

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

07.09.2022

Henna Rahkola

Tiivistelmä

Tämä tutkielma on kaksikielinen, jossa kirjallisuusosa on kirjoitettu suomeksi ja kokeellinen osa englanniksi. Kokeellinen osa kirjoitettiin englanniksi, koska ohjaaja on englannin kielinen. Kirjallisuusosassa perehdytään yleisesti injektoitaviin hydrogeeleihin ja niiden ärsykesensitiivisyyteen.

Kokeellisessa osassa tutkittiin aminohappopohjaisten transienttiorganogeelien molekyyliarakenteen vaikutusta materiaalin ominaisuuksiin. Tutkimuksessa tehtiin neljälle erilaiselle geelisysteemille **I-IV** kahdessa eri gelaattorin konsentraatiossa (1,0 eq ja 0,5 eq). Tutkimus liittyen geelisysteemiin **I** (1,0 eq) on aiemmin julkaistu tutkimusryhmän toimesta¹ ja toimi hypoteesinä tälle projektille. Tutkimustyö sisälsi geelin esiaste- ja gelaattorimolekyylien syntetisointia, geelin valmistusta ja NMR-, FTIR-, nano-FTIR-tutkimuksia sekä geeli kuitujen AFM-kuvantamista.

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella Nanoscience keskuksessa kevään ja kesän 2022 aikana. Tutkielman tiedonhaussa hyödynnettiin Google Scholaria ja Web of Sciencea.

Tutkielman kirjallisen osan ohjaajana toimi professori Maija Nissinen ja kokeellisen osan ohjaajana M.Sc. Romain Chevigny. Haluan kiittää heitä ohjauksesta ja neuvoista työn aikana. Haluan myös kiittää dos. Elina Sievästä toimimisesta toisena tutkielman tarkastajana.

Haluaisin kiittää kumppaniani, perhettäni sekä ystäviäni kaikesta tuesta, jota tämän tutkielman ja koko tutkinnon loppuun vieminen on vaatinut.

Sisällysluettelo / Table of contents

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Lyhenteet / Abbreviations	vi

Kirjallinen osa

1 Johdanto	1
2 Injektoitavat hydrogeelit	3
2.1 Injektoitavien hydrogeelien ominaisuudet.	4
2.1.1 Bioyhteensopivuus	4
2.1.2 Mekaaniset ominaisuudet	5
2.1.3 Geelilytyminen ja muut ominaisuudet	6
2.2 Fysikaalinen ja kemiallinen geelilytyminen.....	7
3 Ärsykesensitiivisyys injektoitavilla hydrogeeleillä.....	8
3.1 Lämpötilasensitiivisyys.....	9
3.2 pH-sensitiivisyys.....	14
3.3 Redox-sensitiivisyys.....	16
3.4 Muut ärsykkeet.....	18
3.5 Kaksoissensitiivisyys.....	20
3.5.1 pH- ja lämpötilasensitiivisyys	20
3.5.2. pH- ja redox-sensitiivisyys.....	23
4 Synteettiset polypeptidit.....	24
4.1 Synteettisten polypeptidien syntetisointimenetelmät.....	26
5 Polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit.....	27
5.1 Lämpötilasensitiiviset polypeptidit.....	29

5.1.1 PEG-polypeptidit.....	30
5.1.2. Polyfosfatseenit	32
5.1.3 Elastini ja elastiinin kaltaiset polypeptidit	35
5.2 pH-sensitiiviset polypeptidit.	36
5.3 Redox-sensitiiviset polypeptidit.....	38
5.4 Kaksoissensitiiviset polypeptidit.....	41
5.5 Entsymaattisesti silloitetut polypeptidit... ..	43
5.4 Valosensitiiviset polypeptidit.....	46
6 Injektoitavien hydrogeelien sovellukset.....	49
6.1 Polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien sovellukset.	50
6.1.1 Lääkeaineiden kuljetus.....	51
6.1.1.1 Syöpälääkkeiden kuljetus	52
6.1.1.2 Insuliinin kuljetus.....	54
6.1.2 Kudostekniikka.....	55
6.1.1 Antibakteerinen materiaali	56

Experimental part

7 Aim of the study.....	59
8 Materials and methods	60
8.1 Chemicals and equipment.	60
8.2 Syntheses of precursors and gelator molecules.....	62
8.2.1 Boc-Phe-Phe-OtBu 1, Boc-Leu-Phe-OtBu 2 and Boc-Phe-Phe-Phe-OtBu 3	62
8.2.2 Phe-Phe-OtBu 1a, Leu-Phe-OtBu 2a and Phe-Phe-Phe-OtBu 3a	63
8.3 Preparation of organogels.....	64
9 Results and discussion.....	66
9.1 Syntheses.....	66
9.2 NMR analysis.....	67

9.2.1 Gel systems I, II, and IV	67
9.2.2 Gel system III	71
9.3 FTIR analysis.	73
9.4 Nano-FTIR analysis.	76
9.5 AFM imaging.	78
9.6 Swelling studies, solubility assay, and lifespan of gel systems II-IV.	80
10 Yhteenveto / Conclusion	81
Kirjallisuusluettelo / References	83

Lyhenteet / Abbreviations

AFM	Atomivoima mikroskooppi / Atomic Force Microscope
AMP	Antibakteeriset peptidit / Antibacterial peptides
AMPEG	Aminometyyli-poly(etyleeniglykoli) / Aminomethyl-poly(ethylene glykol)
Arg (R)	Arginiini / Arginine
Boc	<i>N</i> -tert-butoksikarbonyyli / <i>N</i> -tert-butoxycarbonyl
CDCl ₃	Deuteroitu kloroformi / Deuterated chloroform
CEC	<i>N</i> -karboksietyylikitosaani / <i>N</i> -carboxy ethyl chitosan
CGC	Kriittinen geelitymispitoisuus / Critical gelation concentration
CIP	Siprofloksasiini / Ciprofloxacin
CRB	Klorambusiili / Chlorambucil
Cys (C)	Kysteiini / Cysteine
DCM	Dikloorimetaani / Dichloromethane
DMF	Dimetyyliformamidi / Dimethylformamide
DMSO	Dimetyylisulfoksidi / Dimethyl sulfoxide
DOX	Doksorubisiini / Doxorubicin
DTP	Ditiobis(propionohydratsidi) / Dithiobis(propionohydrazide)
DTT	Ditiotreitoli / Dithiothreitol
eq	Ekvivalentti / Equivalent
ELP	Elastiinin kaltaiset polypeptidit / Elastin like polypeptides
Fmoc	Fluorenyylimetoksikarbonyyli / Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia / Fourier transform infrared spectroscopy
Glu (E)	Glutamiinihappo / Glutamic acid
Gly (G)	Glysiini / Glycine
GSH	Glutationi / Glutathione

HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia / High-performance liquid chromatography
HRP	Piparjuuriperoksidaasi / Horseradish peroxidase
Ile (I)	Isoleusiini / Isoleucine
LCST	Alempi kriittinen liuoslämpötila / Low critical solution temperature
Leu (L)	Leusiini / Leucine
Lys (K)	Lysiini / Lysine
Met (M)	Metioniini /Methionine
Nano-FTIR	Nano Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia /Nano Fourier transform infrared spectroscopy
NCA	α -aminohappo <i>N</i> -karboksianhydridi / α -amino acid <i>N</i> -carboxyanhydride
NMR	Ydin-magneettinen resonanssi / Nuclear Magnetic Resonance
O	Ornitiini / Ornithine (aminohapposekvensissä / in amino acid sequence)
OAEU	Oligo(β -aminoesteriuretaani) / Oligo (β -amino ester urethane)
Oksi-CMC	Hapetettu karboksimeetyyliselluloosa / Oxidized carboxymethylcellulose
<i>Ot</i> Bu	<i>tert</i> -butyyliesteri / <i>tert</i> -butyl ester
OPE	Oligopeptidi / Oligopeptide
OSM	Sulfametatsiinioligomeeri / Sulfamethazine oligomers
PA	Polyalaniini / Polyalanine
PAEU	Polyaminoesteriuretaani / Poly (amino ester urethane)
PAF	Poly(alaniini-fenyyialaniini) / Poly(alanine-phenylalanine)
PBLG	Poly(bentsyyli- <i>L</i> -glutamaatti) / Poly(benzyl- <i>L</i> -glutamate)
PCL	Polykaprolaktaani / Polycaprolactone
PCys	Polykysteiini / Polycysteine
PEG	Poly(etyleeniglykoli) / Poly(ethylene glycol)
PELG	Poly(etyyliglutamaatti) / Poly(ethyl glutamate)
PEO	Poly(etylenioksidi) / Poly(ethylene oxide)
PGA	Polyglykolidi / Polyglycolide
Phe (F)	Fenyyialaniini / Phenylalanine

PLA	Polylaktidihappo / Polylactide acid
PLG	Polyglutamiinihappo / Poly(glutamic acid)
PLGA	Poly(laktidi-glykoli-happo) / Poly(lactic-glycolic acid)
PMet	Polymetioniini / Polymethionine
PNBC	Poly(nitrobentsyylikysteini) / Poly(nitro benzyl cysteine)
PNIPA	Poly(<i>N</i> -isopropyliakryyliamidi) / Poly(<i>N</i> -isopropyl acylamide)
PNLG	Poly[(2-(dibutyliamino)etyyli- <i>L</i> -glutamaatti)] / Poly[(2-(dibutylamino)ethyl- <i>L</i> -glutamate)
PPhe	Polyfenyylialaniini / Polyphenylalanine
PPLG	Poly(propargyyliglutamaatti) / Poly(propargyl glutamate)
PPO	Poly(propyleenioksidi) / Poly(propyl oxide)
Pro (P)	Prolini / Proline
ROP	Renkaan avaus polymerisaatio / Ring-opening polymerization
ROS	Reaktiiviset happilajit / Reactive oxygen species
R.T.	Huoneen lämpötila / Room temperature
s-SNOM	Sirontapyyhkäisy-lähikenttä optinen mikroskopia / Scattering scanning-near-field optical microscopy
TBTU	2-(1H-bentsotriatsoli-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliamiinitetrafluoriboraatti / 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl aminium tetrafluoroborate
Thr (T)	Treoniini / Threonine
UCST	Ylempi kriittinen liuoslämpötila / Upper critical solution temperature
Val (V)	Valiini / Valine

Kirjallinen osa

1 Johdanto

Geeli on vähintään kahdesta komponentista koostuva seos, joista toinen on kiinteässä ja toinen nestemäisessä olomuodossa tarkastelulämpötilassa. Geelin mekaaniset ominaisuudet vastaavat kiinteän aineen ominaisuuksia.² Hydrogeelit ovat veteen liukenemattomia polymeerimateriaaleja, jotka koostuvat polymeeriketjujen muodostamasta kolmiulotteisesta verkkorakenteesta. Verkkorakenne pystyy sitomaan huomattaman määrän vettä tai muuta biologista nestettä, kuten plasmaa tai seerumia painoonsa nähden. Hydrogeelien kyky sitoa vettä johtuu hydrofiilistä funktionaalisista ryhmistä, jotka ovat kiinni polymeerirungossa. Liukenemattomuus veteen puolestaan syntyy verkkorakenteen koossa pitävistä siltasidoksista, jotka myös antavat hydrogeeleille niiden kolmiulotteisen geometrisen verkkorakenteen.³⁻⁵

Siltasidosten muodostumisen mukaan hydrogeelit voidaan jakaa fysikaalisiin ja kemiallisiin hydrogeeleihin.^{3,4} Fysikaaliset hydrogeelit rakentuvat ei-kovalenttisilla vuorovaikutuksilla, joita ovat esimerkiksi vetysidokset, hydrofobiset ja ioniset vuorovaikutukset. Kemiallisissa hydrogeeleissä polymeeriketjut sitoutuvat toisiinsa kovalenttisilla sidoksilla.⁶ Hydrogeelejä voidaan valmistaa joko luonnossa esiintyvistä tai synteettisistä polymeereistä, minkä mukaan ne voidaan jakaa luonnollisiin ja synteettisiin hydrogeeleihin.^{3,7} Luonnollisia hydrogeelejä korvataan usein synteettisillä, koska ne ovat kestävämpiä ja pysyvämpiä ja niillä on parempi absorptiokyky. Lisäksi synteettisillä polymeereillä on hyvin homogeeninen rakenne ja niiden rakennetta voidaan muokata.³

Hydrogeeleillä on monia suotuisia ominaisuuksia, jotka tekevät niistä suosittuja biomateriaaleja. Ne ovat biologisesti yhteensopivia, koska ne jäljittelevät luonnollista soluväliainetta (extracellular matrix) niiden veden sitomiskyvyn ja pehmeän rakenteen vuoksi. Niillä on hyvä soluadheesio, luonnollinen hajoavuus sekä suhteellisen matala toksisuus, ja niiden aiheuttamat tulehdusreaktiot ovat minimaalisia.^{5,7}

Tässä kirjallisuusosassa käydään yleisesti läpi injektoitavien hydrogeelien toimintaa ja ärsykesensitiivisyyttä. Erityisesti perehdytään synteettisiin polypeptideihin ja polypeptidipohjaisiin injektoitaviin hydrogeeleihin johtuen niiden luonnollisesta bioyhteensopivuudesta ja hajoavuudesta sekä erittäin hyvästä ja laajasta muokattavuudesta.

Kirjallisuusosaa rajattiin ärsykesensitiivisiin fysikaalisiin hydrogeeleihin, jotka voivat muodostaa hydrogeelejä muun muassa ympäristön lämpötilan tai pH muutoksen seurauksena. Polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit muodostavat geelejä pääasiassa fysikaalisten silloitusmenetelmien kautta hyödyntäen heikkoja ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia. Tutkielmassa sivutaan kuitenkin myös kemiallisia hydrogeelejä, koska polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit pystyvät muodostamaan geelejä myös valo- ja entsyymiaktiivoinnin kautta. Sovelluskohteissa keskitytään polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien tavallisempiin sovelluksiin eli lääkeaineiden kuljetukseen, kudostekniikkaan ja antibakteerisiin materiaaleihin.

Kokeellisessa osassa tutkittiin aminohappopohjaisten transienttiorganogeelien molekyyliarakenteen vaikutusta geelimateriaalin ominaisuuksiin. Työn aikana syntetisoitiin geelin esiaste- ja gelaattorimolekyylejä sekä valmistettiin geelejä. Geeleille tehtiin NMR-, FTIR- sekä nano-FTIR-tutkimuksia ja geelin kuituja kuvannettiin atomivoimamikroskopian (AFM) avulla

2 Injektoitavat hydrogeelit

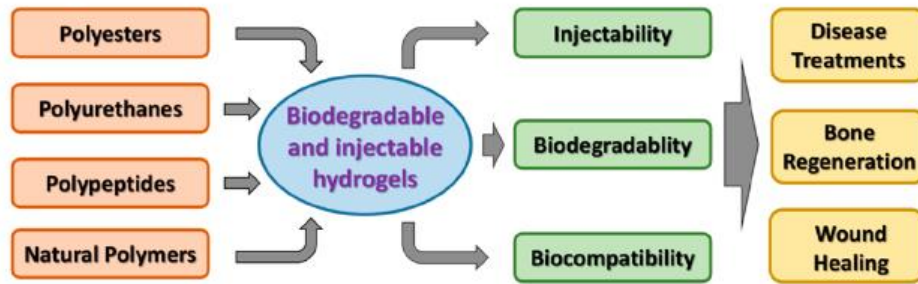
Injektoitavat hydrogeelit ovat *in situ* hydrogeelejä muodostavia polymeerimateriaaleja, jotka läpikäyvät sooli-geelisiirtymän kehossa vasteena ympäristön olosuhteisiin. Injektoitavilla hydrogeeleillä on kolmiulotteinen polymeeriverkkorakenne, joka kykenee polymeerirungossa olevien hydrofiilisten ryhmien avulla sitomaan huomattavan määrän vettä tai muuta biologisia nestettä, kuten seerumia tai plasmata.^{4,5,8} Polymeerirunkoon kiinnittyneitä hydrofiilisiä funktionaalisia ryhmiä voivat olla esimerkiksi hydroksyyli-, karboksyyli-, amiini- tai sulfaattiryhmät.⁵ Lyhyesti ilmaistuna injektoidavat hydrogeelit ovat hydrogeelejä, jotka kuljetaan nestemäisessä esiastemuodossa kohteeseen, jossa ne muodostavat geelirakenteen joko kemiallisesti tai fysikaalisesti.

Nestemäisessä virtaavassa muodossa oleva geelin esiastevesiliuos, jota voidaan siirtää kehoon joko injektion tai katetrin avulla. Siirron jälkeen esiastevesiliuos muuttuu ei-virtaavaksi, puolikiinteäksi geeliksi. Geelin esiastevesiliuos sisältää geelin esiasteet eli gelaattorit sekä mahdollisesti vesiliukoisia bioaktiivisia aineita, joita halutaan kuljettaa kehoon. Nämä bioaktiiviset aineet sekoitetaan geelin esiastevesiliuokseen gelaattoreiden kanssa ja geeliytymisen yhteydessä ne jäävät kiinni hydrogeelin polymeeriverkkoon. Tällaisia bioaktiivisia aineita voivat olla esimerkiksi lääkeaineet, kuten antibiootit, kemoterapeuttiset aineet tai insuliini, proteiinit tai solut. Onnistuneen geelin muodostuksen jälkeen hydrogeeli kykenee joko vapauttamaan tai sitomaan bioaktiivisia aineita ympäristössään. Geeliytyminen voi tapahtua fysikaalisen ärsyksen tai kemiallisen reaktion seurauksena.^{4,8-11}

Injektoitavuus tekee injektoidavista hydrogeeleistä tärkeitä materiaaleja erityisesti biolääketieteellisiin ja farmaseuttisiin sovelluksiin, koska niiden käyttäminen ei vaadi kirurgisia toimenpiteitä tai vaadittu toimenpide on hyvin minimaalinen.^{4,8,9} Niiden avulla voidaan myös ohittaa ensikierron metabolia, koska injektoidavat hydrogeelit hyödyntävät suoliston ulkopuolista reittiä kulkeutuessaan kehoon. Ensikierron metabolian kiertäminen on suuri etu varsinkin lääkeaineiden vaikutuksen kannalta, sillä ensikierrossa annettu lääkeaine kulkeutuu ensimmäisenä maksan verenkiertoon ennen kuin se päätyy isoon verenkiertoon. Lopputuloksena on lääkkeen vähentynyt pitoisuus ennen kuin se saavuttaa kohteensa.⁵

Injektoidavien hydrogeelien valmistuksessa käytetyt polymeerit voidaan jakaa alkuperänsä perusteella luonnonpolymeereihin ja synteettisiin polymeereihin, kuten hydrogeelien polymeerit muutenkin. Luonnonpolymeerejä, joita voidaan hyödyntää injektoidavien hydrogeelien valmistuksessa ovat muun muassa polysakkaridit (esimerkiksi kitosaani, hyaluronihappo, alginaatti ja hepariini) sekä proteiinit (esimerkiksi elastiini ja gelatiini).

Synteettisiä polymeerejä ovat esimerkiksi polyesterit, synteettiset polypeptidit sekä polyuretaanit.^{8,9} Kuva 1 on tiivistetty tärkeimmät injektoitavien hydrogeelien polymeerit, tärkeimmät huomioitavat ominaisuudet, tavallisimmat sovelluskohteet. Seuraavassa luvussa (2.1) on tarkemmin kerrottu injektoitavien hydrogeelien ominaisuuksista ja sovelluskohteista luvussa 6.1.



Kuva 1. Tärkeimmät injektoitavien hydrogeelien rakennepolymeerit, ominaisuudet ja sovellusalueet. Reprinted with permission from⁹. Copyright 2022 American Chemical Society.

2.1 Injektoitavien hydrogeelien ominaisuudet

Injektoitavan hydrogeelin on täytettävä erilaisia kliinisten sovellusten edellyttämiä vaatimuksia. Kliinisillä sovelluksilla tarkoitetaan käytännössä kaikkia lääketieteen, biolääketieteen ja farmaseutiikan sovelluksia, joissa injektoitavia hydrogeelejä voidaan hyödyntää, esimerkiksi lääkeaineiden kuljetus ja kudostekniikka. Siksi on tärkeää, että jo suunnitteluvaiheessa kiinnitetään huomiota muun muassa injektoitavien hydrogeelien bioyhteensopivuuteen sekä mekaanisiin ominaisuuksiin.

2.1.1 Bioyhteensopivuus

Injektoitavien hydrogeelien tulee olla valmistettu bioyhteensopivista materiaaleista ja materiaalien täytyy hajota bioyhteensopiviksi tuotteiksi.⁸ Tämä tarkoittaa, että hydrogeelien on oltava biologisesti yhteensopiva solujen, kudosten ja kehon nesteiden kanssa, toisin sanoen, niiden on oltava myrkyttömiä ja ei-karsinogeenisiä, eivätkä ne saa aiheuttaa haitallista tai

kroonista fysiologista vastetta hajoamisen jälkeen.^{4,5,10} Bioyhteensopivuuteen vaikuttaa pääasiassa polymeerirakenne.⁹

Biologisella hajoavuudella tai biohajoavuudella tarkoitetaan joko polymeerin asteittaista hajoamista tai sen hajoamista luonnollisiksi sivutuotteiksi. Tämä on erittäin tärkeää huomioida suunnittelu vaiheessa, koska hajoamistuotteet voivat kerääntyä elimistöön ja aiheuttaa haitallisia sivuvaikutuksia. Yleensä hiilihidraatit, peptidit ja nukleiinihapot hajoavat luonnollisesti myrkyttömiksi sivutuotteiksi.^{4,5,10} Biohajoavuuteen vaikuttaa vahvasti hydrolysoituvien ryhmien, kuten ester-, karbonaatti- ja peptidiryhmien, määrä polymeeriketjussa, koska ne helpottavat ja nopeuttavat polymeerin hajoamista.⁹ Biologinen yhteensopivuus on myös tärkeää huomioida mahdollisesti tarpeellisten lisäaineiden kohdalla, kuten silloitusaineissa *in situ* kemiallisen geeliytymisen yhteydessä.⁴ Jotkut injektoidut hydrogeelit laukaiset monenlaisia tulehduksellisia, immuunivälitteisiä, paikallisia ja systemaattisia haittavaikutuksia, jotka voivat ilmaantua ennemmin tai myöhemmin, mikä osoittaa bioyhteensopivuuden ja myrkyttömyyden merkityksen.⁵ Luonnolliset polymeerit ovat biologisesti yhteensopivampia kuin synteettiset polymeerit, koska niiden rakenneyksiköt ovat yhdenmukaisia soluväliaineen kanssa.^{5,10}

2.1.2 Mekaaniset ominaisuudet

Tietyt mekaaniset ominaisuudet, kuten esiaisteliuksen viskositeetti ja geelin huokoisuus, ovat tärkeitä parametrejä injektoitavien hydrogeelien toiminnan ja sovellusten kannalta. Lisäksi mekaanisen lujuuden, jäykkyyden ja stabiilisuuden tulisi olla riittävät kestäämään kehossa tapahtuvia muutoksia. Geelin tulisi kyetä säilyttämään muotonsa ja jäykkyytensä myös mekaanisen rasituksen jälkeen, joita esiintyy kehon mekaanisdynaamisessa ympäristössä. Tällaista rasitusta on esimerkiksi pehmytkudosten liikkeet. Riittävä stabiilisuus on tärkeää, jotta hydrogeeli pystyy pitämään bioaktiiviset aineet geelin sisällä. Näin vältetään liian voimakas ja nopea bioaktiivisten aineiden vapautuminen.^{5,8,10} Mekaanisia ominaisuuksia voidaan parantaa lisäämällä silloitusastetta eli kasvattamalla siltasidosten määrää sekä muuttamalla tai lisäämällä polymeerirungon vuorovaikutuksia.⁹ Niin sanotut kovat geelit sopivat paremmin esimerkiksi luunkorjaustoimenpiteisiin, kun taas pehmeät soveltuvat paremmin pehmytkudossovelluksiin. Hydrogeeliliuksen viskositeetin tulee olla riittävän alhainen ja sillä on oltava riittävä sitomiskyky mahdollisia kuljetettavia aineita kohtaan, jotta se olisi helposti injektoitavissa ja

bioaktiiviset aineet muodostaisivat mahdollisimman homogeenisen dispersion ennen geeliytymistä. Homogeeninen dispersio mahdollistaa lääkeaineen tai solujen paremman kapseloitumisen ja matala viskositeetti mahdollistaa injektoitavuuden ja minimaalisen kirurgisen toimenpiteen.^{5,8,10}

Viskositeetin lisäksi hydrogeelin mekaaniset ominaisuudet riippuvat huokoisuudesta, jolla tarkoitetaan siltasidosten väliin jäävää tilaa.¹⁰ Hyvä hydrogeelin verkkorakenne on järjestäytynyt ja huokoinen. Huokoskoon täytyy olla riittävä ja rakenne on hyvin yhteen liitetty, koska huokoinen rakenne helpottaa bioaktiivisten aineiden vapautumista hydrogeelistä diffuusion kautta sekä tukee erilaisten aineiden ja liuoksen parempaa liikkuvuutta verkkorakenteen läpi.^{5,8} Korkeampi silloitustiheys parantaa geelin mekaanista lujuutta, joka taas parantaa geelin eheyskestävyyttä. Toisaalta korkeampi silloitustiheys kuitenkin pienentää hydrogeelin huokoisuutta, mikä taas rajoittaa aineiden ja liuosten liikkuvuutta ja bioaktiivisten aineiden vapautumista.¹⁰ Verkkorakenteet voivat olla mikro- tai nanomittakaavassa hydrogeelin sovelluskohteesta riippuen.⁵

2.1.3 Geeliytyminen ja muut ominaisuudet

Injektoitavien hydrogeelien tapauksessa on erittäin tärkeää kontrolloida geeliytymisnopeutta. Geeliytymisen tulisi tapahtua kokonaisuudessaan tai päättyä vasta esiasteliuoksen injektion jälkeen, jolloin vältetään injektioneulan tukkeutuminen ja mahdollistetaan geeliaineksien pääsy syväkudoksiin. Lisäksi on tärkeää välttää aiheuttamasta ympäristöön toksisuutta tai ylikuumentumista voimakkaiden reaktioiden seurauksena. Sopivalla geeliytymisnopeudella mahdollistetaan solujen/lääkeaineiden tehokas kapseloituminen, jotta hydrogeeliin sidottua ainetta ei vapautuisi liian paljon ja liian nopeasti ympäristöön. Kuitenkin täytyy huomioida myös lääkeaineiden haluttu vapautumisnopeus ympäröiviin kudoksiin.^{4,8} Geeliytymisen aiheuttavien ärsykkeiden voimakkuus on ratkaisevassa roolissa hydrogeelin muodostumisessa. Geeliytymiskinetiikkaan vaikuttavat erilaiset geeliytymismekanismit ja sen tulisi olla sopiva kohdekudokselle tai -elimelle. Tämä täytyy erityisesti huomioida kudostekniikan ja regeneratiivisen lääketieteen sovelluksissa.⁵

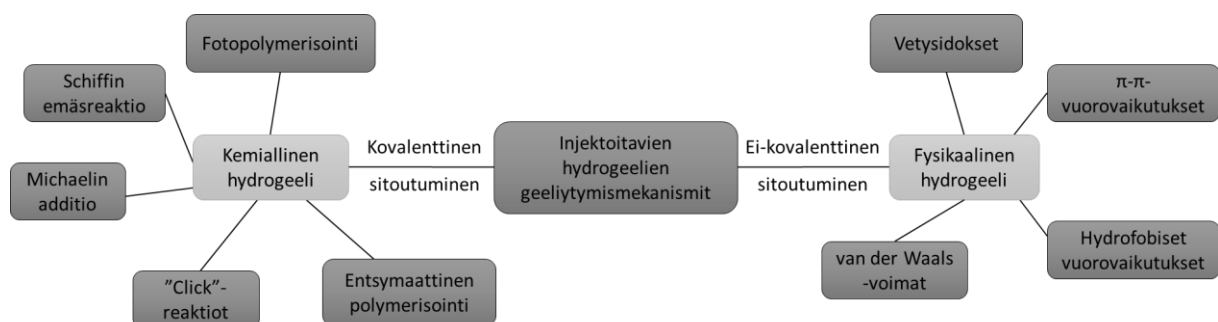
Muita erityisiä vaatimuksia voivat olla esimerkiksi verisuonittumiskyky eli vaskularisaatio (vascularization), joka on erityisen tärkeää kudostekniikan sovelluksissa. Muita huomioitavia seikkoja ovat polymeerien liuottamiseen käytetyt liuottimet, silloitusaineet,

geeliytymisinitiaattorien pitoisuus sekä polymeerin funktionaalisuus.⁵ Myös kudosten ja hydrogeelin välinen adheesio tulisi ottaa huomioon. Tähän voidaan vaikuttaa esimerkiksi erilaisten funktionaalisten ryhmien tai vetysidosten kautta.⁹

2.2 Fysikaalinen ja kemiallinen geeliytyminen

Injektoitavista hydrogeeleistä voidaan valmistaa geelejä *in situ* kemiallisten prosessien eli kemiallisten tai fysikaalisten silloitusmenetelmien kautta, joka injektoidavien hydrogeelin tapauksessa yleensä tarkoittaa geelin muodostumista ulkoisen ärsykkeen seurauksena. Siltasidosten muodostumisen myötä rakentuu hydrogeelin kolmiulotteinen verkkorakenne.^{4,12}

Kemialliset silloitusmenetelmät ovat kemiallisten reaktioiden ohjaamia geeliytymisprosesseja, joihin liittyy kovalenttisen sidoksen muodostuminen tai kemiallinen muutos geeliytymisen aikana.¹³ Kemiallisten hydrogeelien valmistuksessa hyödynnetään usein erilaisia kytkentäreaktioita (Kuva 2), joiden seurauksena geelin esiasteet yhdistyvät toisiinsa.^{5,14,15} Tällaisia reaktioita ovat muun muassa foto- ja entsymaattinen polymerointi, Michaelin additio, ”click”-reaktiot, Schiffin emäsreaktio, disulfididoksen muodostusreaktiot sekä reaktiot tioiden ja akrylaattien tai sulfonien välillä.^{5,13,14,16} Joidenkin kemiallisten hydrogeelien tapauksessa geelin esiastemolekyylit muodostavat geelin sekoittuessaan, jolloin niiden injektioaika riippuu siltasidosten muodostumisnopeudesta. Valo- tai entsyymipolymerisaatioiden tapauksessa kemiallinen reaktio tapahtuu vasta valo/entsyymiaktivoinnin tapahtuessa. Esimerkiksi valoaktivoitava esiastevesiliuos voidaan injektoida kehoon, mutta vasta valosäteilytyksen kohdistuessa injektiokohtaan geeli alkaa muodostua.¹⁵



Kuva 2. Kaaviokuva injektoidavien hydrogeelien geeliytymismekanismeista.

Toisin kuin kemialliset hydrogeelit, fysikaaliset hydrogeelit muodostuvat pääsääntöisesti polymeerien itsejärjestäytymisen (self-assembly) seurauksena ei-kovalenttisten vuorovaikutuksien kautta (Kuva 2). Tällaisia vuorovaikutuksia ovat esimerkiksi vetysidokset, van der Waals -voimat, hydrofobiset tai π - π -vuorovaikutukset. Injektoitavilla hydrogeeleillä itsejärjestäytymisen kautta tapahtuva geeliytyminen tapahtuu yleensä ympäristön ärsykkeen seurauksena, joita voivat olla esimerkiksi lämpötilan tai pH:n muutos ja entsyymaattinen aktivaatio. Ympäristön ärsykkeet alkavat vaikuttaa injektion aikana tai viimeistään sen jälkeen.^{13,14,16} Fysikaalisilla hydrogeeleillä geelinmuodostuminen on usein seurausta hydrofobisten vuorovaikutuksien lisääntymisestä polymeeriketjussa.⁹

Kemiallisten silloitusmenetelmien kautta muodostetut hydrogeelit kestävät paremmin mekaanista rasitusta ja ovat pitkäkestoisesti stabiilimpia kuin fysikaalisten silloitusmenetelmien kautta valmistetut hydrogeelit. Tämä johtuu pääasiassa niitä koossa pitävistä vuorovaikutuksista. Toisaalta fysikaalisten hydrogeelien valmistus ei vaadi orgaanisia liuottimia tai silloituskatalyyttejä eikä geelin muodostus johda lämmöntuotantoon tai lämmön vapautumiseen, millä voi olla vaikutusta esimerkiksi esiasteasteliuokseen lisättyihin lääkeaineisiin, soluihin tai kehon kudoksiin. Lisäksi fysikaaliset hydrogeelit ovat usein palautuvia eli ne pystyvät kokoamaan itsensä uudelleen ärsykkeen seurauksena, minkä vuoksi ne soveltuvat hyvin esimerkiksi lääkeaineiden kuljetukseen. Kemialliset hydrogeelit puolestaan ovat palautumattomia, mikä taas mahdollistaa niiden soveltamisen esimerkiksi istutettavien implanttien valmistukseen.¹¹ Fysikaaliset hydrogeelit voidaan yleensä helposti hajottaa kehon ympäristössä.^{5,14,16} Lisäksi fysikaalisilla hydrogeeleillä sooli-geeli-faasimuutokset tapahtuvat ilman merkittävää tilavuusmuutosta, kun taas kemiallisesti muodostetut hydrogeelit saattavat läpikäydä merkittäviä tilavuusmuutoksia geeliytymisen aikana. Toisin sanoen ne tarvitsevat enemmän tilaa ympärilleen.¹⁶

3 Ärsykesensitiivisyys injektoitavilla hydrogeeleillä

Joihinkin hydrogeelien ominaisuuksiin, kuten turpoamiskäyttäytymiseen, rakenteeseen, mekaaniseen lujuuteen tai läpäisevyyteen, voidaan vaikuttaa erilaisten (ympäristön) ärsykkeiden avulla. Tällöin voidaan puhua ”ärsykkeisiin reagoivista”, ”ärsykesensitiivisistä” tai ”älykkäistä” hydrogeelistä.⁵ Perinteiset hydrogeelit sitovat vettä muuttamatta turpoamistasapainoa (equilibrium swelling) ympäristön ärsykkeistä huolimatta.⁷ Ärsykeinä

voi toimia esimerkiksi lämpötilan, pH:n, ionipitoisuuden tai liuotinkoostumuksen muutos, sähkö- tai magneettikenttä, valo, biomolekyylit tai entsyymit.^{5,7,17}

Ärsykesensitiivisiä hydrogeelejä voidaan valmistaa käyttämällä ärsykkeisiin reagoivia polymeerejä, joita voidaan nimittää myös ”älykkäiksi” polymeereiksi tai modifioimalla ei-ärsykeherkkiä polymeerejä ärsykesensitiivisillä funktionaalisilla ryhmillä tai polymeereillä.⁵ Kyseiset polymeerit läpikäyvät kemiallisen rakenteen tai fysikaalisten ominaisuuksien muutoksen ympäristön muuttumisen seurauksena.^{5,17} Erityisen mielenkiintoisia ovat ärsykkeisiin reagoivat polypeptidipohjaiset polymeerit, jotka voivat reagoida muun muassa lämpötilan ja pH:n muutokseen tai ionipitoisuuteen. Lisäksi niitä voidaan helposti muokata lisäämällä niihin erilaisia funktionaalisia ryhmiä. Polypeptidipohjaisilla hydrogeeleillä ärsyke voi aiheuttaa esimerkiksi konformaatiomuutoksen eri sekundääristen rakenteiden välillä ja sooli-geelisiirtymän, joka voi olla seuraus konformaatiomuutoksista.^{10,17}

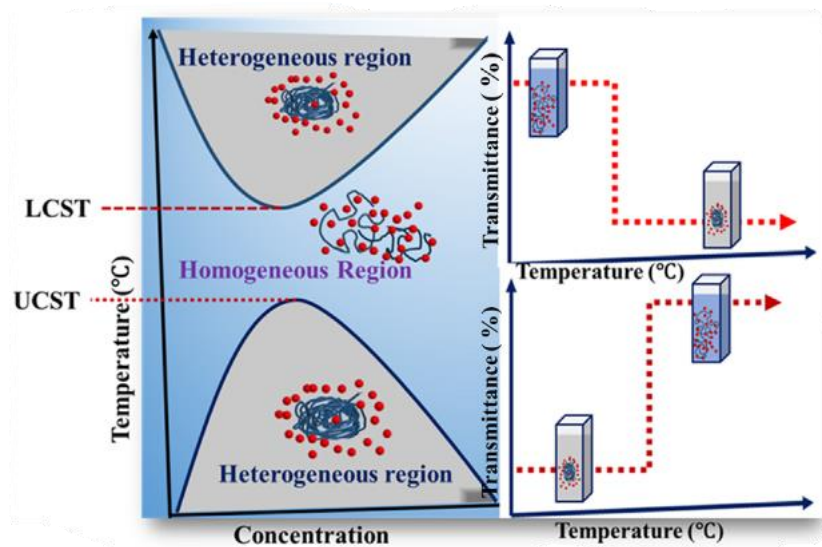
3.1 Lämpötilasensitiivisyys

Lämpötilaan reagoivien eli lämpötilasensitiivisten hydrogeelien verkkorakenteessa on usein hydrofiilisiä ja hydrofobisia ryhmiä, jotka voivat järjestäytyä vesiliuoksessa ei-kovalenttisten vuorovaikutusten avulla miselleiksi. Lämpötilan nouseminen saa misellit muodostamaan edelleen tiiviimpiä rakenteita, mikä johtaa geelin muodostumiseen.^{5,7} Lämpötilan muutoksesta johtuvaa geelitymistä säätelee hydrofobisten ja hydrofiilisten osien välinen tasapainotila. Lämpötilan muutos vaikuttaa hydrofobisten ja hydrofiilisten ryhmien välisiin vuorovaikutuksiin sekä niiden vuorovaikutuksiin vesimolekyylien kanssa. Näin pienikin lämpötilan muutos saattaa häiritä tasapainotilaa hydrofobisten ja hydrofiilisten ryhmien välillä, mikä saa aikaan sooli-geelisiirtymän ja hydrogeelin turpoamisen tai kutistumisen.^{7,17}

Lämpötilasensitiivisillä hydrogeeleillä on tietty lämpötila, jossa polymeeri alkaa itsejärjestäytyä ja sooli-geeli-siirtymä käynnistyy. Tätä lämpötilaa kutsutaan kriittiseksi geelitymlämpötilaksi. On olemassa kaksi erilaista kriittistä geelitymlämpötilaa: alhainen kriittinen liuoslämpötila (low critical solution temperature, LCST) ja ylempi kriittinen liuoslämpötila (upper critical solution temperature, UCST).⁵⁻⁷ Suurin osa lämpötilasensitiivisistä polymeereistä on LCST-polymeerejä.

