19, d). Polimere katılmış tetrazin miktarını hesaplayabilmek için, metilen piki (4,68 ppm) ve PEG uç metil proton (3,31 ppm) pikinin integral oranları kullanılmıştır (integraller için Şekil 4.19). Bu bağlanma yüzdesi PEGMA'ya göre %1,9 (molce) hesaplandı. Başka bir deyişle, %10,6 nitril içeren polimer %17,9 dönüşüm verimi ile %1,9 tetrazin içeren polimere dönüştürülmüştür.

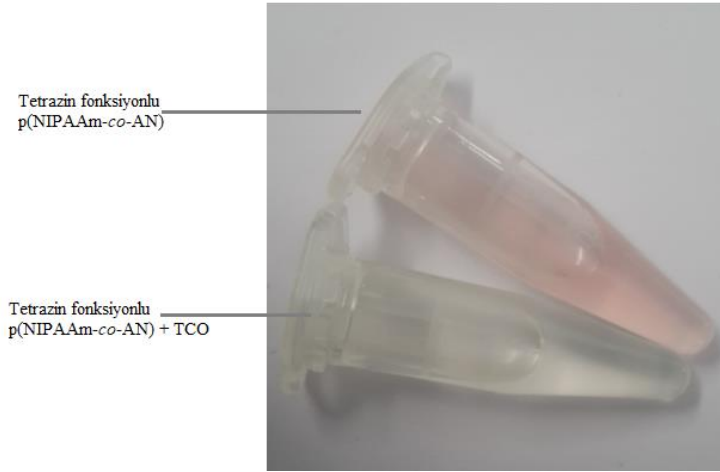
Tablo 4.4 PEGMA temelli polimerlerin fonksiyonel grup taşıma oranları

	Proton	PEGMA:R ^c (besleme)	δ (ppm)	PEGMA:R ^c (NMR)	Fonksiyonel grup oranı (%)
SS050^a	H-CN	1	2,78- 2,46	1	10,6
	PEGMA- O-CH ₃	9	3,44	8,39	
SS051^b	Ar-CH ₂ - NH-	1	4,68	1	1,9
	PEG-O- CH ₃	9	3,31	52	

^a**SS050:** P(PEGMA-co-AN); ^b**SS052:** Tz fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN); ^cR: -CN
SS050 için, R: tetrazin SS052 için

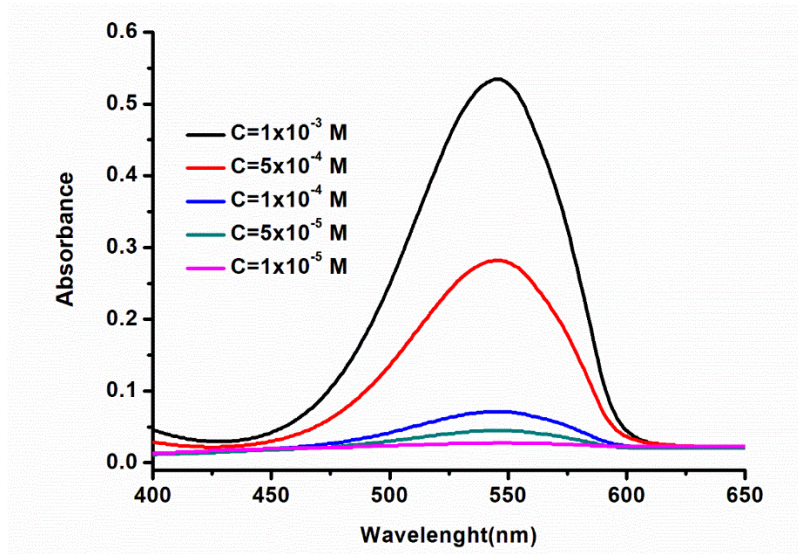
4.4 Polimerler Üzerinde Tetrazinler ile iEDDA Reaksiyonu

Elde edilen tetrazin fonksiyonlu polimerlerin iEDDA reaksiyonundaki etkinlikleri incelenmiştir. Bu amaç için *trans*-siklooktenol (TCO), *trans*-5-hidroksisikloosten süksinimidil esterin (TCO-NHS), poli(etilen glikol) – norbornen (PEG-NB) veya norbornen (NB) ile polimer zincirleri üzerindeki tetrazin grupları arasındaki iEDDA reaksiyonları UV-Vis ve NMR spektroskopisi ile takip edilmiştir. Bu kapsamda, tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve P(PEGMA-co-AN) içeren iki farklı polimer, farklı TCO türevleri ve farklı norbornen türevleri ile reaksiyona sokulmuştur. Tetrazin bileşiklerinin fotokimyasal özelliği olarak tetrazin halkasının çok karakteristik (özgün, belirgin) pembe rengi reaksiyon meydana geldiği zaman anında ortadan kaybolmaktadır. Bu durum iEDDA reaksiyonunun gözle dahi izlenmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 4.20) [2, 191].



Şekil 4.20 Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve iEEDA reaksiyon sonrası tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve TCO

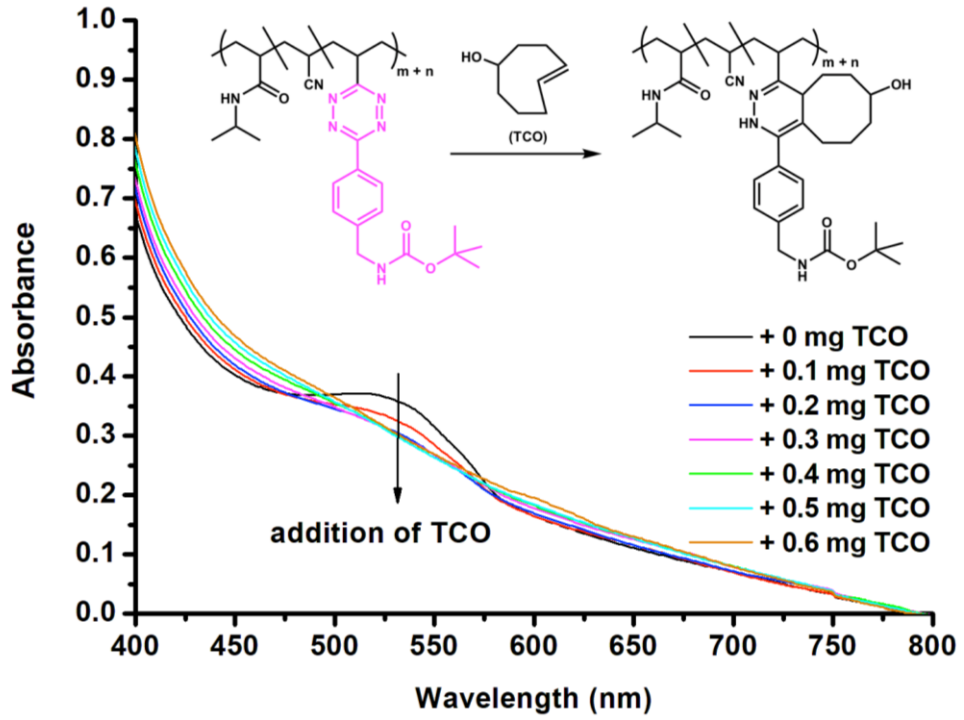
Tert-bütil(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl) karbamat maksimum absorpsiyon dalga boyu Şekil 4.21’de gösterildiği gibi 546 nm’dir [2]. Böylece, bu absorpsiyon bandının düşmesi reaksiyonun izlenmesinde kullanılabilir.



Şekil 4.21 THF içerisinde çözülmüş çeşitli konsantrasyonlardaki *tert*-bütil(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)karbamat’ın UV-Vis spektrumu

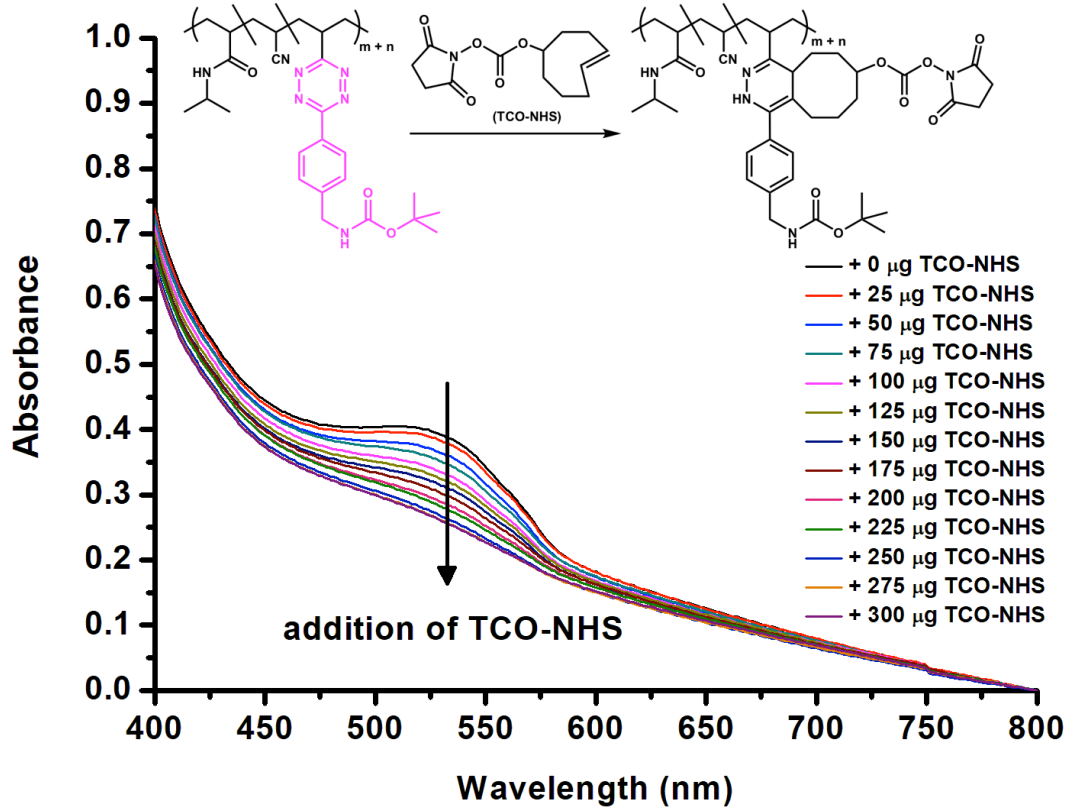
THF içerisinde tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) çözeltisine yine THF’de çözülmüş olan TCO’nun küçük hacimleri ilave edildikten hemen sonra (1 dakikadan kısa bir sürede) UV-Vis spektrumunda izlenmiştir (Şekil 4.22). Görüldüğü gibi, normalize edilmiş spektrumlarda yaklaşık 540 nm’de gözlenen maksimum absorpsiyon TCO’nun eklenmesiyle ortadan kaybolmaktadır ve bu tepe toplam 0,2 mg TCO eklendikten sonra tamamen ortadan kaybolmuştur. Böylece

polimer üzerindeki tetrazin moleküllerinin ekivalan miktarı $1,588 \times 10^{-6}$ mol (polimer başına 20 mg) olarak belirlenmiştir. Dolaylı yoldan belirlenen tetrazin miktarının direkt olarak UV-Vis spektroskopisinde Lambert-Beer kanununa göre konsantrasyon-absorbans arasındaki ilişkiyle belirlenen $1,364 \times 10^{-6}$ mol miktarıyla uyumluluk göstermektedir. Spektrumlar çok kısa sürede (1 dakikadan az) kaydedildiği için, reaksiyonun beklediği gibi çok kısa sürede gerçekleştiği anlaşılmaktadır [12].