UCST-hydrogeelit koostuvat pääasiassa hydrofiilisistä komponenteista. Lämpötilan noustessa niiden kyky turvota vesiliuoksessa kasvaa. Kriittisen lämpötilan alapuolella niiden

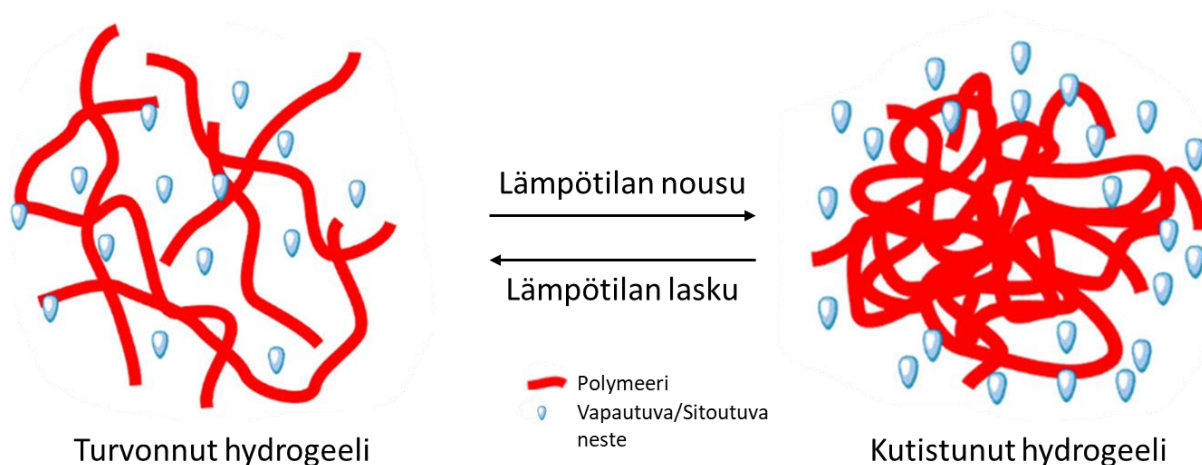
polymeeriverkko vapauttaa rakenteeseen sitoutunutta vettä ja kutistuu, jolloin kriittisen lämpötilan alapuolella niiden tila on geelimäinen. Vastaavasti alemman kriittisen liuoslämpötilan hydrogeelit (LCST) koostuvat sekä hydrofiilisistä että hydrofobisista osista. Tämän tyyppisillä hydrogeeleillä lämpötilan laskiessa kriittisen lämpötilan alapuolelle geeli muuttuu nesteeksi eli LCST-hydrogeelit toimivat päinvastoin kuin UCST-hydrogeelit.⁷ Kuvassa 3 on mallinnettu sooli-geelisiirtymää eri kriittisissä geelitysmislämpötiloissa.



Kuva 3. Diagrammi, jossa on mallinnettu sooli-geelisiirtymää eri kriittisissä geelitysmislämpötiloissa: alhaisessa kriittisessä liuoslämpötilassa (LCST) ja ylemmässä kriittisessä liuoslämpötilassa (UCST). Reprinted from⁷. Copyright 2019, with permission from Elsevier.

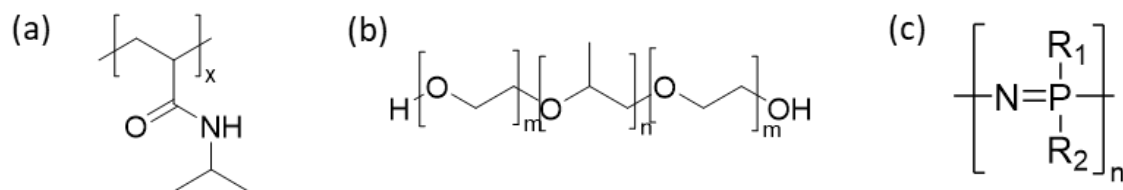
Polymeerejä, joilla on LCST/sooli-geelisiirtymä huoneenlämpötilan ja ruumiinlämpötilan välillä, käytetään injektoitavien *in situ* -geejeä muodostavien hydrogeelien valmistuksessa. Tällaisten polymeerien käyttö mahdollistaa injektion jälkeisen geelityksen fysiologisissa oloissa, toisin sanoen kehon lämpötila saa aikaan geelityksen.⁵ LCST-hydrogeelien geelityminen perustuu hydrofobisten ja hydrofiilisten ryhmien tasapainotilan muutokseen, minkä puolestaan aiheuttaa lämpötilan muutos. Liuksessa ennen geelitystä hallitsevat vesimolekyylien ja polymeeriketjujen hydrofiilisten osien väliset dynaamiset vetysidokset, jotka hajoavat lämpötilan nousun seuraksena.¹⁸ Tällöin polymeeri on vesiliukoinen. Lämpötilan nousun seurauksena hydrofiiliset osat dehydratoituvat, vetysidos vuorovaikutukset vähenevät ja hydrofobisten osien välinen vuorovaikutus kasvaa. Tämä johtaa polymeeriketjujen vesiliukoisuuden laskuun ja ketjujen yhdistymiseen hydrofobisten vuorovaikutusten kautta. Näin ollen polymeeriverkosto kutistuu ja geelii.^{6,17}

Lämpötilasensitiivisten hydrogeelien tilavuuden muuttuminen ja turpoamiskäyttäytyminen toimii samankaltaisesti geelin muodostumisen kanssa (Kuva 4). Esimerkiksi LCST-hydrogeelit kutistuvat lämpötilan noustessa yli kriittisen geelytymislämpötilan ja turpoavat lämpötilan laskiessa alle kyseisen lämpötilan. Yksinkertaisuudessaan lämpötilasensitiivisten hydrogeelien tapauksessa tilavuuden muutosta ohjaa pääasiassa hydrogeelin verkkorakenteen pinnalla olevien ryhmien erittäin nopea muutos hydrofiilisuudesta hydrofobisuuteen. Tilavuusmuutosta ja kriittistä geelytymislämpötilaa voidaan kontrolloida hydrofobisten ja hydrofiilisten ryhmien kautta. Yleensä hydrofobisten ryhmien lisääminen alentaa kriittistä geelytymislämpötilaa ja hydrofiilisten ryhmien lisääminen taas nostaa sitä.^{19,20}



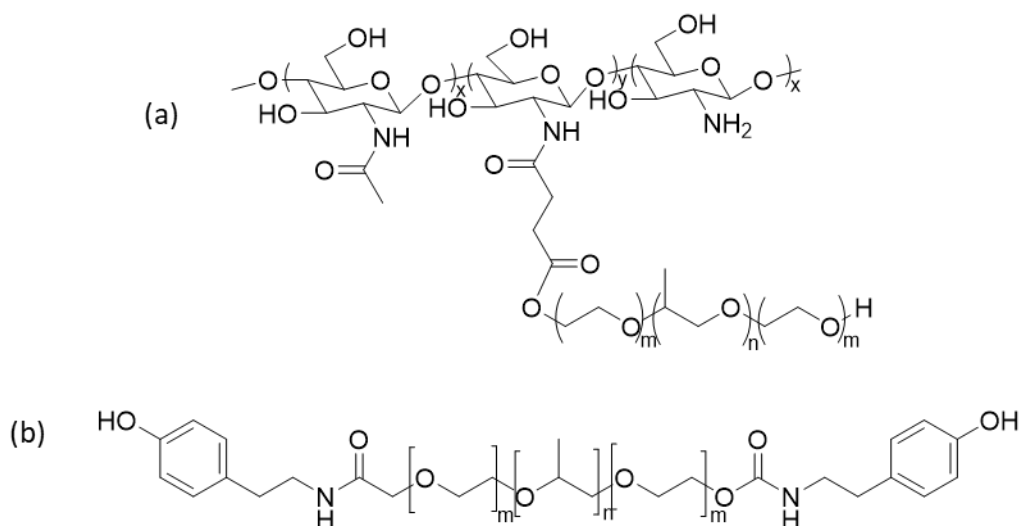
Kuva 4. Lämpötilasensitiivisten hydrogeelien turpoamiskäytös lämpötilan funktiona. Reprinted from⁷. Copyright 2019, with permission from Elsevier.

Tyypillisimpiä lämpötilasensitiivisiä, injektoimisen mahdollistavaa sooli-geelisiirtymäkäytöstä osoittavia polymeerejä/kopolymeerejä ja niiden johdannaisia ovat esimerkiksi poly(*N*-isopropyyliakryyliamidi) (PNIPA) (Kuva 5a), erilaiset poloksameerit (Pluronic® ja sen johdannaiset (Kuva 5b)), erilaiset kolmilohkopolymeerit (triblock), kuten polyesterit, amfifiiliset polypeptidit ja poly(fosfatseenit) (Kuva 5c) sekä jotkut luonnolliset polymeerit.



Kuva 5. Lämpötilasensitiivisten polymeerien molekyyliarakenteita: (a) Poly(*N*-isopropyyliakryyliamidi) (PNIPA), (b) poloksameeri ja (c) polyfosfatseeni.

Poloksameerit ovat synteettisiä kopolymeerejä, jotka koostuvat hydrofiilisestä poly(etyleenioksidista) (PEO) ja hydrofobisesta poly(propyleenioksidista) (PPO) (Kuva 5b). Huoneenlämpötilassa poloksameerien vesiliuokset ovat sooli-tilassa, mutta kehon lämpötilassa ne voivat muodostaa geelirakenteen. Poloksameerit voivat itsejärjestäytyä pallomaisiksi miselleiksi tietyllä pitoisuusalueella. Lämpötilan noustessa kriittisen lämpötilan yläpuolelle misellit pakkautuvat erittäin tiiviisti yhteen, mikä johtaa lämpötilasensitiiviseen sooli-geelisiirtymään. ”Puhtailla” poloksameeripohjaisilla geeleillä on kuitenkin heikot mekaaniset ominaisuudet, nopea vesiliukoisuus ja korkea läpäisevyys, joka johtuu kehon nesteiden aiheuttamasta polymeerikonsentraation laskusta. Nämä ominaisuudet tekevät poloksameerien hyödyntämisestä pitkäaikaisessa käytössä erittäin vaikeaa. Poloksameerien ominaisuuksia voidaan kuitenkin parantaa liittämällä niihin erilaisia ryhmiä, kuten hyaluronihappoa, kitosaania (Kuva 6a), tyramiinia (Kuva 6b) tai oligoesteriryhmiä.^{21–25} Poloksameerien suurin heikkous on kuitenkin niiden funktionaaliset eetteriryhmät, jotka eivät ole luonnostaan biohajoavia.²¹

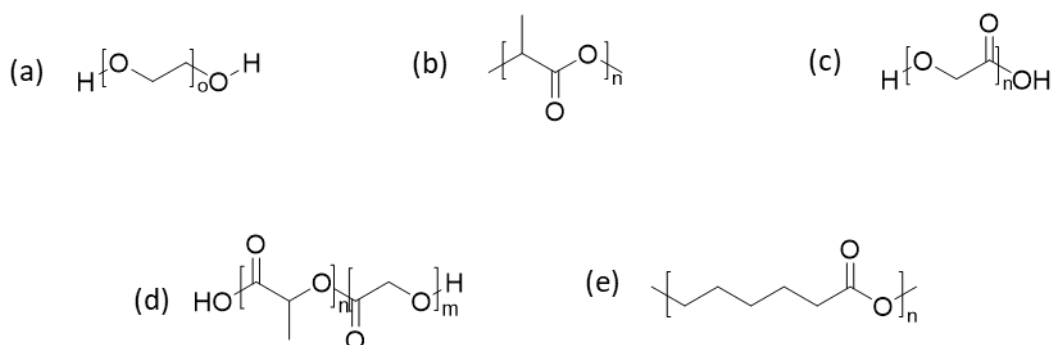


Kuva 6. Kopolymeerien poloksameeri-kitosaani (a) ja poloksameeri-tyramiini (b) molekyyliarakenteet.

PNIPA-polymeeri (Kuva 5a) on ehkä yksi tutkituimmista ja tunnetuimmista lämpötilasensitiivisistä polymeereistä. PNIPA-hydrogeelin rakenne koostuu usein hydrofiilisistä -NHCO- ryhmistä ja hydrofobisista -CH(CH₃)₂- ryhmistä.^{6,26} PNIPA on LCST-hydrogeeli, jonka kriittinen geeliytymislämpötila on noin 32-33 °C. ”Puhtaan” PNIPA:n LCST-lämpötila on huomattavan matala verrattuna kehon fysiologiseen lämpötilaan, minkä takia se muodostaa geelin todella nopeasti kehon olosuhteissa. Tästä seuraa geelin tilavuuden kutistuminen ja kapseloidun materiaalin nopea vapautuminen. Nopeaan vapautumiseen on

myös osittain syynä ”puhtaan” PNIPA hydrogeelien erittäin huokoinen rakenne.⁶ Muodostamalla PNIPA:sta erilaisia kopolymeerejä kriittistä geeliytymislämpötilaa voidaan nostaa tai laskea ja sen ominaisuuksia voidaan parantaa.²⁶

Useat erilaiset kolmilohkopolymeerit ovat injektoitavia ja niillä on lämpötilasensitiivinen sooli-geeli käyttäytyminen. Tyypillisesti nämä amfiifiiliset kopolymeerit koostuvat hydrofiilisestä poly(etyleeniglykolista) (PEG) (Kuva 7a) ja jostain hydrofobisesta, biohajoavasta osasta, kuten polyesteriestä. Hydrofiilisenä osana voi toimia myös jokin muu ryhmä esimerkiksi poly(propyleenioksidi).



Kuva 7. Poly(etyleeniglykolin) (PEG) (a), polylaktidihapon (PLA) (b), polyglykolidin (PGA) (c), poly(laktidi-glykolihapon) (PLGA) (d) ja polykaprolaktonin (PCL) (e) molekyylirakenteet.

PEG-polyesterikopolymeereissä PEG-osa tehostaa kopolymeerin bioyhteensopivuutta ja polyesteri biohajoavuutta. Yleisimmin käytetty hydrofobisia polyestereitä ovat polylaktidihappo (PLA) (Kuva 7b), polyglykolidi (PGA) (Kuva 7c), niiden yhdistelmä poly(laktidi-glykolihappo) (PLGA) (Kuva 7d) ja polykaprolaktoni (PCL) (Kuva 7e), joiden hajomistuotteita ovat maitohappo, glykolihappo ja kapronihappo. PEG-polyesterikopolymeerit voivat järjestäytyä joko kolmilohkopolymeereiksi ABA tai BAB järjestykseen (A hydrofiilinen PEG ja B hydrofobinen polyesteri) tai kaksilohkopolymeereiksi AB. Matalissa lämpötiloissa kopolymeeriliuos on virtaavassa soolitiilassa hydrofiilisten PEG-osien vuoksi. Lämpötilan nousun seurauksena tapahtuva PEG:n dehydraatio vahvistaa hydrofobisten polyesteriosien välisiä vuorovaikutuksia, joka johtaa sooli-geelisiirtymään. Kopolymeerin ominaisuudet, kuten sooli-geelisiirtymälämpötila, hajoamisnopeus ja mekaaniset ominaisuudet riippuvat ainoastaan kopolymeerin hydrofiilisuus-hydrofobisuustasapainosta. Tätä voidaan helposti muokata molekyylipainon, monomeerien pituuden, hydrofiilisten ja hydrofobisten komponenttien moolisuhteen ja polyesteriosan tyypin kautta.⁷

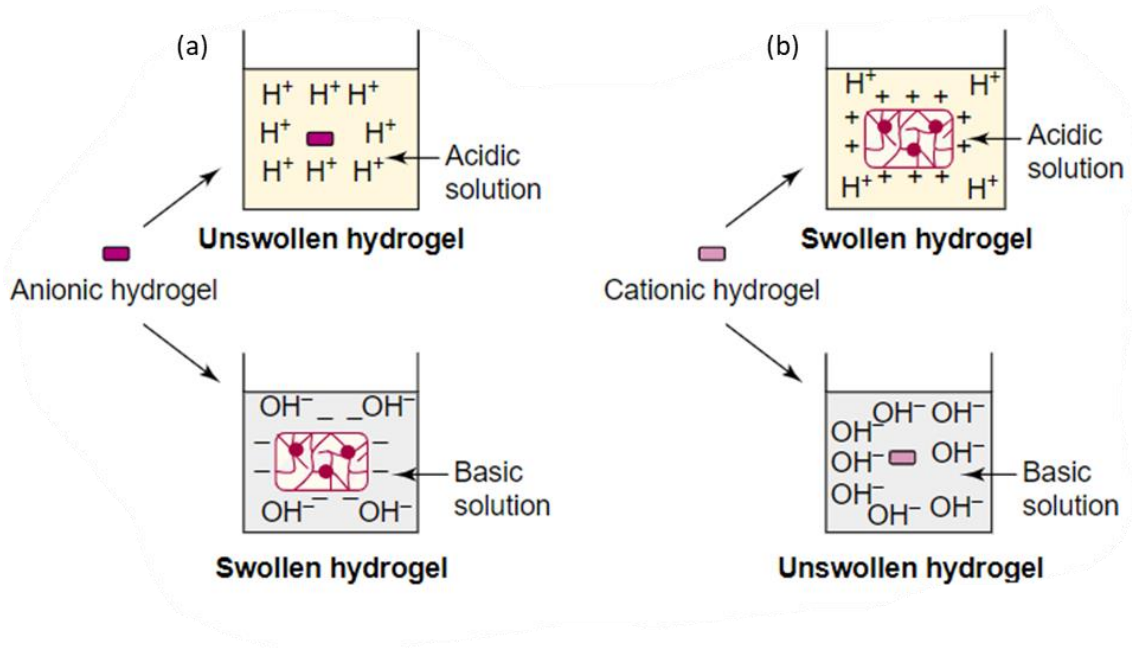
3.2 pH-sensitiivisyys

pH-sensitiivisillä hydrogeeleillä sooli-geelisiirtymä ja tilavuusmuutokset tapahtuvat ympäristön pH:n muutoksen seurauksena.^{6,27} Tällaisia hydrogeelejä voidaan hyödyntää muun muassa mahassa, suolessa, endosomeissa/lysosomeissa sekä kasvaimissa johtuen näissä esiintyvistä spesifisistä pH-alueista.¹⁴ pH-sensitiivisten injektoitavien hydrogeelien sooli-geelisiirtymä tapahtuu tietyssä pH:ssa, joka vastaa injektiopaikan pH:ta. Siksi pH-sensitiivisten injektoitavien hydrogeelien valmistuksessa täytyy huomioida erilaiset fysiologiset ja patologiset olosuhteet.⁵ Esimerkiksi kehon ympäristössä pH on neutraali,²⁸ syöpäkasvaimen pH on yleensä hieman hapan²⁹ ja haavojen pH voi vaihdella happamasta emäksiseen.³⁰

pH-sensitiivisillä hydrogeeleillä on hydrofiilinen verkkorakenne, jossa polymeerit tai verkkorakenteeseen kiinnitetyt funktionaaliset ryhmät ovat heikosti happamia tai emäksisiä ja ne kykenevät ionisoitumaan helposti.^{6,14,27} pH-sensitiiviset hydrogeelit voidaan jakaa anionisiin ja kationisiin hydrogeeleihin. Jako riippuu hydrogeelin verkkorakenteeseen kiinnittyneistä funktionaalisista ryhmistä ja niiden toimintatavasta. Anionisiin hydrogeeleihin on kiinnittynyt happamia ryhmiä, kuten karboksyyli- tai sulfonihappoa, jotka ionisoituvat emäksisissä olosuhteissa.^{6,31} Vastaavasti anioniset kopolymeerit deionisoituivat, kun niitä ympäröivä pH laskee emäksisestä fysiologiseen pH-arvoon. Tämä siirtymä indusoi anionisten kopolymeerien muutoksen hydrofiilisestä tilasta amfiifiiliseen, mikä aiheuttaa geelitymisen.³² Kationiset hydrogeelit sisältävät emäksisiä ryhmiä, kuten amiiniryhmiä, jotka ionisoituvat ympäristön pH-arvon laskun seurauksena.^{6,31} Vastaavasti kationiset kopolymeerit deionisoituvat, kun niitä ympäröivä pH nousee happamasta fysiologiseen pH-arvoon.³²

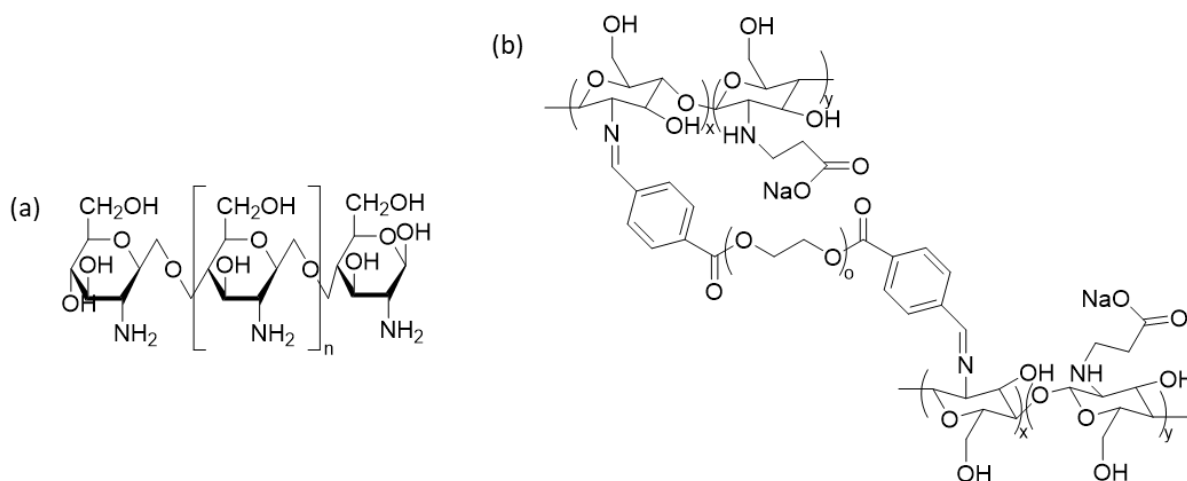
pH-sensitiivisten injektoitavien hydrogeelien tilavuusmuutokset eli turpoamiskäyttäytyminen perustuu siis verkkorakenteessa olevien ryhmien kykyyn ionisoitua tai deionisoitua ympäristön pH:n muutoksen seurauksena. Polymeerien ja funktionaalisten ryhmien ionisoituminen aiheuttaa polymeeriverkossa sisäistä sähköstaattista vuorovaikutusta eli repulsiota. Tämä muuttaa osmoottista painetta, joka vaikuttaa hydrogeelin turpoamiskäyttäytymisen. Hydrogeelin turpoamisaste riippuu syntyvästä osmoottisesta paineesta ja lopulta turpoaminen vähentää repulsiota, jolloin hydrogeeli saavuttaa tasapainotilan. Esimerkiksi anioninen pH-sensitiivinen hydrogeeli ionisoituu ympäristön pH:n noustessa, jolloin osmoottinen paine hydrogeelin sisällä kasvaa ja se turpoaa. pH:n laskiessa se deionisoituu, jolloin osmoottinen paine laskee ja hydrogeeli kutistuu. Kationisella hydrogeelillä toiminta on päinvastaista (Kuva 8). Lyhyesti ilmaistuna varautunut hydrogeeli turpoaa eli sitoo nestettä ja ei-varautunut kutistuu eli vapauttaa nestettä. Hydrogeelien ionisaatio on palautuvaa ja ympäristön pH:n avulla voidaan

helposti kontrolloida niiden tilavuusmuutoksia.^{6,27,31,33} Turpoamiskäyttäytymiseen vaikuttavia tekijöitä ovat polymeerien ominaisuudet, kuten ionisoituvan ryhmän varaus sekä ionisaatioaste, konsentraatio, pK_a -arvo, silloitustiheys ja hydrofiilisyyshydrofobisuus, ja väliaineen ominaisuudet, kuten pH, ionivahvuus ja vastaionit.³³



Kuva 8. Kaaviokuva pH-sensitiivisen hydrogeelin turpoamiskäyttäytymisestä: anioninen hydrogeeli (a) ja kationinen hydrogeeli (b). Reprinted from³³. Copyright 2019, with permission from Elsevier.

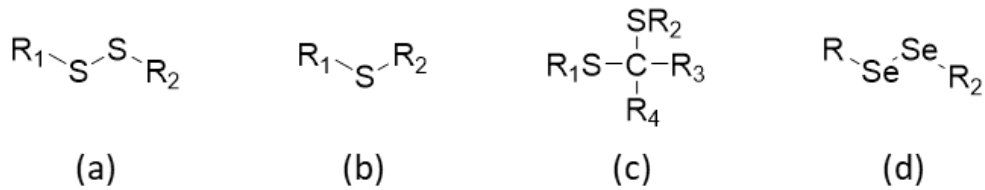
Luonnon materiaali kitosaani (Kuva 9a) on esimerkki kationisesta pH-sensitiivisestä materiaalista, joka liukenee matalassa pH:ssa (<6,2) heikkoihin happoihin aminoryhmien protonaation aiheuttaman hydrofiilisyyden lisääntymisen ja sähköstaattisen repulsion seurauksena. Korkeammassa pH:ssa se on liukenematon tai geeliytyvä. Kationinen kitosaani muodostaa geelejä pääasiassa sähköstaattisten tai hydrofobisten vuorovaikutusten ansiosta tai erilaisten silloittajien, kuten PEG-pohjaisten polymeerien, kanssa.^{5,29} Kuvassa 9b on esitetty *N*-karboksietylikitosaanin (CEC) ja dibentsaldehydipoly(etyleeniglykolin) (PEGDA) kopolymeeri CEC-PEGDA, joka on pH-sensitiivinen, kemiallinen injektoitava hydrogeeli. Hydrogeeli valmistetaan sekoittamalla CEC:a ja PEGDA:a fysiologisissa olosuhteissa, jolloin niiden välille muodostui kovalenttinen Schiffin emässidos. Tätä hydrogeeliä voidaan mahdollisesti hyödyntää esimerkiksi syöpälääkkeiden kuljetuksessa, koska syöpäkasvaimen mikroympäristö on hieman hapan. Hapan ympäristö johtaa kitosaanin aminoryhmien protonoitumiseen ja positiiviseen varautumiseen, joka heikentää ja lopulta katkaisee Schiffin emässidoksen hajottaen hydrogeelin. Samalla hydrogeeli voisi vapauttaa syöpälääkettä syöpäkasvaimeen.²⁹



Kuva 9. Kitosaanin (a) ja kopolymeri N-karboksietyylikitosaani-dibentsaldehydipoly(etyleeniglykolin) (CEC-PEGDA) (b) molekyyliarakenteet.

3.3 Redox-sensitiivisyys

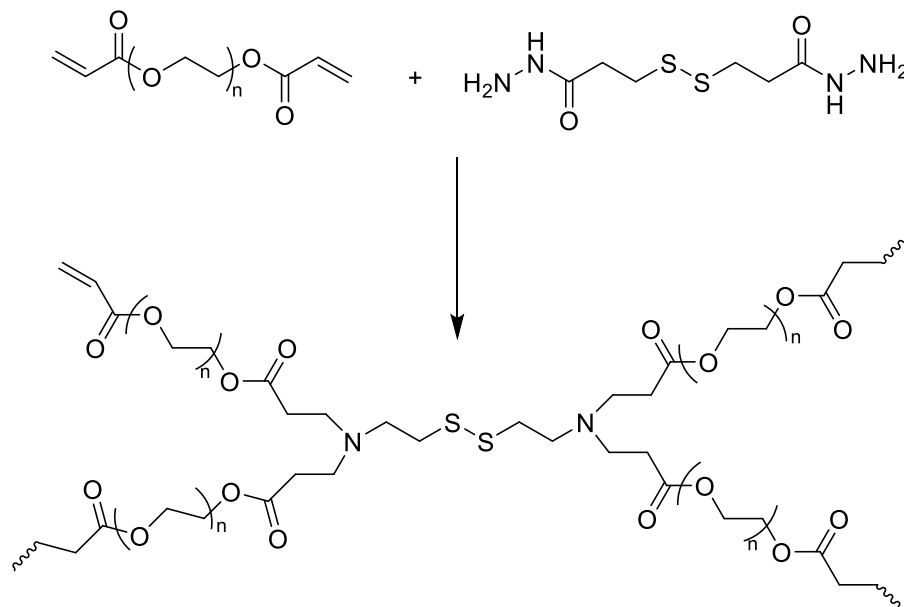
Kehossa muodostuu reaktiivisia happilajeja (reactive oxygen species, ROS), kuten superoksidianioneja ($O_2^{\cdot-}$), vetyperoksidia (H_2O_2) ja hydroksyyliiradikaaleja ($HO\cdot$), hapen osittaisen pelkistymisen seurauksena. Solujen toiminnassa ROS:a syntyy esimerkiksi mitokondrioiden oksidatiivisen aineenvaihdunnan aikana tai solujen vasteesta ksenobioteille, sytokiineille ja bakteerien hyökkäykselle. ROS:illa on tärkeä rooli solujen signaalintireiteissä, mutta niiden liiallinen tuotanto tai solujen antioksidanttikapasiteetin lasku voi synnyttää oksidatiivista stressiä, joka puolestaan voi aiheuttaa suoria tai epäsuoria nukleiinihappo-, proteiini- ja lipidivaurioita. Oksidatiivisen stressin on myös katsottu olevan osallisena karsinogeneesissä eli syövän syntymisessä, hermoston rappeutumisessa, diabeteksessa, sydän- ja verisuonitaudeissa ja ikääntymisessä.^{34,35} Oksidatiivisen stressin välttämiseksi solut alkavat tasapainottamaan ja edistämään omaa pelkistysjärjestelmäänsä esimerkiksi tuottamalla antioksidantti glutationia (GSH), jonka seurauksena solun sisäinen GSH pitoisuus on huomattavasti korkeampi kuin solun ulkoinen pitoisuus.³⁶ Polymeerien redox-sensitiivisyys pohjautuu pääasiassa rikkipitoisiin ryhmiin, kuten disulfididisoksiin, tioetteri ja tioketaaliryhmiin (Kuva 10a-c).^{17,37} Viime vuosina on aloitettu myös tutkimaan diselenididisidoksen (Kuva 10d) hyödyntämistä redox-sensitiivisenä ryhmänä hydrogeeleissä.³⁶



Kuva 10. Disulfidisisidos (a), tioetteri (b), tioketaali (c) ja diselenidisisidos (d).

Useimmat redox-sensitiiviset hydrogeelit on suunniteltu disulfidisisidospohjaisiksi. Disulfidisisidos voidaan liittää suoraan polymeeriin tai disulfidisisidoksen sisältävien silloittajien, kuten kystamiinin ja sen johdannaisten, kautta.³⁷ Disulfidisisidos voi pelkistyä tioliksi esimerkiksi GSH:n tai ditiotreitolin (DTT) avulla, mutta se voi myös hapettua esimerkiksi ROS:n avulla hydrofiiliseksi sulfoksidiksi tai sulfoniksi.^{17,36} Solun ulkopuolella disulfidisisidos on yleensä stabiili, mutta solunsisäisissä olosuhteissa sidos usein pelkistyy ja katkeaa edellä mainitun glutationin konsentraatioeron vuoksi. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää esimerkiksi lääkeaineen kuljetussysteemeissä.¹⁷ Tioetteriryhmä puolestaan voi hapettua sulfoksidiksi tai sulfoniksi ja tioketaali-ryhmä tioliksi ja ketoniksi esimerkiksi ROS:ien läsnäollessa.^{17,37}

Wang *et al.*³⁸ valmistivat redox-sensitiivisen injektoitavan hydrogeelin, joka reagoi kehossa ROS:hin. Hydratsidipohjainen monomeeri ja diakrylaatti-PEG reagoivat muodostaen poly(hydratsidiesteri)-makromeerin (Kuva 11). Nämä makromeerit ovat injektoitavia ja voivat muodostaa hydrogeelin fysiologisissa olosuhteissa, kun akrylaattiryhmään kiinnitetään hyaluronihappotioli. Hydrogeelille mallinnettiin ROS-ympäristöä H_2O_2 :n avulla ja havaittiin, että hapetin nopeuttaa hydrogeelin hajoamista, mutta saman aikaisesti hydrogeeli kykenee suojaamaan soluja erittäin hyvin. Kyseinen hydrogeeli voisi toimia ROS:lta suojaavana lääkeaineiden kuljetusalustana esimerkiksi biolääketieteen sovelluksissa.



Kuva 11. Kystamiinin ja diakrylaatti-PEG:n välisestä reaktiosta muodostuvan poly(hydratsidiesteri) -makromeerin molekyylirakenne.

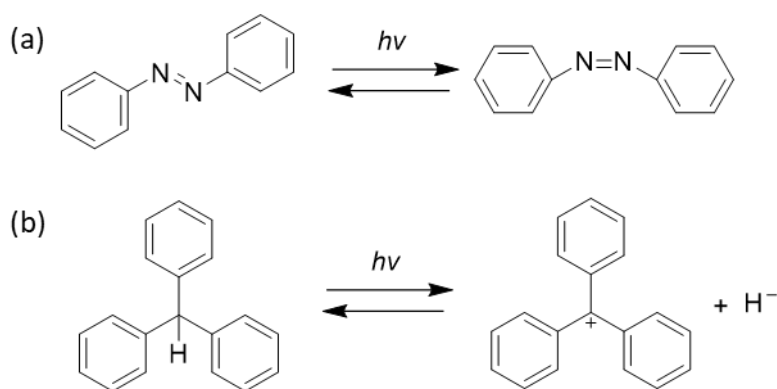
Seleenillä on hyvin samanlainen kemiallinen käyttäytyminen ja redox-sensitiivisyys kuin rikillä, koska se kuuluu samaan pääryhmään sen kanssa. Diselenididoksen sisältävien hydrogeelien on jopa oletettu sopivan paremmin biologisiin systeemiin, koska sidoksen sidosenergia on pienempi kuin disulfididoksen.^{36,37} Diselenididoksen huono vesiliukoisuus on kuitenkin ollut esteenä sidoksen sisältävien hydrogeelien kehitykselle³⁶ kirjallisuus tuntee vain muutamia diselenididoksen sisältäviä injektoitavia hydrogeelejä, joilla on huomattavaa sensitiivisyyttä ROS:ja sekä GSH:a kohtaan.^{39,40}

3.4 Muut ärsykkeet

Hydrogeelien valosensitiivisyys viittaa ilmiöön, jossa hydrogeelin geelin muodostusta tai tilavuusmuutosta ohjataan valostimulaation avulla. Säättämällä valaistusaikaa, valon aallonpituutta ja intensiteettiä absorboituneiden fotonien määrää voidaan hallita tarkasti ja ohjata tietylle alueelle.¹² Valosensitiiviset hydrogeelit pohjautuvat usein lämpötilasensitiiviseen polymeeriin, johon on liitetty valosensitiivisiä funktionaalisia ryhmiä. Valosensitiiviset hydrogeelit voidaan luokitella UV- ja näkyvälle valolle sensitiivisiin materiaaleihin.^{6,27}

Valosensitiiviset hydrogeelit voivat reagoida valoon kolmella mekanismilla. Ensimmäinen mekanismi pohjautuu valon muuntamiseen lämmöksi lämpötilasensitiivisten polymeerien valosensitiivisten molekyylien kautta. Lämpötilan nousun seurauksena tapahtuu sooli-geelisiirtymä eli mekanismi pohjautuu lämpötilasensitiivisten polymeerien käyttäytymiseen lämpötilan muutoksen seurauksena. Toinen mekanismi perustuu valosensitiivisten molekyylien ionisaatioon, joka toiminnaltaan muistuttaa pH-sensitiivisten polymeerien toimintaa. Valolle altistuessa polymeerin ryhmät ionisoituvat, minkä seurauksena geelin sisäpuolen ja ulkopuolen välille syntyy osmoottinen paine-ero ja hydrogeeli turpoaa. Valoaltistuksen loppuessa ryhmät deionisoituvat ja hydrogeeli kutistuu. Kolmas mekanismi perustuu kromoforisten ryhmien lisäksi hydrogeeliin. Tämä aiheuttaa vasteena valolle rakenteellisia muutoksia polymeeriketjuun ja edelleen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien muutoksen.⁶

Paljon tutkittuihin valosensitiivisiin ryhmiin kuuluvat kromoforit, jotka kykenevät absorboimaan ja emittoimaan näkyvää valoa sekä reagoimaan UV-valoon muun muassa isomerisoinnin kautta. Näkyvän valon absorboituminen johtaa useissa tilanteissa lämpötilan nousuun ja saman kaltaiseen käytökseen lämpötilasensitiivisten polymeerien kanssa.⁶ Kromoforiksi luokiteltava atsobentseeni voi puolestaan läpikäydä palautuvaa cis-trans-isomerisoinnin kautta UV-valon läsnäollessa (Kuva 12a). Hydrogeelissä immobilisoitujen atsobentseeniryhmien fotoisomerisaatio välillä saa aikaan ominaisuuksien muutoksen, esimerkiksi palautuvan tilavuusmuutoksen.^{27,41} Isomerisoinnin lisäksi valosensitiivisten hydrogeelien valmistamiseksi on tutkittu myös dimerisaatiota. Erilaiset trifenyylimetaanin (Kuva 12b) leukojohdannaiset ionisoituvat UV-säteilyn seurauksena.⁴² Trifenyylimetaani ryhmiä sisältävät valosensitiiviset hydrogeelit käyttäytyvät hyvin samalla tavalla kuin pH-sensitiiviset hydrogeelit.²⁷



Kuva 12. Atsobentseenin isomerisaatio (a) ja trifenyylimetaanin ionisaatio (b) valosäteilytyksen seurauksena.

Entsyymit ovat biokatalyyttejä, joilla on merkittävä rooli monissa kemiallisissa ja biologisissa prosesseissa. Entsyymikatalysoidut reaktiot ovat spesifisiä ja selektiivisiä, ja reaktio-olosuhteet ovat usein maltillisempia verrattuna muihin yleisiin kemiallisiin reaktioihin.⁶ Entsyymisensitiivisyys ilmenee hydrogeeleissä entsyymikatalysoituina reaktioina, joiden avulla voidaan muodostaa hydrogeelin siltasidoksia, entsyymiaktivoinnin avulla lohkeavina ryhminä tai hydrolyysin tehostajana.^{6,37} Suurin osa tutkimuksista on keskittynyt proteaasi- ja glykosidaasi-entsyymien hyödyntämiseen hydrogeelien toiminnassa.⁶

Entsyymisensitiivisyyden hyödyntäminen on mahdollista, koska useiden sairauksien seurauksena tiettyjen entsyymien määrä poikkeaa paikallisesti normaalista tasosta. Esimerkiksi erityyppisiä metalloproteaasi-entsyymejä esiintyy runsaasti kroonisesti tulehtuneissa kudoksissa. Tätä hyödyntäen voidaan kehittää merkkiaineita, joiden avulla voidaan seurata sydän- ja verisuonitautien kehittymistä.³⁶

3.5 Kaksoissensitiivisyys

Kaksoissensitiiviset injektoitavat hydrogeelit reagoivat erityisellä ja selkeällä tavalla kahteen eri ärsykkeeseen. Kaksoissensitiivisten hydrogeelien sooli-geelisiirtymää ja tilavuusmuutosta voidaan hallita paremmin kuin yksittäissensitiivisillä hydrogeelillä.³⁷ Yksittäissensitiivinen hydrogeeli ei esimerkiksi välttämättä kykene vapauttamaan bioaktiivisia aineita yhtä tarkasti kuin kaksoissensitiivisiin hydrogeeleihin. Tämä johtuu bioaktiivisten aineiden kohdealueiden mikroympäristöistä, jotka ovat usein hyvin monimutkaisia ja heterogeenisiä.^{43,44} Lisäksi hydrogeelien kaksoissensitiivisyys helpottaa injektiovaihetta, sillä niiden avulla on helpompi välttää ennen aikaista geelin muodostumista.⁴

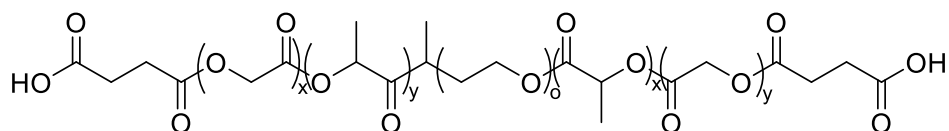
3.5.1 pH- ja lämpötilasensitiivisyys

Injektoitavat pH- ja lämpötilasensitiiviset hydrogeelit reagoivat pH:n ja lämpötilan muutoksiin. Niillä on joitakin etuja verrattuna monosensitiivisiin lämpötilan muutoksiin reagoiviin injektoitaviin hydrogeeleihin. Yleinen ongelma lämpötilasensitiivisillä hydrogeeleillä on injektioneulan tukkeutuminen, koska geelilytyminen tapahtuu liian nopeasti lämpötilan

nousteissa neulan sisällä fysiologiseen lämpötilaan. Lisäksi liian nopea tai liian voimakas terapeuttisen aineen vapautuminen voi aiheuttaa ongelmia, esimerkiksi erilaisia komplikaatioita kehossa. Lämpötilasensitiiviset hydrogeelit ovat myös usein neutraaleja, mikä rajoittaa ionisten terapeuttisten aineiden kuljetusta.⁴⁵ Lämpötilasensitiiviset hydrogeelit ovatkin melko huonosti kontrolloitavissa fysiologisissa olosuhteissa injektion jälkeen. Lisäämällä pH-sensitiivisiä funktionaalisia ryhmiä lämpötilasensitiivisiin kopolymeereihin voidaan ehkäistä injektioneulojen tukkeutumista, koska ioniset ryhmät parantavat polymeerin liukoisuutta johtuen ionisilan aiheuttamasta hydrofiilisyyden kasvusta. Ne myös mahdollistavat esiastevesiliuoksen ja terapeuttisten aineiden pääsyn syväkudoksiin sekä muodostavat ionisia komplekseja terapeuttisten aineiden kanssa. Lisäksi pH-sensitiivisten ryhmien ionisoituminen nopeuttaa usein sooli-geelisiirtymää.^{11,21,32}

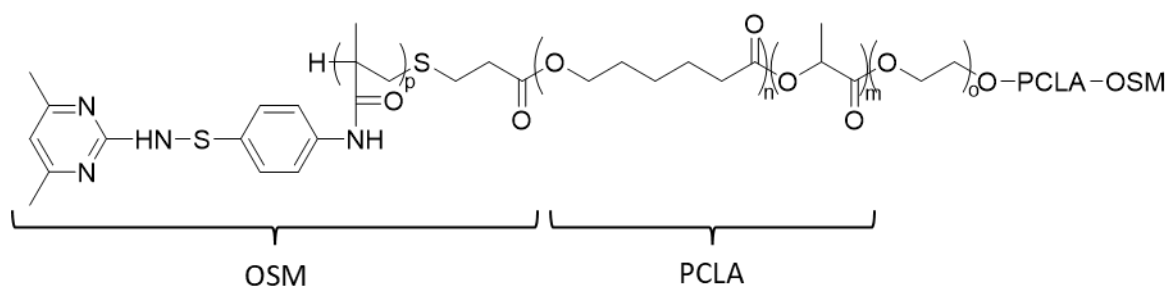
pH- ja lämpötilasensitiiviset injektioitavat hydrogeelit ovat usein rakenteeltaan kopolymeerejä, joissa pH-sensitiivisiä amfiifiilisiä ryhmiä on kiinnitetty lämpötilasensitiivisen tai sen kaltaisen ”runkopolymeerin” pääteryhmiksi.^{4,14} Kopolymeerin pH-sensitiivisenä osana voi toimia esimerkiksi sulfametatsiinioligomeeri⁴⁶, poly(β -aminoesteri)⁴⁷, poly(amidoamiini)⁴⁸, poly(β -aminoureaani)^{49,50} tai poly(β -aminoesteriuretaani). Lämpösensitiivisenä osana voi toimia myös ryhmiä tai polymeerejä, jotka eivät yksinään ilman pH-sensitiivistä osaa osoita geelitymisominaisuuksia. pH-sensitiivisten hydrogeelien tavoin pH- ja lämpötilasensitiiviset hydrogeelit voidaan jakaa kationisiin ja anionisiin hydrogeeleihin pH-sensitiivisen osan toiminnan perusteella.³²

Chang *et al.*⁵¹ esittelivät anionisen pH- ja lämpötilasensitiivisen kopolymeerin HOOC-PLGA-PEG-PLGA-COOH (Kuva 13), jossa PLGA on poly(D,L-maitohappo-ko-glykolihappo). Kopolymeeri PLGA-PEG-PLGA ei yksinään ole lämpötilasensitiivinen kopolymeeri, koska sillä ei tapahdu sooli-geelisiirtymää lämpötilan muutoksen seurauksena. Sen rakenteessa on kuitenkin hydrofiilisiä ja hydrofobisia ryhmiä, jotka osallistuvat hydrogeelin muodostumiseen. Karboksyylihappopääteisenä sillä on havaittavissa neljä erilaista tilaa sooli, geeli, sakka ja samea sooli, jotka riippuvat vallitsevasta pH:sta ja lämpötilasta.



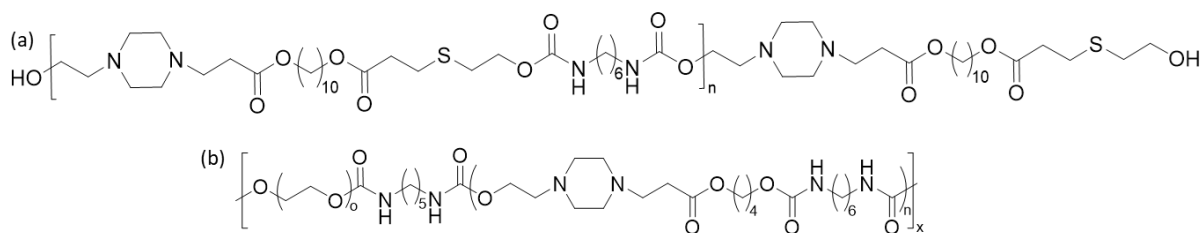
Kuva 13. pH- ja lämpötilasensitiivinen kopolymeerin HOOC-PLGA-PEG-PLGA-COOH molekyyli rakenne.

Shim *et al.*⁴⁶ ovat syntetisoineet pH- ja lämpösensitiivisen ja injektoitavan kationisen viisilohkokopolymeerin OSM-PCLA-PEG-PCLA-OSM liittämällä sulfametatsiinioligomeerejä (OSM) lämpöherkkään PCLA-PEG-PCLA polymeeriin (Kuva 14). Tämän kopolymeerin vesiliuoksella tapahtuu palautuva sooli-geelisiirtymä pienen pH:n muutoksen seurauksena alueella 7,4-8,0 sekä lämpötilan noustessa kehon lämpötilaan (37 °C). Kopolymeerin ollessa huoneenlämpötilassa ja pH:ssa 8,0 sooltilassa, tarvitaan pH:n ja lämpötilan muutos geelin muodostumiseksi. Kopolymeeri ei muodosta geeliä pH:ssa 8,0, koska hydrofobisen PCLA:n ja pH-sensitiivisen OSM:n välillä on vai heikko hydrofobinen vuorovaikutus, jota häiritsee OSM:n ionisoitunut sulfonamidiryhmä hieman emäksisessä ympäristössä. pH:n laskiessa OSM deionisoituu, mikä parantaa PCLA:n ja OSM:n hydrofobista vuorovaikutusta ja mahdollistaa sooli-geelisiirtymän. Geelitymisominaisuuksiin voidaan myös vaikuttaa PCLA:n hiiliketjun pituudella, joka kasvaessaan lisää hydrofobista vuorovaikutusta. PCLA:n hydrofobisuus kuitenkin laskee lämpötilan laskiessa, joka on tyypillistä lämpösensitiivisistä käytöstä.



Kuva 14. pH- ja lämpötilasensitiivinen kopolymeerin OSM-PCLA-PEG-PCLA-OSM molekyylirakenne

Poly(aminoesteriuretaani) (PAEU) on pH-sensitiivinen ryhmä, jolla on myös hieman lämpötilasensitiivisiä ominaisuuksia. PAEU:ta hyödynnetään pH- ja lämpösensitiivisten injektoitavien hydrogeelien valmistuksessa ja sillä on valtavaa potentiaalia lääkeaineiden ja proteiinien kuljetuksessa, koska se on myrkytön ja kykenee muodostamaan vetysidoksia ja ionisia vuorovaikutuksia. PAEU-ryhmään voi olla kiinnittynyt erilaisia lämpötilasensitiivisiä polymeerejä tai se voi esiintyä oligomeerinä.³² Kuvassa 15 on esitetty oligomeeri oligo(β -aminoesteriuretaani)⁴⁵ (OAEU) ja kopolymeeri poly(etyleeniglykoli)-poly(β -aminoesteriuretaani)⁵² (PEG-PAEU), joissa on hyödynnetty PAEU-ryhmää. Molemmat ovat injektoitavia hydrogeelejä, joiden geelitysmisalue osuu fysiologisiin olosuhteisiin, ja niiden avulla voidaan kuljettaa sekä vapauttaa kontrolloidusti kemoterapeuttista ainetta, doksorubisiinia (DOX).



Kuva 15. Oligomeerin oligo(β -aminoesteriuretaani) (OAEU) (a) ja kopolymerin poly(etyleeniglykoli)-poly(β -aminoesteriuretaani) [PEG-PAEU]_x (b) molekyyliarakenteet.

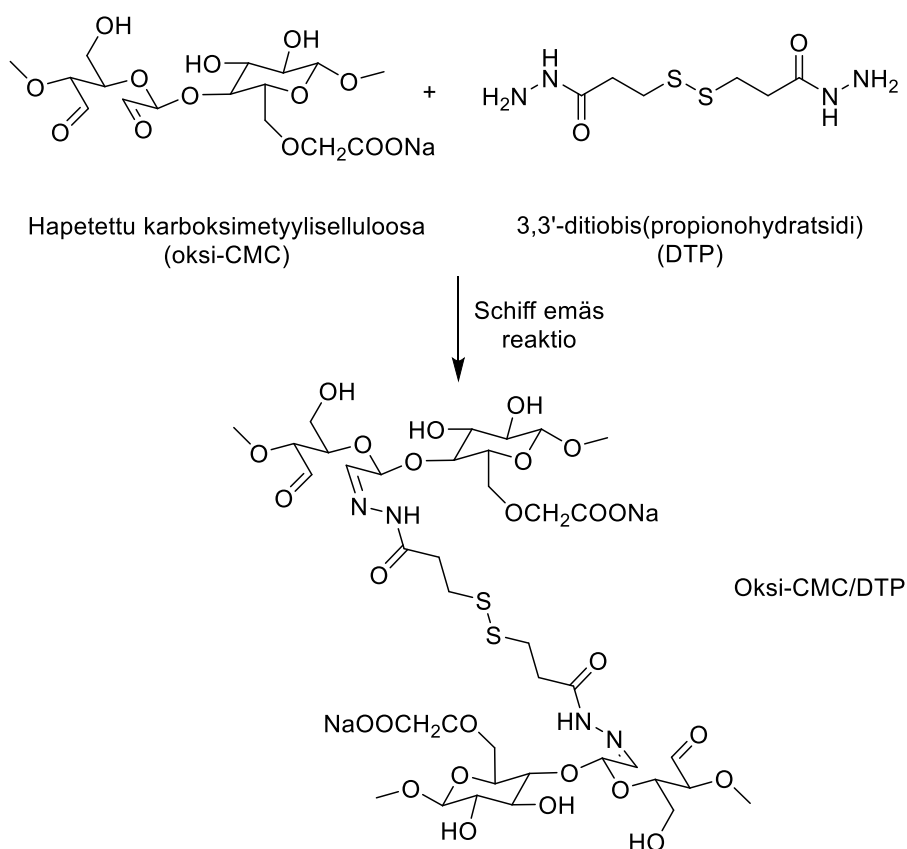
OAEU:n on kationinen oligomeeri, jonka toiminta perustuu tertiääristen amiiniryhmien ionisoitumiseen. Matalassa pH:ssa (6,6) amiiniryhmä on ionisoitunut, OAEU:lla on hydrofiilisiä ominaisuuksia ja polymeeri on liukoinen. pH:n noustessa amiiniryhmät deprotonoituvat, hydrofobiset ominaisuudet kasvavat ja polymeeri muuttuu vähemmän vesiliukoiseksi. Polymeerin konsentraation kautta voidaan muuttaa geeliytymisaluetta laajemmaksi tai kapeammaksi. Esimerkiksi 15 wt.-% geeliytymisalue on noin pH 7,2-7,5 ja 20-50 °C, kun taas 30 wt.-% vastaava alue on huomattavasti laajempi pH 6,8-7,5 ja hieman alle 0-52 °C.⁴⁵

Kopolymerin PEG-PAEU:n lämpötilasensitiivinen PEG parantaa kopolymerin hydrofiilisyyttä, kun taas pH-sensitiivinen PAEU tuo kopolymeriin pH-sensitiivisyyttä ja lämpötilasensitiivisyyttä. Happamassa pH:ssa huoneenlämpötilassa PEG ja ionisoitunut PAEU ovat hydrofiilisiä, jolloin kopolymeri liukenee täysin. Fysiologisissa olosuhteissa PAEU:n tertiäärinen amiiniryhmä deionisoituu, jolloin hydrofobisuus kasvaa ja amiiniryhmä kykenee muodostamaan vetysidoksia, mikä aiheuttaa sooli-geelisiirtymän. Geeliytymiseen voidaan vaikuttaa kopolymerin konsentraation, PEG/PAEU-jakauman ja PEG:n molekyylipainon kautta.⁵² Molempien esimerkkien tapauksessa PAEU:n tertiäärinen amiiniryhmä on vastuussa kopolymerin pH-sensitiivisyydestä ja sitä kautta geelin muodostuksesta. Tämä on hyvin tyypillistä kationisille kopolymeereille.

3.5.2 pH- ja redox-sensitiivisyys

Shen *et al.*⁵³ ovat valmistaneet kaksoissensitiivisen pH- ja redox-ärsykkeisiin reagoivan injektoitavan hydrogeelin silloittamalla Schiffin emäsreaktion avulla hapetetun karboksimeetyyliselluloosan (oksi-CMC) ditiobis(propionohydratsidin) (DTP) kanssa (Kuva

16). Asyylihydratsoni- ja tiolisidos antavat hydrogeelille pH- ja redox-ärsykkeisiin reagoivan ominaisuuden. Asyylihydratsonisidos on stabiili neutraalissa tai emäksisessä pH:ssa, mutta heikosti happamissa olosuhteissa, kuten kasvaimen lähellä, sidos hydrolysoituu ja korkea tiolitaso katkaisee disulfidididoksen. Tämä aiheuttaa ristosilloitusrakenteen tuhoutumisen, joka kiihdyttää hydrogeelin hajoamista ja mahdollisen lääkeaineen vapautumisnopeutta. Geeliytymisaikaa ja geelin ominaisuuksia voidaan säädellä oksi-CMC:n ja DTP:n konsentraatioiden kautta.



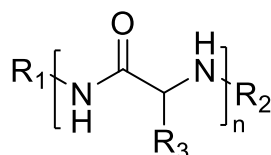
Kuva 16. Oksi-CMC/DTP hydrogeelin muodostaminen Schiffin emäsreaktion avulla.

4 Synteettiset polypeptidit

Proteiinien toiminta perustuu järjestäytyneeseen rakenteeseen, joka muodostuu proteiinin rungon vetysidosten kautta ja muiden aminohapposivuketjujen välillä olevien ei-kovalenttisten vuorovaikutusten kautta. Synteettiset polypeptidit ovat synteettisiä, proteiinia jäljitteleviä materiaaleja. Niiden runko on samanlainen kuin luonnossa esiintyvien proteiinien runko, joka

koostuu peptidisidoksilla toisissaan kiinni olevista aminohapoista. Juuri tämän vuoksi ne ovat luonnollisesti bioyhteensopivia ja biohajoavia, mikä mahdollistaa niiden käytön biolääketieteellisissä sovelluksissa, kuten lääkeaineiden kuljetuksessa, geenisiirrossa ja kudostekniikassa.⁵⁴

Synteettisillä polypeptideillä on erittäin laaja kemiallinen sivuketjujen monimuotoisuus, sillä ne koostuvat 21 luonnollisesta aminohaposta sekä lukuisista ei-luonnollisista aminohapoista (Kuva 17). Näihin sisältyy laajakirjo erilaisia hydrofobisia, hydrofiilisiä, ionisia ja ei-ionisia aminohappoja. Lisäksi aminohappojen sivuketjuihin voidaan helposti kiinnittää erilaisia funktionaalisia ryhmiä, kuten sokereita, erilaisia varautuneita tai reaktiivisia ryhmiä, tuomaan lisää monimuotoisuutta.⁵⁴



Kuva 17. Aminohappoketjun perusrakenne.

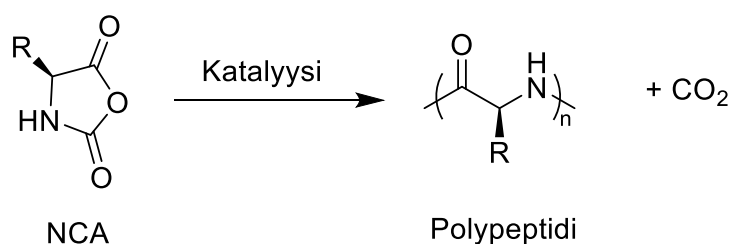
Luonnollisen yhteensopivuuden ja monimuotoisuuden lisäksi synteettiset polypeptidit pystyvät proteiinien tavoin muodostamaan sekundäärirakenteita esimerkiksi α -kierteitä ja β -levyjä molekyylin sisäisten vetysidosten avulla. Sekundäärirakenteiden muodostaminen mahdollistaa konformaatiospesifistisen itsejärjestäytymiskäyttäytymisen ja polypeptidien bioaktiivisuuden. Näistä syistä synteettisiä itsejärjestäytyviä polypeptidejä käytetäänkin hyvin paljon lähtöaineina injektoitavien hydrogeelien valmistuksessa.⁵⁴

Vaikka synteettiset polypeptidit pääsääntöisesti ovat ihanteellisia molekyylijä biomateriaaleiksi, niillä on kuitenkin joitakin rajoituksia, muun muassa konformaation joustavuus ja taipumus olla laskotumatta stabiileiksi rakenteiksi lyhyen pituuden vuoksi. Ne ovat myös huonosti liukenevia useisiin orgaanisiin liuottimiin ja veteen. Näitä ominaisuuksia pyritään parantamaan erilaisten kemiallisten ryhmien avulla ja muodostamalla monitoimipeptideitä.⁷

4.1 Synteettisten polypeptidien syntetisointimenetelmät

Tällä hetkellä synteettisiä polypeptidejä muodostetaan pääasiassa kolmella erilaisella menetelmällä, jotka ovat mikrobisynteesi,⁵⁵ kiinteän faasin peptidisynteesi (solid phase peptide synthesis) ja *N*-karboksianhydridien (NCA) ”renkaan avaus”-polymerointi (ROP). Lisäksi hyödynnetään valmiita helposti saatavilla olevia polypeptidilähtöaineita ja sivuketjujen modifiointia ennen tai jälkeen polymerisoinnin, millä pyritään tuomaan monipuolisuutta synteettisiin polypeptideihin.^{17,54} Huomattavaa edistystä synteettisten polypeptidien valmistukseen on tuonut NCA-monomeerien flash-kromatografinen puhdistustekniikka ja ”click”-synteesin hyödyntäminen polymerisaation jälkeisessä sivuryhmien muokkauksessa.¹⁷

”Renkaan avaus”-polymerisaatio (ROP) perustuu α -aminohappo *N*-karboksianhydridien (NCA) renkaan avaamiseen, jota voidaan aktivoida nukleofiilien (primääriset amiinit), emäksien (tertiääriset amiinit tai alkyylisoksidit), siirtymämetallikatalyyttien tai organopiiamiinien avulla (Kuva 18). Reaktio johtaa suoraan synteettisten polypeptidien muodostumiseen. Strategia on hyvin suoraviivainen ja lopputuloksena on polypeptidejä, joilla on tunnetut pääteryhmät, muokattava molekyylipaino ja kapea molekyylipainojakauma. ROP-strategian ei mieluisana puolena ovat kuitenkin monivaiheiset synteesit sekä uusien NCA-monomeerien puhdistus, joka usein on työlästä.¹⁷ ROP:n avulla voidaan valmistaa suuren molekyylipainon peptidejä suuressa mittakaavassa.⁵⁶



Kuva 18. Synteettisten polypeptidimateriaalien synteesireitti NCA-monomeerien renkaan avaus polymerisaation (ROP) kautta.

Ärsykesensitiivisyyttä ROP-tekniikalla valmistettuihin polymeereihin saadaan lisäämällä ärsykesensitiivisiä ryhmiä aminohappojen sivuketjuihin.¹⁷ Tähän on pääasiassa olemassa kaksi perusreittiä: funktionaalisen NCA-monomeerin polymerointi tai reaktiivisten sivuryhmien sisältävien NCA-monomeerien polymerisointi, jota seuraa polymerisoinnin jälkeinen modifikaatio.⁵⁷ Reaktiivisina ryhminä voidaan hyödyntää muun muassa alkeeneja, alkyynejä, tioleita, tioettereitä tai halogeeneja.⁵⁶ Molemmilla sivuketjujen modifiointitekniikoilla on

hyvät ja huonot puolensa. Funktionaalisten NCA-monomeerien polymerointi vaatii yleensä ennakkoinvestointeja NCA-monomeerien synteesiä ja puhdistusta varten, mutta lopputulos on täysin modifioituja polypeptideitä ja useiden modifikaatioiden liittäminen tapahtuu helposti ja hallitusti. Polymerisoinnin jälkeisessä modifioimisessa polypeptidien funktionalisuus voi olla epätäydellistä johtuen steerisistä ahtaudesta ja kytkentäreaktioiden saannot voivat olla huonoja. Lisäksi selektiivisyys ja liukoisuus rajoittavat monien reaktioiden käyttöä, koska ne eivät ole yhteensopivia polypeptidien kanssa.⁵⁷ Tässä tapauksessa kuitenkin ”click”-synteetit (atsidi-alkyynisykloadditioreaktio) ovat osoittautuneet hyvin hyödylliseksi menetelmäksi, jonka avulla vältetään erilaisten funktionaalisten monomeerien syntetisointi ja puhdistus sekä polymerisointiolosuhteiden optimointi.^{17,57}

Kiinteän faasin peptidisynteesissä suojattu aminohappo on kiinnitetty karboksyyli-ryhmän kautta kiinteään faasiin, joka voi olla esimerkiksi sidottu hydroksyyli- tai aminohartsiin. Tällöin saadaan aikaiseksi esteri- tai aminosidottu peptidi, joka tuottaa toisesta päästä joko happo- tai amidipeptidin. Ensimmäisen aminohapon lisäämisen jälkeen haluttu peptidisekvenssi kootaan CN-strategian avulla, eli polypeptidin C-päästä N-päähän poistamalla N-pään suojaus ja liittämällä siihen uusi aminohappo. Kyseistä prosessia toistetaan, kunnes haluttu sekvenssi on valmis ja lopuksi polypeptidi vapautetaan hartsista. Aminohappojen sivuketjut voidaan tarvittaessa suojata suojausryhmien avulla. Reagensseja reaktiossa on suuri ylimäärä, jotta kytkentäreaktiot saadaan vietyä loppuun saakka. Ylimääräiset reagenssit ja sivutuotteet voidaan erottaa liukenemattomasta polypeptidistä suodattamalla ja pesemällä. Kaikki synteesivaiheet voidaan suorittaa samassa astiassa ilman materiaalin siirtoa, mikä parantaa saantoa.⁵⁸

Polypeptidipohjaisia hydrogeelejä voidaan myös valmistaa luonnollisista materiaaleista, mutta yleisempää on kuitenkin hyödyntää synteettisiä materiaaleja. Luonnollisten polypeptidipohjaisten hydrogeelien, kuten elastiinin tai gelatiinin, haittoja ovat muun muassa puhdistusongelmat, heikko stabiilisuus ja heterogeeninen koostumus. Tällaisia ongelmia ei yleensä synteettisillä polypeptideillä esiinny.⁷

5 Polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit

Polypeptidipohjaisia injektoitavia hydrogeelejä valmistetaan pääasiassa fysikaalisten silloitusmenetelmien kautta, hyödyntäen peptidisekvenssien itsejärjestäytymistä heikkojen ei-

kovalenttisten vuorovaikutuksien avulla. Itsejärjestäytyminen ja siitä seuraava geeliytyminen saadaan aikaan ulkoisen ärsykkeen avulla, joka polypeptidien tapauksessa on usein lämpötila tai pH:n muutos.^{8,10,12} Itsejärjestäytyminen voi tapahtua esimerkiksi π - π -vuorovaikutusten, hydrofobisten tai sähköstaattisten vuorovaikutusten kautta. π - π -vuorovaikutus on aromaattisille yhdisteille tyypillinen vuorovaikutustyyppi, joka yleensä esiintyy π -elektronirikkaiden ja π -elektronivajaiden ryhmien välillä. π - π -vuorovaikutusta hyödynnetään erityisesti sellaisten peptidipohjaisten hydrogeelien muodostamisessa, joiden aminohapposekvenssi sisältää fenyylialaniinia tai tyrosiinia.¹⁸ Edellä mainittujen lisäksi molekyylien sisäisiä ja välisiä vetysidoksia hyödynnetään mekaanisesti vahvojen peptidihydrogeelien muodostamisessa. Erityisen tärkeässä roolissa ovat aminohappotähteiden väliset vetysidokset, jotka vaikuttavat peptidihydrogeelien laskostumiseen ja kokoontumiseen.¹¹

Polypeptidipohjaisia hydrogeelejä voidaan valmistaa myös kemiallisilla silloitusmenetelmillä, kuten entsyymaattisella silloittamisella,⁵⁹ tai polypeptidiketjujen aktiivisia reaktiivisia ryhmiä ja silloitusaineita hyödyntämällä.¹² Tällöin muodostetaan erilaisia kopolymeerejä, joissa peptidiryhmät ovat konjugaatiolla yhdistetty johonkin synteettiseen polymeeriin.¹⁰ Kopolymeerit pystyvät läpikäymään palautuvia sekundäärikonformaation muutoksia ja/tai hydrofobisia/hydrofiilisiä muutoksia olosuhteiden muuttumisen seurauksena. Tällaisia muutoksia ovat esimerkiksi hapettuminen, pelkistyminen, pH-muutos, entsyymit tai eksogeeniset ärsykkeet, kuten lämpötila ja valo.³²

Polypeptidipohjaisia materiaaleja hyödynnettäessä täytyy ottaa huomioon aminohappojen kiraalisuus ja kyky muodostaa erilaisia sekundäärirakenteita, sillä näillä voi olla vaikutusta muodostuvan hydrogeelin toimintaan ja ominaisuuksiin. Sekundäärirakenteiden erilaisuus ilmenee peptidihydrogeelien kuitujen itsejärjestäytymisessä ja laskostumisessa, mutta myös verkkorakenteiden siltasidosten muodostumisessa. Rakenteiden muodostumiseen vaikuttavat erityisesti aminohappotähteiden väliset vetysidokset¹¹ sekä muut kineettiset tekijät, kuten varaukset ja ionit,⁶⁰ mitkä puolestaan riippuvat aminohapposivuketjujen funktionaalisista ryhmistä ja niiden kemiallisesta yhteensopivuudesta koko polymeerin kanssa.⁶¹

Aminohapot ovat glysiiniä lukuun ottamatta pääsääntöisesti kiraalisia, joilla on luonnollinen L-muoto ja ei-luonnollinen D-muoto. Esimerkiksi Kang *et al.*⁶² ovat tutkineet poly(etyleeniglykoli)-poly(alaniini-fenyylialaniini):n (PEG-PAF) kahden eri kiraalisen muodon (PEG-L-PAF ja PEG-D-PAF) avulla kiraalisuuden vaikutusta lämpötilasensitiiviseen sooli-geelisiirtymään ja biohajoavuuteen. Molemmilla polymeereillä oli samanlainen sooli-geelisiirtymä ja itsejärjestäytymisominaisuudet. Merkittäviä eroja ilmeni kuitenkin hajoamisessa entsyymiliuoksessa ja hydrogeelin kestossa rottien ihon alaisessa kerroksessa. L-

muotoisen hydrogeelin koko pieneni viidessä päivässä ja se oli lähes hajonnut 15 päivässä, kun taas D-muotoinen hydrogeeli oli tiivis geeli vielä 15 päivän jälkeen. Lisäksi molempien hydrogeelien ympärille alkoi muodostua kollageenikapseli, mikä viittaa lievään kudosaärsytykseen. D-muotoisen hydrogeelin ympärille muodostui kuitenkin paksumpi kollageenikapseli, mikä viittaa mahdollisesti pahempaan akuuttiin tulehdustilaan D-muodolla kuin L-muodolla.

Pääsääntöisesti synteettisiin polypeptideihin pohjautuvat hydrogeelit hajoavat ainoastaan tiettyjen entsyymien toimesta *in vivo*, mutta poikkeuksena ovat reaktiivisille happilajeille alttiit rikkiä sisältävät hydrogeelit, josta esimerkkinä on kaksoissensitiivinen polypeptidipohjainen hydrogeeli.³⁵ Tämä hajoaa tioetterin hapettumisen seurauksena.

5.1 Lämpötilasensitiiviset polypeptidit

Polypeptidipohjaiset materiaalit ovat houkuttelevia materiaaleja lämpötilasensitiivisten hydrogeelien materiaaliksi johtuen niiden sopivasta sooli-geelisiirtymän lämpötilasta ja geelin muodostusominaisuuksista, joita voidaan kontrolloida muun muassa hydrofobisten ja hydrofiilisten vuorovaikutusten tasapainon kautta. Lisäksi polypeptidipohjaiset hydrogeelit eivät laske ympäristön pH:ta hajotessaan seurauksena ja niillä on alhainen kriittinen geeliytymispitoisuus (critical gelation concentration, CGC).^{7,63}

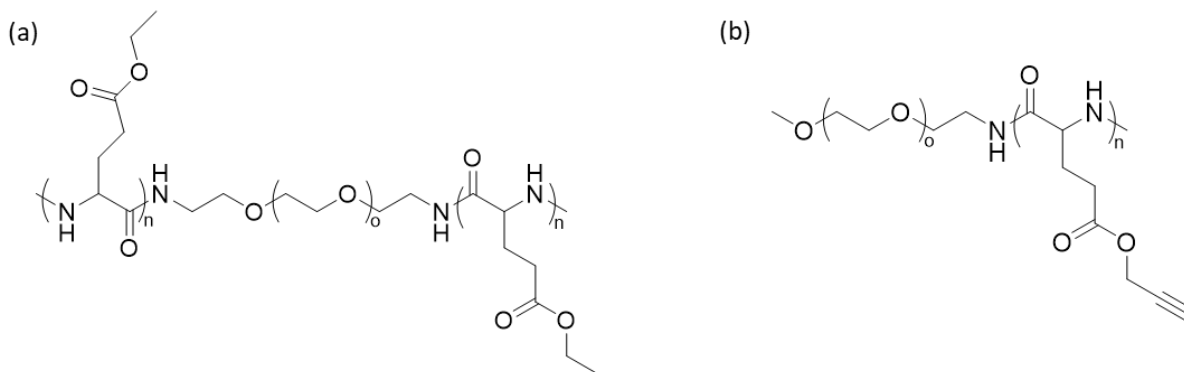
Lämpötilasensitiivisten polypeptidipohjaisten hydrogeelien geeliytymisominaisuuksiin voidaan vaikuttaa erityisesti aminohapposubstituenttien rakenteen ja ominaisuuksien kautta. Aminohapposekvenssin sekundaarisella rakenteella, erilaisilla hydrofobisten ja hydrofiilisten aminohappomonomeerien kopolymeereillä, hydrofiilisten ja hydrofobisten osioiden pituudella sekä polypeptidien sivuketjujen rakenteella on vaikutusta lämpötilasensitiivisten polypeptidipohjaisten hydrogeelien geeliytymisominaisuuksiin.^{7,16,63,64} Chen *et al.*⁶⁴ havainnoivat tutkimuksessaan, että hydrofobisen sivuryhmän pituus on vaikuttaa lämpötilasensitiivisten polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien geeliytymiskäyttäytymiseen ja sekundaarirakenteeseen. Lyhyemmillä sivuketjuilla (metyyli- ja etyyli-ryhmä) on alhaisempi CGC verrattuna pidempiin sivuketjuihin (*n*-propyyli- ja butyyli-ryhmä), mikä johtuu suuremmasta β -levy rakenteiden määrästä geeleissä. Lisäksi geeliytymisominaisuuksiin voidaan vaikuttaa polymeeriliuoksen konsentraatiolla, jolla voi olla myös vaikutusta viskositeettiin.^{16,65}

5.1.1 PEG-polypeptidit

Kaksois- tai kolmilohko peptidikopolymeerit koostuvat usein hydrofiilisestä PEG:sta tai PEO-PPO-PEO-polymeereistä sekä hydrofobisista polypeptidipohjaisista osista, kuten polyalaniini (PA), poly(alaniini-fenyyialaniini) (PAF), poly(etyylylgutamaatti) (PELG)⁶⁶ tai poly(etyylylgutamaattiglutamiinihappo) P(ELG-LG).^{7,65}

PEG-polypeptidit ovat yleensä jauhemaisia ja ne liukenevat helposti veteen. Erityisesti lämpötilasensitiivisillä PEG-polypeptidipohjaisilla kopolymerihydrogeeleillä on suhteellisen matala kriittinen geeliytymispitoisuus. Sooli-geelisiirtymä ei riipu PEG-polypeptidien tapauksessa vain PEG-ryhmien dehydraation ajamasta misellien muodostumisesta ja niiden tiivistymisestä, kuten luvussa 3.1 mainittiin, vaan myös sekundääristen konformaatioiden muodostumisesta. Täten sekundäärinen rakenne ei ainoastaan vaikuta itsejärjestäytymiseen vaan myös kontrolloi geeliytymisominaisuuksia. Hydrofiilisen PEG:n sivuketjun pituudella on myös vaikutusta sooli-geelisiirtymään.⁶⁵

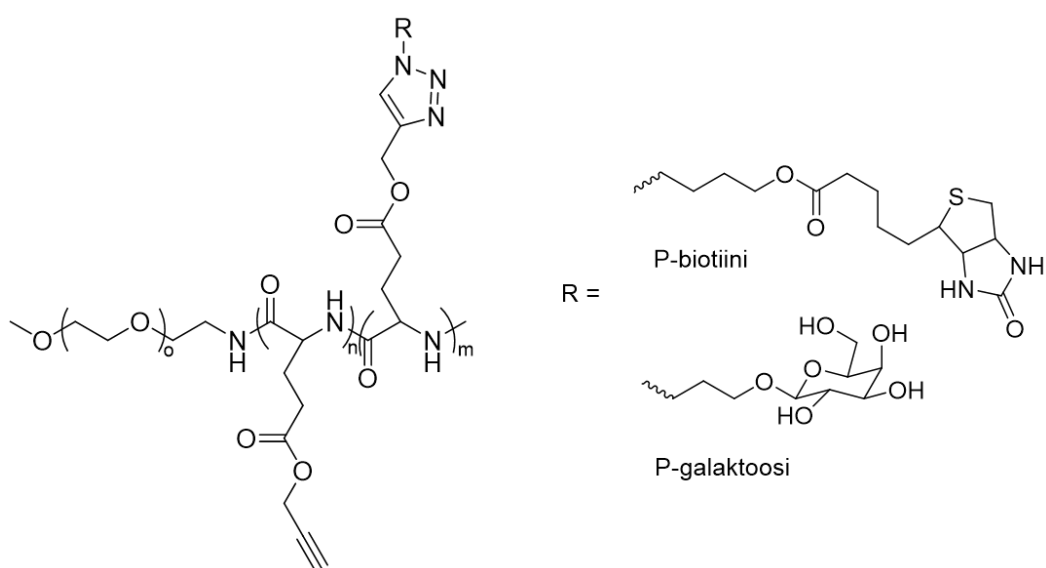
Kuvassa 19 on esitetty kaksi lämpötilasensitiivistä PEG:iin ja glutamaattiin (glutamiinihapon anioninen muoto) pohjautuvaa kopolymeriä: poly(etyylylgutamaatti)-poly(etyleeniglykoli)-poly(etyylylgutamaatti) (PELG-PEG-PELG, (a))⁶³ ja poly(etyleeniglykoli)-poly(propargyylylgutamaatti) (PEG-PPLG, (b)).⁶⁷ Molemmat kopolymerit kykenevät läpikäymään sooli-geelisiirtymän vasteena lämpötilan nousulle ja molempien tapauksessa polymeeriliuoksen konsentraation nostaminen laskee kriittistä geeliytymislämpötilaa. PELG-PEG-PELG:n tapauksessa se myös parantaa polymeeriliuoksen viskositeettia ja sitä myötä liuoksen injektointavuutta. Hydrogeeleillä on hyvä sytoyhteensopivuus ja ne ovat biohajoavia *in vitro* - ja *in vivo* -kokeiden perusteella.