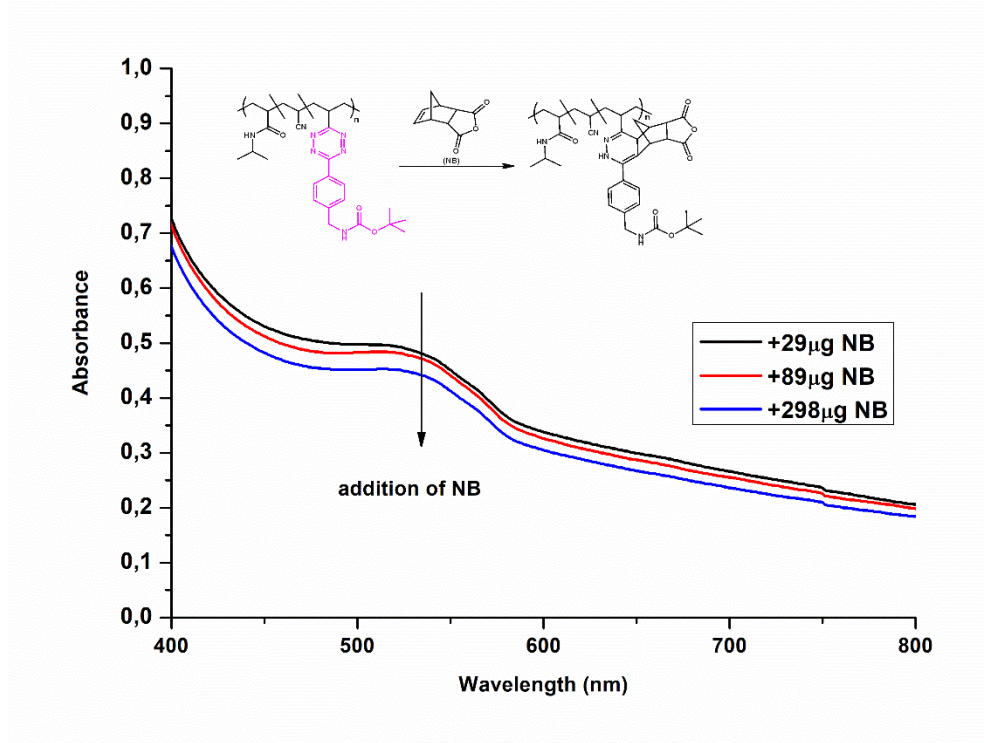
Şekil 4.22 THF içerisinde çözünmüş tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL) eklenen THF içerisinde çözünmüş TCO (2 mg/mL)'nin UV-Vis spektrumu

Benzer olarak, süksinimidil ester fonksiyonlu TCO molekülünde (TCO-NHS) aynı amaç için kullanılmıştır. TCO-NHS bu kez az miktarda ($25 \mu\text{g}$) eklenerek reaksiyon incelenmiştir. Benzer davranış bu deneyde de gözlemlenmiştir; yaklaşık 540 nm absorbans bandı TCO-NHS'nin eklenmesiyle yok olmuştur (Şekil 4.23).

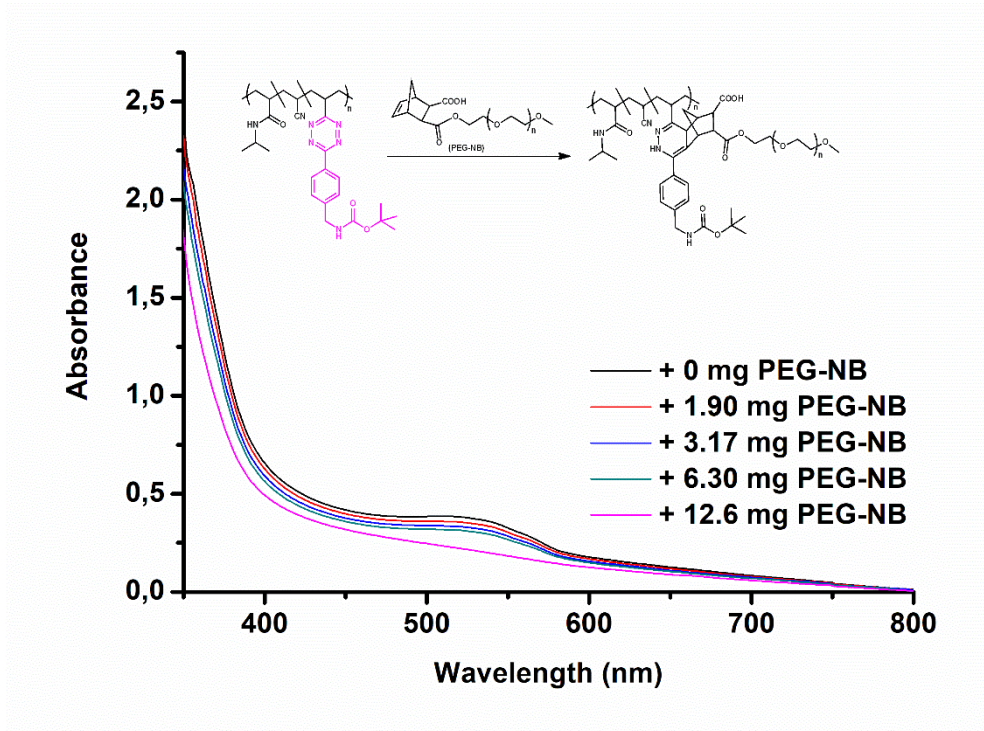


Şekil 4.23 THF içerisinde çözülmüş tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL) eklenen THF içerisinde çözülmüş TCO-NHS (1 mg/mL)'nin UV-Vis spektrumu

Tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) polimerinin TCO türevleri ile gerçekleştirmiş olduğu iEDDA reaksiyonlarına benzer olarak TCO türevleri yerine NB ve NB'nun türevleri kullanılarak gerçekleşen reaksiyon UV-Vis spektroskopisi incelenmiştir. Bu reaksiyonların TCO ile yapılan reaksiyonlara göre daha uzun sürede gerçekleştiği görülmüştür. Bu durum literatürdeki örneklerle uyumludur [12]. Reaksiyon sonunda yaklaşık 540 nm civarındaki maksimum absorpsiyon NB ve PEG-NB miktarı artıktıkça gözden kaybolmuştur (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25). Özellikle, 12,6 mg PEG-NB'nun eklenmesiyle oluşan tepe yükseltisinin tamamen ortadan kaybolduğu görülmüştür.



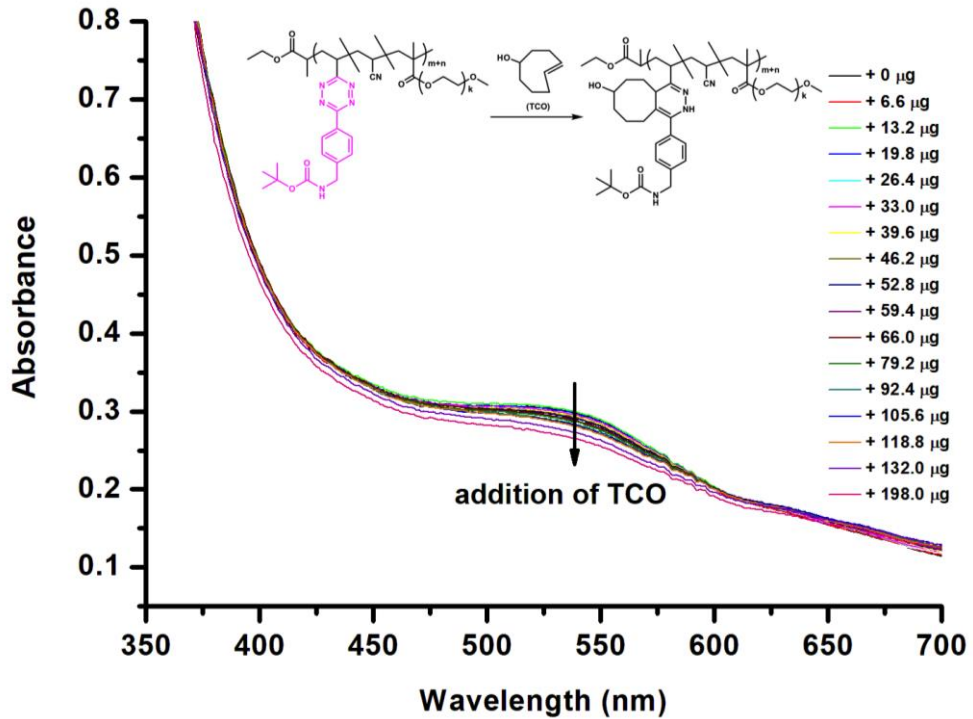
Şekil 4.24 Tetrazine fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL THF’de) eklenen NB (0,029 mg/mL THF’de) UV-Vis spektrumu



Şekil 4.25 Tetrazine fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) (1 mL, 20 mg/mL THF’de) eklenen PEG-NB (1,9 mg/mL THF’de) UV-Vis spektrumu

Polimer çözeltisinin pembe renginin kaybolması her dört deneyde de gözlemlendi. Sonuç olarak her iki TCO ve NB türevi molekülü ile gerçekleşen reaksiyonların UV-Vis spektrum sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