Kuva 19. Lämpötilasensitiivisten polypeptidipohjaisten kopolymerien molekyyliarakenteet: poly(etyylylgutamaatti)-poly(etyleeniglykoli)-poly(etyylylgutamaatti) (PELG-PEG-PELG) (a) ja poly(etyleeniglykoli)-poly(propargyylylgutamaatti) (PEG-PPLG) (b).

Molempien kopolymeerien sooli-geelisiirtymän on ehdotettu tapahtuvan hyvin samalla tavalla. Kopolymeerit järjestäytyvät miselleiksi vesiliuoksessa alemmassa lämpötilassa, joissa hydrofiilinen PEG-osa toimii ytimenä ja hydrofobinen PELG- tai PPLG-osa toimii kuorena. Tässä tilanteessa kopolymeerin konsentraatio on suurempi kuin misellien konsentraatio. Lämpötilan nousun seurauksena PEG-osa dehydratoituu ja PELG- tai PPLG-osan sekundäärinen β -levy-rakenne voimistuu, mikä saa aikaan misellien aggregoitumisen. Tämän seurauksena liuos menettää viskositeettia ja muodostaa verkoston, joka johtaa geelin muodostumiseen. Nämä kopolymeerit siis muodostavat geelin lämpötilasensitiivisille hydrogeeleille tyypillisellä tavalla.^{63,67}

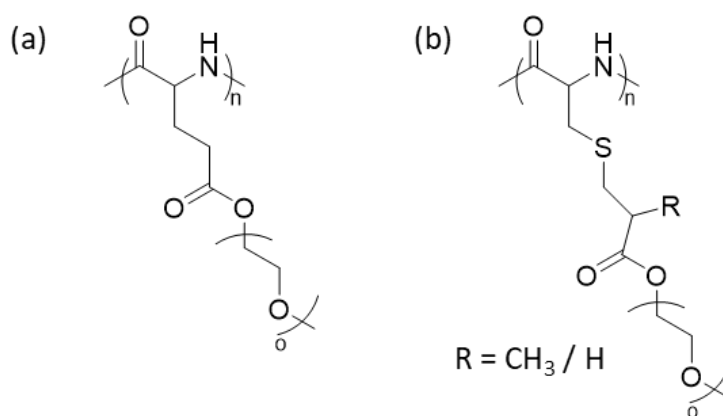
Kopolymeerin PEG-PPLG polypeptidiosassa oleva alkynyyliiryhmä mahdollistaa erilaisten bioaktiivisten molekyylien lisäämisen kopolymeeriin. Niiden avulla voidaan mahdollisesti parantaa solujen ja hydrogeelien välistä vuorovaikutusta. Cheng *et al.*⁶⁷ kokeilivat lisätä biotiiniä (P-biotiini) ja galaktoosia (P-galaktoosi) PEG-PPLG kopolymeeriin ”click”-kemialla hyödyntäen (Kuva 20). Myös muokkauksen jälkeen kopolymeeri osoitti sooli-geelisiirtymää vasteena lämpötilan nousulle. P-galaktoosi osoitti suotuisampaa geelitymislämpötilaa johtuen hydrofiilisuuden kasvusta, mutta P-biotiinin kohdalla geelitymislämpötila aleni verrattuna modifioimattomaan PEG-PPLG:iin. P-galaktoosihydrogeelissä galaktoosi on hydrogeelin pinnalla, mikä edistää soluadheesiota. Tämä johtuu todennäköisesti galaktoosin tehostamasta fibronectiinin adsorptiosta solunulkoiseen matriisiin. Fibronectiinillä taas on ratkaiseva rooli soluadheesion välityksessä. P-biotiinihydrogeelissä biotiini asettuu ”ytimeen”, minkä seurauksena hydrogeelin pinnalle asettui runsaasti PEG-osia. Tämä taas rajoitti soluadheesiota.



Kuva 20. Kopolymeeri PEG-PPLG ja bioaktiiviset molekyylit biotiini ja galaktoosi.

Hydrofiilinen PEG-osa voi toimia myös aminohapon sivuryhmänä, jolloin polymeerin runko koostuu polypeptideistä. PEG:n liittäminen polypeptidien sivuryhmäksi ei kuitenkaan kaikissa tapauksissa tuo polypeptideille lämpötilasensitiivisiä ominaisuuksia, vaikka ne muodostaisivatkin stabiileja sekundäärirakenteita vesiympäristössä. Syynä tähän on todennäköisesti se, että PEG-sivuketjullisten polypeptidien liukoisuusominaisuudet eivät riipu ainoastaan sivuketjujen rakenteesta, vaan myös niiden luontaisesta sekundäärirakenteesta.⁶¹

Kuvassa 21 on esitetty kaksi polypeptideistä koostuvaa polymeeriä, joilla on aminohappojen sivuketjuna PEG: poly-L-glutamaattietyleeniglykoli (poly-L-EG₀-Glu, (a))⁶⁸ ja poly-L-kysteiinioligoetyleeniglykoli (poly-EG₀-MA-C / poly-EG₀-A-C, (b)).⁶¹ Molempien polymeerien liukoisuus riippuu aminohapon sivuketjun pituudesta ja liukoisuus paranee sivuketjun pidentyessä. Lisäksi molemmilla polymeereillä havaitaan palautuvaa lämpötilasensitiivistä käytöstä. Molempien polymeerien lämpötilasensitiivinen käytös johtuu PEG-osion dehydraatiosta lämpötilan nousun seurauksena, joka saa aikaan polypeptidien itsejärjestäytymisen. Poly-L-glutamaattietyleeniglykolipolymeereillä kriittistä geeliytymislämpötilaa voidaan muuttaa muodostamalla kopolymeerejä eri glutamaattietyleeniglykolimonomeereistä, joilla on eri pituiset PEG-sivuketjut.^{61,68}



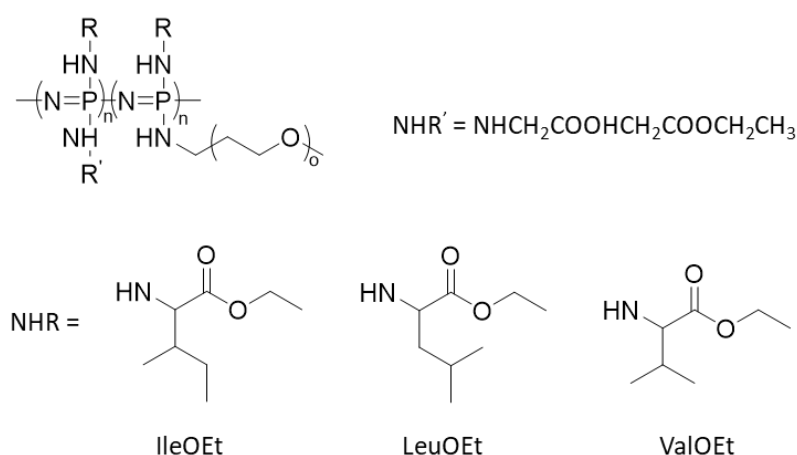
Kuva 21. Poly-L-glutamaattietyleeniglykolin (poly-L-EG₀-Glu, (a)) ja poly-L-kysteiinioligoetyleeniglykolin (poly-EG₀-MA-C / poly-EG₀-A-C, (b)) molekyyliarakenteet.

5.1.2 Polyfosfatseenit

Polyfosfatseenit ovat epäorgaanisia tai orgaanisia hybridipolymeerejä, joita voidaan käyttää injektoitavien lämpötilasensitiivisten polypeptidipohjaisten hydrogeelien valmistuksessa. Niiden runko koostuu vuorottelevista fosfori- ja typpi-atomeista, jossa kuhunkin fosforiatomiin

on liitetty kaksi sivuryhmää (Kuva 5c).⁶⁹ Lämpötilasensitiivisten polypeptidien tapauksessa polyfosfatseenirunkoon on kiinnittynyt hydrofiilistä PEG:a ja aminohappopohjaisia hydrofobisia ryhmiä.^{16,21} Hydrofobisina ryhminä voivat toimia aminohaponesterit ja erilaiset di-, tri-, ja oligopeptidit.⁶⁵

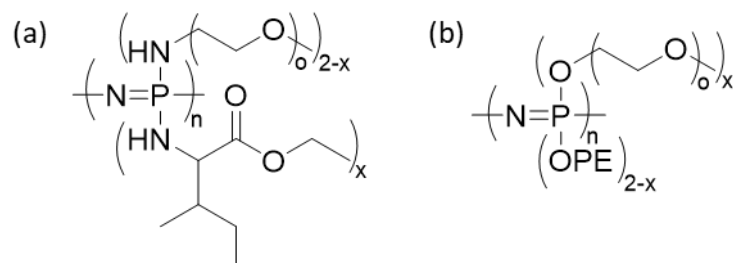
Song *et al.*⁷⁰ ovat tutkineet lämpötilasensitiivisiä poly(fosfatseeni)geelejä, joissa sivuryhminä on aminometyyli-poly(etyleeniglykolia) (AMPEG), erilaisia hydrofobisia aminohappoestereitä, kuten isoleusiinietyyliesteri (IleOEt), leusiinietyyliesteri (LeuOEt), valiinietyyliesteri (ValOEt) ja depsiptidi-etyyliesteri (Kuva 22), joka on hydrolyysille herkkä ryhmä ja nopeuttaa polymeerin hajomista. Polymeerien geeliytymisominaisuuksiin vaikuttavat AMPEG-ketjun pituus, polymeeriliuoksen konsentraatio ja substituenttien rakenne eli sivuketjun aminohappoesterien moolisuhde ja sen hydrofobisuus.



Kuva 22. Polymeerin fosfatseenirunko ja sen sivuryhmät aminometyyli-poly(etyleeniglykoli), depsiptidietyyliesteri (NHR') ja aminohappoesterit IleOEt, LeuOEt ja ValOEt.

Mitä hydrofobisempi aminohappoesterin sivuryhmä on, sitä paremmat ovat polymeerin geeliytymisominaisuudet. Esimerkiksi polymeerin, jossa oli IleOEt tai LeuOEt, viskositeetti kasvoi nopeasti lämpötilan noustessa. Lämpötilan ollessa alle kriittisen lämpötilan polymeeriliuos on sooltilassa. Lämpötilan noustessa kriittiseen lämpötilaan polymeeriliuos saavuttaa maksimi viskositeetin ja muodostuu läpinäkyvä hydrogeeli aminohappoesterien (IleOEt ja LeuOEt) ja polymeerirungon välisten hydrofobisten vuorovaikutuksien kautta. Läpinäkyvä hydrogeeli muuttuu läpinäkymättömäksi geeliksi edelleen lämpötilan noustessa. Tämä johtaa hydrogeelin kutistumiseen ja lopulta geeli hajoaa takaisin sameaksi sooliksi. Aminohappoesterisivuryhmän ValOEt sisältävä polymeeri ei ilmentänyt samanlaista viskositeetin lisääntymistä lämpötilan noustessa.⁷⁰

Song *et al.*⁷¹ ovat valmistaneet edellä mainitun polyfosfatseenipolymeerin kaltaisen polymeerin, mutta ilman depsiptidiä. Polymeerissä sivuryhminä oli isoleusiinietyyliesteri ja aminometyyli-poly(etyyliyglykoli) (Kuva 23a). Kyseinen polymeeri osoitti palautuvaa sooli-geelisiirtymää vesiliuoksessa lämpötilan nousun seurauksena. Hydrogeeli todettiin kuitenkin myöhemmin todettiin liian heikoksi lääkeaineiden kuljetussovelluksiin.⁷²



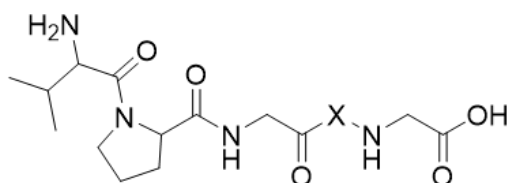
Kuva 23. Polyfosfatseenipolymeerien molekyylirakenteet, jossa polymeerissä (a) sivuryhminä isoleusiini-etyyliesteri ja aminometyyli-poly(etyyliyglykoli) ja polymeerissä (b) poly(etyyliyglykoli) ja oligopeptidi.

Tämän seurauksena Sohn *et al.*⁷² havaitsivat, että hyödyntämällä oligopeptidejä (OPE) PEG:n kanssa polymeerin sivuryhminä (Kuva 23b), saadaan aikaiseksi mekaanisesti vahvempia geelejä verrattuna polymeereihin, jossa sivuryhminä toimi aminometyyli-PEG ja yksittäinen aminohappoesteri. Polymeerin (b) oligopeptidisivuryhminä kokeiltiin useampaa tripeptidietyyliesteriä ja yhtä tetrapeptidietyyliesteriä. Kriittinen geelitymislämpötila ja polymeeriliuoksen maksimi viskositeetti vaihteli laajalla alueella riippuen oligopeptidin rakenteesta ja mooliosuudesta polymeerissä. Lisäksi polymeerin konsentraatiolla oli vaikutusta geelitymisominaisuuksiin. Vesiliuoksessa polymeerit osoittivat neljän erilaisen faasin siirtymäkäytöstä lämpötilan nousun seurauksena (läpinäkyvä sooli, läpinäkyvä geeli, läpinäkymätön geeli ja samea sooli) samankaltaisesti IleOEt- ja LeuOEt-ryhmiä sisältävien polymeerien kanssa. Polymeerien geelitymisen oletetaan johtuvan polymeerinrungon ja hydrofobisten oligopeptidisivuryhmien välisistä vuorovaikutuksista, jotka muodostavat fysikaalisia siltasidoksia.⁷²

5.1.3 Elastiini ja elastiinin kaltaiset polypeptidit

Elastiini on liukenematon proteiini, jota esiintyy sidekudoksissa ja joka antaa elastisuutta ja joustavuutta kudosten venymiselle. Se koostuu hydrofobisista osista, joissa on glysiiniä, valiinia ja proliinia, sekä silloittavista osista, joissa voi olla muun muassa lysiniä ja alaniinia. Elastiinia voidaan syntetisoida liukoisesta tropoelastiinista, joka koostuu lysiinin avulla silloittuvista, vuorottelevista hydrofobisista ja hydrofiilisista osista. Luonnollinen elastiini on kuitenkin erittäin vaikea puhdistaa ja sillä on taipumus kalkkeutua. Sen käyttö on hyvin vähäistä lukuun ottamatta kudostekniikkaa, jossa sitä voidaan hyödyntää geeli- tai kuitumuodossa injektoitavana kudosten tukirunkona (scaffold).^{7,8}

Elastiinin kaltaiset polypeptidit (ELP) ovat keinotekoisia polymeerejä, jotka on johdettu tropoelastiinin hydrofobisesta osasta. Ne muodostuvat Val-Pro-Gly-X-Gly (VPGXG) pentapeptidi-yksiköistä, jossa X voi olla mikä tahansa muu aminohappo pois lukien proliini (Kuva 24). ELP:t voivat toimia lämpötilasensitiivisinä polypeptideinä, koska ne osoittavat käänteistä lämpötilafaasimuutosta (inverse temperature phase transition), joka on hyvin samankaltainen ilmiö kuin luvussa 3.1 kuvailtu LCST sooli-geelisiirtymä.^{8,73,74} Matalassa lämpötilassa ELP:t ovat liukoisia ja sivuketjujen rakenne on epäjärjestäytynyt. Lämpötilan noustessa ELP:t muuttuvat ei-liukoisiksi ja järjestäytyvät kriittisessä lämpötilassa, jota kutsutaan käänteiseksi muutoslämpötilaksi T_i (inverse transition temperature). Käänteistä muutoslämpötilaa voidaan säätää hyvinkin tarkasti 0-100 °C välillä muutaman asteen vaihteluvälillä. Käänteiseen muutoslämpötilaan vaikuttavat monet muuttujat mukaan lukien aminohapposekvenssi, sivuketjun pituus, polypeptidin konsentraatio sekä lioksen konsentraatio ja tyyppi. Esimerkiksi hydrofobinen ”vieras aminohappo” X laskee muutoslämpötilaa, ioniset ja polaariset taas nostavat sitä.⁷³



Kuva 24. Elastiinin kaltaisen polypeptidin pentapeptidi-yksikön molekyyli rakenne, jossa X on ”vieras aminohappo”.

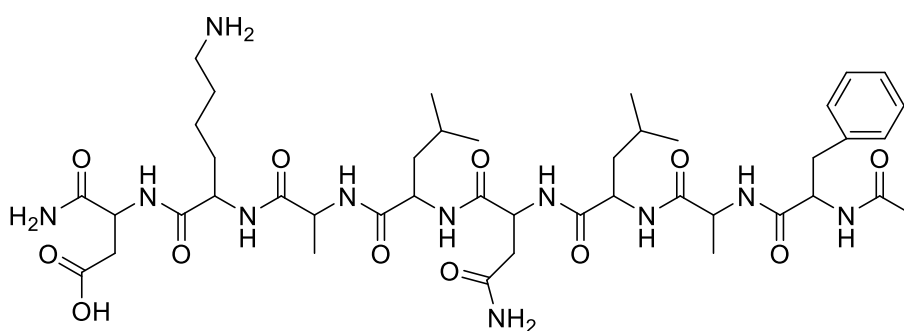
Peptidit, joissa on reaktiivisia sivuketjuja, voidaan helposti liittää ELP-sekvenssiin joko polypeptidin päähän tai pentapeptidiyksiöiden väliin. Lisäksi ELP:n rakenteeseen voidaan

lisätä silloituskohtia esimerkiksi lääkeaineille, erilaisille ligandeille ja kuvantamisaineille vaarantamatta niiden lämpötilasensitiivistä käytöstä. Mahdollisia sovelluskohteita elastiinin kaltaisille polypeptideille ovatkin erityisesti lääkeaineiden kuljetus- ja kudostekniikkasovellukset.^{73,74}

5.2 pH-sensitiiviset polypeptidit

Itsejärjestäytyvät pH-sensitiiviset polypeptidihydrogeelit ovat osoittautuneet erittäin potentiaalisiksi paikallisiksi lääkeaineiden kuljetusalustoiksi. pH-sensitiiviset polypeptidihydrogeelit muodostuvat pääsääntöisesti itsejärjestäytymisen kautta, jota aktivoi ympäristön muuttuva pH. Hydrofiilisten ja hydrofobisten ryhmien tasapaino vaikuttaa pH-sensitiivisten peptidihydrogeelin kykyyn itsejärjestäytyä vesiliuoksessa.

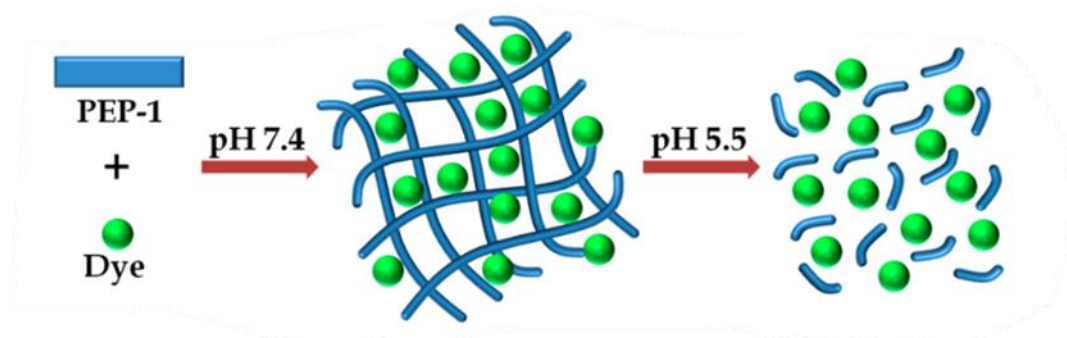
Ghosh *et al.*⁷⁵ syntetisoivat amfifiilisen polypeptidin (PEP1; Kuva 25), joka itsejärjestäytyy vahvaksi hydrogeeliksi fysiologisessa pH:ssa ilmentäen β -levysekundäärirakennetta. Neutraaleissa olosuhteissa itsejärjestäytyminen tapahtuu aspargiinihapon ja lysiinin välillä vallitsevan sopivan sähköstaattisen vetovoiman vuoksi. Sähköstaattisen repulsion vähentyminen johtaa pidempien, toisiinsa kietoutuvien nanokuitujen muodostumiseen vahvan hydrogeelin muodostumiseen. Hydrogeelin lujutta kasvattaa myös aminohapposivuketjujen muodostamat vetysidokset ja aromaattiset vuorovaikutukset.



Kuva 25. PEP1:n (Asp-Lys-Ala-Leu-Asn-Leu-Ala-Phe) molekyyli rakenne.

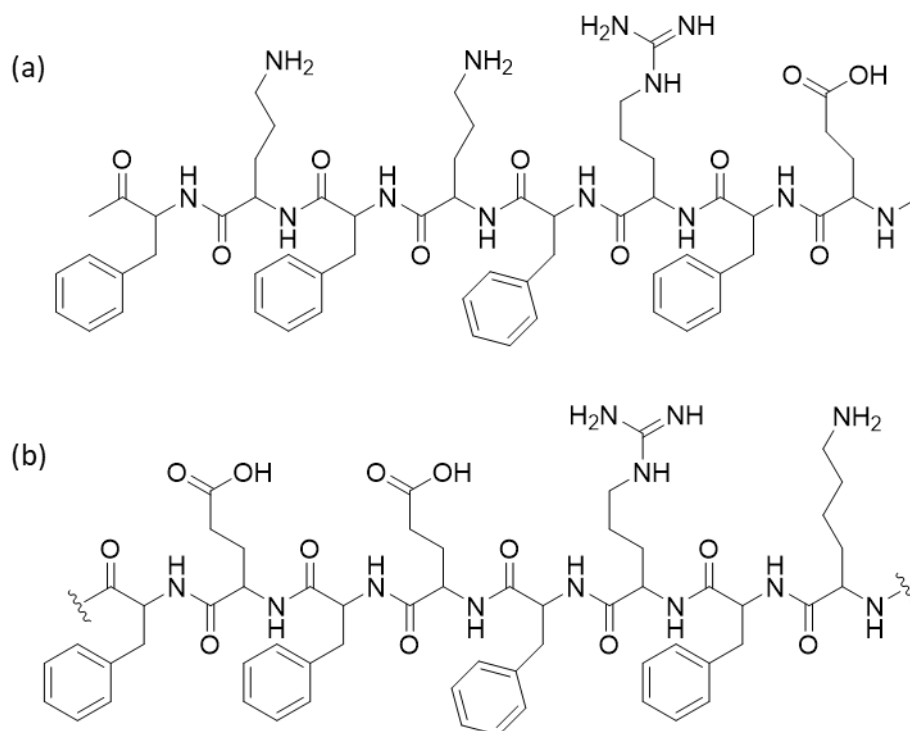
Muodostunut peptidihydrogeeli on erittäin herkkä pH-muutoksille ja sen sekundäärinen rakenne voi romahtaa pH:n nousun ja laskun seurauksena. Syynä tähän on aminohapposivuketjujen ionisaatio happamassa ja emäksisessä ympäristössä ja siitä johtuvan kasvava repulsio. Polypeptidihydrogeelin pH-sensitiivistä käytöstä tutkittiin hydrogeeliin

kapseloidun väriaineen vapautuksen avulla (Kuva 26). Havaittiin, että väriaine vapautui huomattavasti nopeammin hieman happamassa ympäristössä verrattuna neutraaliin ympäristöön.⁷⁵



Kuva 26. Mallinnus pH:n vaikutuksesta polypeptidi hydrogeelin itsejärjestäytymiseen ja väriaineen vapauttamiseen. Reprinted with permission from⁷⁵. Copyright 2019 American Chemical Society.

FOE- (FOFOFRFE, jossa O on ortiniini)⁷⁶ ja FER-8 (FEFEFRFK) -oktopeptidit⁷⁷ (Kuva 27) itsejärjestäytyvät neutraalissa pH:ssa stabiiliksi geeliksi. Happamassa ympäristössä, esimerkiksi syöpäkasvaimen mikroympäristössä, polypeptidit muuttuvat ei-järjestäytyneiksi ja hajoavat nestemäisiksi. FOE-oktopeptidi muodostaa stabiilin hydrogeelin neutraalissa pH:ssa. Selkeästi happamassa pH:ssa (5,8) FOE on nestemäisessä muodossa. Kun pH:ta nostetaan muodostuu ensin tasalaatuisia nanopartikkeleita (nanosphere), minkä jälkeen muodostuu kuituja (pH 6,5) ja lopuksi neutraalissa pH:ssa geelin verkkorakenne.⁷⁶



Kuva 27. Vesiliuoksessa itsejärjestäytyvien FOE- (FOFOFRFE (a)) ja FER-8-oktopeptidien (FEFEFRFK (b)) molekyyliarakenteet.

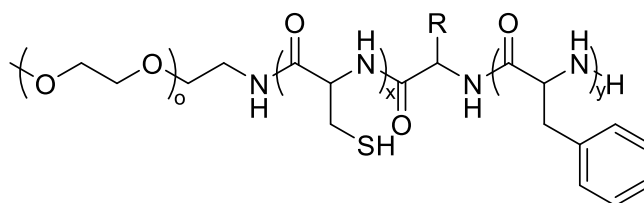
Samoin kuin FOE-oktopeptidi myös FER-8-oktopeptidi muodostaa stabiilin hydrogeelin neutraalissa pH:ssa ja happamassa ympäristössä hydrogeelin hajoaminen on nopeampaa kuin neutraalissa. FER-8-hydrogeelin kykyä toimia lääkeaineen antojärjestelmänä tutkittiin paklitakseli-syöpälääkkeellä. Happamassa ympäristössä (pH 5.5) hydrogeeli osoitti tasaista lääkeaineen vapautumista melkein viikon ajan.⁷⁷

5.3 Redox-sensitiiviset polypeptidit

Redox-sensitiiviset polypeptidit voivat soveltua lääkeaineiden ja geenien kuljetukseen, mutta erityisesti syöpähoitoihin.¹⁷ Muutama luonnollinen aminohappo (kysteini ja metioniini) sisältää rikkiä, joka mahdollistaa tiolikemian ja redox-sensitiivisyyden hyödyntämisen polypeptidipohjaisten hydrogeelien toiminnassa. Pääsääntöisesti polypeptidipohjaisten redox-sensitiivisten hydrogeelien toiminta perustuu disulfididoksen pelkistymiseen tai tioetteriryhmän hapettumiseen. Polypeptidipohjaisiin polymeereihin voidaan syntetisoida disulfididosis kahdella eri tavalla joko hyödyntäen disulfididoksen sisältävää PEG:a

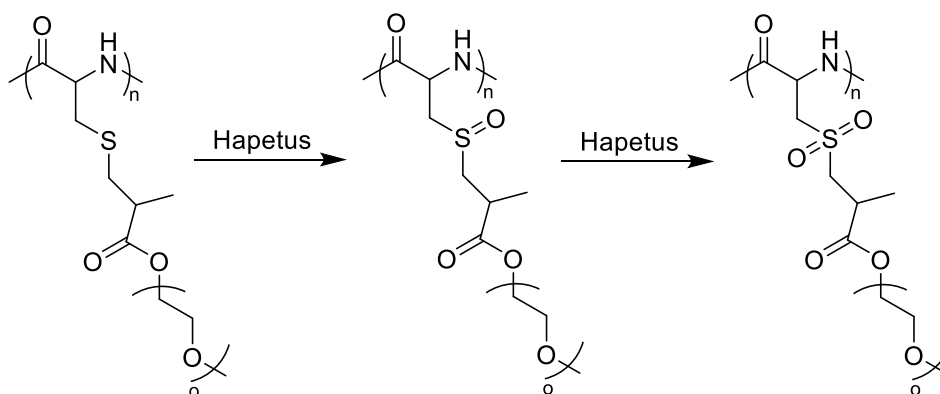
initaattorina tai käyttämällä poly(kysteiniä) yhtenä polymeerin komponenttina.¹⁷ Luvussa 3.3 mainittua solunsisäisen ja solunulkoisen glutationin pitoisuuseroa ja reaktiivisten happilajien muodostumista hyödynnetään polypeptidipohjaisten hydrogeelien redox-sensitiivisyyden aktivoinnissa.

Zhang *et al.*⁷⁸ ovat suunnitelleet lääkeaineiden kuljetusta varten poly(etyleeniglykoli)-polykysteini-polyfenyyialaniini (PEG-PCys-PPhe) kopolymerin (Kuva 28), joka voi itsejärjestäytyä miselliksi vesiliuoksessa. Miselleillä on havaittavissa ydin-kuori-kehä rakenne. Hydrofiilinen PEG-osa muodostaa ulkoisen kehä rakenteen, PCys-osa muodostaa kuoren, josta tioliryhmät voivat muodostaa siltasidoksia, ja hydrofobinen PPhe-osa muodostaa ytimen. Kysteinin tioliryhmät voivat muodostaa hapettumisen seurauksena siltasidoksina toimivia disulfididoksia. Siltasidosten muodostuminen pitää misellirakenteen kasassa, parantaa muodostuneen hydrogeelin kestävyttä ja vähentää lääkeaineen vapautumista solun ulkopuolisessa ympäristössä. Solun sisällä siltasidosten disulfididokset pelkistyvät takaisin tioliryhmiksi korkean GSH-pitoisuuden vuoksi eli ne katkeavat ja misellin rakenne hajoaa, joka taas edistää lääkeaineen vapautumista.



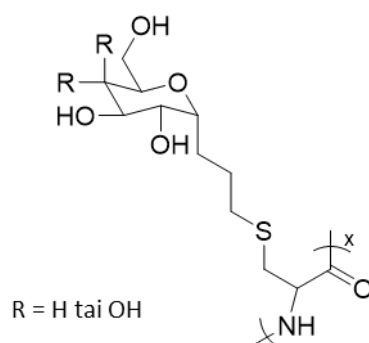
Kuva 28. Kopolymerin poly(etyleeniglykoli)-polykysteini-polyfenyyialaniini (PEG-PCys-PPhe) molekyyli rakenne.

Hapettamalla tioetteriryhmiä saadaan aikaiseksi konformaatiomuutoksia. Aiemmin luvussa 5.1.1 esitelty lämpötilasensitiivinen kopolymeri poly-L-kysteinioligoetyleeniglykoli on osoittanut jatkotutkimuksissa myös redox-sensitiivistä käytöstä.⁷⁹ Kysteinin aminohappotähteestä lähtöisin olevan tioetterin hapettaminen (Kuva 29) kasvattaa kopolymerin hydrofiilisyyttä, parantaa sen vesiliukoisuutta, nostaa LCST-lämpötilaa sekä mahdollistaa lääkeaineiden vapautuksen hydrogeelistä. Hapettamisen seurauksena kopolymerin rakenne muuttui β -levystä ”random coil” -rakenteeseen hajottaen lämpötilasensitiivisesti muodostuneen misellirakenteen, jonka seurauksena lääkeaine pääsee vapautumaan hydrogeelistä.



Kuva 29. Poly-L-kysteinioligoetyleeniglykolin kopolymerin hapettuminen sulfoksidiksi ja sulfoniksi.

Deming ja Kramer⁸⁰ syntetisoivat glykopolypeptidejä (Kuva 30), joilla tapahtuu konformaatiomuutoksia hapettumisen seurauksena. Tioetteriryhmän hapettaminen polaariseksi sulfoniryhmäksi aiheuttaa konformaatiomuutoksen α -kierteestä ”random coil” -rakenteeksi johtuen sulfoniryhmien voimakkaasta vuorovaikutuksesta vesimolekyylien kanssa.



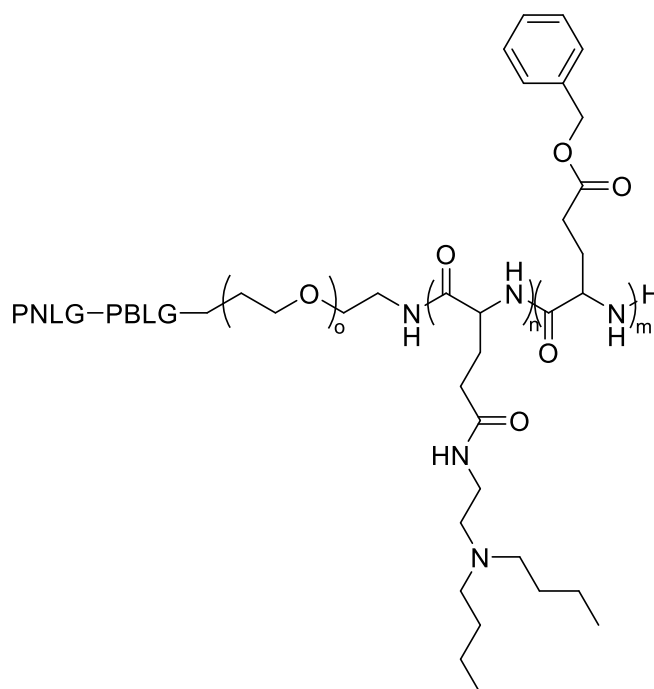
Kuva 30. Glykopolypeptidin molekyyli rakenne.

Edellä kuvatut hydrogeelisysteemit voisivat toimia esimerkiksi lääkeaineiden kuljetuksessa tulehtuneille kudosalueille. Tulehtuneiden kudosaluiden ympäristö on happirikkaampi verrattuna normaaleihin kudoksiin johtuen ylimääräisestä ROS:ien tuotannosta, mikä mahdollistaa rikkiä sisältävien ryhmien hapettumisen ja konformaatiomuutoksen myötä tapahtuvan lääkeaineiden vapautumisen.

5.4 Kaksoissensitiiviset polypeptidit

Polypeptidipohjaiset injektoitavat hydrogeelit voivat myös olla kaksoissensitiivisiä. Polypeptidipohjaisten hydrogeelien tapauksessa polymeeri voidaan muodostaa ominaisuuksiltaan erilaisista aminohapoista tai ärsykesensitiivisyyttä voidaan tuoda sensitiivisillä osilla, kuten lämpösensitiivisen PEG:n avulla.

Turabee *et al.*¹¹ esittävät kationisen pH- ja lämpötilasensitiivisen bioyhteensopivan ja biohajoavan injektoitavan polypeptidihydrogeelin, joka voisi olla sopiva kuljettamaan ihmisen kasvuhormonia (hGH). Hydrogeeli muodostuu kopolymeeristä poly[(2-(dibutyylimino)etyyli-L-glutamaatti)-ko-(γ -bentsyyli-L-glutamaatti)]-poly(etyleeniglykoli)-b-poly[(2-(dibutyylimino)etyyli-L-glutamaatti)-ko-(γ -bentsyyli-L-glutamaatti)] (PNLG-ko-PBLG-b-PEG-b-PBLG-ko-PNLG) (Kuva 31). Tämä polypeptidi pohjautuu glutamaattiin, johon on liitetty erilaisia sivuryhmiä.

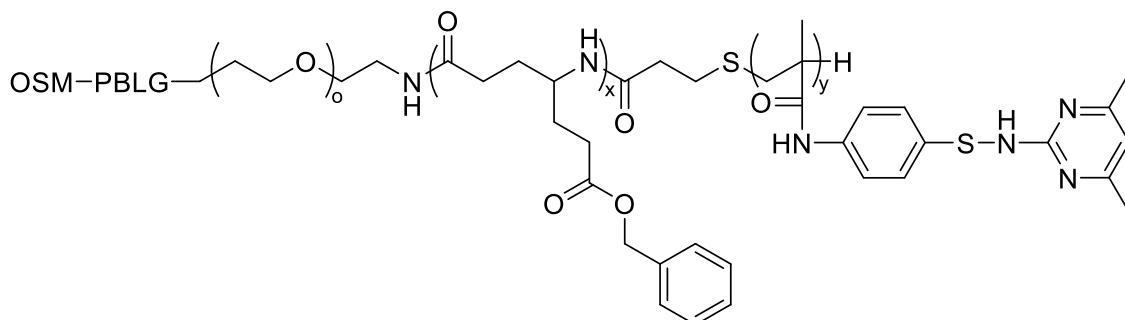


Kuva 31. pH- ja lämpötilasensitiivisen polypeptidihydrogeelin kationisen kopolymeerin (PNLG-ko-PBLG-b-PEG-b-PBLG-ko-PNLG) molekyyli rakenne.

Kopolymeerillä on tyypillinen pH- ja lämpötilasensitiivinen polymeerirakenne eli amfiifiiliset pH-sensitiiviset osiot ovat polymeerin päissä ja polymeerin ”ydin” on lämpötilasensitiivinen. Polypeptidikopolymeerin lämpötilasensitiivinen ”ydin” koostuu hydrofiilisestä PEG:stä ja hydrofobisesta PBLG:sta. pH-sensitiiviset osat koostuvat PNLG:sta, joka on liukoinen

matalassa pH:ssa johtuen tertiäärisen amiinin protonoitumisesta. Korkeassa pH:ssa amiiniryhmä deprotonoituu ja PNLG:n hydrofobiset ominaisuudet lisääntyvät. Amfifiilisen osien vuoksi kopolymeeri muodostaa verkostoja alhaisessa pH:ssa ja lämpötilassa, mutta pysyy nestemäisenä. Korkeammassa pH:ssa ja lämpötilassa tapahtuu aggregoitumista PEG:n dehydraation vuoksi. Tämä johtaa sooli-geelisiirtymään fysiologisissa olosuhteissa (pH 7,4; 37 °C), jota PNLG:n deprotonoituminen nopeuttaa edelleen. Geelin mekaanista lujuutta kasvattava amidisidosten muodostamat vetysidokset. Hydrofobinen PBLG ja kationinen PNLG voivat kompleksoitua anionisen hGH:n kanssa hydrofobisilla ja ionisilla vuorovaikutuksilla kautta. hHG-ladattu peptidihydrogeeli kykenee vapauttamaan hHG:tä noin viikon ajan.¹¹

Turabee *et al.*⁸¹ ovat raportoineet injektoitavan anionisen pH- ja lämpötilasensitiivisen polypeptidipohjaisen kopolymeerin OSM-b-PBLG-b-PEG-b-PBLG-b-OSM (Kuva 32), joka on sopiva kationisten proteiinien kuljettamiseen. Kopolymeeri on rakenteeltaan hyvin samankaltainen kuin edellä kuvattu PNLG-PBLG-PEG-PBLG-PNLG. Se koostuu hydrofiilisestä PEG:stä, lämpötilasensitiivisestä PBLG:stä ja pH-sensitiivisenä ryhmänä toimii OSM (oligo(sulfametatsiini)) PNLG:n sijasta.

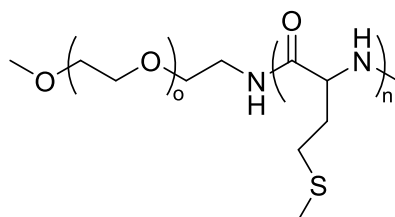


Kuva 32. pH- ja lämpötilasensitiivisen polypeptidihydrogeelin anionisen kopolymeerin OSM-b-PBLG-b-PEG-b-PBLG-b-OSM molekyyli rakenne.

Korkeassa pH:ssa ja matalassa lämpötilassa (pH 8,3; 23 °C) sulfonamidi-ryhmät ionisoituvat ja kopolymeeri on hydrofiilinen. Negatiivisesti varautuneiden OSM-osien sähköstaattinen repulsiio johtaa virtaavaan kopolymeeriliuokseen. Fysiologisissa olosuhteissa sulfonamidi ryhmät de-ionisoituvat ja OSM-ryhmät muuttuvat hydrofobisiksi, eikä kopolymeeriliuos enää liiku. Toisin sanoen sooli-geelisiirtymä tapahtuu fysiologisissa olosuhteissa. Lämpötilan nostaminen lisää kopolymeerin hydrofobisuutta luonnollisesti johtuen PBLG-osista.⁸¹

Xu *et al.*³⁵ ovat kehittäneet lämpötila- ja redox-sensitiivinen, hapetukseen perustuvan polypeptidipohjaisen hydrogeelin poly(etyleeniglykoli)-poly(metioniini) (PEG-PMet; Kuva 33), jossa PEG on hydrofiilinen osa ja Pmet on hydrofobinen osa. Tämä kaksoislohkopolymeeri

läpikäy sooli-geelisiirtymän lämpötilan noustessa. Geelin muodostuslämpötila osuu fysiologiselle alueelle ja se olisi mahdollista injektoida kehoon, koska polymeerivesiliuoksella on matala viskositeetti alhaisessa lämpötilassa.



Kuva 33. Lämpötila- ja redox-sensitiivinen polypeptidihydrogeelin kaksoislohkopolymeerin poly(etyleeniglykoli)-poly(metioniini) (PEG-PMet) molekyyli rakenne.

Alhainen viskositeetti matalassa lämpötilassa mahdollistaa myös bioaktiivisten aineiden sekoittamisen esiastevesiliuokseen ennen injektiota. Polymeerin geelinmuodostus lämpötila riippuu polymeerin konsentraatiosta ja PMet-osion pituudesta. Vakiokonsentraatiossa geelin muodostuslämpötila laskee, kun Pmet-osion pituus kasvaa. Pidempi PMet-osio myös kasvattaa hydrogeelin mekaanista lujuutta. Hydrogeelin sensitiivisyyttä ROS:ia kohtaan testattiin H₂O₂:lla, mikä johti hydrogeelin nopeutettuun hajoamiseen ja hydrogeeliin kapseloidun väriainemolekyylin vapautumiseen. Tämä on seurausta hydrofobisen PMet-osion hapettumisesta hydrofiiliseksi sulfoksidiksi ja sulfoniksi, mikä tekee polymeeristä vesiliukoisemman ja nopeuttaa sen hajoamista. Tällaista polypeptidipohjaista hydrogeeliä voitaisiin hyödyntää esimerkiksi ROS:ien vähentämiseksi paikkaspesifisesti tai lääkekuljetukseen sairauksia kohtaan, joissa ilmenee ROS:ien ylituotantoa.³⁵

5.5 Entsymaattisesti silloitetut polypeptidit

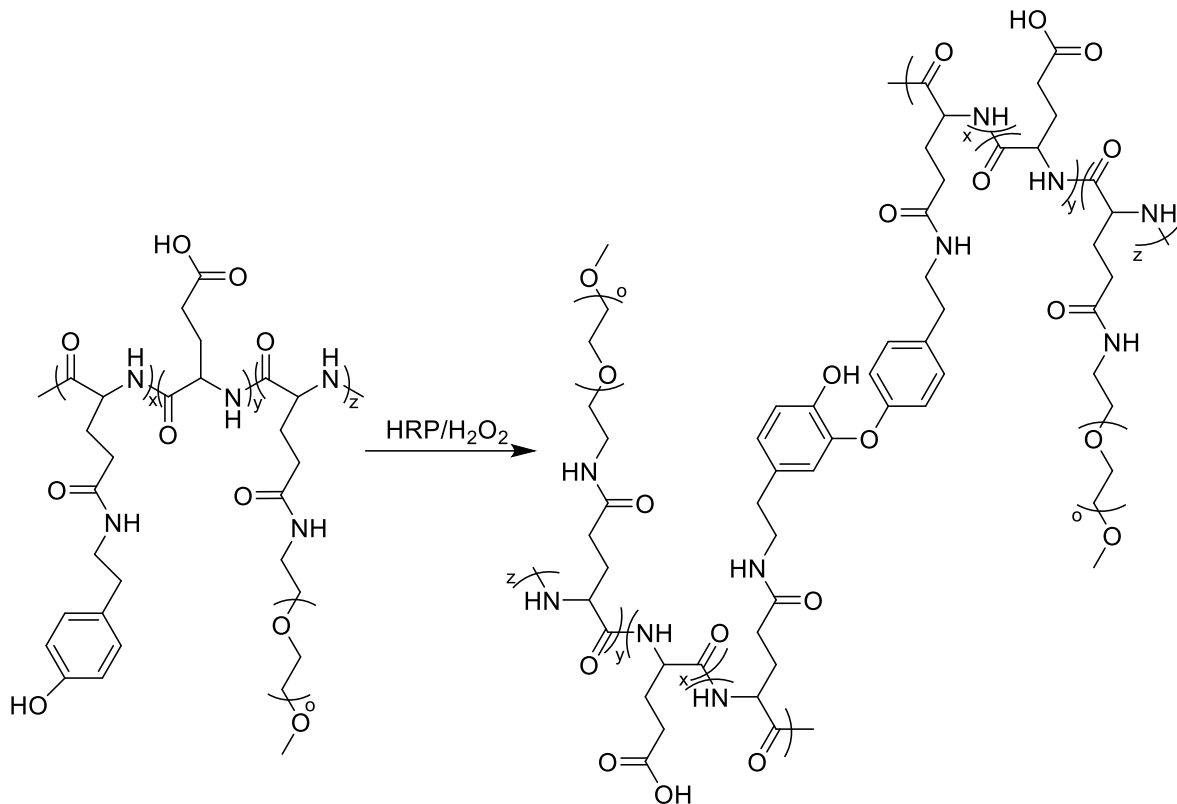
Polypeptidien geelilytyminen entsyymien avustuksella tuottaa herkkiä, helposti hajoavia ja homogeenisiä geelejä, joiden reaktio-olosuhteet ovat hyvin miedot. Tällöin kuumentumista tai muita sivuvaikutuksia ei juurikaan havaita.^{12,59,60} Polypeptidien itsejärjestäytymistä tehostavia biologisia entsyymejä ovat pääasiassa silloittavat entsyymit. Entsymaattisesti silloitettavien polypeptidihydrogeelien peptidikonjugaattien itsejärjestäytymistä ja ominaisuuksia, kuten geelilytymisnopeutta, mekaanista kestävyyttä ja huokosten rakennetta, voidaan kontrolloida

entsyymien aktiivisuuden kautta.^{12,59} Defosforylaasientsyymi pystyy aktivoimaan β -levyjen järjestäytymistä ja proteaasientsyymi katalysoimaan hydrolyysiä.¹²

Ulijn *et al.* ovat tehneet urauurtavaa työtä entsyymien käytössä polypeptidipohjaisten hydrogeelien valmistuksessa. He ovat muun muassa hyödyntäneet proteaasientsyymejä katalysoimaan amfiifiilisten polypeptidipohjaisten hydrogeelien itsejärjestäytymistä käänteisen hydrolyysin kautta. Reaktion etuna on, että sivutuotteena syntyy ainoastaan vettä. Proteaasi aktivoi selektiivisesti polypeptidien itsejärjestäytymistä ja helpottaa *in situ* -hydrogeelin muodostumista kehon ympäristössä.^{12,60,82} Ryhmä on myös suunnitellut fluorenyylimetoksykarbonyyli (Fmoc)-suojattuja dipeptidiamfiifiilejä, jotka voivat reagoida alkaliseen fosfataasiin ja itsejärjestäytyä hydrogeeleiksi. Näillä hydrogeeleillä on myös havaittu erinomainen antimikrobinen vaste.⁸³

Yang *et al.*⁸⁴ muokkasivat peptidipohjaista hydrogelaattoria syöpälääkkeenä käytetyllä klorambusiililla (CRB). Klorambusiili- $G^{DFDFpDY}$ (CRB- $G^{DFDFpDY}$) on läpinäkyvä liuos fosfaattipuskurissa pH:ssa 7,4. Liuos voidaan muuttaa läpinäkyväksi hydrogeeliksi lisäämällä liuokseen alkalista fosfataasientsyymiä 4 °C lämpötilassa. Entsyymi muuntaa polymeerin klorambusiili- $G^{DFDFpDY}$:ksi (CRB- $G^{DFDFpDY}$) (Kuva 34). Peptidit muodostivat α -helikaalisia sekundäärirakeita, mikä on yleensä haastavaa lyhyille peptideille. Hydrogeelin muodostusta testattiin kehon lämpötilaa vastaavassa lämpötilassa. Hydrogeeli muodostui, mutta huomattavasti hitaammin kuin alemmassa lämpötilassa, ja peptidit omaksuivat sekundäärirakenteen α -kierteen ja β -levyn väliltä. Tulokset viittaavat, että reaktiolämpötilalla on vaikutusta peptidin itsejärjestäytymiseen ja sen lopputulokseen.

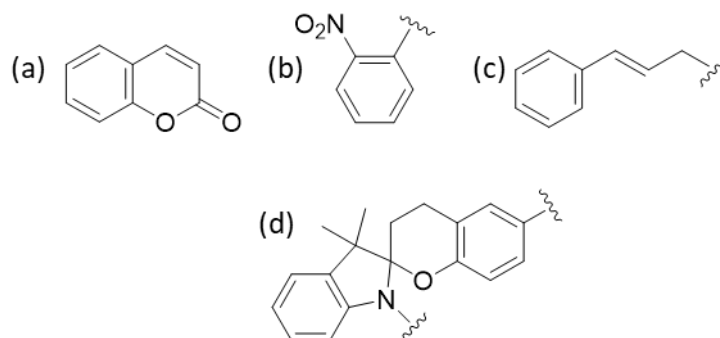
ja biohteensopiva. Nämä hydrogeelit voisivat soveltua biolääketieteen sovelluksiin, esimerkiksi kudostekniikan tukirakenteiksi tai pitkäaikaisiksi kantoaineiksi bioaktiivisten molekyylien kuljetukseen.



Kuva 35. Kopolymeeri (PLG-g-TA/PEG) ja entsymaattinen siltasidosten muodostus piparjuuriperoksidaasin avulla.

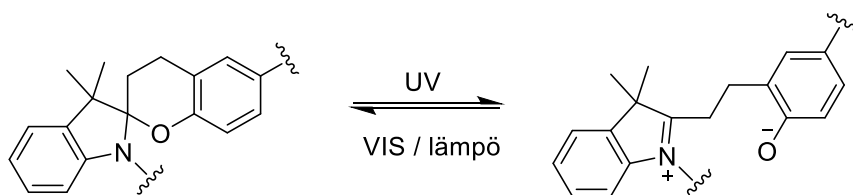
5.6 Valosensitiiviset polypeptidit

Valosensitiivisten polypeptidien tutkimus on suhteellisen rajallista muihin ärsykesensitiivisiin polypeptideihin verrattuna. Polypeptideihin sisällytettyjä valosensitiivisiä molekyyliä ovat esimerkiksi kumariini, 2-nitrobentseeni, kanemyyli ja spiropyraani (Kuva 36). Valosensitiivisiä polypeptidejä on käytetty valopolymeroitujen polypeptidien valmistuksessa, valolla laukaistavien lääkeaineiden kuljetusjärjestelmissä ja valolla säädettävien itsejärjestäytyvien systeemien muodostuksessa.¹⁷



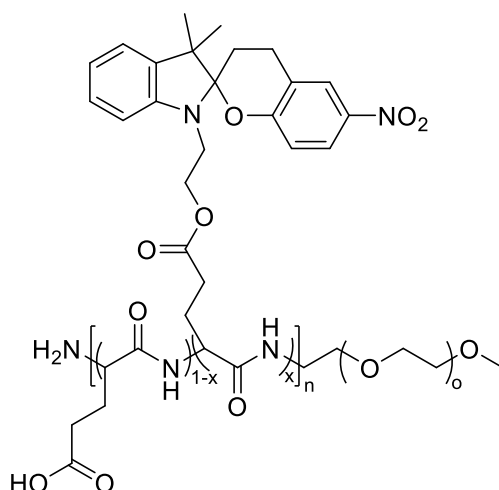
Kuva 36. Molekyylirakenteet: (a) kumariini, (b) 2-nitrobentseeni, (c) kanemyyli ja (d) spiropyraani.

Spiropyraaniyhdisteet (Kuva 37) ovat suljetussa muodossa pääasiassa värittömiä, poolittomia ja hydrofobisia molekyyliä, mutta UV-valosäteilytyksessä spiropyraanimolekyylit isomerisoituvat merosyaniiniksi. Tällöin spiropyraanimolekyyli on sen avoimessa muodossa ja muuttuu värilliseksi, polaariseksi ja hydrofiiliseksi molekyyliksi. Spiropyraani voi kuitenkin palata suljettuun muotoon näkyvän valon vaikutuksesta tai lämpötilan muutoksen seurauksena.⁸⁵



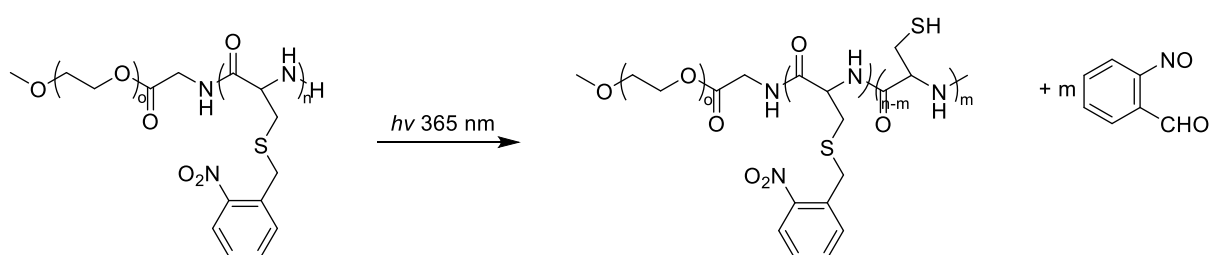
Kuva 37. Spiropyraanimolekyylin suljettu ja avoin muoto.

Mezzenga *et al.*⁸⁵ syntetisoivat spiropyraania sisältävän valosensitiivisen ja amfifiilisen polypeptidikopolymeerin poly(*L*-glutamiinihappospiropyraani-*b*-poly(etyleeniglykoli) (PLGASP-*b*-PEG) (Kuva 38). Tämä kopolymeeri kykenee läpikäymään palautuvaa sooli-geelisiirtymää vesiliuoksessa vasteena valolle. Ennen kopolymeerin altistusta UV-valolle kopolymeeri on hydrofobinen ja vesiliukoinen, koska spiropyraani on suljetussa muodossa. UV-valosäteilytyksen jälkeen kopolymeeri liukenee veteen, mikä johtuu hydrofiilisuuden lisääntymisestä spiropyraanin siirtyessä avoimeen muotoon. Tämän jälkeen kopolymeeriä voidaan säteilyttää näkyvällä valolla, jolloin kopolymeeri palautuu suljettuun muotoonsa. Kopolymeeriä voidaan pitää mallina valosensitiivisille lääkeaineiden kuljetussysteemeille tai muihin valolla kontrolloitaviin biolääketieteen sovelluksiin.



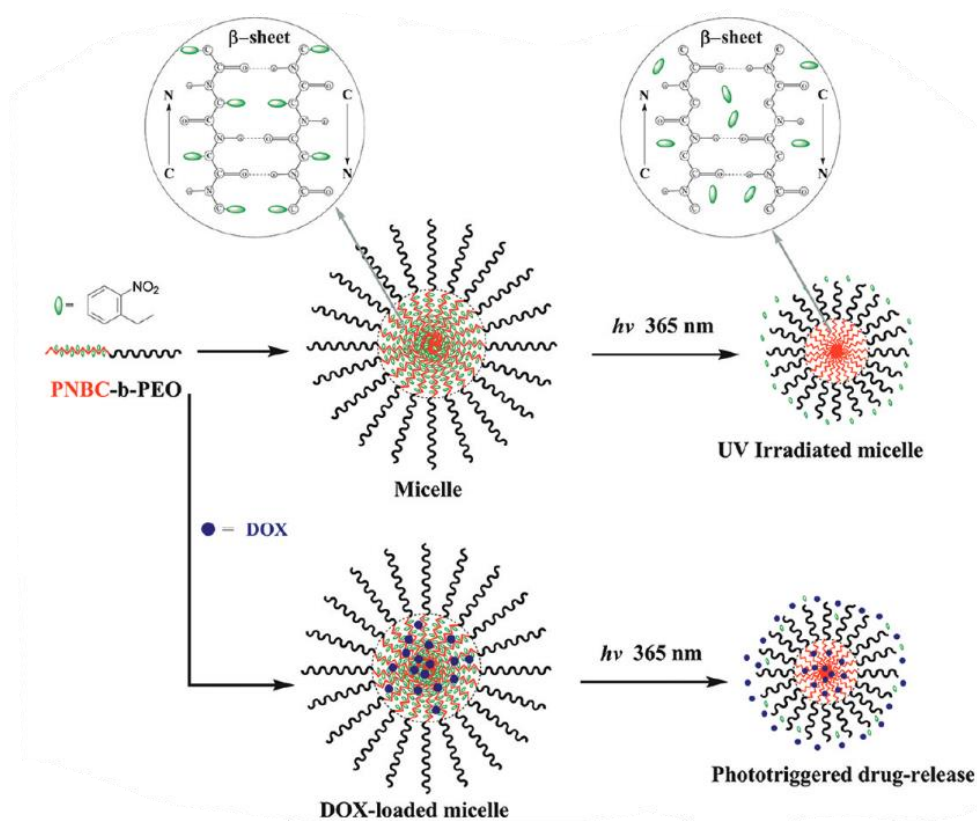
Kuva 38. Kopolymerin PLGASP-b-PEG molekyyli rakenne.

Dong ja Liu⁸⁶ ovat suunnitelleet valosensitiivisen polypeptidipohjaisen kopolymerin poly(nitrobentsyylikysteiini)-amiini-poly(etyleeniglykoli) (PNBC-b-PEG), joka muodostaa geelin itsejärjestäytymisen kautta UV-valosäteilytyksen seurauksena ja kykenee myös vapauttamaan lääkeainetta valosäteilytyksen laukaisemana. Kopolymerissa poly(nitrobentsyylikysteiini) on kopolymerin valosensitiivinen osa, josta UV-valosäteilytyksessä irtoaa nitrobentsyyli ryhmä (Kuva 39).



Kuva 39. Kopolymerin poly(nitrobentsyylikysteiini)-amiini-poly(etyleeniglykoli) (PNBC-b-PEG) valopilkkoutuminen.

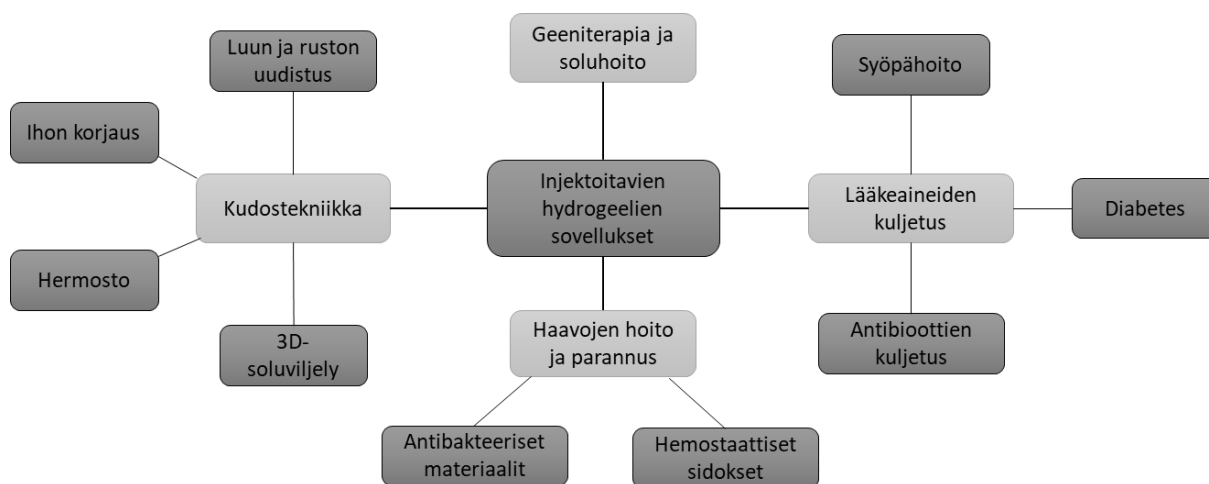
Kun nitrobentsyyli ryhmät ovat asteittain valopilkkoutuneet, kopolymerit PNBC-b-PEG itsejärjestäytyvät pallomaisiksi miselleiksi, joissa valopilkkottu PNBC toimii ytimenä ja sitä ympäröi hydrofiilinen PEG-kuori (Kuva 40). Misellit kutistuvat pienemmiksi UV-valosäteilyn vaikutuksesta. Hydrogeeliin sisällytettiin doksorubisiinia ja huomattiin, että lääkeaineen vapautuminen nopeutui UV-säteilytysajan pidentyessä, mikä osoittaa, että DOX:ia voidaan vapauttaa hallittavalla tavalla. Lääkeaineen vapautuminen johtuu asteittaisesta hydrofobisen vuorovaikutuksen vähenemisestä DOX:n ja poly(nitrobentsyylikysteiinin) välillä, jonka aiheuttaa nitrobentsyyli ryhmien valopilkkoutuminen.⁸⁶



Kuva 40. Havaintokuva kopolymerin PNBC-b-PEG valosensitiivisestä itsejärjestäytymisestä miselliksi ja lääkeaineen vapautuksesta. Reprinted with permission from⁸⁶. Copyright 2012 American Chemical Society.

6 Injektoitavien hydrogeelien sovellukset

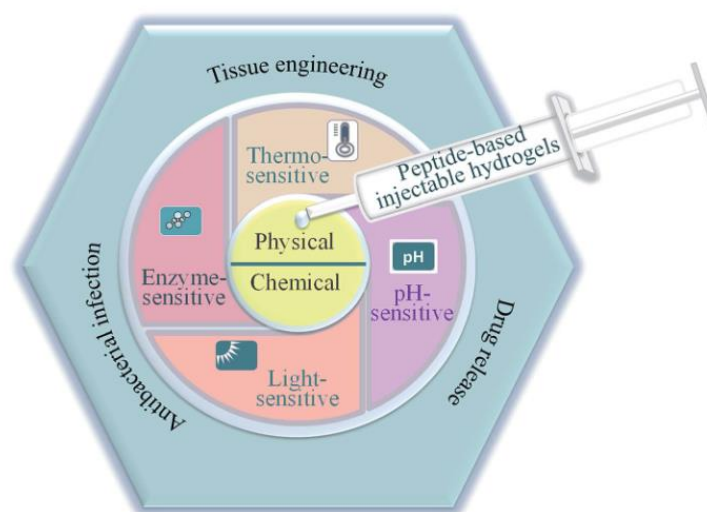
Injektoitavien hydrogeelien sovellukset keskittyvät pääasiassa biolääketieteeseen ja farmasiaan. Niitä voitaisiin hyödyntää esimerkiksi kudostekniikassa, lääkeaineiden kuljetuksessa, haavojen parantamisessa ja sidonnassa (Kuva 41). Tällaisille systeemeille on tarvetta erityisesti, kun hoidon tarpeessa olevaan kohteeseen on hankala päästä tai kehon ympäristö vaikeuttaa hoidon toteuttamista. Injektoitavat hydrogeelit ovat vielä suurelta osin tutkimusasteella ja vain muutamat ovat edenneet klinisiin tutkimuksiin.^{5,7}



Kuva 41. Kaaviokuva injektoitavien hydrogeelien mahdollisista sovelluskohteista.

6.1 Polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien sovellukset

Erityisesti polypeptidipohjaisia injektoitavia hydrogeelejä voidaan hyödyntää erilaisissa biolääketieteen sovelluksissa, kuten kudostekniikassa, lääkeaineiden kuljetuksessa ja antibakteerisena materiaalina. Kuvassa 42 on esitetty kaaviokuva polypeptidipohjaisten hydrogeelien silloitusmenetelmistä, ärsykesensitiivisyydestä ja suurimmista sovelluskohteista, jotka liittyvät vahvasti biolääketieteeseen.¹²



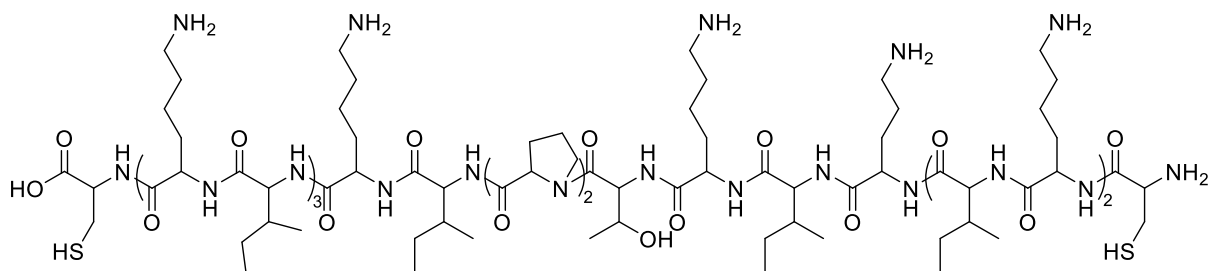
Kuva 42. Kaaviokuva polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien silloitusmenetelmistä, ärsykesensitiivisyydestä ja niiden suurimmista sovelluskohteista.¹²

6.1.1 Lääkeaineiden kuljetus

Tavanomaisia lääkeaineiden antostrategioita rajoittaa toksisuus, toistuva annostelu, nopea aineenvaihdunta, ei-toivottu lääkeaineen imeytyminen ja lääkeaineen helppo hajoaminen fysiologisissa olosuhteissa.¹² Injektoivat biohajoavat hydrogeelit, joilla on säädeltävät fysikaaliset ominaisuudet, hallittava hajoavuus sekä pitkäkestoiset, jatkuvat ja hallitut lääkeaineen vapauttamisominaisuudet, ovat lupaava lääkeaineiden kuljetusvälineitä, joiden avulla voidaan minimoida edellä mainittuja haittoja ja optimoida lääkeaineen hyötyjä.^{12,87}

Lyhyet geelilytyvät polypeptidit, joissa on hydrofobisia aromattiseen vuorovaikutukseen kykeneviä molekyyliä, esimerkiksi fenyylialaniini, ovat sopivia kuljetusalustoja hydrofobisten aromaattisia ryhmiä sisältävien lääkeaineiden kuljetukseen. Kyseisillä molekyyliillä on usein myös keskeinen rooli polypeptidigeelin itsejärjestäytymisessä.⁸⁸ Hydrogeelisysteemeissä lääkeaineen vapautuminen tapahtuu pääasiassa hydrogeelin turpoamisen tai kutistumisen kautta, jota seuraa lääkeaineen diffuusio verkkorakenteen läpi. Lääkeaineen vapautumista voidaan kontrolloida hydrogeelin turpoamisnopeudella, joka vaikuttaa lääkeaineen diffuusionopeuteen.⁵

Zhu *et al.*⁴⁴ ovat suunnitelleet kaksoissensitiivisen (pH ja redox) IC1-R (CKIKIKIK-^DIPPT-KIOIKIKC-NH₂; Kuva 43) polypeptidihydrogeelin, joka kykenee kapseloimaan lääkeaineita *in vitro* -kokeiden perusteella. Kun hydrogeeli injektoidaisiin esimerkiksi syöpäkasvainkudokseen, sen mikroympäristön matala pH ja korkea GSH-pitoisuus vaikuttaisi hydrogeeliin, jonka seurauksena se kykenisi hitaasti ja jatkuvasti vapauttamaan lääkeainetta. Tämä hydrogeelijärjestelmä voisi olla erittäin käyttökelpoinen, sillä muutamalla polypeptidin konsentraatiota voidaan muuttaa verkkorakenteen huokoskokoa, jolloin siihen voisi kapseloida erikokoisia molekyyliä. Tämän vuoksi se voisi soveltua useiden bioaktiivisten aineiden kuljetukseen. Lisäksi lääkeaineen ja polypeptidin konsentraation muutoksilla voidaan säädellä lääkeaineen vapautumista. Materiaali vaatii kuitenkin lisätutkimuksia esimerkiksi lääkeaineen vapautumisprosessin selvittämiseksi ja sen mahdollisesta soveltamisesta yhdessä kudostekniikan kanssa.



Kuva 43. Polypeptidihydrogeelin IC1-R (CKIKIKIK-^DIPPT-KIOIKIKC-NH₂)
molekyyli rakenne.

6.1.1.1 Syöpälääkkeiden kuljetus

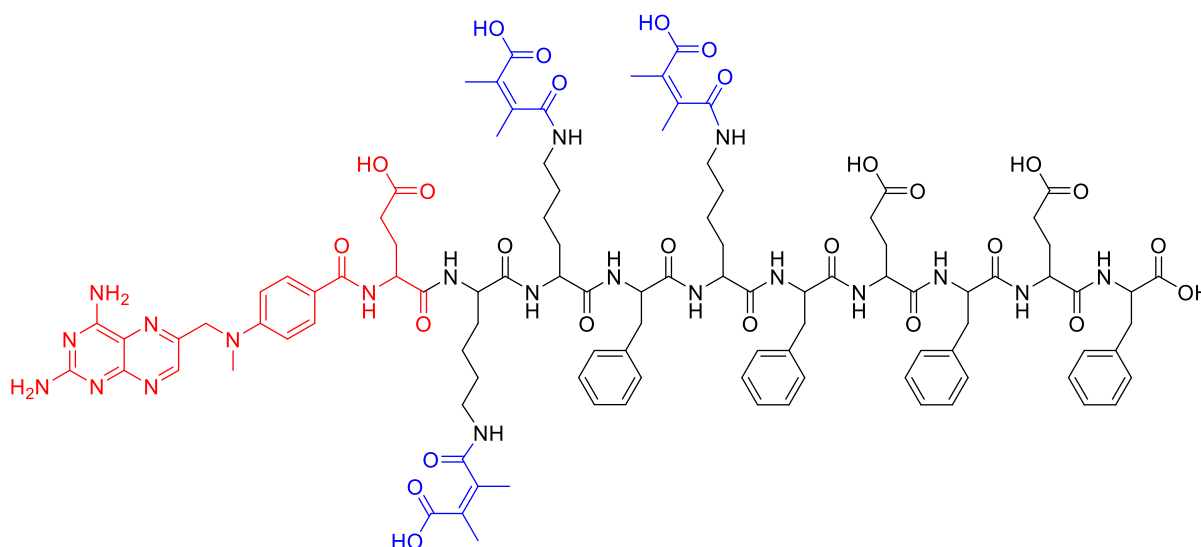
Syöpä on yksi suurimmista sairastumisen ja kuolleisuuden syistä maailmanlaajuisesti. Syövän hoitostrategiat vaihtelevat syöpätyypin ja vaiheen mukaan, jossa se diagnosoidaan ensimmäisen kerran. Tällä hetkellä saatavilla olevia hoitovaihtoehtoja ovat leikkaus, sädehoito, kemoterapia, hormonihoito, immunoterapia ja geeniterapia. Yleisimmin käytetty hoitomuoto on kemoterapia, jolla tarkoitetaan sytotoksisten lääkkeiden käyttöä syöpäsolujen tappamiseksi. Menetelmän valitettava ongelma on sytotoksisuuden rajaaminen ainoastaan syöpäsoluihin, jolloin myrkyllisyys kohdistuu myös normaaleihin kudoksiin, mikä usein rajoittaa kemoterapian käyttöä.⁸⁷

Paikalliset lääkeannostelutekniikat vähentävät normaaleihin kudoksiin kohdistuvaa toksisuutta verrattuna perinteiseen kemoterapiaan, koska niillä vältetään sytotoksisten lääkkeiden kierrättäminen verenkierron mukana. Niillä myös mahdollistetaan jatkuva paikallinen lääkeaineen vapautuminen ja kasvatetaan kasvaimen kohdistuvaa lääkemäärää, mikä parantaa syöpähoidon tehokkuutta ja vähentää hoidon aikana tarvittavaa lääkemäärää. Lisäksi useat syöpälääkkeet ovat heikosti liukenevia, niillä on matala biologinen hyötysuhde ja ne ovat helposti hajoavia fysiologisissa olosuhteissa, joten paikallinen lääkeannostelu olisi järkevä vaihtoehto. Paikallista lääkeannostelua varten on tutkittu erilaisia systeemejä muun muassa nano-/mikrohiukkaset, misellit, liposomit ja tutkielmassa käsiteltävät (injektoitavat) hydrogeelit.^{60,87}

Syöpäkasvaimien mikroympäristö poikkeaa normaalin kudoksen ympäristöstä huomattavasti. Kasvaimen ympäristössä on alhainen pH (6,5-6,8), mikä johtuu siellä vallitsevasta aineenvaihdunnan tuottamasta maitohaposta. Ympäristössä esiintyy myös hypoksiaa ja

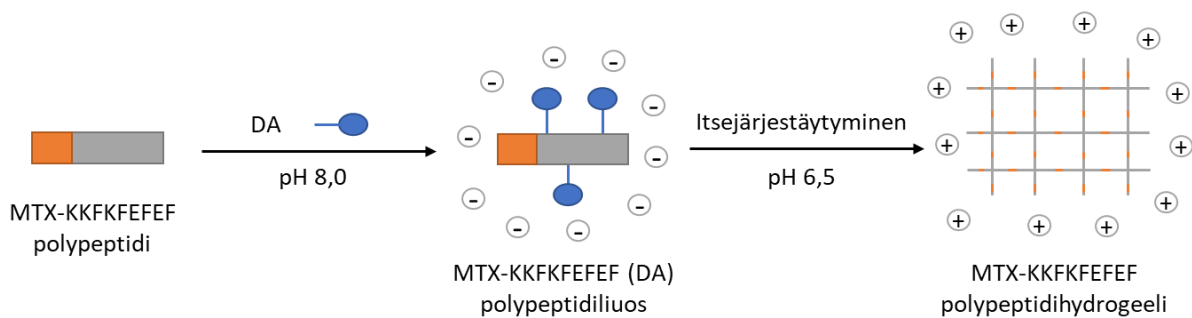
ROS:ien määrä voi olla kohonnut.^{29,89} Poikkeava ympäristö tarjoaa mahdollisuuden hyödyntää ärsykesensitiivisiä, kuten redox- ja pH-sensitiivisiä sekä entsyymiaktiivisia, syöpälääkkeiden kuljetusalustoja esimerkiksi injektaitavia hydrogeelejä.⁸⁹

Zhang *et al.*⁸⁹ ovat kehittäneet pH-sensitiivisen polypeptidipohjaisen syöpälääkkeen kuljetusalustan (Kuva 44), joka tehostaa syöpälääkkeen (metotreksaatti (MTX)) kasvainten vastaisia vaikutuksia (antitumor effects) ja vähentää sen sivuvaikutuksia.