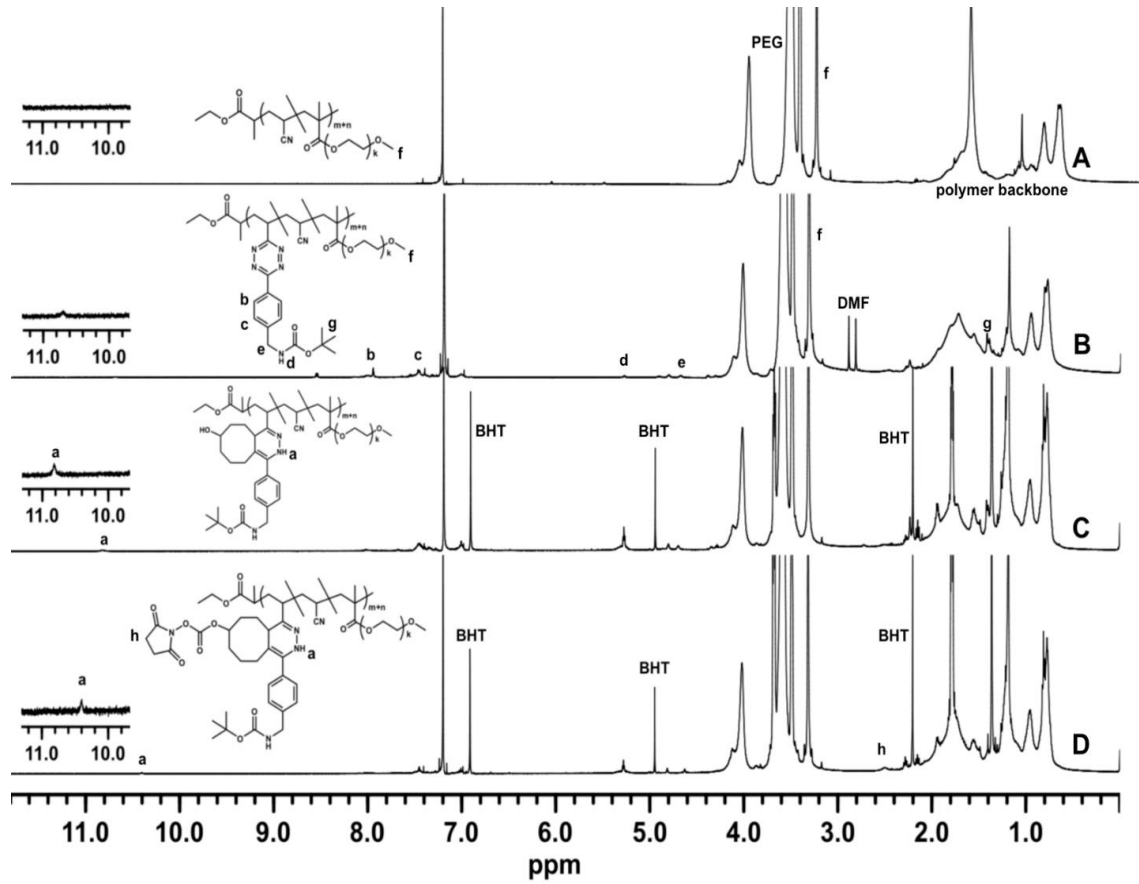
NIPAAm esaslı polimerlerden elde edilen başarılı sonuçlar nedeniyle biyolojik uygulamalar için önemli olan bir diğer polimer olan PEG esaslı polimerlerin de benzer amaçla kullanılabileceği düşünülmüştür. Bunun için TCO ve TCO-NHS ile P(PEGMA-co-AN) üzerindeki tetrazin grupları arasında iEDDA reaksiyonu incelenmiştir. Tetrazin fonksiyonlu PEGMA-co-AN (1 mL, 5 mg/mL THF’de) çözeltisine TCO çözeltisinin (0,066 mg/mL, THF’de) küçük miktarlarda eklemesi üzerine, 540 nm civarında tetrazin gruplarının absorpsyon bandı hemen azalmış olduğu görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Tetrazine fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) (1 mL, 5 mg/mL THF’de) eklenen TCO (0,066 mg/mL, THF’de) UV-Vis spektrumu

TCO çözeltisinin son kısmının (toplam 198 µg TCO) eklenmesinden sonra, polimer izole edilmiştir ve daha sonra ¹H-NMR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Sırasıyla, P(PEGMA-co-AN), tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN), TCO ve TCO-NHS ile reaksiyona girmiş tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN)’nin ¹H-NMR spektrurumu Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Her spektrum ilgili polimerlerin

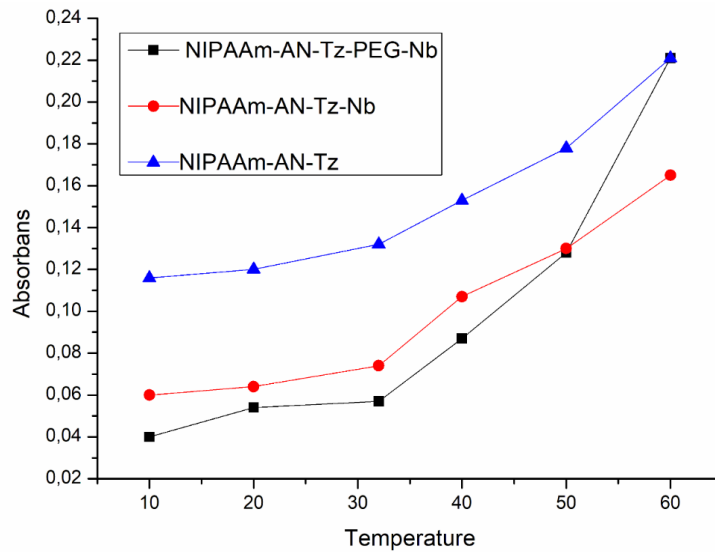
karakteristik piklerini içermektedir. Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) polimeri ve TCO türevleri ile reaksiyona giren polimerlerin ^1H -NMR spektrumunları arasındaki en belirgin fark 10,91 ppm (TCO ile reaksiyonu için) ve 10,40 ppm’de (TCO-NHS ile reaksiyonu için) yeni piklerin ortaya çıkmış olmasıdır. Bu pikler Diels-Alder reaksiyonu sırasında oluşan ikincil (seconder-destekleyici) aminin protonunda kaynaklanmaktadır. Ayrıca, TCO-NHS substrat molekül olarak kullanıldığı zaman suksinimidil esterin proton piki 2,50 ppm civarında gözlemlenmiştir. Hem UV-Vis spektroskopisi hem de ^1H -NMR spektroskopisi sonuçları polimer bağlı tetrazin ve TCO türevleri arasındaki iEDDA reaksiyonunu desteklemektedir.



Şekil 4.27 (A) P(PEGMA-co-AN) ^1H -NMR spektrumu, (B) tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN), (C) TCO ve (D) TCO-NHS ile reaksiyona girmiş tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN)’nın ^1H -NMR spektrumu analizi

4.5 Fonksiyonel p(NIPAAm-co-AN) Esaslı Polimerlerin Sıcaklık Değişimiyle Davranışlarının İncelenmesi

PNIPAAm esaslı polimerler bilindiği üzere sıcaklıkla faz değişimine uğramaktadır. Tez kapsamında elde edilen PNIPAAm polimerlerinin bu davranışını incelemek amacıyla polimerin sulu çözeltilerinin değişen sıcaklıkla UV-Vis spektroskopisi ile absorbansları takip edilmiştir. Bunun için su içinde tetrazin fonksiyonlu polimer (1mL, 2 mg/mL), tetrazin fonksiyonlu polimer (20 mg/mL) ve PEG-Nb (1,90 mg/mL), tetrazin fonksiyonlu polimer (20mg/mL) ve Nb (1 mg/mL) miktarlarda ters elektron gereksinimli Diels Alder (iEDDA) reaksiyonu prensibine göre karıştırılmıştır. UV-Vis ölçümleri farklı sıcaklıklarda 250 - 800 nm dalgaboyu aralığında kaydedildi. 375 nm'deki absorbans-sıcaklık grafiği çizilmiştir. Bu grafiğe göre pNIPAAm düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) 32 °C olması nedeniyle bu sıcaklığın üstüne çıkıldığı zaman polimerin hidrofobik özelliği artmıştır, çözelti bulanıklaşmış ve böylece absorbans değerleri artmıştır. Bu durum üç farklı polimer için Şekil 28'da verilen absorbans-sıcaklık eğrisinde de gözlemlenmektedir.



Şekil 4.28 Tetrazin fonksiyonlu polimerlerin 375 nm'deki absorbans-sıcaklık değişim grafiği

Tetrazin sentezi ile ilgili ilk çalışmalar yaklaşık yüz yıl önce başlamıştır. Son yıllarda ise yüksek hızlı ve yüksek seçicilik özelliğinin yanı sıra biyoortogonal özelliği de sahip olması tetrazin ile ilgili yeni sentez yöntemlerinin geliştirilmesini tekrardan gündeme gelmiştir. Tetrazin molekülü ve bir alken arasındaki ilk siklokatalizma reaksiyonu Sauer tarafından 1990'lı yıllarda gerçekleştirilmiştir [33]. Tetrazinin *trans*-siklooktenin (TCO) ve norbornen (NB) ile birlikte gerçekleştirmiş olduğu iEDDA reaksiyonu biyoortogonal tetrazin reaksiyonları arasında yüksek hıza sahip olduğu ise 2008 yılında, Fox [10] ve Hilderbrand [9] tarafından gösterilmiştir ve bu çalışmaların sonuçlarından sonra bu reaksiyon türü oldukça dikkat çekmiştir.

Literatür çalışmalarına baktığımızda zaman fonksiyonel polimerlerin elde edilmesinde kullanılan post-modifikasyon yöntemleri, bu tez kapsamında geliştirilmiş olan tetrazin sentezi yöntemine kıyasla çok daha fazla basamaktan oluşan bir sentez yöntemleriyle elde edilmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan sentez yönteminde geliştirilen yaklaşım daha az basamak gerektirmekte olup daha kısa sürede tamamlandığı görülmektedir. Burada yüksek hıza sahip biyoortogonal konjugasyon tekniği olan tetrazinin *trans*-siklookten ve norbornen türevleri ile meydana getirdiği iEDDA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yaklaşım ile polimer modifikasyonunda hızlı, etkili bir yöntemin temeli atılmıştır.