Kuva 44. MTX-KKFKFEF(DD) molekyyli rakenne. Polypeptidirunko on esitetty mustalla värillä. Pääteryhmäksi on liitetty MTX (punainen) karbonyyliryhmien kautta ja pH-sensitiivisyyttä lisäämään on lysiiniin liitetty 2,3-dimetyylimaleiinihappoanhydridit (DA) (sininen).

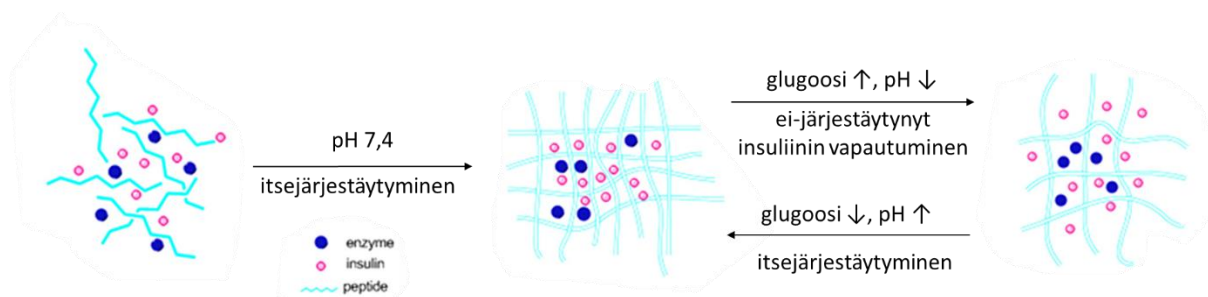
Emäksisessä ympäristössä 2,3-dimetyylimaleiinihappoanhydridi (DA) kiinnittyy polypeptidirungossa oleviin lysiineihin, mutta happamassa ympäristössä DA:n ja lysiinin välinen sidos hydrolysoituu helposti ja muodostuu positiivinen varaus. Tämä helpottaa hydrogeelin kulkeutumista syöpäsoluihin. Sooli-geelisiirtymä tapahtuu välittömästi, kun esiasteliuos on injektoitu kasvaimen alueelle johtuen happamasta ympäristöstä (Kuva 45). Polypeptidihydrogeelillä on havaittavissa selkeä nanokuiturakenne, joka parantaa hydrofobisen MTX:n liukoisuutta. Lisäksi polypeptidihydrogeelillä havaittiin erinomainen biohteensopivuus, lujuus, pitkä lääkkeen vapautusaika ja korkea kasvaimen sietokyky *in vivo* eli hydrogeeli selviää syöpäkasvainympäristössä.



Kuva 45. Havainnollistava kaaviokuva MTX-KKFKFEFEEF(DA) polypeptidihydrogeelin toimintaperiaatteesta.

6.1.1.2 Insuliinin kuljetus

Diabetes on aineenvaihduntasairaus, jossa veren glukoosipitoisuus on liian korkea. Tehokkain diabeteksen hoitomuoto tällä hetkellä on säännölliset insuliinipistot, jotka alentavat veren glukoosipitoisuutta.⁵ Ge *et al.*²⁸ ovat valmistaneet pH-sensitiivisen polypeptidihydrogeelin, jota voitaisiin hyödyntää diabeteksen hoidossa. Glukoosiherkkä insuliinin annostelujärjestelmä koostuu pH-sensitiivisestä peptidihydrogeelistä, johon on kapseloitu insuliinia sekä entsyymejä (glukoosioksidaasi ja katalaasi). Kun glukoosin pitoisuus kasvaa, se vuorovaikuttaa hydrogeelissä olevien entsyymien kanssa, jotka muuttavat glukoosia glukonihapoksi. Tämän seurauksena ympäristön pH laskee ja insuliinia vapautuu, mikä laskee glukoosipitoisuutta. Glukoosipitoisuuden laskiessa myös glukolihapon pitoisuus laskee, jolloin ympäristön pH nousee ja insuliinia ei enää vapaudu ympäristöön (Kuva 46).

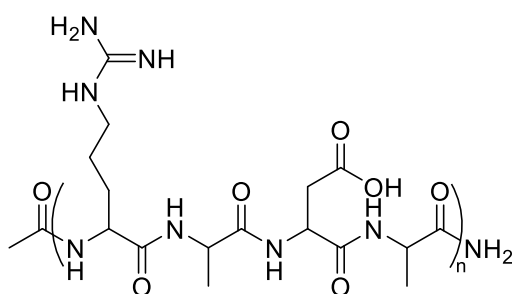


Kuva 46. Havainnollistava kaaviokuva pH-sensitiivisen polypeptidihydrogeelin toiminnasta insuliinin vapautusjärjestelmänä. Reprinted from²⁸. Copyright 2017, with permission from Elsevier.

6.1.2 Kudostekniikka

Kudostekniikassa joko korjataan tai korvataan vaurioitunut/tulehtunut kudokse luonnollisella tai synteettisellä kudosta jäljittelevällä materiaalilla. Synteettisiä materiaaleja käytetään usein korjaamaan, ylläpitämään ja edistämään eri kudosten tai elinten toimintaa ja pintarakennetta.¹² Kudostekniikkaan kuuluu esimerkiksi 3D-soluviljely, ihon korjaus, luuston tai ruston uudistaminen. Hydrogeelit soveltuvat kudostekniikkaan, koska ne voivat luoda luonnollisten kudosten kaltaisen ympäristön, niillä on korkea vesipitoisuus ja kudomainen elastisuus. Hydrogeelejä on viime vuosina tutkittu sopivina materiaaleina muun muassa luun, ruston, hermojen ja jänteiden kudossuunnitteluun.⁹⁰ Kudostekniikkaan suunnitellun materiaalin mekaanisten ominaisuuksien on vastattava alkuperäisen kudoksen mekaanisia ominaisuuksia. Esimerkiksi ruston korjauksessa rustomateriaalin mekaanisten ominaisuuksien ja toiminnan palauttaminen on ratkaisevassa roolissa kudosten ja nivelten toiminnan ylläpidon kannalta.⁷⁴

Polypeptidipohjaiset hydrogeelit sopivat kudostekniikkaan erityisen hyvin niiden biologisen yhteensopivuuden takia. Ne tarjoavat ravintoympäristöjä endogeeniselle solukasvulle ja soluväliaineen kerääntymiselle. Ne jäljittelevät soluväliainetta ja niillä on kyky kapseloida soluja sekä bioaktiivisia molekyyliä. Lisäksi niiden hajoamistuotteena muodostuu aminohappoja, jotka eivät aiheuta haitallisia vaikutuksia immuuni- tai tulehdusreaktioita kehossa.¹² Esimerkiksi arginiini-alaniini-aspargiinihappo-alaniini (RADA, Kuva 47) on yleisesti käytetty vesiliuoksessa itsejärjestäytyvä polypeptidi, jota on hyödynnetty aivojen, selkäytimen ja sydämen kudostekniikkasovelluksissa. Se itsejärjestäytyy vesiliuoksessa stabiiliksi β -levy-rakenteeksi.¹⁵



Kuva 47. Arginiini-alaniini-aspargiinihappo-alaniinipolypeptidin (RADA) molekyyli rakenne. Yhdistettä käytetään kudostekniikan sovelluksissa.

Koutsopoulos *et al.*⁹¹ onnistuivat kapseloimaan hermoston kantasoluja itsejärjestäytyvään RADA:an pohjautuvan peptidihydrogeeliin. Hydrogeeli loi hermosoluille hyvän 3D-

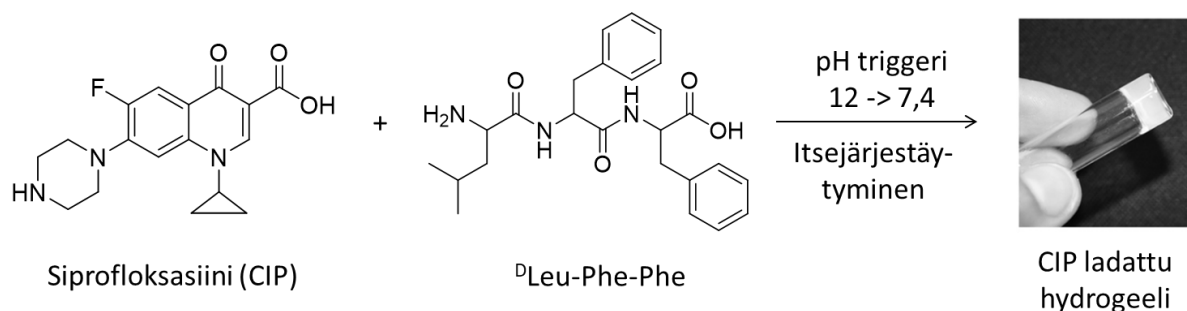
kasvu ympäristön, jossa ne kykenivät lisääntymään ja erilaistumaan eri tyyppisiksi hermosoluiksi. Tutkimuksessa verrattiin polypeptidihydrogeeliä kasvu ympäristönä muun muassa tyypin I kollageeniin ja Matrigeeliin (MatrigelTM), joka on kaupallinen kalvomateriaali. Huomattiin, että tyypin I kollageeniin kapseloidut hermosolun kantasolut erilaistuivat huonosti eivätkä jakautuneet merkittävästi. Matrigeelissä taas hermosolun kantasolut näyttävät lisääntyvän ja erilaistuvan paremmin verrattuna peptidipohjaiseen hydrogeeliin ensimmäisen kahden viikon aikana. Pitkäaikaisessa solututkimuksessa kuitenkin huomattiin, että Matrigeelissä solujen määrä vähenee ja peptidihydrogeelissä niiden eloonjäämisaste on parempi.

6.1.3 Antibakteerinen materiaali

Bakteeri-infektio on hyvin yleinen ongelma biolääketieteen alalla. Kestävä antibakteerinen, biohyhteensopiva ja kliinisesti sovellettavissa oleva materiaali voisi vähentää huomattavasti bakteeriperäisiä infektioita, potilaiden kipua sekä lisätä lääketieteen resursseja.¹² Kroonisissa haavoissa pH vaihtelee riippuen haavan sijainnista, nekroosiasteesta ja paikallisesta hapen saatavuudesta. Alimmillaan pH voi olla 5,4 ja korkeimmillaan 8,9.³⁰ On olemassa kaksi tapaa, jolla hydrogeeleihin saadaan antibakteerisia ominaisuuksia. Ensimmäinen tapa on sitoa antimikrobista ainetta tai antibakteerista lääkettä hydrogeelin sisälle, jolloin toiminta on verrattavissa lääkeainekuljetukseen. Toinen tapa on hyödyntää peptidihydrogeelien luontaista antimikrobista aktiivisuutta, jolloin puhutaan antimikrobisista / antibakteerisista peptideistä (AMP).^{12,60} Esimerkiksi infektiot ortopedisessä implanttikirurgiassa ovat erittäin vakava komplikaatoriski ja on pääasiallinen syy implanttien epäonnistuneeseen asentukseen. Nämä infektiot ovat yleensä resistenttejä antibioottiprofylaksille. Tällöin lääkeaineiden toimittaminen suoraan erilaisilla lääkinnällisillä laitteilla tarjoaa etuja, kuten bakteerien tuhoutuminen ennen bakteeribiofilmin muodostusta ja antibioottien riittävä paikallinen annos aiheuttamatta systemaattista toksisuutta.⁹²

Peptidipohjaisia injektoidavien hydrogeelien avulla voidaan kuljettaa antibiootteja infektoituneelle alueelle aiheuttamatta systemaattista toksisuutta kehossa.¹² Marchesan *et al.*⁸⁸ on esittänyt, että tripeptidi ^DLeu-Phe-Phe sekä antibiootti siprofloksasiini (CIP) pystyvät järjestäytymään yhdessä hydrogeeliksi pH-muutoksen seurauksena. ^DLeu-Phe-Phe muodostaa välittömästi itsekantavan läpikuultavan hydrogeelin, kun pH muuttuu emäksisestä (pH 12)

fysiologiseen pH:een (7,4).⁹³ CIP puolestaan on niukkaliukoinen fysiologisessa pH:ssa, mutta erittäin liukeneva emäksisessä pH:ssa (pH > 10). CIP liuotettiin emäksiseen liuokseen, johon lisättiin neutralisoivaa puskuriliuosta. Tämä aiheutti välittömästi tripeptidin geelitymisen ja antibiootin kiinnittymisen hydrogeelin verkkorakenteeseen (Kuva 48). CIP:n läsnäolo vaikuttaa muodostuvan geelin nanorakenteeseen pehmentäen rakennetta ja kasvattaen stabiilisuutta. Tripeptidihydrogeelillä on myös lievää luontaista antimikrobista aktiivisuutta gram-negatiivisia bakteereja kohtaan.⁸⁸

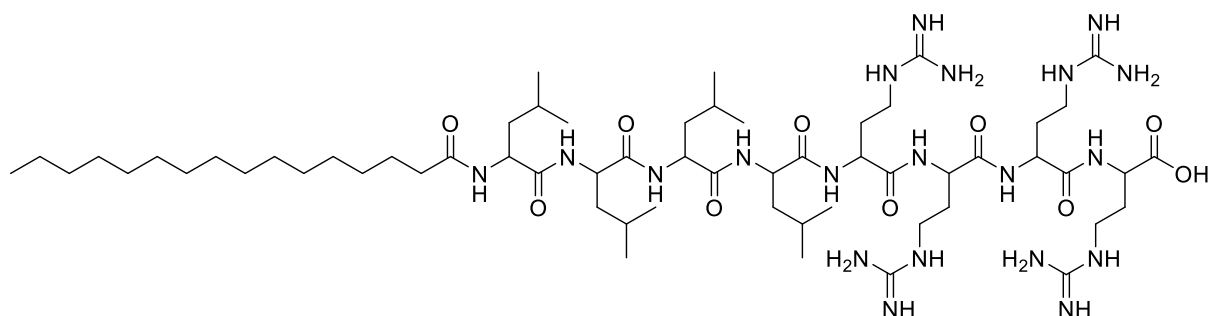


Kuva 48. Molekyylirakenne siprofloksasiinista ja tripeptidistä (^DLeu-Phe-Phe), jotka itsejärjestäytyvät pH-muutoksen seurauksena hydrogeeliksi. Reprinted from⁸⁸. Copyright 2013, with permission from Elsevier.

Antibakteeriset peptidit ovat osoittautuneet tärkeäksi puolustusmekanismiksi monenlaisia mikro-orgasmeja vastaan, erityisesti antibioottiresistenttien bakteeri-infektioiden yhteydessä. Antibakteeristen peptidien uskotaan häiritsevän bakteerikalvojen toimintaa ja bakteerien kasvua, peptidien ja bakteerien välisten vuorovaikutusten kautta. Ne voivat estää soluseinä-, nukleiinihappo- ja proteiinisynteesiä, häiritä sytoplasmakalvon väliseinän muodostumista sekä rikkoa bakteerien solukalvon, joka johtaa bakteerien kuolemaan. Tällä tuhoutumismekanismilla on epätodennäköisempää, että kehittyisi antibiooteilla havaittua resistenssiä ja samalla ehkäistään antibioottiresistenttien bakteerikantojen syntyminen.^{12,94}

Antibakteerisilla peptideillä on amfifiilinen rakenne, jossa on hydrofobinen runko ja polykationinen pinta, joka koostuu usein arginiinista⁹⁵ tai lysiinistä.⁹⁶ Kationinen pinta kasvattaa vuorovaikutusta negatiivisesti varautuneiden bakteerikalvojen kanssa.¹² Antibakteeristen peptidihydrogeelien ei kuitenkaan ole välttämättä pakko sisältää lysiiniä tai arginiinia. Näidenkin hydrogeelien tapauksessa antibakteerinen aktiivisuus johtuu todennäköisesti amfifiilisen rakenteen kationisista ja hydrofobisista aminohapoista tai osista, jotka matkivat luonnollisen antibakteerisen peptidin rakennetta.^{12,97}

Xie *et al.*⁹⁴ esittävät itsejärjestäytyvän ja injektoitavan antibakteerisen peptidihydrogeelin C₁₆-^DLeu₄^LArg₄ (Kuva 49). Rasvahapon palmiittinen hiiliketju, joka on kiinnittynyt leusiiniosaan ohjaa molekyyliä järjestäytymään β-levy sekundäärirakenteeksi ja kationinen arginiiniosa lisää reaktiivisuutta bakteerien solukalvoja kohtaan. Hydrogeeli osoittaa antibakteerista aktiivisuutta gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereita vastaan. LIVE/DEAD-solujen elinkelpoisuusanalyysin ja SEM:n avulla on voitu vahvistaa, että hydrogeeli tehostaa solujen aggregaatiota ja vuorovaikuttaa bakteerin solukalvon kanssa johtaen bakteerien kuolemaan.



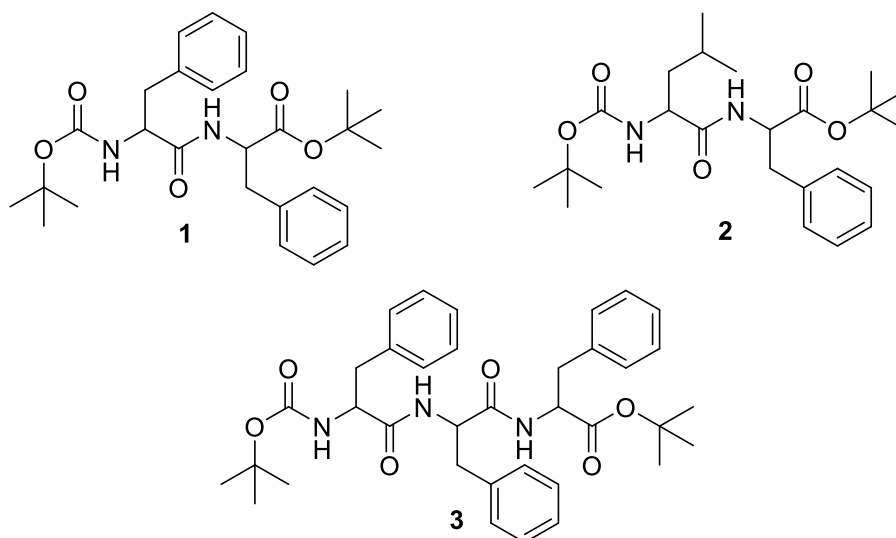
Kuva 49. Antibakteerinen, itsejärjestäytyvä ja injektoitava polypeptidi C₁₆-^DLeu₄^LArg₄ molekyyli rakenne.

Experimental part

7 Aim of the study

The self-assembly leading to supramolecular gels is commonly categorized either as “in equilibrium” or “far-from-equilibrium” self-assembly.^{98,99} The “in equilibrium” self-assembly is thermodynamically driven based on the free energy landscapes or temperature. The non-assembled free molecules (building blocks) are in a higher energy state. Hence assembled structures are energetically favourable. In addition, for the “in equilibrium” self-assembly, there is no net flow of energy/matter with the surrounding environment. In contrast, “in far-from-equilibrium” or “dissipative self-assembly” refers to the assembled structures with a higher energy state than the non-assembled building blocks. In general, these systems consist of non-assembling building blocks, which through the consumption of an external energy source, for instance, light or chemical fuel, self-assemble into higher-ordered structures. Such materials are referred to as transient, meaning they display a limited lifespan. In other words, if not continuously supplied with energy from the surrounding environment, such systems disassemble and turn back to a solution.^{98–100}

The aim of the study was to investigate the effect of the molecular structure of amino acid-based transient organogels on material properties. The study included four gel systems **I–IV** using two different equivalents of accelerator (1.0 eq and 0.5 eq of sulfuric acid), which refer to a different amount of acid relative to the gel precursor’s concentration. Gel systems **I–III** consist of phenylalanine-based precursor molecules Boc-Phe-Phe-*Or*Bu **1**, Boc-Leu-Phe-*Or*Bu **2** and Boc-Phe-Phe-Phe-*Or*Bu **3** (Scheme 1), while the gel system **IV** is a mixture of precursor molecules **1** and **2**, in a 1:1 ratio. The research project is based on the gel system **I** published earlier by the research group. The reaction mechanism leading to gelation, the presence of gelator molecules in the systems and their ratio were studied by NMR spectroscopy. The secondary structure of gel systems **I–IV** in the bulk state was determined by ATR-FTIR spectroscopy whereas nano-FTIR spectroscopy showed the homogeneity of gel system **I** at the nanoscale. Additionally, the supramolecular network of these systems was visualized by AFM imaging.



Scheme 1. Molecular structures of precursors Boc-Phe-Phe-OtBu **1**, Boc-Leu-Phe-OtBu **2** and Boc-Phe-Phe-Phe-OtBu **3**.

8 Materials and methods

8.1 Chemicals and equipment

All chemicals were used as purchased without further purification, unless stated otherwise, and are presented in Table 1. The equipment and their details are listed below.

Scales and an evaporator: A Mettler Toledo XP205 scale was used to weigh synthesis reagents and gel precursors. A VWR LAG 214i scale was used to weigh round-bottom flasks. A Heidolph Laborta 4000 efficient rotary evaporator was used to evaporate solvents during syntheses.

NMR spectroscopy: ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III HD 300 MHz spectrometer.

FTIR spectroscopy: A Bruker Tensor 27 FTIR spectrometer in Attenuated Total Reflection (ATR) mode was used to record all FTIR spectra from 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} .

sSNOM: IR-neaSCOPE⁺ from neaSpec GmbH was used to record nano-FTIR spectra with a tunable broadband femtosecond Mid-IR laser source, FemtoFiber dichro mid-IR nano-FTIR

laser from Toptica Photonics AG. 100 nm Au coated Si- chip (5x5 mm) was used as a substrate. The AFM tips were Pr/Ir coated with 20 nm apex diameter.

AFM imaging: Bruker Dimension Icon microscope was used to record height images in tapping mode, using quantitative mechanical mapping, PeakForce QNM in the air with a SCANASYST AIR probe from Bruker on Si chips.

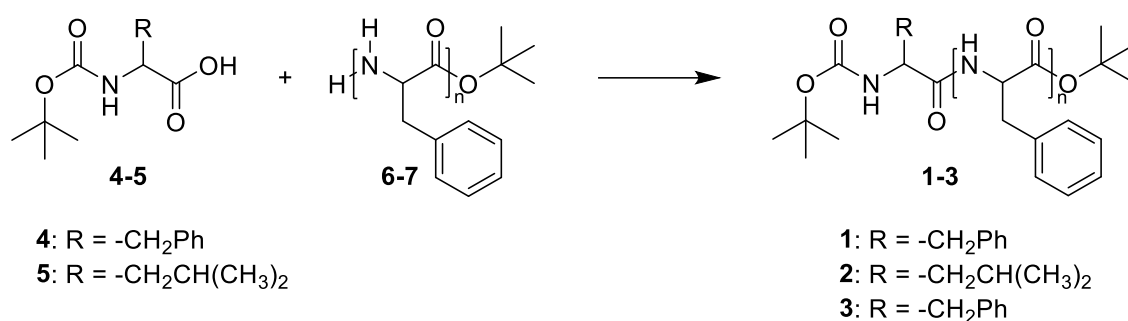
Table 1. List of chemicals, manufacturers, and purities

Chemical	Manufacturer	Purity (%)
Chloroform- <i>d</i>	Eurisotop	99.8
Dichloromethane	VWR Chemicals	-
Dimethylsulfoxide- <i>d</i> ₆	TCL	> 99.0
Ethyl acetate	VWR Chemicals	-
Hydrochloric acid	VWR Chemicals	-
Magnesium sulfate hydrate	Sigma-Aldrich	-
<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-leucine OH	Sigma-Aldrich	≥ 99.0
<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-L-phenylalanine	TCL	> 99.0
N-N-dimethylformamide	Sigma Aldrich	99.8
Sodium hydrogen carbonate	VWR Chemicals	-
(<i>S</i>)-phenylalanine <i>tert</i> -butyl ester HCl	Carbosynth	-
Sulfuric acid	Fluka	95.0-97.0
TBTU	Novabiochem	> 98.0
<i>tert</i> -butyl acetate	TCL	> 99.0
Toluene	VWR Chemicals	-

8.2 Syntheses of precursors and gelator molecules

8.2.1 Boc-Phe-Phe-OtBu 1, Boc-Leu-Phe-OtBu 2 and Boc-Phe-Phe-Phe-OtBu 3

Precursors **1-3** were synthesized as depicted in Scheme 2. Reagents, masses and yields of products are presented in Table 2.



Scheme 2. Peptide bond formation for the syntheses of precursors **1-3**.

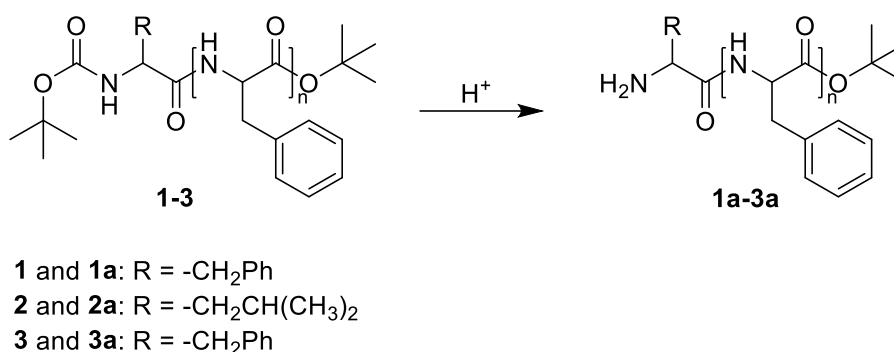
The general procedure of the synthesis: Boc-R **4-5**, TBTU and NaHCO₃ were dissolved in dry DMF (10 mL) to form solution A. Phe_n-OtBu **6-7** and NaHCO₃ were dissolved in dry DMF (10 mL) to form solution B. Both solutions were left to stir under an N₂ atmosphere at R.T. for 1 h. Solution B was then added to solution A and the mixture was left to stir under an N₂ atmosphere at R.T. overnight. DMF was evaporated under vacuum and co-evaporated with toluene twice. The residue was dissolved in DCM and extracted with water twice. The organic phase was washed with HCl (1 M), water (×2), and finally with a saturated solution of NaHCO₃. The organic phase was then dried with MgSO₄ and evaporated under a vacuum, yielding each product **1-3** as a yellow powder.

Table 2. Experimental details of the synthesis of precursors **1-3**

Product	n	m (mg) Boc 4-5	m (mg) OtBu 6-7	m (mg) TBTU	m (mg) NaHCO ₃ (A)	m (mg) NaHCO ₃ (B)	Yield (%/mg)
1 : R = CH ₂ Ph	1	1000 (4)	1068.7 (6)	1210.3	316.6	348.3	66/1157
2 : R = CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1	1000 (5)	1225.9 (6)	1388.3	363.2	399.5	67/1258
3 : R = CH ₂ Ph	2	506.6 (4)	774.0 (7)	613.2	160.4	176.4	42/1175

8.2.2 Phe-Phe-OtBu **1a**, Leu-Phe-OtBu **2a** and Phe-Phe-Phe-OtBu **3a**

The deprotection of precursors **1-3** was performed as shown in Scheme 3. Masses and volumes of reagents and yield of products are presented in Table 3.

Scheme 3. Deprotection reaction of precursors **1-3**.

The general procedure of the deprotection: Precursor **1-3** was suspended in *tert*-butyl acetate (*t*BuOAc) at a final concentration of 0.2 M. Concentrated H₂SO₄ was added dropwise, and the solution was left to stir at R.T. for 1 h. The solution was neutralized with a saturated solution of NaHCO₃ and extracted with ethyl acetate. The organic phase was dried with MgSO₄ and evaporated under vacuum, yielding product **2a** as a yellow oil and products **1a** and **3a** as a yellowish powder.

Table 3. Experimental details of the deprotection of precursors **1-3**

Product	n	m (mg) precursor	V (mL) <i>t</i> BuOAc	V (μ L) H ₂ SO ₄	Yield (%/mg)
1a : R=CH ₂ Ph	1	1062.7 (1)	11.3	607.5	95/774
2a : R=CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1	500.0 (2)	5.8	308.3	39/150
3a : R=CH ₂ Ph	2	250.0 (3)	2.0	108.7	55/115

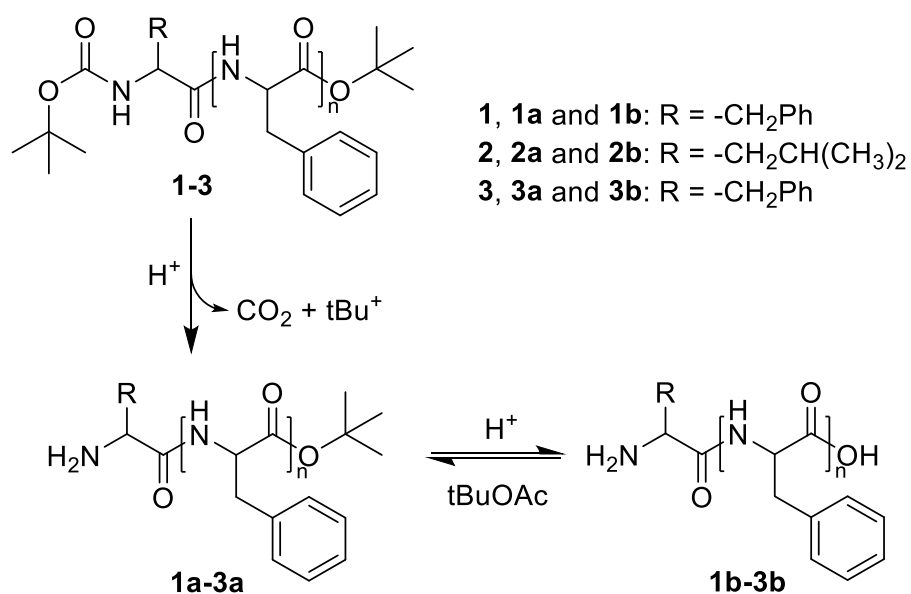
8.3 Preparation of organogels

The precursor **1-3** was suspended in *t*BuOAc (1.0 mL) to reach the desired concentration (Table 4) and sonicated until the fine suspension was obtained. Concentrated H₂SO₄ was then added to the solution, the vial was gently swirled and allowed to rest without disturbance at R.T. for at least 12 h. Two acid concentrations were used (1.0 eq and 0.5 eq). Although both formed a self-supporting gel, 0.5 eq gels required a longer time to reach a complete gel state (no liquid was observed on the surface of the gel). Gelation conditions for the systems **I-IV** are presented in Table 4.

Table 4. Gelation conditions for the gel systems **I-IV**.

Gel system	Precursor	m (mg)	M (mol/L)	H ₂ SO ₄ (eq)	H ₂ SO ₄ (μl)
I	Boc-Phe-Phe-OtBu 1	23.50	0.05	1.0	2.7
		23.50	0.05	0.5	1.3
II	Boc-Leu-Phe-OtBu 2	21.7	0.05	1.0	2.7
		21.7	0.05	0.5	1.3
III	Boc-Phe-Phe-Phe-OtBu 3	30.8	0.05	1.0	2.7
		15.4	0.025	1.0	1.3
		15.4	0.025	0.5	0.6
IV	Boc-Phe-Phe-OtBu 1	11.80 1	0.05	1.0	2.7
		10.86 2			
	Boc-Leu-Phe-OtBu 2	11.80 1	0.05	0.5	1.3
		10.86 2			

As previously reported by the group,¹ the proposed *in situ* gelation mechanism is presented in Scheme 4. The irreversible deprotection of the Boc-group of **1-3** under acidic conditions yields the mono-protected ester **1a-3a**. Additionally, hydrolysis/esterification cycles between **1a-3a** and the fully deprotected molecule **1b-3b** lead to the formation of a self-supporting gel. *Tert*-butyl alcohol (*t*BuOH) is also formed as a side product of the reaction.

Scheme 4. Proposed reaction mechanism leading to gelation for the gel systems **I-IV**.

9 Results and discussion

9.1 Syntheses

Precursor **1-3** and gelator molecules **1a-3a** were synthesized following the protocols described in 2.2.1 and 2.2.2, respectively. Beside Phe-Phe-Phe-O*t*Bu **3a**, all synthesized molecules were previously reported, and the recorded ^1H NMR spectra are in accordance with the literature.^{1,101,102} The ^1H NMR spectrum of **3a** is presented in Figure 50. Some signals are combined under the same letter because before 2D NMR measurements it is not possible to be entirely sure about the positions of similar proton signals in the spectrum. A ^{13}C NMR spectrum, high-resolution mass spectrum and the melting point of **3a** will be measured in the future because the work time was limited and information from ^1H NMR spectrum was enough for us to accomplish this work. The missing measurements will be made before possible publication.

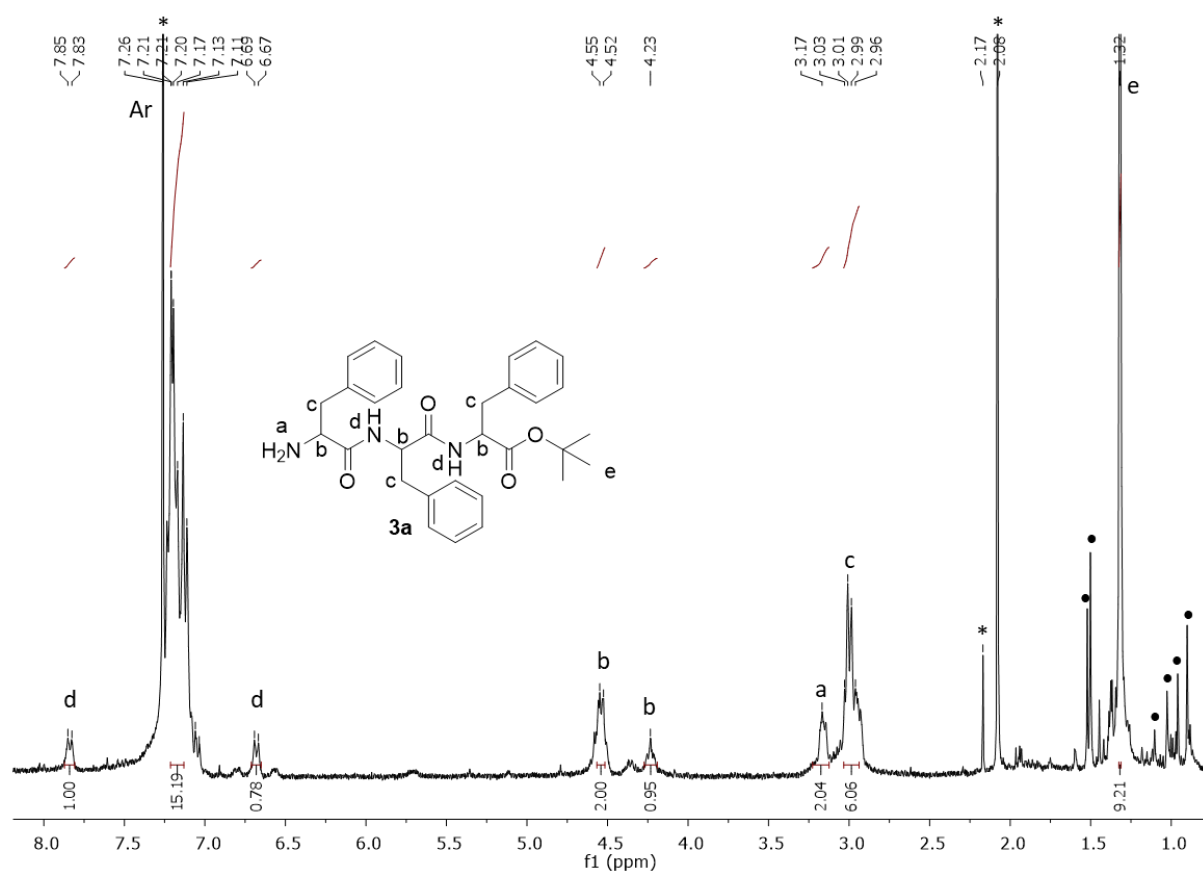


Figure 50. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) spectrum of Phe-Phe-Phe-O*t*Bu **3a**.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, **NH**), 7.21 – 7.13 (m, 15H, **Ar**), 6.68 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, **NH**), 4.54 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, **CH**), 4.23 (s, 1H, **CH**), 3.17 (s, 2H, **NH**₂), 3.03 – 2.93 (m, 6H, **CH**₂), 1.32 (s, 9H, **C(CH**₃)₃). The peaks marked with an asterisk at 7.26 ppm, 2.17 ppm and 2.08 ppm correspond to CDCl_3 , acetone and ethyl acetate, respectively. The peaks marked with a black dot correspond to *t*BuOAc impurities. Similar impurity peaks are always seen on gels' spectra.