Bu tez kapsamında ilk olarak nitril yan grubuna ve uç grubuna sahip olan öncül polimerler serbest radikal polimerizasyonu ve atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemleri ile sentezlenmiştir. Poli(poli(etilen glikol)metil eter metakrilat) (PPEGMA), poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) ve poli(metil metakrilat) (PMMA) temelli polimerler biyouyumlu olmaları nedeniyle tercih edilmiştir. Biyomedikal uygulamalarda ihtiyaç duyulan görüntüleme ve etiketleme gibi amaçlar için kullanılma potansiyeli olabilecek bu polimerik malzemelerin geliştirilmesinde iki ayrı yaklaşım izlenmiştir. Birinci yaklaşım olarak, ATRP yöntemi kullanılarak PPEGMA-CN elde edilmiştir ve

ardından PPEGMA-CN'nin uç grubunda bulunan nitril grubunun tetrazine dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Reaksiyon sonrasında yapılan karakterizasyon sonucunda tetrazin grubuna veya aromatik bir protana ait herhangi bir pik görülmemiştir. Bunun nedeni olarak, polimerin uç kısmındaki aromatik nitril grubunun $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ Lewis asidinin varlığında hidroliz ile bağın kırılmış olabileceği düşünülmüştür [188, 189]. İkinci yaklaşım ise PNIPAAm, PPEGMA ve PMMA gibi polimerlerin akrilonitril (AN) monomerlerinin kopolimerizasyonu ile nitril yan grubuna sahip polimerler ATRP ve serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Yan zincirlerin nitril grubu içeren P(NIPAAm-co-AN), P(PEGMA-co-AN) ve P(MMA-co-AN) veya nitril uç fonksiyonlu polimerler klasik tetrazin sentezinde gerekli olan nitrillerden biridir. Yan grup olarak hazırlanan tetrazin fonksiyonlu bu polimerler için basit bir sentez yaklaşımı kullanılmıştır. Hazırlanan nitril fonksiyonlu öncül polimer zincirleri üzerinden doğrudan tetrazin sentezi gerçekleştirilmiştir. Tetrazin sentezi, hidrazin ve katalizör olarak $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ veya $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ 'in varlığında polimerik nitrilin ikinci nitril bileşeni olarak *tert*-butyl 4-siyanobenzilkarbamate ile reaksiyona sokulması ve takip eden oksidasyon ile tek-kap yaklaşımıyla gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda belirtilen ikinci yaklaşıma göre PMMA yan zincirlerinde direkt tetrazin sentezi hedeflenmiş fakat reaksiyon sonunda tetrazinin karakteristik rengi olan pembe renk gözlemlenmemiştir. ^1H -NMR spekturumu incelendiğinde tetrazin gruplarının oluşmadığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak tepkenin hidrofilik, polimerin ise hidrofobik özellikte olması sonucunda reaksiyon karışımının heterojen olmasıdır. Yüksek miktarda çözücü kullanılmasına rağmen reaksiyon ortamının heterojenliği engellenememiştir. Bu durum sonucunda bu tür reaksiyonlar için daha hidofilik özelliğe sahip polimerlerin kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

NIPAAm ve nitril yan grubuna sahip olan AN monomeri serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile P(NIPAAm-co-AN) öncül polimeri elde edilmiştir. Elde edilen P(NIPAAm-co-AN) polimerin nitril grupları direkt olarak tetrazin sentezinde hidrazin monohidrat, *tert*-butyl 4-siyanobenzilkarbamate ve $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ katalizörlü varlığında gerçekleştirilmiş olan yaklaşım kullanılmıştır. P(NIPAAm-co-AN)'ın tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) dönüşümünde karakteristik

pembe renk elde edilmiş olup ^1H -NMR spektrum analizine göre yeni aromatik pikler (7,75 ppm ve 8,65 ppm) veya yan zincir olarak polimer üzerindeki alifatik proton piki de (1,35 ppm) gözlemlenmiştir. P(NIPAAm-co-AN) polimerlerindeki nitrilin tetrazine dönüşüm oranı %7,9 olduğu ve bu oranın doğası gereği sterik engele sahip polimerler için küçük moleküller (% 12-59) ile karşılaştırıldığında kabul edilebilir olduğu anlaşılmaktadır [5].

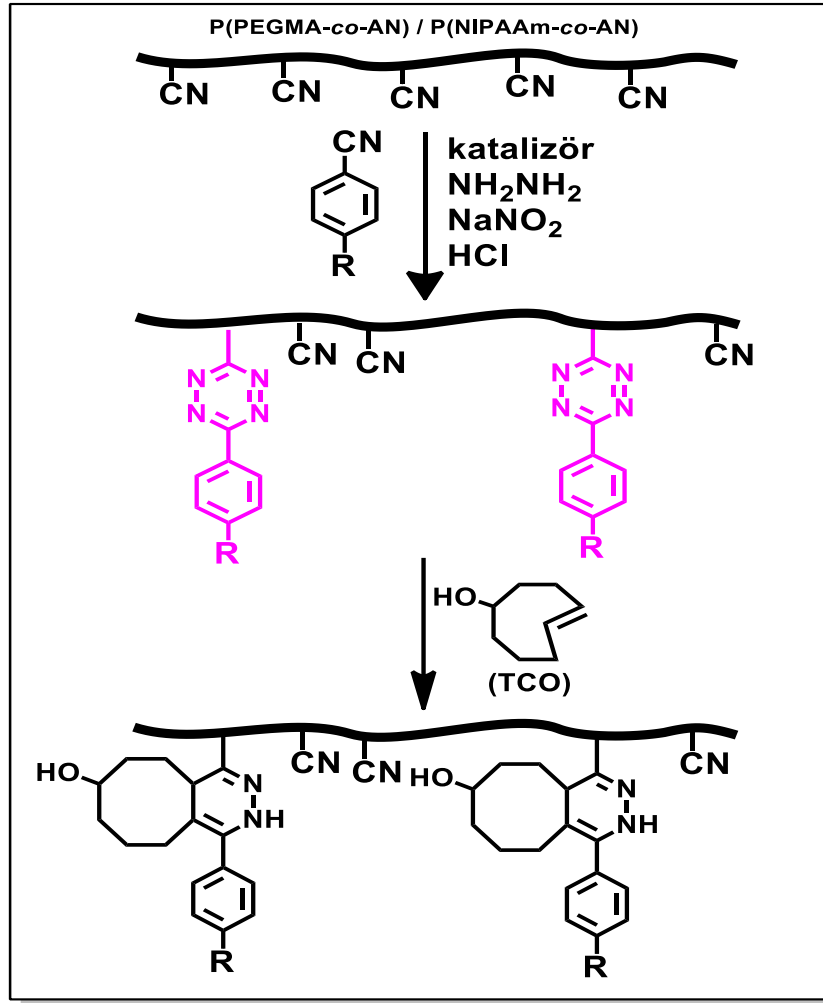
P(PEGMA-co-AN) öncül polimeri ise ATRP yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen bu polimer zincirleri üzerine benzer yaklaşım ile tetrazin fonksiyonları doğrudan sentezlenmiştir. PEG'in uç metil protonları ve akrilonitrilin ana iskeletinin protonuna göre, AN'nin bağlanma oranının 1:8,4 olduğunu belirlenmiştir. Elde edilen P(PEGMA-co-AN)'in molce %10,6'sının nitril yan gruplarını içermekte olduğu hesaplanmıştır. Tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN)'in ^1H -NMR spektrumuna göre tetrazin aromatik protonları (7,47 ppm ve 8,56 ppm) oluşmuş ve ayrıca tetrazinin *tert*-bütoksit'in metil protonları, amid protonu ve metilen protonları gözlemlenmiştir. Polimere katılmış tetrazin miktarı ^1H -NMR spektrumundan belirlenmiş ve nitril/tetrazin dönüşümü %17,9 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilmiş olan tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN) polimerleri iEDDA reaksiyonundaki etkileri UV-Vis ve ^1H -NMR spektroskopisi ile izlenmiştir. Bu reaksiyonda substrat olarak TCO ve NB türevleri kullanılmıştır. Tetrazine ve substrat arasında meydana gelen bu click reaksiyonlarında tetrazin halkasının kendine özgü pembe renginin reaksiyon gerçekleştiğinde belirgin bir şekilde ortadan kaybolmuştur. İEDDA reaksiyonlarının UV-Vis spektrumunda yaklaşık 540 nm'de gözlenen tetrazinin maksimum absorpsiyonunun TCO, TCO-NHS, NB ve PEG-NB'nun eklenmesiyle ortadan yok olması ile izlenebileceğini göstermiştir. Sentezlenen her iki tetrazin fonksiyonlu P(NIPAAm-co-AN) ve P(PEGMA-co-AN) polimerlerinin UV-Vis spektrum sonuçlarının birbirleriyle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

P(PEGMA-co-AN), tetrazin fonksiyonlu P(PEGMA-co-AN), tetrazin fonksiyonlu bu polimerin TCO ve TCO-NHS ile reaksiyon sonucu oluşan polimerlerin ^1H -NMR

spektrum sonuçlarına bakıldığında bu sonuçların da UV-Vis spektrumu sonuçları ile desteklenmiş olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak direkt olarak tek-kap yaklaşımına dayanan yeni geliştirilen bu yaklaşım, basit ve etkili bir şekilde tetrazin fonksiyonlu polimerlerin sentezine katkı sağlamıştır (Şekil 5.1). Bu yaklaşımda PMMA gibi hidrofobik polimerler yerine PEG ve NIPAAm esaslı suda çözünür polimerlerin tercih edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Bu tez kapsamında geliştirilen tetrazin fonksiyonlu polimerlerin sentezlenmesiyle çaba, zaman ve maliyet tasarrufu olacağı öngörülmektedir. Ayrıca tezde bu polimerlerin iEDDA reaksiyonundaki etkinlikleri ve hızları da başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Tetrazin iEDDA reaksiyonunun sağladığı yüksek hızlı ve seçicilik ile de yüksek etkinlikte hızlı bir modifikasyon sağlanabilecektir. Yine reaksiyonun özellikleri gereği bu polimerlerin potansiyel uygulamalarından biri olan hastalıkların yanı ve teşhisinde hızlı kinetikle öne çıkacağı düşünülmektedir. Tetrazin uygulamaları ile ilgili olarak, bu yaklaşım moleküller görüntüleme [9, 13, 30, 73, 74], hücreyi hücreye birleştirme [75], çeşitli polimer mimarilerinin üretilmesi [76, 77, 192], hidrojel sentezi [81], yüzey örüntüleme [82], mikroçip teknolojileri [83, 84] ve protein polimer konjugatlarında [85] kullanılabilecek faydalı bir araç olabilir.



Şekil 5.1 Nitril yan grubu taşıyan polimerler üzerinde direkt olarak sentezlenmiş tetrazin gruplarına sahip polimerin TCO ile arasındaki iEDDA reaksiyonu

-
- [1] M. A. Tasdelen, "Diels–Alder “click” reactions: recent applications in polymer and material science," *Polymer Chemistry*, vol 2, no. 10, pp. 2133-2145, 2011.
- [2] A. C. Knall and C. Slugovc, "Inverse electron demand Diels–Alder (iEDDA)-initiated conjugation: a (high) potential click chemistry scheme," *Chemical Society Reviews*, vol 42, no. 10, pp. 5131-5142, 2013.
- [3] A. K. Kristian Kempe, C. Remzi Becer and Ulrich S. Schubert, "“Clicking” on/with polymers: a rapidly expanding field for the straightforward preparation of novel macromolecular architectures," *Chemical Society Reviews*, vol 41, pp. 176-191, 2012.
- [4] H. Wu, and N. K. Devaraj, "Inverse Electron-Demand Diels–Alder Bioorthogonal Reactions," *Topics in Current Chemistry*, 374, p. 3, 2016.
- [5] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, and N. K. Devaraj, "Metal-catalyzed one-pot synthesis of tetrazines directly from aliphatic nitriles and hydrazine," (in English), *Angew Chem Int Ed Engl*, vol 51, no. 21, pp. 5222-5, May 21 2012.
- [6] H. Wu, J. Yang, J. Seckute, and N. K. Devaraj, "In situ synthesis of alkenyl tetrazines for highly fluorogenic bioorthogonal live-cell imaging probes," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol 53, no. 23, pp. 5805-9, Jun 2 2014.
- [7] P. Agarwal, B. J. Beahm, P. Shieh, and C. R. Bertozzi, "Systemic Fluorescence Imaging of Zebrafish Glycans with Bioorthogonal Chemistry," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol 54, no. 39, pp. 11504-11510, Sep 21 2015.
- [8] A. Wieczorek, T. Buckup and R. Wombacher*, "Rigid tetrazine fluorophore conjugates with fluorogenic properties in the inverse electron demand Diels–Alder reaction," *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, pp. 4177–4185, 2014.