9.2 NMR analysis

NMR analysis was performed on the gel systems **I-IV**. Based on the previous findings on the system **I** at 1.0 eq,¹ the aim was to observe both gelator molecules **a** and **b** in the gel systems **II-IV** to confirm that the proposed gelation mechanism applies, even though different molecular skeletons are used in the precursors. In addition, we wanted to verify whether the mechanism or the gels' final properties are altered by changing the accelerator concentration. NMR analyses were performed on freeze-dried gels or gels dried at R.T.

9.2.1 Gel systems **I**, **II** and **IV**

Figures 51-53 show ^1H NMR spectra of the precursor and the corresponding gels (0.05 M, 1.0 eq and 0.05 M, 0.5 eq) for systems **I**, **II** and **IV**, respectively. In the spectra of the 1.0 eq gel, the peak corresponding to the Boc group at ~1.30 ppm, and the associated amide NH group peak disappeared. The chemical shift corresponding to the second NH group shifted to ~9.00 ppm. The peak at ~8.00 ppm formed and relate to the protonated state NH_3^+ of the free amine. A broad peak corresponding to *t*BuOH is observed between 4.40-6.00 ppm.

Interestingly, in the spectra of the gels at 0.5 eq, the residue of the precursor and often only one NH peak is observed ~9.00 ppm. Therefore, the ratio of gelator molecules cannot be determined. Also, it was found that the drying method is irrelevant to the final composition of the gels. ^1H NMR spectra of Boc-Phe-Phe-*Ot*Bu **1** and corresponding 0.05 M gel at 1.0 eq shown in Figure 51 agree with previously reported spectra.¹

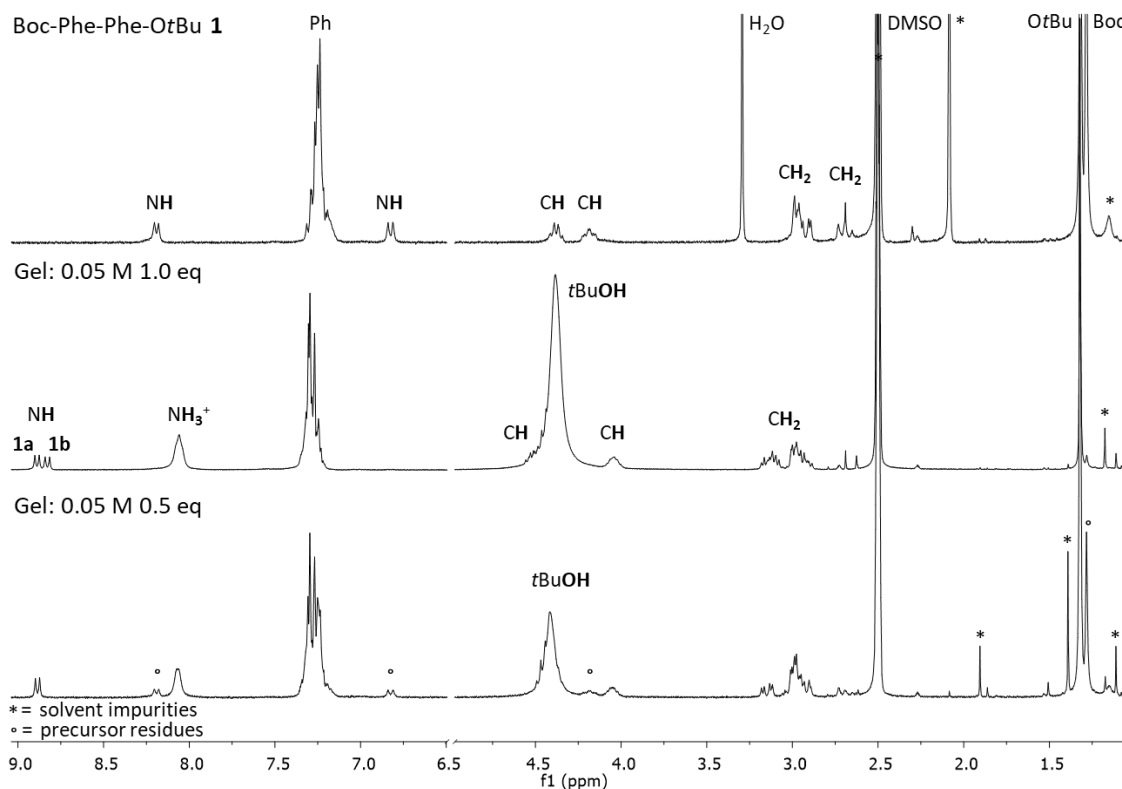


Figure 51. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) spectra of precursor Boc-Phe-Phe-OtBu **1**, gel system **I** 0.05 M, 1.0 eq and 0.05 M, 0.5 eq. Gelation is induced by gelator molecules **1a** and **1b** in approximately 1:0.88 ratio in 0.05 M, 1.0 eq gel.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.19 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, **NH**), 7.32 – 7.18 (m, 10H, **Ar**), 6.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **NH**), 4.38 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, **CH**), 4.18 (s, 1H, **CH**), 3.00 – 2.85 (m, 2H, **CH**₂), 2.69 (t, $J = 12.1$ Hz, 2H, **CH**₂), 1.32 (s, 9H, C(**CH**₃)₃), 1.28 (s, 9H, C(**CH**₃)₃). The peaks at 3.29 ppm and 2.50 ppm correspond to water and d_6 -DMSO, respectively.

The peak identification for gel system **I** (0.05 M, 1.0 eq) is as follow: ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, **NH**), 8.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, **NH**), 8.06 (s, 6H, **NH**₃⁺), 7.32 – 7.23 (m, 20H, **Ar**), 4.04 (s, 2H, **CH**), 3.18 – 2.92 (m, 8H, **CH**₂), 1.32 (s, 9H, C(**CH**₃)₃). The broad peak at 4.38 ppm corresponds to *t*BuOH. The signals at 2.50 ppm and 1.18 ppm correspond to DMSO and *t*BuOAc solvent impurities, respectively.

The ^1H NMR spectrum of Boc-Leu-Phe-OtBu **2** (Figure 52) is in agreement with the previously published spectrum.¹⁰¹

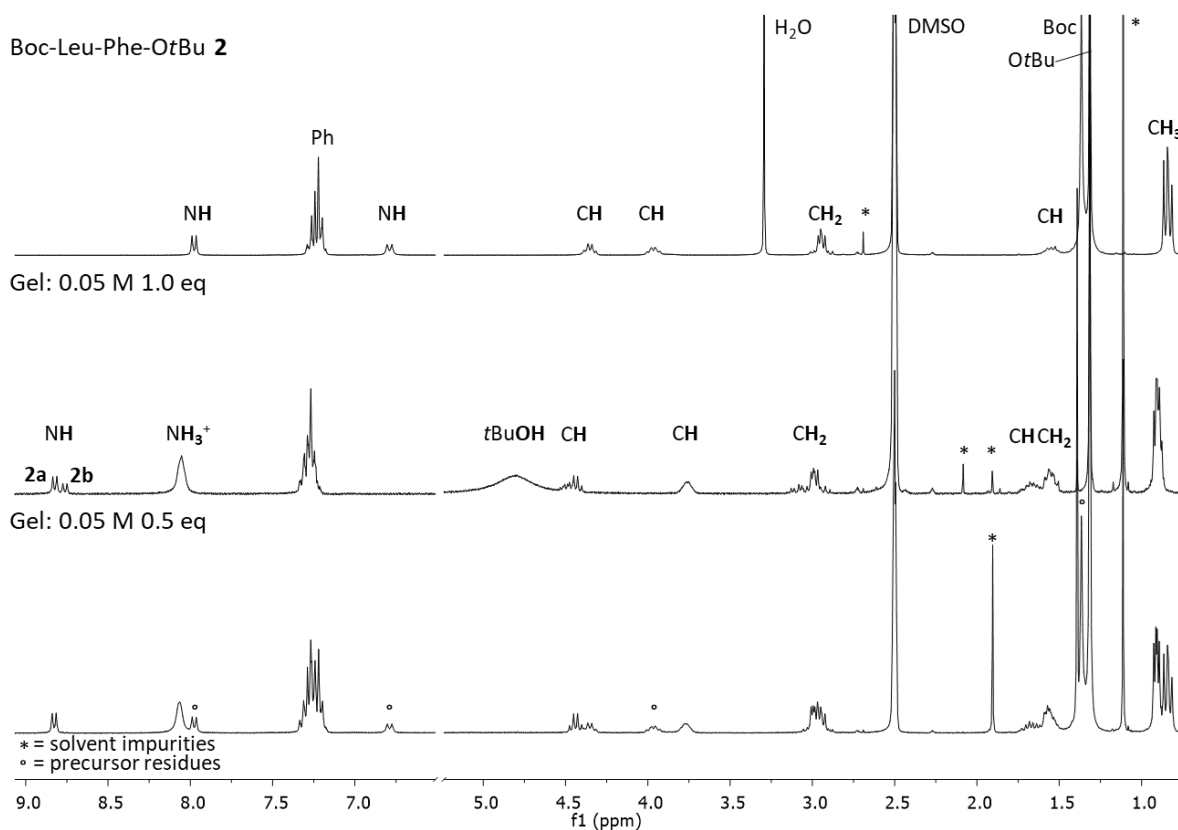


Figure 52. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) spectra of precursor Boc-Leu-Phe-OtBu **2**, gel system **II** 0.05 M, 1.0 eq and 0.05 M, 0.5 eq. Gelation is induced by gelator molecules **2a** and **2b** in approximately 1:0.53 ratio in 0.05 M, 1.0 eq gel.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 7.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, **NH**), 7.28 – 7.18 (m, 5H, **Ar**), 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, **NH**), 4.39 – 4.30 (m, 1H, **CH**), 3.97 (dd, $J = 15.0, 8.6$ Hz, 1H, **CH**), 3.03 – 2.89 (m, 2H, **CH**₂), 1.54 (dd, $J = 13.4, 6.4$ Hz, 2H, **CH**), 1.37 (s, 9H, **C(CH**₃)₃), 1.31 (s, 9H, **C(CH**₃)₃), 0.87 – 0.80 (m, 6H, (**CH**₃)₂). The signals at 3.29 ppm and 2.50 ppm are related to water and DMSO, respectively.

The peak identification for gel system **II** gel (0.05 M 1.0 eq) is as follow: ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, **NH**), 8.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, **NH**), 8.05 (s, 4H, **NH**₃⁺), 7.34 – 7.22 (m, 10H, **Ar**), 4.47 (ddd, $J = 22.4, 11.7, 6.4$ Hz, 3H, **CH**), 3.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, **CH**), 3.01 (tt, $J = 10.8, 5.6$ Hz, 3H, **CH**₂), 1.71 – 1.61 (m, 2H, **CH**), 1.60 – 1.52 (m, 4H, **CH**₂), 1.31 (s, 9H, **C(CH**₃)₃), 0.92 – 0.87 (m, 12H, **C(CH**₃)₂). The signals at 4.81 ppm and 2.50 ppm correspond to *t*BuOH and DMSO, respectively. The signals at 2.08 ppm, 1.91 ppm and 1.11 ppm are corresponding *t*BuOAc solvent impurities.

The ^1H NMR spectra of precursors Boc-Phe-Phe-OtBu **1** and Boc-Leu-Phe-OtBu **2** are shown in Figure 53.

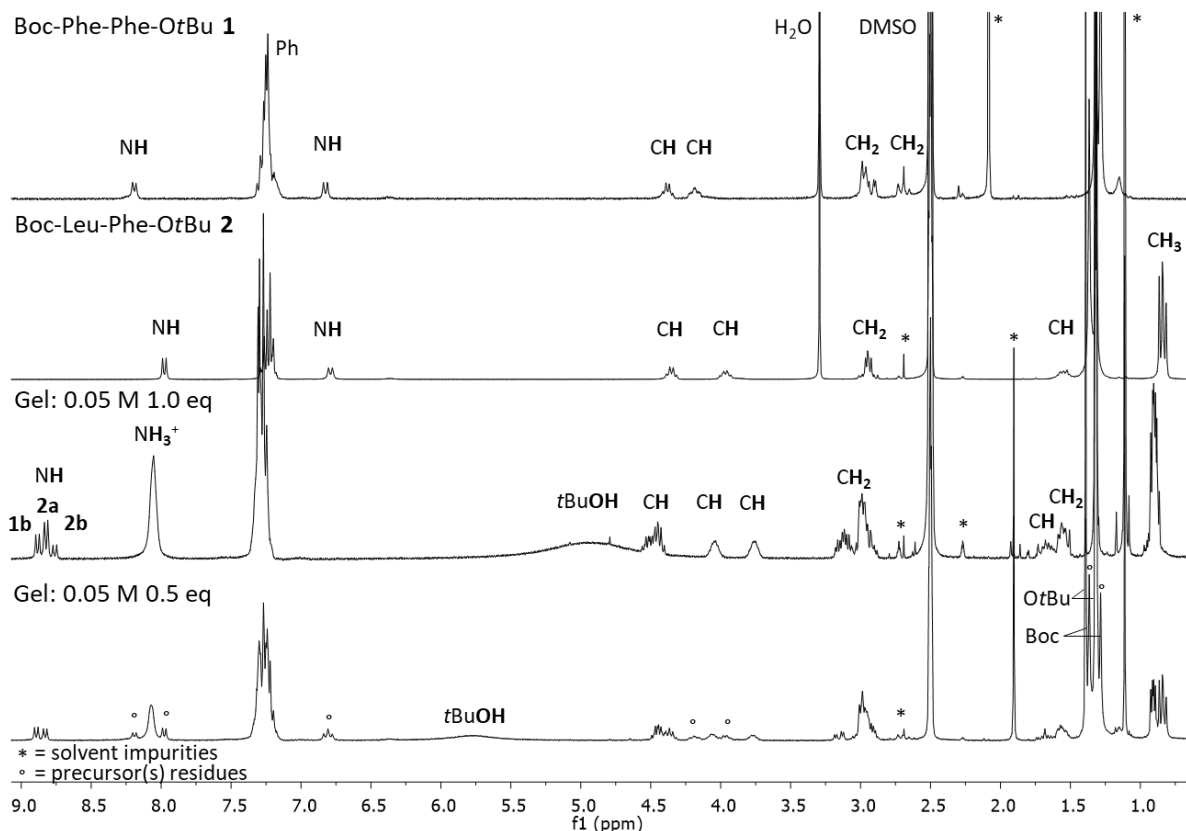


Figure 53. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) spectra of precursor Boc-Phe-Phe-OtBu **1**, Boc-Leu-Phe-OtBu **2**, and gel system **IV** 0.05 M, 1.0 eq and 0.05 M, 0.5 eq. Gelation is induced by gelator molecules **1b**, **2a** and **2b** in approximately 0.55:1:0.32 ratio in 0.05 M, 1.0 eq gel.

The peak identification for gel system **IV** (0.05 M 1.0 eq): ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, **NH**), 8.82 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, **NH**), 8.76 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, **NH**), 8.05 (s, 6H **NH** $_3^+$), 7.34 – 7.23 (m, 12H, **Ar**), 4.47 (ddd, $J = 19.8, 11.2, 6.2$ Hz, 3H, **CH**), 4.04 (s, 1H, **CH**), 3.75 (s, 1H, **CH**), 3.05 (tdd, $J = 14.2, 10.9, 5.8$ Hz, 7H, **CH** $_2$), 1.75 – 1.61 (m, 2H, **CH**), 1.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H, **CH** $_2$), 1.32 (s, 9H, C(**CH** $_3$) $_3$), 0.90 (dt, $J = 8.2, 4.6$ Hz, 12H, (**CH** $_3$) $_2$).

^1H NMR spectra of the gel systems **I-II** show the presence of two gelator molecules, mono-protected **1a-1b** and fully deprotected **2a-2b** (Figures 54a and 54b). All spectra of the gel system **I** were measured one day after gelation (black). The bottom spectrum was measured 10 days after gelation (green) for gel system **II**. In both cases, the ratio between gelator molecules changes randomly. However, in the case of gel system **IV** (Figure 54c), more than two gelator molecules can be detected due to the presence of two precursor molecules. In theory, four gelator molecules would be observed. However, only three or fewer gelator molecules were

observed. ^1H NMR spectra of the gel system **IV** were measured the day after gelation (black) and 5 days after gelation (red). Similarly, to gel systems **I** and **II**, the ratio between the gelator molecules change randomly. The presence of two gelator molecules in the gels and their randomly changing ratio support the previous results from the group.¹

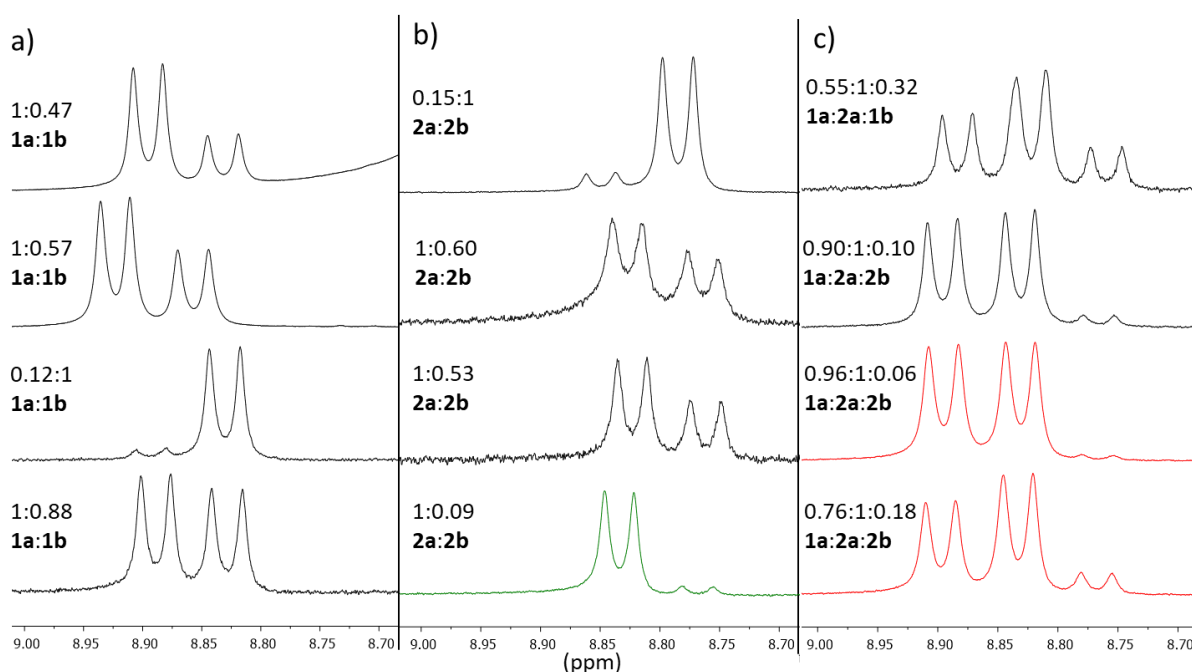


Figure 54. Expansion gels to NH peaks of ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) spectra of 0.05 M, 1.0 eq one day after gelation (black), 5 days after gelation (red) and 10 days after gelation (green). a) Gel system **I**, b) gel system **II** and c) gel system **IV**.

9.2.2 Gel system **III**

Figure 55 shows the ^1H NMR spectrum of precursor molecule Boc-Phe-Phe-Phe-*Ot*Bu **3** recorded in d_6 -DMSO and CDCl_3 . The spectrum measured in CDCl_3 is in agreement with previously reported spectra¹⁰². However, there is no earlier report of a ^1H NMR spectrum of **3** in d_6 -DMSO. In the spectrum recorded in d_6 -DMSO, extra doublets NH region are observed, possibly due to the different conformation of **3**.

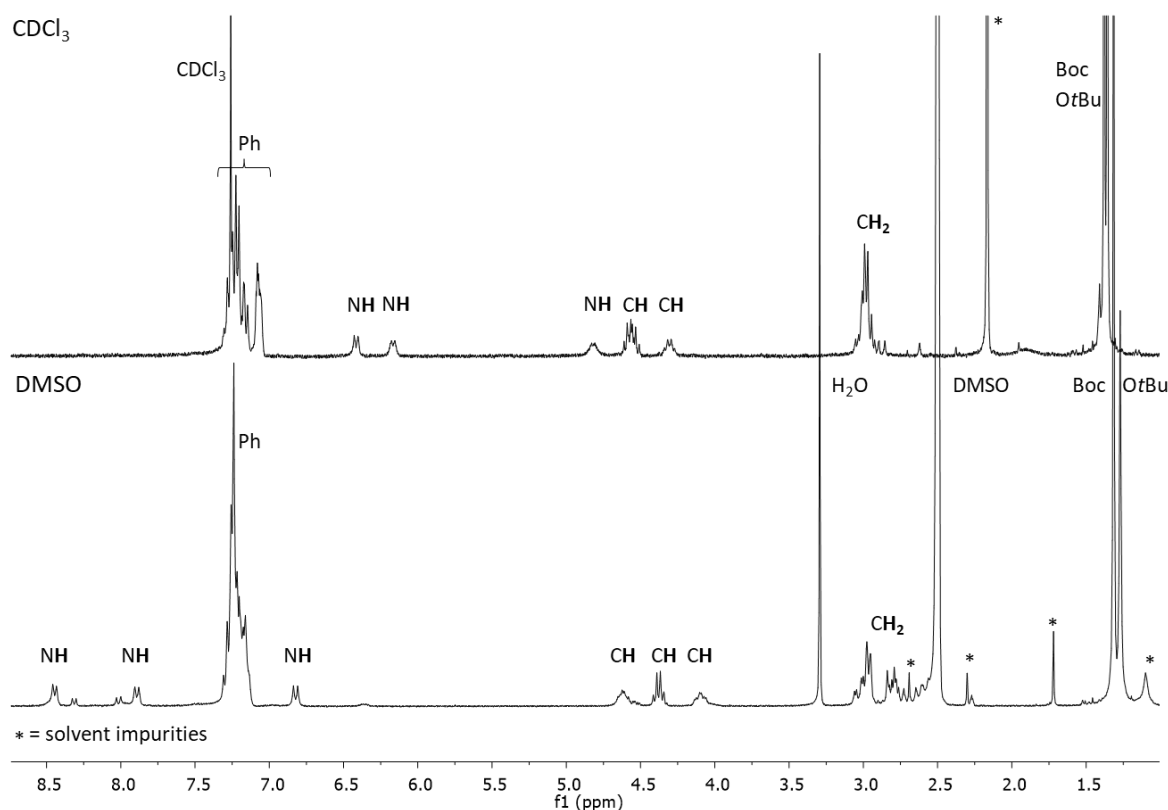


Figure 55. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO and d - CDCl_3) spectrum of gel precursor Boc-Phe-Phe-OtBu **3**.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28 – 7.13 (m, 15H, **Ar**), 6.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, **NH**), 6.18 (s, 1H, **NH**), 4.81 (s, 1H, **NH**), 4.59 – 4.52 (m, 2H, **CH**), 4.29 (s, 1H, **CH**), 3.03-2.95 (m, $J = 4.5$ Hz, 6H, **CH₂**), 1.38 (s, 9H, **C(CH₃)₃**), 1.36 (s, 9H, **C(CH₃)₃**).

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.38 (dd, $J = 39.6, 7.5$ Hz, 1H, **NH**), 7.95 (dd, $J = 36.7, 8.4$ Hz, 1H, **NH**), 7.53 – 7.10 (m, 15H, **Ar**), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, **NH**), 4.62 (s, 1H, **CH**), 4.38 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, **CH**), 4.10 (s, 1H, **CH**), 3.09 – 2.68 (m, 6H, **CH₂**), 1.31 (s, 9H, **C(CH₃)₃**), 1.27 (s, 9H, **C(CH₃)₃**).

The ^1H NMR spectrum of the gel system **III** (0.025 M, 1.0 eq) measured in d_6 -DMSO shows extra two doublets in the NH region, similarly to the precursor **3** spectrum. This could arise from the formation of two gelator molecules after the reaction or be a conformation effect. To enlighten the issue and verify the conformation hypothesis, NMR measurement of the gel system **III** gel was also attempted in CDCl_3 , but the dried gels were not soluble in CDCl_3 at R.T. Therefore, ^1H NMR spectra of gel system **III** were recorded at 30 °C and 110 °C in d_6 -DMSO (Figure 56). At 110 °C, the extra doublets begin to disappear, which indicates a

conformational change. It is of note that only one gelator molecule, **3a**, is present in the gel. This suggests that the gelation mechanism might differ from the other gel systems **I**, **II** and **IV**.

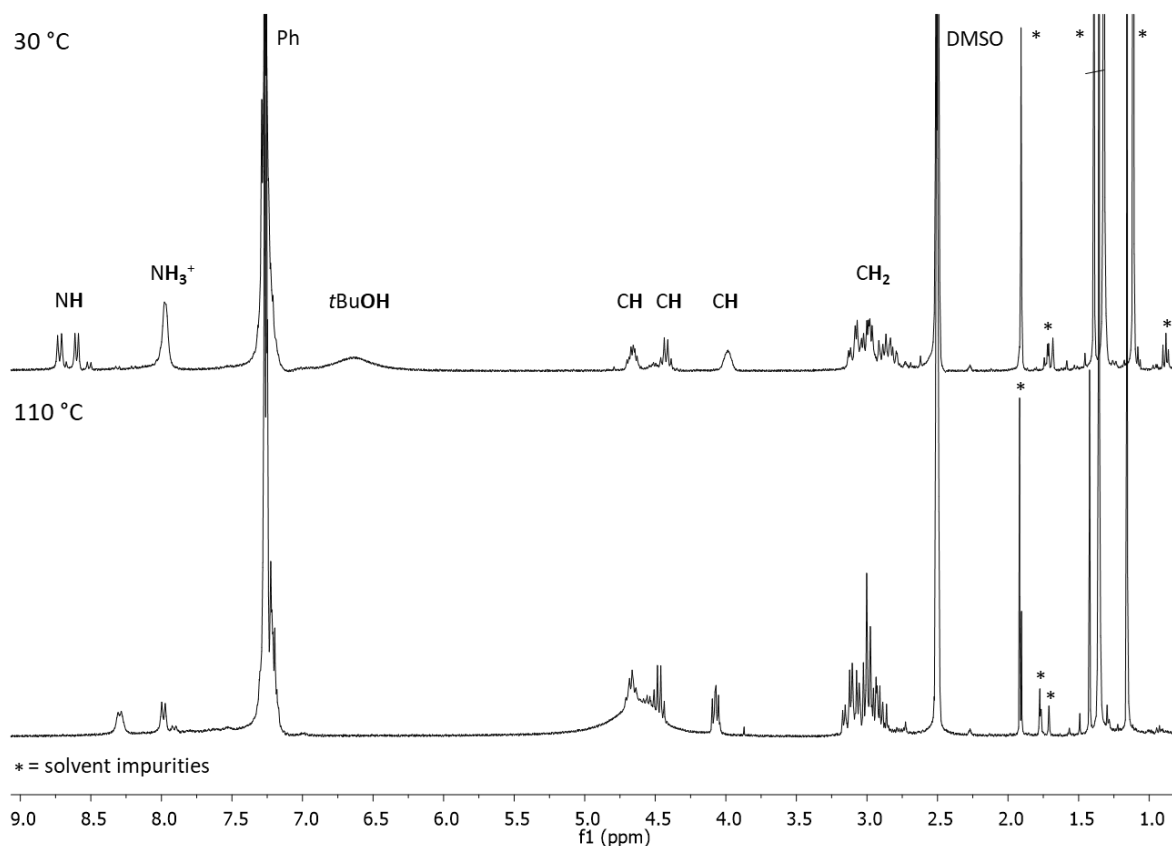


Figure 56. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) spectrum of gel system **III** 0.025 M, 1.0 eq at 30 °C and 110 °C.

9.3 FTIR analysis

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is a widely used technique to analyse protein morphology and secondary structure.^{103,104} Organic compounds have a characteristic set of absorption bands in the infrared region related to the vibration modes of their chemical bonds. Proteins and polypeptides exhibit characteristic IR absorption bands in specific regions, referred to as amide A, B, and I-VII regions. The amide I (1600 to 1700 cm^{-1}) and II (1500-1600 cm^{-1}) regions are of particular interest in biological systems and contain the most important vibrational bands of the protein backbone. The amide I region consists of the C=O stretching vibrations of peptide bonds and are known to correlate with the secondary structure of proteins. The amide II region consists of N-H bending and C-N stretching vibrations.^{104,105}

This study focuses on the secondary structure of gel systems **I-IV**. Therefore, the amide I region is of our interest. Gel samples (0.05 M, 1.0 eq) were prepared as described in chapter 8.3 and dried at R.T. Two distinct gel samples were prepared for gel systems **I** (**I-1** and **I-2**) and **II** (**II-1** and **II-2**).

The amide I region of gelator Phe-Phe-O*t*Bu **1a** and two distinct gel systems **I** (**I-1** and **I-2**) are shown in Figure 57. Phe-Phe-O*t*Bu **1a** absorbs at 1651 cm^{-1} , which is assigned to an aperiodic secondary structure.¹⁰⁶ Gel **I-1** exhibits a peak at 1684 cm^{-1} , corresponding to an antiparallel β -sheet secondary structure.¹⁰⁷ Both gels **I-1** and **I-2** exhibit a peak at 1661 cm^{-1} , indicating an α -helix secondary structure.¹⁰⁴

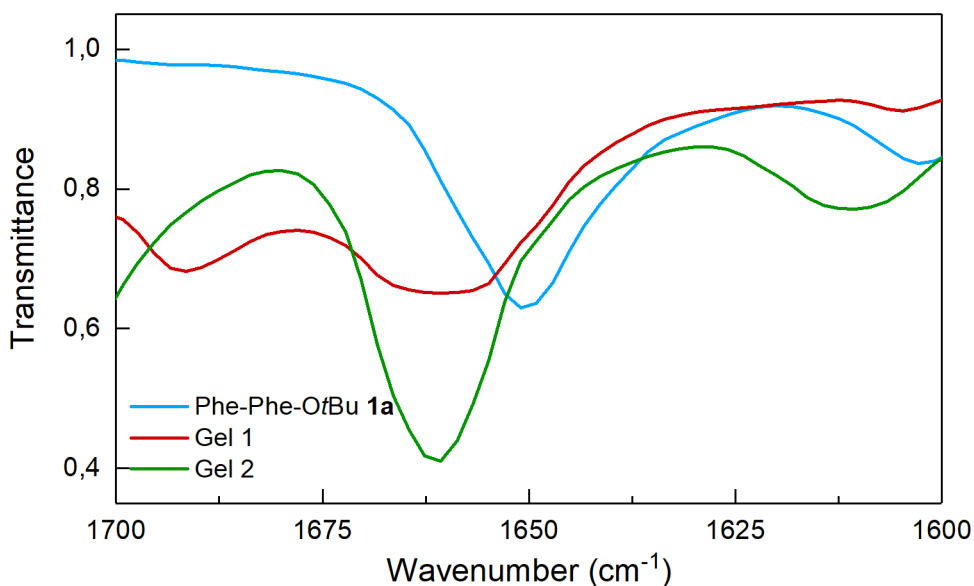


Figure 57. ATR-FTIR spectra depicting the amide I region of Phe-Phe-O*t*Bu **1a** and gel systems **I-1** and **I-2**.

The amide I region of the gelator Leu-Phe-O*t*Bu **2a** and two distinct gel systems **II** (**II-1** and **II-2**) are presented in Figure 58. Both gels **II-1** and **II-2** absorb at 1656 cm^{-1} indicating an α -helix secondary structure¹⁰⁴, while gel **II-1** also has a peak at 1684 cm^{-1} , characteristic of an antiparallel β -sheet.¹⁰⁷

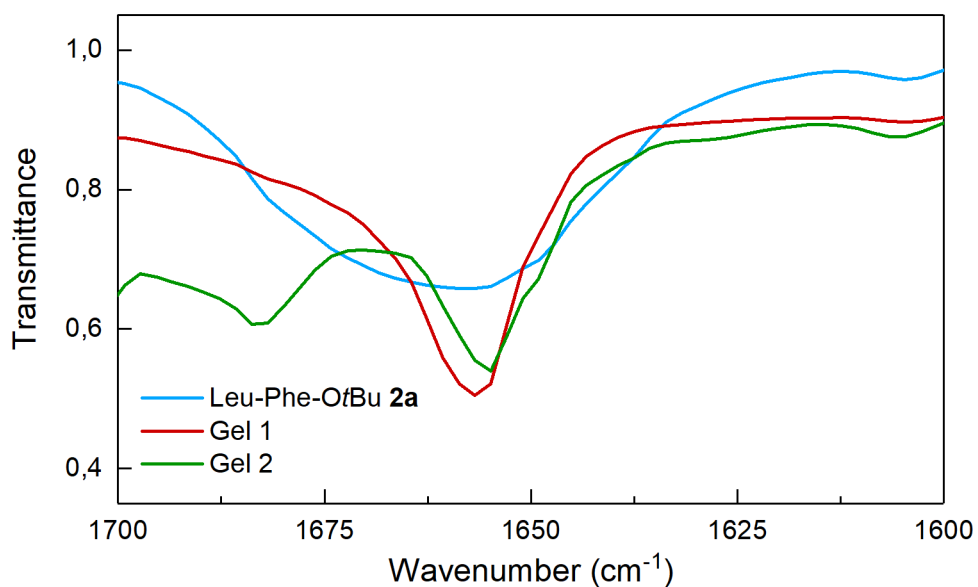


Figure 58. ATR-FTIR spectra depicting the amide I region of Leu-Phe-OtBu **2a** and gel systems **II-1** and **II-2**.

Figure 59 shows the amide I region of the gelator Phe-Phe-Phe-OtBu **3a** and its corresponding gel **III**. Phe-Phe-Phe-OtBu **3a** absorbs at 1647 cm⁻¹, assigned to random coil secondary structure.¹⁰⁴ Gelator **3a** also have a peak at 1688 cm⁻¹, suggesting the secondary amide stretching.¹⁰⁸ The gel absorbs at 1651 cm⁻¹, indicating an α -helix secondary structure.¹⁰⁴

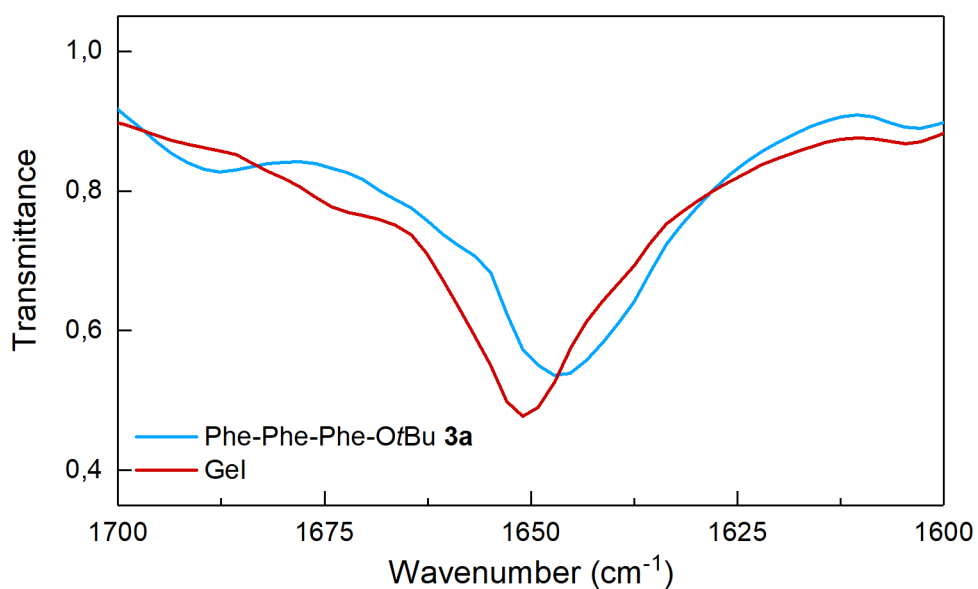


Figure 59. ATR-FTIR spectra depicting the amide I region of Phe-Phe-Phe-OtBu **3a** and gel system **III**.

Figure 60 shows the amide I region of the gelators Phe-Phe-*O*tBu **1a**, Leu-Phe-*O*tBu **2a** and gel system **IV**. The gel absorbs at 1657 cm^{-1} , corresponding to the α -helix secondary structure.¹⁰⁴ It is of note that the gel system **IV** consisting initially of a 1:1 mixture of precursors **1** and **2**, still shows α -helix secondary structures of the individual gels.