- [9] N. K. Devaraj, R. Weissleder, and S. A. Hilderbrand, "Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging," *Bioconjug Chem*, vol 19, no. 12, pp. 2297-9, Dec 2008.
- [10] M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, "Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity," *J Am Chem Soc*, vol 130, no. 41, pp. 13518-9, Oct 15 2008.
- [11] H. Wu and N. K. Devaraj, "Advances in Tetrazine Bioorthogonal Chemistry Driven by the Synthesis of Novel Tetrazines and Dienophiles," (in English), *Acc Chem Res*, vol 51, no. 5, pp. 1249-1259, May 15 2018.
- [12] B. L. Oliveira, Z. Guo and G. J. L. Bernardes, "Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology," *Chem. Soc. Rev*, 46, pp. 4895-4950, 2017.
- [13] N. K. Devaraj and R. Weissleder, "Biomedical Applications of Tetrazine Cycloadditions," *Accounts of Chemical Research*, 44, no. 9, pp. 816-827, Sep 2011.
- [14] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, and J. A. Prescher, "Functionalized Cyclopropenes As Bioorthogonal Chemical Reporters," *Journal of the American Chemical Society*, 134, no. 45, pp. 18638-18643, Nov 14 2012.
- [15] U. R. a. N. W. Luedtke, "Alkene–Tetrazine Ligation for Imaging Cellular DNA," *Angewandte Chemie International Edition*, 53, pp. 9168 –9172, 2014.
- [16] R. S. Erdmann *et al.*, "Super-Resolution Imaging of the Golgi in Live Cells with a Bioorthogonal Ceramide Probe," *Angewandte Chemie-International Edition*, 53, no. 38, pp. 10242-10246, Sep 15 2014.
- [17] K. Lang and J. W. Chin, "Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins," *Chemical Reviews*, 114, no. 9, pp. 4764-4806, May 14 2014.
- [18] J. Li and P. R. Chen, "Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry," *Nature Chemical Biology*, 12, no. 3, pp. 129-137, Mar 2016.

- [19] C. P. Ramil *et al.*, "Spirohexene-Tetrazine Ligation Enables Bioorthogonal Labeling of Class B G Protein-Coupled Receptors in Live Cells," *Journal of the American Chemical Society*, 139, no. 38, pp. 13376-13386, Sep 27 2017.
- [20] D. R. B. Robert J. Blizzard, Wes Brown, Christopher G. Bazewicz, Yi Li, Ryan A. Meh, "Ideal Bioorthogonal Reactions Using A Site-Specifically Encoded Tetrazine Amino Acid," *Journal of the American Chemical Society*, 137, p. 10044–10047, 2015.
- [21] R. Selvaraj. and J. M. Fox, "trans-Cyclooctene — a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling," *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, pp. 753–760, 2013.
- [22] J. B. Haun, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee, and R. Weissleder, "Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection," *Nat Nanotechnol*, 5, no. 9, pp. 660-5, Sep 2010.
- [23] H. Z. Shuang Liu , Roddel A. Remy , Fei Deng , Michael E. Mackay , Joseph M. Fox , and Xinqiao Jia, "Meter-Long Multiblock Copolymer Microfi bers Via Interfacial Bioorthogonal Polymerization," *Advanced Materials*, 27, pp. 2783–2790, 2015.
- [24] Y. L. Fang Liu, and K. N. Houk, "Theoretical Elucidation of the Origins of Substituent and Strain Effects on the Rates of Diels–Alder Reactions of 1,2,4,5-Tetrazines," *Journal of the American Chemical Society*, 136, p. 11483–11493, 2014.
- [25] K. Wang *et al.*, "Post-synthesis DNA modifications using a trans-cyclooctene click handle," *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, no. 3, pp. 909-915, 2015.
- [26] Y. G. Xinyuan Fan, Feng Lin, Yi Yang, Gong Zhang, William Shu Ching Ngai, Zhi Lin, Siqi Zheng, Jie Wang, Jingyi Zhao, Jie Li, and Peng R. Chen, "Optimized Tetrazine Derivatives for Rapid Bioorthogonal Decagingin Living Cells," *Angewandte Chemie International Edition*, 55, pp. 14046 – 14050, 2016.

- [27] H. H. A. Nilesh M. Meghani, Beom-Jin Lee, "Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery," *Drug Discovery Today*, 22, 2017.
- [28] N. K. D. Hee-Sun Han, Jungmin Lee, Scott A. Hilderbrand, Ralph Weissleder, and Mounji G. Bawendi, "Development of a Bioorthogonal and Highly Efficient Conjugation Method for Quantum Dots using Tetrazine-Norbornene Cycloaddition," *Journal of the American Chemical Society*, 132, pp. 7838–7839, 2010.
- [29] J. Schoch, M. Wiessler, and A. Jaschke, "Post-Synthetic Modification of DNA by Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reaction," *Journal of the American Chemical Society*, 132, no. 26, pp. 8846, Jul 7 2010.
- [30] R. U. Neal K. Devaraj, Jered B. Haun, Scott A. Hilderbrand, and Ralph Weissleder, "Fast and Sensitive Pretargeted Labeling of Cancer Cells via Tetrazine/Trans-Cyclooctene Cycloaddition," *Angewandte Chemie International Edition in English*, 48, pp. 7013–7016, 2009.
- [31] I. A. Barker, D. J. Hall, C. F. Hansell, F. E. Du Prez, R. K. O'Reilly, and A. P. Dove, "Tetrazine-norbornene click reactions to functionalize degradable polymers derived from lactide," *Macromol Rapid Commun*, 32, no. 17, pp. 1362-6, Sep 1 2011.
- [32] S. T. K. Rajiv M. Desai, Scott A. Hilderbrand, David J. Mooney, Neel S. Joshi, "Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine-norbornene chemistry," *Biomaterials*, 50, pp. 30-37, 2015.
- [33] D. K. H. Jürgen Sauer, Josef Hetzenegger, Josef Krauthan, Heinz Sichert, and Johann Schuster, "1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions," *European Journal of Organic Chemistry*, pp. 2885-2896, 1997.
- [34] L. Z. Mengmeng Zheng, Peiyuan Zhang, Jinbo Li and Yan Zhang "Development of Bioorthogonal Reactions and Their Applications in Bioconjugation," *Molecules*, 20, pp. 3190-3205, 2015.

- [35] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew Chem Int Ed Engl*, 40, no. 11, pp. 2004-2021, Jun 1 2001.
- [36] R. R. P. Chauhan, "Click Chemistry: Mechanistic and Synthetic Perspectives," in *Click Reactions in Organic Synthesis*, S. Chandrasekaran, Ed., 2016, pp. 1-24.
- [37] C. R. Becer, R. Hoogenboom, and U. S. Schubert, "Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition," *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, no. 27, pp. 4900-4908, 2009.
- [38] M. Arslan and M. A. Tasdelen, "Polymer Nanocomposites via Click Chemistry Reactions," *Polymers*, 9, no. 10, p. 499, Oct 2017.
- [39] F. P. B. Manuel Gregoritz, "The Diels–Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, pp. 438-453, 2015.
- [40] J. F. Lutz, "Copper-Free Azide–Alkyne Cycloadditions: New Insights and Perspectives," *Angew.Chem.Int.Ed.*, 47, pp. 2182-2184, 2008.
- [41] L. G. G. Vsevolod V. Rostovtsev, Valery V. Fokin, and K. Barry Sharpless, "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(i)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes," *Angewandte Chemie-International Edition*, 41, pp. 2596-2599, 2002.
- [42] C. C. Christian W. Tornøe, and Morten Meldal, "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides," *J. Org. Chem*, 67, pp. 3057-3064, 2002.
- [43] E. M. S. John C. Jewett, and Carolyn R. Bertozzi, "Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones," *Journal of the American Chemical Society*, 132, pp. 3688-3690, 2010.
- [44] G. O. J. Daniel H. Ess, and K. N. Houk, "Transition States of Strain-Promoted Metal-Free Click Chemistry: 1,3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes," *Organic Letters*, 10, pp. 1633-1636, 2008.

- [45] X. H. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, and G. J. Boons, "Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 47, 12, pp. 2253-2255, 2008.
- [46] V. S. Khire, A. M. Kloxin, C. L. Couch, K. S. Anseth, and C. N. Bowman, "Synthesis, Characterization and Cleavage of Linear Polymers Attached to Silica Nanoparticles Formed Using Thiol-Acrylate Conjugate Addition Reactions," *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 46, no. 20, pp. 6896-6906, Oct 15 2008.
- [47] K. L. K. Luis M. Campos, Ryosuke Sakai, Jos M. J. Paulusse, Denis Damiron, Eric Drockenmuller, Benjamin W. Messmore, and Craig J. Hawker, "Development of Thermal and Photochemical Strategies for Thiol-Ene Click Polymer Functionalization," *Macromolecules*, 40, pp. 7063-7070, 2008.
- [48] T. Posner, "Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe," *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 38, pp. 646–657, 1905.
- [49] J. P. S. Neil B. Cramer, and Christopher N. Bowman, "Photopolymerizations of Thiol-Ene Polymers without Photoinitiators," *Macromolecules*, 35, pp. 5361-5365, 2002.
- [50] R. H. K. Dietliker, J.-L. Birbaum, S. Ilg, S. Villeneuve, K. Studer, T. Jung, J. Benkhoff, H. Kurab, A. Matsumoto, H. Okab, "Advancements in photoinitiators—Opening up new applications for radiation curing," *Progress in Organic Coatings*, 58, pp. 146-157, 2007.
- [51] O. Diels. a. K. Alder, "Synthesen in der hydroaromatischen Reihe," *Liebigs Annalen*, 460, pp. 98-122, 1928.
- [52] Z. M. P. P. Jianwei Xu, Huining Zeng Zeng, and Qun Ye, "Inverse Electron-Demand Diels-Alder Reactions: Principles and Applications," *Chemistry An Asian Journal*, 12, pp. 2142-2159, 2017.

- [53] R. M. H. L. Holmes, C. C. Lee, and P. Kawulka, "Isomerism in the Diels-Alder Reaction " *The Journal of the American Chemical Society*, 70, pp. 141–142, 1948.
- [54] M. Lautens, W. Klute, and W. Tam, "Transition metal-mediated cycloaddition reactions," *Chemical Reviews*, 96, no. 1, pp. 49-92, Jan-Feb 1996.
- [55] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, T. Montagnon, and G. Vassilikogiannakis, "The Diels-Alder reaction in total synthesis", *Angewandte Chemie-International Edition*, 41, no. 10, pp. 1668-1698, 2002.
- [56] R. B. Woodward. a. T. J. Kauz, "The Mechanism of The Diels-Alder Reaction" *Tetrahedron*, 5, pp. 70-89, 1959.
- [57] R. B. Woodward. a. R. Hoffmann, "The Conservation of Orbital Symmetry " *Angewandte Chemie International Edition*, 8, pp. 781- 932 1969.
- [58] J. Sauer and R. Sustmann, "Mechanistic Aspects of Diels-Alder Reactions - a Critical Survey," *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 19, no. 10, pp. 779-807, 1980.
- [59] K. N. Houk, Y. T. Lin, and F. K. Brown, "Evidence for the Concerted Mechanism of the Diels-Alder Reaction of Butadiene with Ethylene," *Journal of the American Chemical Society*, 108, no. 3, pp. 554-556, Feb 5 1986.
- [60] S. O. Michael J. S. Dewar, and James J. P. Stewartt, "Mechanism of the Diels-Alder Reaction: Reactions of Butadiene with Ethylene and Cyanoethylenes " *Journal of the American Chemical Society*, 108, pp. 5771-5779 1986.
- [61] M. H. Astrid-Caroline Knall, Christian Slugovc, "Kinetic studies of inverse electron demand Diels–Alder reactions (iEDDA) of norbornenes and 3,6-dipyridin-2-yl-1,2,4,5-tetrazine," *Tetrahedron Letters*, 55, pp. 4763-4766, 2014.

- [62] W. E. D. Bachmann, N. C., "The Diels-Alder Reaction of 1-Vinylnaphthalene with α , β - and α , β , γ , δ -Unsaturated Acids and Derivatives," *Journal of the American Chemical Society*, 71, pp. 3062-3072, 1949.
- [63] A. Meijer, S. Otto, and J. B. F. N. Engberts, "Effects of the hydrophobicity of the reactants on Diels-Alder reactions in water", *Journal of Organic Chemistry*, 63, no. 24, pp. 8989-8994, Nov 27 1998.
- [64] U. M. Ronald Breslow, and Darryl Rideout "Selective Diels-Alder Reactions In Aqueous Solutions And Suspensions," *Tetrahedron Letters*, 24, pp. 1901-1904, 1983.
- [65] W. Blokzijl, M. J. Blandamer, and J. B. F. N. Engberts, "Diels-Alder Reactions in Aqueous-Solutions - Enforced Hydrophobic Interactions between Diene and Dienophile", *Journal of the American Chemical Society*, 113, no. 11, pp. 4241-4246, May 22 1991.
- [66] J. M. P. Aline Dantas de Araffljo, Janina Cramer, Maja Köhn, Hendrik Schröder, Ron Wacker, Christof Niemeyer, Kirill Alexandrov, and Herbert Waldmann, "Diels–Alder Ligation and Surface Immobilization of Proteins," *Angewandte Chemie International Edition*, 45, pp. 296 –301, 2006.
- [67] B. J. Adzima, H. A. Aguirre, C. J. Kloxin, T. F. Scott, and C. N. Bowman, "Rheological and Chemical Analysis of Reverse Gelation in a Covalently Cross-Linked Diels-Alder Polymer Network", *Macromolecules*, 41, no. 23, pp. 9112-9117, Dec 9 2008.
- [68] R. C. Boutelle and B. H. Northrop, "Substituent Effects on the Reversibility of Furan-Maleimide Cycloadditions", *Journal of Organic Chemistry*, 76, no. 19, pp. 7994-8002, Oct 7 2011.
- [69] A. D. Kenneth Christopher Koehler, Christopher J. Kloxin, Christopher N. Bowman "Kinetic and Thermodynamic Measurements for the Facile Property Prediction of Diels–Alder-Conjugated Material Behavior," *American Institute of Chemical Engineers*, 58, pp. 3545–3552, 2012.
- [70] K. Kang, J. Park, and E. Kim, "Tetrazine ligation for chemical proteomics," *Proteome Sci*, 15, p. 15, 2017.

- [71] R. A. Carbon and R. V. Lindsey, "Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines " *Journal of the American Chemical Society*, 81, pp. 4342-4346, 1959.
- [72] M. Royzen, G. P. A. Yap, and J. M. Fox, "A photochemical synthesis of functionalized trans-cyclooctenes driven by metal complexation," (in English), *Journal of the American Chemical Society*, 130, no. 12, pp. 3760-+, Mar 26 2008.
- [73] A. T. Daniel S. Liu, Ramajeyam Selvaraj, Michael T. Taylor, Joseph M. Fox, and Alice Y. Tin, "Diels-Alder Cycloaddition for Fluorophore Targeting to Specific Proteins inside Living Cells," *J Am Chem Soc*, 2, pp. 782-795, 2012.
- [74] J. L. Seitchik *et al.*, "Genetically encoded tetrazine amino acid directs rapid site-specific in vivo bioorthogonal ligation with trans-cyclooctenes," (in English), *J Am Chem Soc*, 134, no. 6, pp. 2898-901, Feb 15 2012.
- [75] H. Koo, M. Choi, E. Kim, S. K. Hahn, R. Weissleder, and S. H. Yun, "Bioorthogonal Click Chemistry-Based Synthetic Cell Glue," *Small*, 11, no. 48, pp. 6458-66, Dec 22 2015.
- [76] C. F. Hansell *et al.*, "Additive-free clicking for polymer functionalization and coupling by tetrazine-norbornene chemistry," *J Am Chem Soc*, 133, no. 35, pp. 13828-31, Sep 7 2011.
- [77] A. L. Claire F. Hansell, Joseph P. Patterson and Rachel K. O'Reilly, "Exploiting the tetrazine–norbornene reaction for single polymer chain collapse," *Nanoscale*, 6, pp. 4102-4107, 2014.
- [78] J. E. F. J. Carthewa, J. S. Forsythea, and V. X. Truong, "Polyethylene Glycol-Gelatin Hydrogels with Tuneable Stiffness Prepared by Horseradish Peroxidase-Activated TetrazineNorbornene Ligation," *Journal of Materials Chemistry B*, 6, pp. 1394-1401, 2018.
- [79] S. J. Kevin Neumann, Jin Geng and Mark Bradley, "Nanoparticle “switch-on” by tetrazine triggering," *Royal Society of Chemistry*, 52, pp. 11223-11226, 2016.

- [80] E. H. Discekici, A. H. St Amant, S. N. Nguyen, I. H. Lee, C. J. Hawker, and J. Read de Alaniz, "Endo and Exo Diels-Alder Adducts: Temperature-Tunable Building Blocks for Selective Chemical Functionalization," *J Am Chem Soc*, 140, no. 15, pp. 5009-5013, Apr 18 2018.
- [81] M. A. A. Daniel L. Alge, Dillon F. Donohue, and Kristi S. Anseth, "Synthetically Tractable Click Hydrogels for Three-Dimensional Cell Culture Formed Using Tetrazine–Norbornene Chemistry," *Biomacromolecules*, 14, pp. 949-953, 2013.
- [82] A. M. Oliver Roling, Sebastian Lamping, Benjamin Vönhören, Stefan Rinnen, Heinrich F. Arlinghaus, Armido Studera and Bart Jan Ravoo, "Surface patterning with natural and synthetic polymers via an inverse electron demand Diels–Alder reaction employing microcontact chemistry," *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, pp. 7828-7835, 2014.
- [83] H. Y. Sun, G. Y. J. Chen, and S. Q. Yao, "Recent Advances in Microarray Technologies for Proteomics," *Chemistry & Biology*, 20, no. 5, pp. 685-699, May 23 2013.
- [84] C. Y. J. T. Chong-Jing Zhang, Jingyan Ge, Zhenkun Na, Grace Y. J. Chen, Mahesh Uttamchandani, Hongyan Sun, and Shao Q. Yao, "Preparation of Small-Molecule Microarrays by trans-Cyclooctene Tetrazine Ligation and Their Application in the High-Through put Screening of Protein–Protein Interaction Inhibitors of Bromodomains," *Angewandte Chemie International Edition*, 52, pp. 14060 –14064, 2013.
- [85] C. G. D. Maltish M. Lorenzo, Muhammet U. Kahveci, Samantha J. Paluck, and Heather D. Maynard, "Homodimeric Protein-Polymer Conjugates via the Tetrazinetrans-Cyclooctene Ligation," *Macromolecules*, 49, pp. 30–37, 2016.
- [86] O. D. Eszter Kozma, and Peter Kele, "Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactions," *ChemBioChem*, 18, pp. 486– 501, 2017.

- [87] D. K. H. Jürgen Sauer, Josef Hetzenegger, Josef Krauthan, Heinz Sichert, and Johann Schuster, "1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions," *European Journal of Organic Chemistry*, 12, pp. 2885-2896, 1998.
- [88] A. Pinner, "Ueber die Einwirkung von Hydrasin auf ImidoBther," *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 26, pp. 2126–2135, 1893.
- [89] R. W. Mark R. Karver, and Scott A. Hilderbrand, "Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation," *Bioconjugate Chemistry*, 22, p. 2263–2270, 2011.
- [90] M. A. K. N.O.Abdel, M.N.Tolba, "A direct synthesis of dihydrotetrazines," *Tetrahedron Letters*, 9, no. 35, pp. 3871-3872, 1968.
- [91] S. S. Pierre Audebert, Fabien Miomandre, Gilles Clavier, Marie Claude Vernières, Merzaka Saoud and Philippe Hapiot, "Synthesis of new substituted tetrazines: electrochemical and spectroscopic properties," *New Journal of Chemistry*, 28, pp. 387–392, 2004.
- [92] D. F. D. Daniel L. Alge, Kristi S. Anseth, "Facile and efficient Lewis acid catalyzed synthesis of an asymmetric tetrazine useful for bio-orthogonal click chemistry applications," *Tetrahedron Letters*, 54, pp. 5639-5641, 2013.
- [93] W. C. Danzhu Wang , Yueqin Zheng , Chaofeng Dai , Lifang Wang and Binghe Wang, " A general and efficient entry to asymmetric tetrazines for click chemistry applications " *Heterocyclic Communications*, 19, no. 3, pp. 171–177, 2013.
- [94] A. L. R. E. Sagot, C. Soulivet, E. Pasquinet, D. Poullain, E. Girard and P. Palmas, "Synthesis of linear and hyperbranched tetrazine-based polyhetarylene assemblies with high nitrogen content," *Tetrahedron*, 63, pp. 11189–11194, 2007.
- [95] D. Wang *et al.*, "3,6-Substituted-1,2,4,5-tetrazines: tuning reaction rates for staged labeling applications," *Org Biomol Chem*, 12, no. 23, pp. 3950-5, Jun 21 2014.

- [96] S. G. Tolshchina, G.L. Rusinov and V. N. Charushin, "1,2,4,5-Tetrazines and Azolo[1,2,4,5]Tetrazines: Synthesis and Reactions With Nucleophiles," *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 49, pp. 66-91, 2013.
- [97] T. Peng. and H. C. Hang, "Site-specific bioorthogonal labeling for fluorescence imaging of intracellular proteins in living cells," *J Am Chem Soc*, 138, pp. 87-92, 2016.
- [98] K. Wang *et al.*, "Optimized orthogonal translation of unnatural amino acids enables spontaneous protein double-labelling and FRET," *Nat Chem*, 6, no. 5, pp. 393-403, May 2014.
- [99] C. Uttamapinant *et al.*, "Genetic code expansion enables live-cell and super-resolution imaging of site-specifically labeled cellular proteins," *J Am Chem Soc*, 137, no. 14, pp. 4602-5, Apr 15 2015.
- [100] D. W. Zhengqiu Li, Lin Li, Sijun Pan, Zhenkun Na, Chelsea Y J Tan, and Shao Q. Yao, "'Minimalist' Cyclopropene-Containing Photo-Cross-Linkers Suitable for Live-Cell Imaging and Affinity-Based Protein Labeling," *Journal of the American Chemical Society*, 136, 2014.
- [101] F. M. T. Thomas S. Elliott, Ambra Bianco, Russell J. Ernst, Amit Sachdeva, Simon J. Elsässer, Lloyd Davis, Kathrin Lang, Rudolf Pisa, Sebastian. Greiss, Kathryn S. Lilley, and Jason W. Chin, "Proteome labelling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal," *Nature Biotechnology*, 32, no. 465-472, 2014.
- [102] J. Seckute, J. Yang and N.K. Devaraj "Rapid oligonucleotide-templated fluorogenic tetrazine ligations," *Nucleic Acids Research*, 41, pp. 1-9, 2013.
- [103] M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, "Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity," *Journal of the American Chemical Society*, 130, no. 41, pp. 13518, Oct 2008.
- [104] N. K. Devaraj, R. Weissleder, and S. A. Hilderbrand, "Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging," *Bioconjugate Chemistry*, 19, no. 12, pp. 2297-2299, Dec 2008.

- [105] N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, and R. Weissleder, "Fluorogenic tetrazine cycloadditions for cellular imaging and detection," *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 240, Aug 2010.
- [106] A. A. Neves *et al.*, "Imaging Cell Surface Glycosylation in Vivo Using "Double Click" Chemistry," *Bioconjugate Chemistry*, 24, no. 6, pp. 934-941, Jun 2013.
- [107] B. V. Rao, S. Dhokale, P. R. Rajamohanan, and S. Hotha, "A tetrazine templated method for the synthesis of ternary conjugates," *Chemical Communications*, 49, no. 92, pp. 10808-10810, 2013.
- [108] C. J. Zhang *et al.*, "Preparation of Small-Molecule Microarrays by trans-Cyclooctene Tetrazine Ligation and Their Application in the High-Throughput Screening of Protein-Protein Interaction Inhibitors of Bromodomains," *Angewandte Chemie-International Edition*, 52, no. 52, pp. 14060-14064, Dec 2013.
- [109] T. S. Elliott *et al.*, "Proteome labeling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal," *Nature Biotechnology*, 32, no. 5, pp. 465-U186, May 2014.
- [110] L. G. Meimetis, J. C. T. Carlson, R. J. Giedt, R. H. Kohler, and R. Weissleder, "Ultrafluorogenic coumarin-tetrazine probes for real-time biological imaging," *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 2014.
- [111] A. K. Spate, H. Basskamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, and V. Wittmann, "Rapid Labeling of Metabolically Engineered Cell-Surface Glycoconjugates with a Carbamate-Linked Cyclopropene Reporter," *Bioconjugate Chemistry*, 25, no. 1, pp. 147-154, Jan 2014.
- [112] E. Jiménez-Moreno *et al.*, "Vinyl ether/tetrazine pair for the traceless release of alcohols in cells," *Angew Chem Int Ed Engl*, 56, 2017.
- [113] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, and R. Wombacher, "Green- to far-red-emitting fluorogenic tetrazine probes – synthetic access and no-wash protein imaging inside living cells," *Chem Sci*, 8, 2017.

- [114] J. Kalia and R. T. Raines, "Advances in Bioconjugation," *Current organic chemistry*, 14, pp. 138-147, 2010.
- [115] L. A. N. David M. Patterson, and Jennifer A. Prescher, "Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry," *American Chemical Society*, 9, pp. 592-605, 2014.
- [116] Q. L. Carlo P. Ramil, "Bioorthogonal chemistry: strategies and recent development," *Chem Commun (Camb)*., 49, pp. 11007-11022, 2013.
- [117] W. H. Li-Huai Qin, Ya-Qiu Long, "Bioorthogonal chemistry: Optimization and application updates during 2013–2017," *Tetrahedron Letters*, 59, pp. 2214-2228, 2018.
- [118] O. S. Walker, S. J. Elsasser, M. Mahesh, M. Bachman, S. Balasubramanian, and J. W. Chin, "Photoactivation of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 2 Reveals Rapid Cancer-Associated Metabolic and Epigenetic Changes," *J Am Chem Soc*, 138, no. 3, pp. 718-21, Jan 27 2016.
- [119] T. P. Ivana Nikic, Oliver Schraidt, Jędrzej Szymanski, John A. G. Briggs, Carsten Schultz, and Edward A. Lemke, "Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and SuperResolution Microscopy," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, pp. 2245 –2249, 2014.
- [120] T. H. Wright *et al.*, "Posttranslational mutagenesis: A chemical strategy for exploring protein side-chain diversity," *Science*, 354, no. 6312, Nov 4 2016.
- [121] P. S. a. C. R. Bertozzi, "Design Strategies for Bioorthogonal Smart Probes," *Org. Biomol. Chem.*, 12, pp. 9307-9320, 2014.
- [122] J. C. M. v. H. a. F. P. J. T. R. Marjoke F. Debets, "Bioorthogonal labelling of biomolecules: new functional handles and ligation methods," *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11, pp. 6439-6455, 2013.
- [123] D. Braun, "Origins and Development of Initiation of Free Radical Polymerization Processes %J International Journal of Polymer Science," *International Journal of Polymer Science*, 2009, pp. 1-10, 2009.

- [124] G. a. D. H. S. Moad, *The Chemistry of Radical Polymerization (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier Science Ltd, 2005.
- [125] P. Nesvadba, "Radical Polymerization in Industry," *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, pp. 1-36, 2012.
- [126] K. Matyjaszewski and J. Spanswick, "Controlled/living radical polymerization," *Materials Today*, 8, no. 3, pp. 26-33, Mar 2005.
- [127] B. B. Noble and M. L. Coote, "First principles modelling of free-radical polymerisation kinetics," *International Reviews in Physical Chemistry*, 32, no. 3, pp. 467-513, 2013.
- [128] C. B. K. P. V. T. P. Davis, "The Kinetics of Free-Radical Polymerization," in *Handbook of Radical Polymerization*, K. M. T. P. Davis, Ed.: John Wiley & Sons, Inc., pp. 187-261, 2003.
- [129] J. P. A. Heuts, "Theory of Radical Reactions," in *Handbook of Radical Polymerization*, K. M. T. P. Davis, Ed.: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-76, 2003.
- [130] B. Y. a. P. B. Zetterlund, "General Chemistry of Radical Polymerization," in *Handbook of Radical Polymerization*, K. M. T. P. Davis, Ed.: John Wiley & Sons, Inc, pp. 117-186, 2003.
- [131] P. V. C. B. K. T. P. D. K. Matyjaszewski, "Radical Polymerization," in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 15, H. F. Mark, Ed. 4 ed.: John Wiley & Sons, Inc, 2014.
- [132] T. Çelik, "4-Metoksifenasil Metakrilat'ın Serbest Radikal Polimerizasyonu, Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) ve Termal Davranışı", Yüksek Lisans, Kimya, Fırat, 2011.
- [133] G. Odian, *Principles of Polymerization*, 4 ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2004.
- [134] K. Matyjaszewski, et all "Gradient copolymers by atom transfer radical copolymerization," *Journal of Physical Organic Chemistry* 13, no. 12, pp. 775–786, 2000.

- [135] K. M. Kelly A. Davis, "Statistical, Gradient, Block, and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations," *Advances in Polymer Science*, 159, p. 2, 2002.
- [136] T. P. Veerle Coessens, Krzysztof Matyjaszewski, "Functional polymers by atom transfer radical polymerization," *Progress in Polymer Science*, 26, no. 3, pp. 337-377, 2001.
- [137] K. Matyjaszewski, "The synthesis of functional star copolymers as an illustration of the importance of controlling polymer structures in the design of new materials," *Polymer International*, 52, no. 10, pp. 1559–1565, 2003.
- [138] K. M. Hosei Shinoda, "Improving the Structural Control of Graft Copolymers. Copolymerization of Poly(dimethylsiloxane) Macromonomer with Methyl Methacrylate Using RAFT Polymerization," *Macromolecular Rapid Communications*, 22, pp. 1176–1181, 2001.
- [139] K. M. Hosei Shinoda, Lidia Okrasa, Michal Mierzwa, and Tadeusz Pakula, "Structural Control of Poly(methyl methacrylate)-g-poly(dimethylsiloxane) Copolymers Using Controlled Radical Polymerization: Effect of the Molecular Structure on Morphology and Mechanical Properties," *Macromolecules*, 36, no. 13, pp. 4772-4778, 2003.
- [140] B. Zhao and W. J. Brittain, "Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules," *Progress in Polymer Science*, 25, pp. 677–710, 2000.
- [141] J. Pyun, T. Kowalewski and Krzysztof Matyjaszewski, "Synthesis of Polymer Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization," *Macromolecular Rapid Communications*, 24, pp. 1043–1059, 2003.
- [142] M. Szwarc, "Living Polymers," *Nature*, 176, pp. 1168-1169, 1956.
- [143] L. M. Szwarc M, Milkovich R., "Polymerization Initiated By Electron Transfer To Monomer. A New Method Of Formation Of Block Polymers'," *Journal of the American Chemical Society*, 78, pp. 1656-7, 1956.

- [144] W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, "Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives," *Progress in Polymer Science*, 32, no. 1, pp. 93-146, Jan 2007.
- [145] M. Szwarc and J. W. Taylor, "Determination of Some Carbon-Chlorine Bond Dissociation Energies," *The Journal of Chemical Physics*, 22, pp. 270-274, 1954.
- [146] M. Szwarc, "Reactions of Methyl Radicals and Their Applications to Polymer Chemistry," *J Polym Sci A Polym Chem.*, 16, pp. 367-382, 1955.
- [147] Buckley R. P., F. Lravitt and M. Szwarc , "Reactions of Methyl Radicals with Substrates Acting as Hydrogen Donors and as Methyl Radical Acceptors," *Journal of the American Chemical Society*, 78, pp. 5557-5560, 1956.
- [148] R. P. Buckley and M. Szwarc, "Methyl Affinities of Ethylene, Tetrafluoroethylene and Tetrachloroethylen," *Journal of the American Chemical Society* vol. 78, pp. 5690-5697, 1956.
- [149] M. S. Kharasch, B.M. Kuderna and W. Urry "Reactions of Atoms and Free Radicals In Solution. Xv. The Preparation of The Additions of Bromodichloromethane and Dibromodichloromethane to Olefins. The Preparation Of 2-Al.Kenals," *The Journal of Organic Chemistry*, 13, no. 6, pp. 895-902, 1948.
- [150] D. P. Curran, "The design and application of free radical chain reactions in organic synthesis. Part 2," *Synthesis*, 7, pp. 489-513, 1988.
- [151] H. Fischer, "The persistent radical effect: a principle for selective radical reactions and living radical polymerizations," *Chem Rev*, 101, no. 12, pp. 3581-610, Dec 2001.
- [152] K. Matyjaszewski and C.H. Lin, "Exchange Reactions in the Living Cationic Polymerization of Alkenes," *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, 47, pp. 221-237, 1991.
- [153] G. Litvinenko and A. H. E. Müller, "General Kinetic Analysis and Comparison of Molecular Weight Distributions for Various Mechanisms of

- Activity Exchange in Living Polymerizations," *Macromolecules*, 30, pp. 1253-1266, 1997.
- [154] T. Otsu, "Iniferter Concept and Living Radical Polymerization," *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 38, pp. 2121-2136, 2000.
- [155] B. Boutevin, "From Telomerization to Living Radical Polymerization," *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 38, pp. 3235-3243, 2000.
- [156] C. H. Bamford, "Reactivities in Free-radical Polymerization," in *Comprehensive Polymer Science and Supplements*, G. Allen, and Bevington, J. C., Ed.: Elsevier, 1992.
- [157] O. W. Webster, "Living polymerization methods," *Science*, 251, no. 4996, pp. 887-93, Feb 22 1991.
- [158] J. M. J. Freche, "Functional polymers: from plastic electronics to polymer-assisted therapeutics," *Progress in Polymer Science*, 30, pp. 844-857, 2005.
- [159] L. Leibler, "Nanostructured plastics: Joys of self-assembling," *Progress in Polymer Science*, 30, no. 8-9, pp. 898-914, Aug-Sep 2005.
- [160] T. M. A. Petr Munk, *Introduction to Macromolecular Science*. John Wiley & Sons Inc, 2002.
- [161] Y. G. Julien Nicolas, Catherine Lefay, Denis Bertin, Didier Gigmes, Bernadette Charleux, "Nitroxide-mediated polymerization," *Progress in Polymer Science*, 38, pp. 63-235, 2013.
- [162] M. T. Yuanyuan Jing, Lin Wang, Constantin Gabriel Daniliuc, Armido Studer, "Synthesis of a bulky nitroxide and its application in the nitroxide-mediated radical polymerization," *Tetrahedron*, vol. 72, pp. 7665-7671, 2016.
- [163] C. J. Hawker, "Molecular Weight Control by a "Living" Free-Radical Polymerization Process," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 116, pp. 11185-11186 1994.
- [164] A. Studer, "The Persistent Radical Effect in Organic Synthesis," *Chemistry – A European Journal* vol. 7, pp. 1159-1164, 2005.

- [165] T. S. ARMIDO STUDER, "Nitroxide-Mediated Radical Processes," *The Chemical Record*, vol. 5, pp. 27–35, 2005.
- [166] D. G. Denis Bertin, Sylvain R. A. Marque and Paul Tordo, "Kinetic subtleties of nitroxide mediated polymerization," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, pp. 2189–2198, 2011.
- [167] X. Y. Tian, J. J. Ding, B. Zhang, F. Qiu, X. D. Zhuang, and Y. Chen, "Recent Advances in RAFT Polymerization: Novel Initiation Mechanisms and Optoelectronic Applications," *Polymers*, vol. 10, no. 3, p. 318, Mar 2018.
- [168] J. Chiefari *et al.*, "Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process," *Macromolecules*, vol. 31, no. 16, pp. 5559-5562, Aug 11 1998.
- [169] H. Zhang, "Controlled/"living" radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers," *European Polymer Journal* vol. 49, pp. 579–600, 2013.
- [170] T. P. D. Philipp Vana, Christopher Barner-Kowollik, "Kinetic Analysis of Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerizations: Conditions for Inhibition, Retardation, and Optimum Living Polymerization," *Macromolecular Theory and Simulations*, vol. 11, 2002.
- [171] N. D. Rybel *et al.*, Marie-Françoise Reyniers, Christopher Barner-Kowollik, Dagmar R. D'hooge, Guy. B. Marin, "An Update on the Pivotal Role of Kinetic Modeling for the Mechanistic Understanding and Design of Bulk and Solution RAFT Polymerization," *Macromolecular Theory and Simulations*, vol. 26, no. 1, 2017.
- [172] N. D. Rybel *et al.*, Marie-Françoise Reyniers, Dagmar R. D'hooge, Guy B. Marin, "How chain length dependencies interfere with the bulk RAFT polymerization rate and microstructural control," *Chemical Engineering Science*, vol. 177, pp. 163–179, 2018.
- [173] J.-S. Wang. a. K. Matyjaszewski, "Controlled/"Living" Radical Polymerization. Halogen Atom Transfer Radical Polymerization Promoted

- by a Cu(I)/Cu(II) Redox Process," *Macromolecules*, vol. 28, pp. 7901-7910, 1995.
- [174] J.-S. Wang. and K. Matyjaszewski, "Controlled/Living" Radical Polymerization Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes," *Journal of American Chemical Society* vol. 117, pp. 5614-5615 1995.
- [175] M. Kato et al., "Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine) ruthenium (II) / Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization1" *Macromolecules*, vol. 28, pp. 1721-1723, 1996.
- [176] K. Matyjaszewski and J. Xia, "Atom Transfer Radical Polymerization," *Chemical Reviews*, vol. 101, pp. 2921-2990, 2001.
- [177] J. Queffelec, et al., "Optimization of Atom Transfer Radical Polymerization Using Cu(I)/Tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine as a Catalyst," *Macromolecules*, vol. 33, pp. 8629-8639, 2000.
- [178] K. Matyjaszewski, et al. "Observation and Analysis of a Slow Termination Process in the Atom Transfer Radical Polymerization of Styrene," *Tetrahedron*, vol. 45, pp. 15321-15329, 1997.
- [179] B. B. Virgil Percec, Andreas Neumann, Joan C. Ronda, and Mingyang Zhao, "Metal-Catalyzed "Living" Radical Polymerization of Styrene Initiated with Arenesulfonyl Chlorides. From Heterogeneous to Homogeneous Catalysis," *Macromolecules*, vol. 29, pp. 3665-3668, 1996.
- [180] H. Uegaki, et al., "Nickel-Mediated Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate," *Macromolecules*, vol. 30, pp. 2249-2253, 1997.
- [181] N. V. Tsarevsky and K. Matyjaszewski, "'Green" Atom Transfer Radical Polymerization: From Process Design to Preparation of Well-Defined Environmentally Friendly Polymeric Materials," *Chemical Reviews*, vol. 107, p. 2270–2299, 2007.

- [182] W. A. B. Nicolay V. Tsarevsky, Alberto Vacca, Peter Gans, Krzysztof Matyjaszewski, "Competitive Equilibria in Atom Transfer Radical Polymerization," *Macromolecular Symposia*, vol. 248, pp. 60-70, 2007.
- [183] J. K. Oh, et al., "AGET ATRP in Water and Inverse Miniemulsion: A Facile Route for Preparation of High-Molecular-Weight Biocompatible Brush-Like Polymers," *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 47, pp. 1771–1781, 2009.
- [184] Z. Zhou, N. Devoogdt, M. R. Zalutsky, and G. Vaidyanathan, "An Efficient Method for Labeling Single Domain Antibody Fragments with ^{18}F Using Tetrazine-Trans-Cyclooctene Ligation and a Renal Brush Border Enzyme-Cleavable Linker," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, no. 12, pp. 4090-4103, 2018/12/19 2018.
- [185] M. K. Rahim, R. Kota, and J. B. Haun, "Enhancing Reactivity for Bioorthogonal Pretargeting by Unmasking Antibody-Conjugated trans-Cyclooctenes," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 352-360, 2015/02/18 2015.
- [186] M. F. n.-S. Jose Luis de la Fuente, Marta Fernández-García, Enrique López Madruga, "Solvent Effects on the Synthesis of Poly(methyl methacrylate) by Atom-Transfer Radical Polymerization (ATRP)," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 202, pp. 2565-2571, 2001.
- [187] Z. P. T. Karina L. Heredia, and Heather D. Maynard, "Aminoxy End-Functionalized Polymers Synthesized by ATRP for Chemoselective Conjugation to Proteins," *Macromolecules*, vol. 40, pp. 4772-4779, 2007.
- [188] N. F. F. N. Liana Hie, Tejas K. Shah, Emma L. Baker, Xin Hong, Yun-Fang Yang, Peng Liu, K. N. Houk & Neil K. Garg, "Conversion of amides to esters by the nickel-catalysed activation of amide C–N bonds," *NATURE*, vol. 524, pp. 79-83, 2015.
- [189] J. E. D. a. N. K. Garg, "Breaking Amides using Nickel Catalysis," *ACS Catalysis*, 3, no. 2, pp. 1413–1423, 2017.

- [190] M. G. K.D. Topp, "Synthesis and characterization of a 1,2,4,5-tetrazine-modified ion-exchange resin," *Reactive & Functional Polymers* 31, pp. 117-136 1996.
- [191] H. M. Jonathan C. T. Carlson, and Ralph Weissleder, "Unraveling Tetrazine-Triggered Bioorthogonal Elimination Enables Chemical Tools for Ultrafast Release and Universal Cleavage," *J. Am. Chem. Soc.*, 140, p. 3603–3612, 2018.
- [192] H. Y. Zhu, H. X. Wu, M. Wu, and Q. Y. Gong, "Tetrazine Bioorthogonal Reaction: A Novel Scheme for Polymer and Biomaterials," *Current Organic Chemistry*, 20, no. 17, pp. 1756-1767, 2016.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: sinemsipahioglu@gmail.com

Makaleler

1. S. S. Kara, M. Y. Ateş, G. Deveci, A. Cetinkaya, M. U. Kahveci, “Direct synthesis of tetrazine functionalities on polymer backbones”, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 2019, 57 (6), 673-680.

Konferans Bildirileri

1. S. Sipahioglu, M. Y. Ates, , A. Cetinkaya, & M. U. Kahveci, “In Situ Synthesis of Tetrazine Functional Polymers” (Poster). IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2016).İstanbul, 17-21 Temmuz 2016.

2. S. Sipahioğlu, M. Y. Ateş, G. Deveci, M. Ü. Kahveci; “Biyokonjugasyonda Kullanılabilecek Tetrazin Fonksiyonlu Polimerlerin Sentezi”, 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 01-03.12.2017, Eskişehir, TÜRKİYE, (2017).

Projeler

1. Biyo Aktif Polimerik Yapılara Dayalı Tedavi ve Tanı Platformlarının Kontrollü Polimerizasyon ve Biyoortogonal Yöntemleri ile Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1001, 214M175, 15.04.2015 -23.11.2017