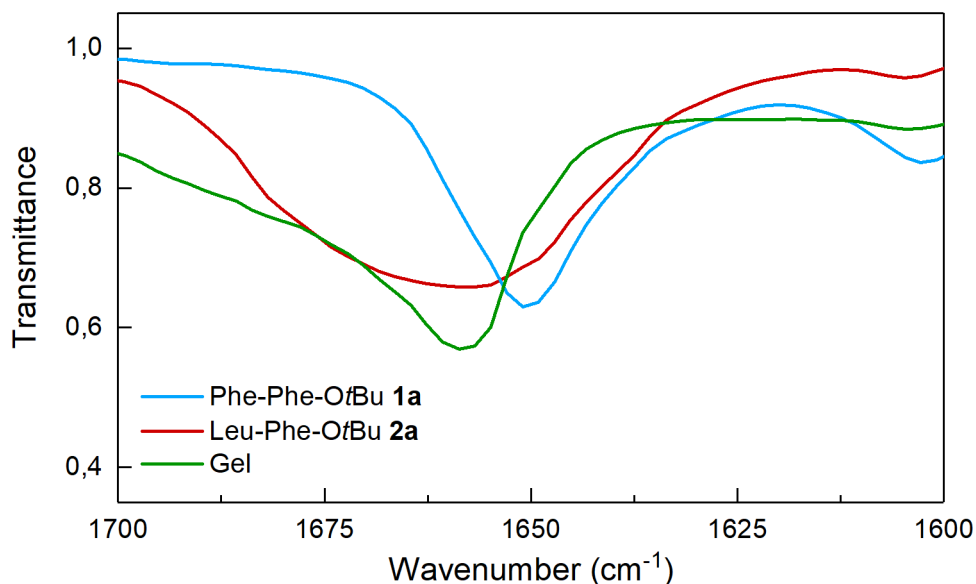


Figure 60. ATR-FTIR spectra depicting the amide I region of Phe-Phe-*O*tBu **1a**, Leu-Phe-*O*tBu **2a** and gel system **IV**.

9.4 Nano-FTIR analysis

Fourier transform infrared nanospectroscopy (nano-FTIR) provides information on the secondary structure of proteins at the nanoscale, which is impossible with regular FTIR due to the sub-diffraction limit.¹⁰³ Nano-FTIR is performed on a scattering scanning-near-field optical microscopy (s-SNOM) which combines an atomic force microscope (AFM) with an IR illumination source. The metal-coated AFM tip is illuminated by a broad band infrared (IR) laser and the scattered light is analysed by Fourier transform. The Michelson interferometer separates the amplitude and phase of the light yielding the reflective and absorptive properties of the illuminated material, respectively^{103,109}

Due to lack of time, nano-FTIR measurements have been performed solely on the gel system **I**. The measurements at the nanoscale were compared with bulk FTIR to observe differences

between the nano (single fibres) and macro (bulk) scale and define the hetero/homogeneity of the material. Gel samples (0.05 M, 1.0 eq) were prepared as described in chapter 9.3. Samples were diluted in tBuOAc (1:10) and the gel was mechanically broken. 3 μL of the suspended fibre solution was transferred onto an Au-coated Si chip and freeze-dried for 2 h. As reported earlier, the gels are sensitive to water. Hence a fresh sample must be prepared daily to avoid decomposition of the network over time by atmospheric humidity.¹

The amide I region of the nano-FTIR spectra of five single fibres is presented in Figure 61 (black curves). The deconvolution of the bands (peak fitting) allows for the quantification of each individual band. Lorentzian and Gaussian functions were used to deconvolute the bands but remain constant within each spectrum. The area of the fitted peaks determines the percentage distribution of the secondary structure in single fibres.

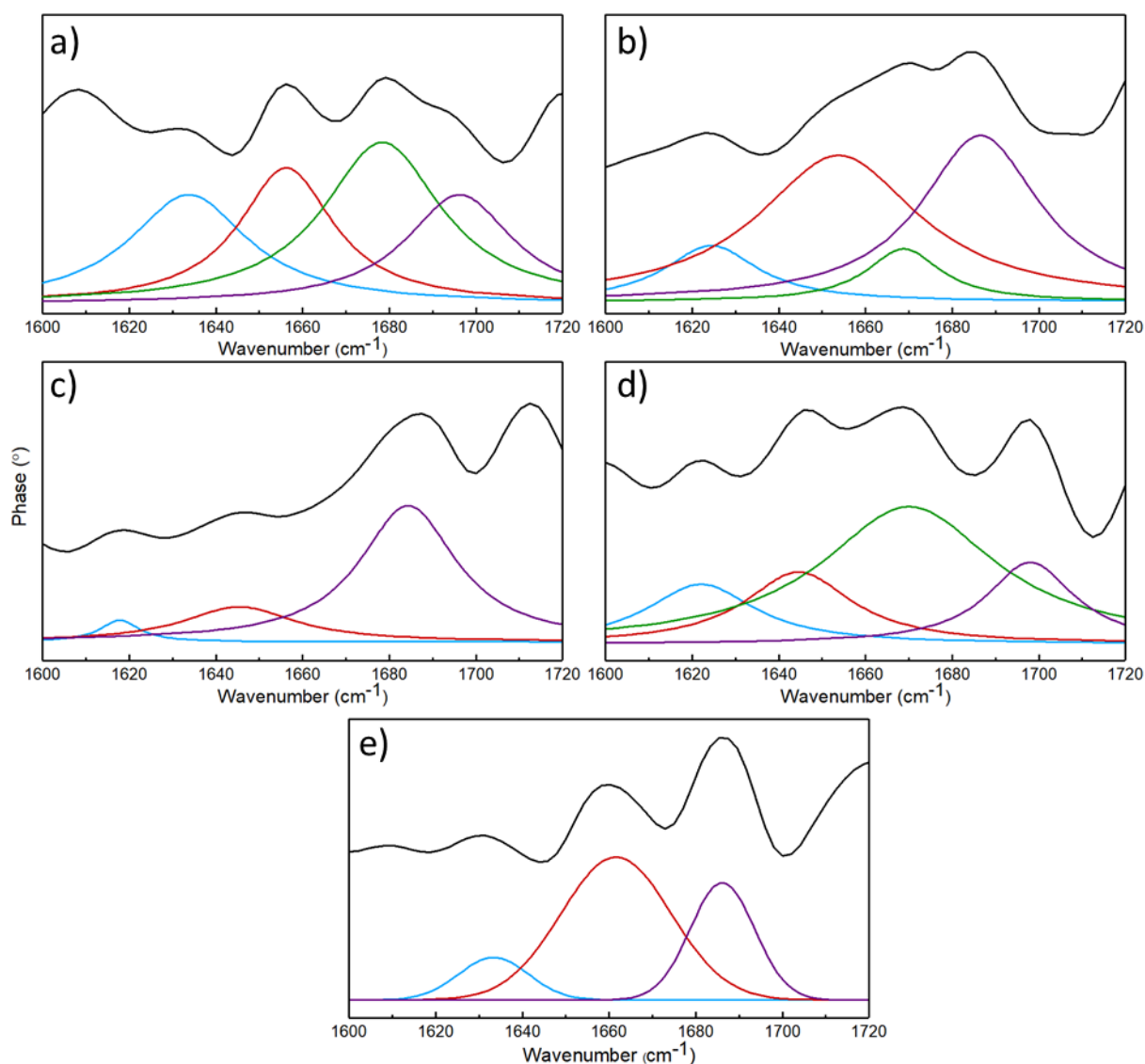


Figure 61. Nano-FTIR spectra of five single fibre **a-e** (black curves). The peaks related to secondary structures obtained by fitting are β -sheet (blue), α -helix (red), and antiparallel β -sheet (green and purple).

Table 5 summarizes the average composition of the single fibres and the average peak positions. In all cases, the fibres consist of α -helix and β -sheet structures, although the composition differs slightly among them. Most structures exhibit parallel β -sheets and antiparallel β -sheets (71 %) with a minor component of α -helix (29 %). Peak positions are averaged for β -sheet at 1632 cm^{-1} (blue), for α -helix at 1655 cm^{-1} (red), and for two positions of antiparallel β -sheets around 1674 cm^{-1} (green) and 1692 cm^{-1} (purple). The secondary structure observed at the nanoscale differs from the bulk state. The latter displays only the α -helix characteristic peak, while at the nanoscale, the secondary structure consists mainly of β -sheets.

Table 5. The average peak positions (cm^{-1}) and composition (%) of the secondary structure and single fibres.

Secondary structure	Wavenumber avg. (cm^{-1})	Fit. (a) (%)	Fit. (b) (%)	Fit. (c) (%)	Fit. (d) (%)	Fit. (e) (%)	Avg. (%)
α -helix	1655	22	44	22	18	60	29
β -sheet	1632	27	10	5	15	11	71
antiparallel	1674	27	8	-	51	-	
β -sheet	1691	24	38	73	16	29	

9.5 AFM imaging

AFM height images of gel systems **I-IV** are presented in Figure 62. The samples were prepared as described in chapter 8.3, but a plain Si chip without Au coating was used. Single fibres were observed for the gel systems **I**, **III**, and **IV** (Figure 62a, 62c and 62d, respectively). However, system **II** (Figure 62b) displays only fibre agglomeration. The average heights and widths of the single fibres of different gel systems are given in Table 6. The average height of a single fibre in the system **I** is 9.2 nm, and the average width is 100 nm and constant for systems **III** and **IV**. As system **II** consists of agglomerated fibres, their heights and widths are higher (48.7 nm and 1500 nm, respectively).

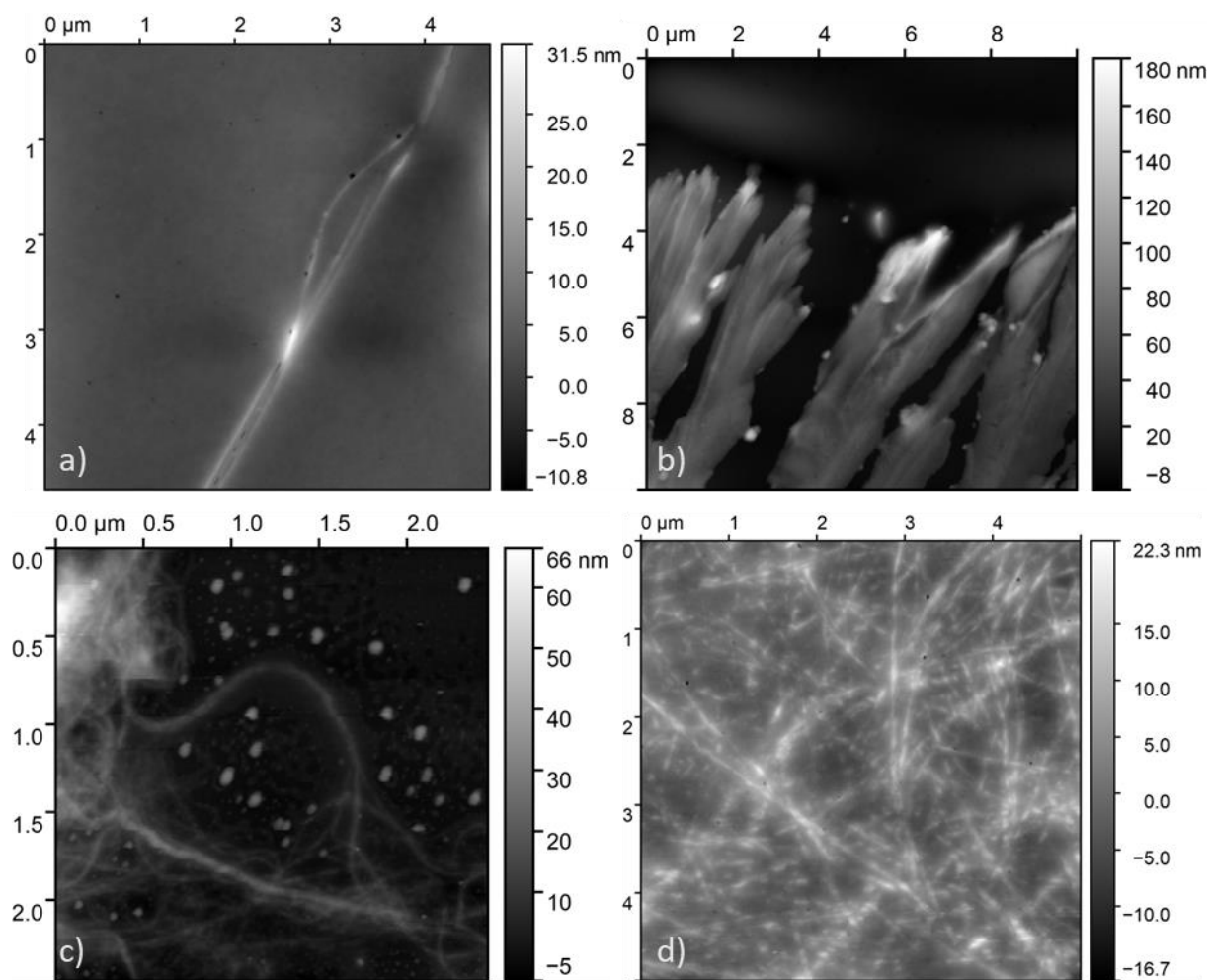


Figure 62. AFM height images of gel systems **I-IV**. a) Gel system **I**, b) gel system **II**, c) gel system **III** and d) gel system **IV**.

Table 6. The average heights and widths for the single fibres of gel systems **I**, **III** and **IV** and for fibre agglomeration of gel system **II**.

Gel system	Height (nm)	Width (nm)
I	9.2	100
II	48.7	1500
III	11.3	400
IV	9.6	100

9.6 Swelling studies, solubility assays and lifespan of gel systems II-IV

Swelling test, solubility assay and the lifespan of the gel system **I** were previously published by the group.¹ Gel system **I** (0.05 M, 1.0 eq) has a lifespan of 4 days, after which it turns back into a solution. The gel can be dissolved in *t*BuOH and water, although at different rates, and can absorb 6 % of its initial weight of solvent. Similar studies were performed on gel systems **II-IV**.

Gel samples (0.05 M, 1.0 eq) were prepared as described in chapter 8.3. Gels were weighted (w_0), and *t*BuOAc solvent (1 mL) was gently added to the surface of the gels. After 24 h, the solvent was removed, swollen gels were weighed (w_t), and the new solvent was added on top of the gels. The procedure was repeated for 12 days. The swelling degree (SD-%) was calculated according to equation (1):

$$SD(\%) = \frac{w_t}{w_0} \times 100. \quad (1)$$

Figure 63 shows the swelling degree as a function of time. However, for these systems, no swelling was observed.

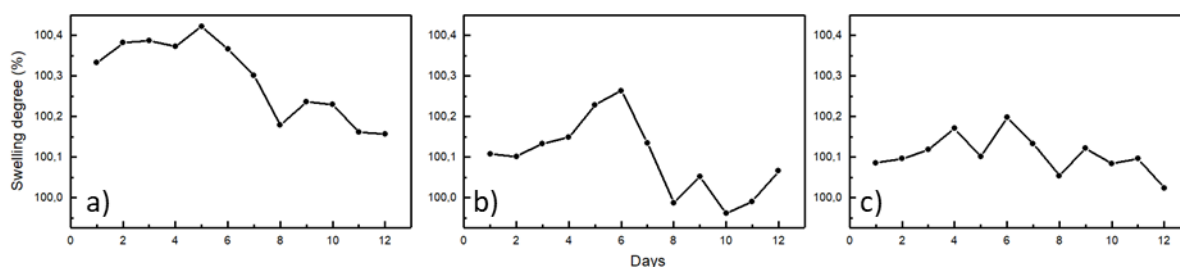


Figure 63. The swelling degree (%) of gels (0.05 M, 1.0 eq) as a function of time (days). a) Gel system I gel, b) gel system III, and c) gel system IV.

Based on previous research, the collapse of the gels is not due to the interconversion of gel molecules, but rather to the formation of *t*BuOH over time, which dissolves the network. The stability of the gel system **I** towards the effect of *t*BuOH was previously tested.¹ Similar experiments were performed for gel systems **II-IV**. Upon addition of *t*BuOH on the surface of the gels, gels collapsed within 24 h, faster than the gel system **I** (48 h). The observed lifespan for Boc-Leu-Phe-*Ot*Bu gel system **II** (1.0 eq) is 22 days, Boc-Phe-Phe-Phe-*Ot*Bu gel system **III** (1.0 eq) 11 days and gel system **IV** (1.0 eq) 9 days. Notably, gels at 0.5 eq of acid do not break over time, probably because of insufficient formation of *t*BuOH.

10 Yhteenveto / Conclusion

Injektoitavat hydrogeelit ovat *in situ* -geelejä muodostavia polymeerimateriaaleja, jotka pääasiassa läpikäyvät sooli-geelisiirtymän kehossa vasteena ympäristön olosuhteille. Injektoitavat hydrogeelit kuljetetaan kohteeseen nestemäisenä esiasteliuksena injektion tai katetrin avulla, minkä jälkeen ne muodostavat hydrogeelin kolmiulotteisen verkkorakenteen polymeeriketjujen välisten siltasidosten avulla hyödyntäen joko kemiallisia tai fysikaalisia silloitusmenetelmiä. Injektoitavien hydrogeelien tärkeimpiä ominaisuuksia ovat bioyhteensopivuus, biohajoavuus ja injektoitavuus, jonka takaa esiasteliuksen sopiva viskositeetti ja geeliytymisnopeus. Polymeerimateriaalin täytyy olla myrkytön eli se ei saa aiheuttaa fysiologista vastetta kehossa ja sen täytyy samasta syystä hajota mahdollisimman luonnollisiksi sivutuotteiksi.

Synteettiset polypeptidit ovat synteettisiä aminohapoista koostuvia proteiinia jäljitteleviä materiaaleja, jotka soveltuvat hyvin injektoitavien hydrogeelien valmistukseen. Ne ovat kemiallisesti monimuotoisia ja niiden aminohapposivuketjuihin voidaan liittää erilaisia funktionaalisia ryhmiä. Synteettiset polypeptidit ovat luonnollisesti bioyhteensopivia ja kykenevät itsejärjestäytymään vesiliuoksessa erilaisiksi sekundäärirakenteiksi muodostaen hydrogeelejä vasteena ulkoiselle ärsykkeelle. Ulkoisia ärsykeitä voivat olla lämpötilan ja pH:n muutos, polymeerin hapettuminen tai pelkistyminen, valo tai entsyymaattinen aktivointi. Polypeptidipohjaisten injektoitavien hydrogeelien lupaavimmat sovelluskohteet keskittyvät pääasiassa biolääketieteeseen ja farmasiaan, joihin kuuluu lääkeaineiden kuljetus, kudostekniikka ja antibakteeriset materiaalit.

The experimental part of the thesis aimed to study the effect of the molecular structure of amino acid-based transient organogels on the final material properties. Studies included four different gel systems **I-IV** at two accelerator concentrations (1.0 eq and 0.5 eq). Research on gel system **I** (1.0 eq) was published by the group¹ and was the hypothesis of this project. The gels were prepared using 1.0 and 0.5 eq of the accelerator. The 0.5 eq gels have a longer gelation time, the ¹H NMR spectra showed precursor residues, and they do not break over time.

¹H NMR analysis confirmed the presence of both gelator molecules and the proposed gelation mechanism when extended to similar gel systems. The secondary structure of the gel system was probed by FTIR for all gel systems **I-IV** and by nano-FTIR for gel system **I**. The bulk FTIR measurements indicated that all systems have an α -helix secondary structure. However, nano-FTIR measurements on the gel system **I** revealed that at the nanoscale, the major composition of the single fibres is parallel and antiparallel β -sheets (71 %), and the minor α -helix (29 %).

Imaging of the network by AFM showed similar height and widths for gel systems **I**, **II**, and **IV** (9.2 nm, 100 nm, respectively). System **II** formed agglomerated fibres with a height of 48.7 nm and width of 1500 nm.

Research can be continued using high-performance liquid chromatography (HPLC). This technique would confirm the presence of the gelator molecules and their ratios over time as observed in ^1H NMR. HPLC measurements can be based on a previously published protocol, where the authors studied amino acid-based hydrogels.¹¹⁰ Also, nano-FTIR measurements could be done for gel systems **II**, **III** and **IV**.

Kirjallisuusluettelo / References

1. Chevigny, R.; Schirmer, J.; Piras, C. C.; Johansson, A.; Kalenius, E.; Smith, D. K.; Pettersson, M.; Sitsanidis, E. D. ja Nissinen, M., Triggering a transient organo-gelation system in a chemically active solvent, *Chem. Commun.*, **2021**, *57*, 10375–10378.
2. Lan, Y.; Corradini, M. G.; Weiss, R. G.; Raghavan, S. R. ja Rogers, M. A., To gel or not to gel: correlating molecular gelation with solvent parameters, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 6035–6058.
3. Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.*, **2015**, *6*, 105–121.
4. Yu, L. ja Ding, J., Injectable hydrogels as unique biomedical materials, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1473–1481.
5. Mathew, A. P.; Uthaman, S.; Cho, K. H.; Cho, C. S. ja Park, I. K., Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, *110*, 17–29.
6. Mahinroosta, M.; Jomeh Farsangi, Z.; Allahverdi, A. ja Shakoori, Z., Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Mater. Today Chem.*, **2018**, *8*, 42–55.
7. Darge, H. F.; Andrgie, A. T.; Tsai, H. C. ja Lai, J. Y., Polysaccharide and polypeptide based injectable thermo-sensitive hydrogels for local biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *133*, 545–563.
8. Li, Y.; Rodrigues, J. ja Tomás, H., Injectable and biodegradable hydrogels: Gelation, biodegradation and biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2193–2221.
9. Li, Y.; Yang, H. Y. ja Lee, D. S., Biodegradable and Injectable Hydrogels in Biomedical Applications, *Biomacromolecules*, **2022**, *23*, 609–618.
10. Cirillo, G.; Spizzirri, U. G.; Curcio, M.; Nicoletta, F. P. ja Iemma, F., Injectable hydrogels for cancer therapy over the last decade, *Pharmaceutics*, **2019**, *11*, 1–51.
11. Turabee, M. H.; Thambi, T.; Lym, J. S. ja Lee, D. S., Bioresorbable polypeptide-based comb-polymers efficiently improves the stability and pharmacokinetics of proteins: In vivo, *Biomater. Sci.*, **2017**, *5*, 837–848.
12. Liu, C.; Zhang, Q.; Zhu, S.; Liu, H. ja Chen, J., Preparation and applications of

- peptide-based injectable hydrogels, *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 28299–28311.
13. Ko, D. Y.; Shinde, U. P.; Yeon, B. ja Jeong, B., Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.*, **2013**, *38*, 672–701.
 14. Censi, R.; Di Martino, P.; Vermonden, T. ja Hennink, W. E., Hydrogels for protein delivery, *J. Control. Release*, **2012**, *161*, 680–692.
 15. Overstreet, D. J.; Dutta, D.; Stabenfeldt, S. E. ja Vernon, B. L., Injectable hydrogels, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, **2012**, *50*, 881–903.
 16. Nguyen, M. K. ja Lee, D. S., Injectable biodegradable hydrogels, *Macromol. Biosci.*, **2010**, *10*, 563–579.
 17. Shen, Y.; Fu, X.; Fu, W. ja Li, Z., Biodegradable stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring opening polymerization, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 612–622.
 18. Sun, Y.; Nan, D.; Jin, H. ja Qu, X., Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications, *Polym. Test.*, **2020**, *81*, 1–13.
 19. Park, T. G. ja Hoffman, A. S., Synthesis and Characterization of pH-and/or Temperature-Sensitive Hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1992**, *46*, 659–671.
 20. Fell, H.; Bae, H.; Feijen, J. ja Kim, S. W., Effect of Comonomer Hydrophilicity and Ionization on the Lower Critical Solution Temperature of N-Isopropylacrylamide Copolymers, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 2496–2500.
 21. Singh, N. K. ja Lee, D. S., In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery, *J. Control. Release*, **2014**, *193*, 214–227.
 22. Lee, S. H.; Lee, Y.; Lee, S. W.; Ji, H. Y.; Lee, J. H.; Lee, D. S. ja Park, T. G., Enzyme-mediated cross-linking of Pluronic copolymer micelles for injectable and in situ forming hydrogels, *Acta Biomater.*, **2011**, *7*, 1468–1476.
 23. Kim, M. R. ja Park, G., Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid / Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone, *J. Control. Release*, **2002**, *80*, 69–77.
 24. Park, K. M.; Lee, S. Y.; Joung, Y. K.; Na, J. S.; Lee, M. C. ja Park, K. D., Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration, *Acta Biomater.*, **2009**, *5*, 1956–1965.

25. Zhu, W.; Wang, B.; Zhang, Y. ja Ding, J., Preparation of a thermosensitive and biodegradable microgel via polymerization of macromonomers based on diacrylated Pluronic/oligoester copolymers, *Eur. Polym. J.*, **2005**, *41*, 2161–2170.
26. Rzaev, Z. M. O.; Dinçer, S. ja Pişkin, E., Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications, *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 534–595.
27. Lim, H. L.; Hwang, Y.; Kar, M. ja Varghese, S., Smart hydrogels as functional biomimetic systems, *Biomater. Sci.*, **2014**, *2*, 603–618.
28. Li, X.; Fu, M.; Wu, J.; Zhang, C.; Deng, X.; Dhinakar, A.; Huang, W.; Qian, H. ja Ge, L., pH-sensitive peptide hydrogel for glucose-responsive insulin delivery, *Acta Biomater.*, **2017**, *51*, 294–303.
29. Qu, J.; Zhao, X.; Ma, P. X. ja Guo, B., pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy, *Acta Biomater.*, **2017**, *58*, 168–180.
30. Dimatteo, R.; Darling, N. J. ja Segura, T., In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, *127*, 167–184.
31. Ullah, F.; Othman, M. B. H.; Javed, F.; Ahmad, Z. ja Akil, H. M., Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Mater. Sci. Eng. C*, **2015**, *57*, 414–433.
32. Li, Y.; Yang, H. Y. ja Lee, D. S., Advances in biodegradable and injectable hydrogels for biomedical applications, *J. Control. Release*, **2021**, *330*, 151–160.
33. Gupta, P.; Vermani, K. ja Garg, S., Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discov. Today*, **2002**, *7*, 569–579.
34. Ray, P. D.; Huang, B. W. ja Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell. Signal.*, **2012**, *24*, 981–990.
35. Xu, Q.; He, C.; Ren, K.; Xiao, C. ja Chen, X., Thermosensitive Polypeptide Hydrogels as a Platform for ROS-Triggered Cargo Release with Innate Cytoprotective Ability under Oxidative Stress, *Adv. Healthc. Mater.*, **2016**, *5*, 1979–1990.
36. Mo, C.; Luo, R. ja Chen, Y., Advances in the Stimuli-Responsive Injectable Hydrogel for Controlled Release of Drugs, *Macromol. Rapid Commun.*, **2022**, *43*, 1–18.

37. Marques, A. C.; Costa, P. J.; Velho, S. ja Amaral, M. H., Stimuli-responsive hydrogels for intratumoral drug delivery, *Drug Discov. Today*, **2021**, 26, 2397–2405.
38. Xu, Q.; Venet, M.; Wang, W.; Creagh-Flynn, J.; Wang, X.; Li, X.; Gao, Y.; Zhou, D.; Zeng, M.; Lara-Sáez, I.; Sigen, A.; Tai, H. ja Wang, W., Versatile Hyperbranched Poly(β -hydrazide ester) Macromers as Injectable Antioxidative Hydrogels, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10, 39494–39504.
39. Gong, C.; Shan, M.; Li, B. ja Wu, G., Injectable dual redox responsive diselenide-containing poly(ethylene glycol) hydrogel, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, **2017**, 105, 2451–2460.
40. Won, H. J.; Ryplida, B.; Kim, S. G.; Lee, G.; Ryu, J. H. ja Park, S. Y., Diselenide-Bridged Carbon-Dot-Mediated Self-Healing, Conductive, and Adhesive Wireless Hydrogel Sensors for Label-Free Breast Cancer Detection, *ACS Nano*, **2020**, 14, 8409–8420.
41. Kumar, G. S. ja Neckers¹, D. C., Photochemistry of Azobenzene-Containing Polymers, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 1915–1925.
42. Irie, M. ja Kunwathakun, D., Photoresponsive Polymers. Reversible Photostimulated Dilation of Polyacrylamide Gels Having Triphenylmethane Leuco Derivatives, *Macromolecules*, **1986**, 19, 295–383.
43. Jiang, Z.; Chen, J.; Cui, L.; Zhuang, X.; Ding, J. ja Chen, X., Advances in Stimuli-Responsive Polypeptide Nanogels, *Small Methods*, **2018**, 2, 1–15.
44. Zhu, Y.; Wang, L.; Li, Y.; Huang, Z.; Luo, S.; He, Y.; Han, H.; Raza, F.; Wu, J. ja Ge, L., Injectable pH and redox dual responsive hydrogels based on self-assembled peptides for anti-tumor drug delivery, *Biomater. Sci.*, **2020**, 8, 5415–5426.
45. Huynh, C. T.; Nguyen, M. K. ja Lee, D. S., Biodegradable pH/temperature-sensitive oligo(β -amino ester urethane) hydrogels for controlled release of doxorubicin, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 3123–3130.
46. Shim, W. S.; Yoo, J. S.; Bae, Y. H. ja Lee, D. S., Novel injectable pH and temperature sensitive block copolymer hydrogel, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2930–2934.
47. Zheng, Y.; Nguyen, M. K.; He, C.; Huynh, C. T. ja Lee, D. S., pH- and temperature-sensitive PCL-grafted poly(β -amino ester)-poly(ethylene glycol)-poly(β -amino ester) copolymer hydrogels, *Macromol. Res.*, **2010**, 18, 1096–1102.

48. Nguyen, M. K.; Park, D. K. ja Lee, D. S., Injectable poly(amidoamine)-poly(ethylene glycol)-poly(amidoamine) triblock copolymer hydrogel with dual sensitivities: pH and temperature, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 728–731.
49. Huynh, D. P.; Shim, W. S.; Kim, J. H. ja Lee, D. S., pH/temperature sensitive poly(ethylene glycol)-based biodegradable polyester block copolymer hydrogels, *Polymer (Guildf)*., **2006**, *47*, 7918–7926.
50. Huynh, C. T.; Nguyen, M. K.; Huynh, D. P.; Kim, S. W. ja Lee, D. S., pH/temperature-sensitive 4-arm poly(ethylene glycol)-poly(amino urethane) copolymer hydrogels, *Polymer (Guildf)*., **2010**, *51*, 3843–3850.
51. Chang, G.; Yu, L.; Yang, Z. ja Ding, J., A delicate ionizable-group effect on self-assembly and thermogelling of amphiphilic block copolymers in water, *Polymer (Guildf)*., **2009**, *50*, 6111–6120.
52. Huynh, C. T.; Nguyen, M. K.; Kim, J. H.; Kang, S. W.; Kim, B. S. ja Lee, D. S., Sustained delivery of doxorubicin using biodegradable pH/temperature- sensitive poly(ethylene glycol)-poly(β -amino ester urethane) multiblock copolymer hydrogels, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 4974–4982.
53. Shen, Y.; Li, X.; Huang, Y.; Chang, G.; Cao, K.; Yang, J.; Zhang, R.; Sheng, X. ja Ye, X., pH and redox dual stimuli-responsive injectable hydrogels based on carboxymethyl cellulose derivatives, *Macromol. Res.*, **2016**, *24*, 602–608.
54. Song, Z.; Han, Z.; Lv, S.; Chen, C.; Chen, L.; Yin, L. ja Cheng, J., Synthetic polypeptides: From polymer design to supramolecular assembly and biomedical application, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 6570–6599.
55. van Hest, J. C. M. ja Tirrell, D. A., Protein-based materials, toward a new level of structural control, *Chem. Commun.*, **2001**, *19*, 1897–1904.
56. Song, Z.; Tan, Z. ja Cheng, J., Recent Advances and Future Perspectives of Synthetic Polypeptides from N-Carboxyanhydrides, *Macromolecules*, **2019**, *52*, 8521–8539.
57. Deming, T. J., Synthesis of Side-Chain Modified Polypeptides, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 786–808.
58. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J. ja Subra, G., Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis, *Mol. Biotechnol.*, **2006**, *33*, 239–254.
59. Ren, K.; He, C.; Cheng, Y.; Li, G. ja Chen, X., Injectable enzymatically crosslinked

- hydrogels based on a poly(L-glutamic acid) graft copolymer, *Polym. Chem.*, **2014**, *5*, 5069–5076.
60. Li, J.; Xing, R.; Bai, S. ja Yan, X., Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications, *Soft Matter*, **2019**, *15*, 1704–1715.
61. Fu, X.; Shen, Y.; Fu, W. ja Li, Z., Thermoresponsive oligo(ethylene glycol) functionalized poly-L-cysteine, *Macromolecules*, **2013**, *46*, 3753–3760.
62. Kang, E. Y.; Yeon, B.; Moon, H. J. ja Jeong, B., PEG-L-PAF and PEG-D-PAF: Comparative study on thermogelation and biodegradation, *Macromolecules*, **2012**, *45*, 2007–2013.
63. Cheng, Y.; He, C.; Ding, J.; Xiao, C.; Zhuang, X. ja Chen, X., Thermosensitive hydrogels based on polypeptides for localized and sustained delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, **2013**, *34*, 10338–10347.
64. Cheng, Y.; He, C.; Xiao, C.; Ding, J.; Zhuang, X.; Huang, Y. ja Chen, X., Decisive role of hydrophobic side groups of polypeptides in thermosensitive gelation., *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 2053–2059.
65. Shi, J.; Yu, L. ja Ding, J., PEG-based thermosensitive and biodegradable hydrogels, *Acta Biomater.*, **2021**, *128*, 42–59.
66. Cheng, Y.; He, C.; Ding, J.; Xiao, C.; Zhuang, X. ja Chen, X., Thermosensitive hydrogels based on polypeptides for localized and sustained delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, **2013**, *34*, 10338–10347.
67. Cheng, Y.; He, C.; Xiao, C.; Ding, J.; Cui, H.; Zhuang, X. ja Chen, X., Versatile biofunctionalization of polypeptide-based thermosensitive hydrogels via click chemistry, *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 468–475.
68. Chen, C.; Wang, Z. ja Li, Z., Thermoresponsive polypeptides from pegylated poly-L-glutamates, *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 2859–2863.
69. Tian, Z.; Chen, C. ja Allcock, H. R., Injectable and biodegradable supramolecular hydrogels by inclusion complexation between poly(organophosphazenes) and α -cyclodextrin, *Macromolecules*, **2013**, *46*, 2715–2724.
70. Lee, B. H. ja Song, S. C., Synthesis and characterization of biodegradable thermosensitive poly(organophosphazene) gels, *Macromolecules*, **2004**, *37*, 4533–4537.

71. Lee, B. H.; Lee, Y. M.; Sohn, Y. S. ja Song, S., A Thermosensitive Poly(organophosphazene) Gel, *Macromolecules*, **2002**, *3*, 3876–3879.
72. Seong, J. Y.; Jun, Y. J.; Jeong, B. ja Sohn, Y. S., New thermogelling poly(organophosphazenes) with methoxypoly(ethylene glycol) and oligopeptide as side groups, *Polymer (Guildf)*, **2005**, *46*, 5075–5081.
73. Shang, Y.; Yan, Y. ja Hou, X., Stimuli responsive elastin-like polypeptides and applications in medicine and biotechnology, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2014**, *25*, 101–120.
74. Varanko, A. K.; Su, J. C. ja Chilkoti, A., Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2020**, *22*, 343–369.
75. Ghosh, G.; Barman, R.; Sarkar, J. ja Ghosh, S., pH-Responsive Biocompatible Supramolecular Peptide Hydrogel, *J. Phys. Chem. B*, **2019**, *123*, 5909–5915.
76. Li, J.; Wang, Z.; Han, H.; Xu, Z.; Li, S.; Zhu, Y.; Chen, Y.; Ge, L. ja Zhang, Y., Short and simple peptide-based pH-sensitive hydrogel for antitumor drug delivery, *Chinese Chem. Lett.*, **2022**, *33*, 1936–1940.
77. Raza, F.; Zhu, Y.; Chen, L.; You, X.; Zhang, J.; Khan, A.; Khan, M. W.; Hasnat, M.; Zafar, H.; Wu, J. ja Ge, L., Paclitaxel-loaded pH responsive hydrogel based on self-assembled peptides for tumor targeting, *Biomater. Sci.*, **2019**, *7*, 2023–2036.
78. Wang, K.; Luo, G. F.; Liu, Y.; Li, C.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X. ja Zhang, X. Z., Redox-sensitive shell cross-linked PEG-polypeptide hybrid micelles for controlled drug release, *Polym. Chem.*, **2012**, *3*, 1084–1090.
79. Fu, X.; Ma, Y.; Shen, Y.; Fu, W. ja Li, Z., Oxidation-responsive OEGylated poly-l-cysteine and solution properties studies, *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 1055–1061.
80. Kramer, J. R. ja Deming, T. J., Glycopolypeptides with a redox-triggered helix-to-coil transition, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4112–4115.
81. Turabee, M. H.; Thambi, T.; Duong, H. T. T.; Jeong, J. H. ja Lee, D. S., A pH- and temperature-responsive bioresorbable injectable hydrogel based on polypeptide block copolymers for the sustained delivery of proteins: In vivo, *Biomater. Sci.*, **2018**, *6*, 661–671.
82. Toledano, S.; Williams, R. J.; Jayawarna, V. ja Ulijn, R. V., Enzyme-triggered self-assembly of peptide hydrogels via reversed hydrolysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*,

- 1070–1071.
83. Hughes, M.; Debnath, S.; Knapp, C. W. ja Ulijn, R. V., Antimicrobial properties of enzymatically triggered self-assembling aromatic peptide amphiphiles, *Biomater. Sci.*, **2013**, *1*, 1138–1142.
 84. Liang, C.; Zheng, D.; Shi, F.; Xu, T.; Yang, C.; Liu, J.; Wang, L. ja Yang, Z., Enzyme-assisted peptide folding, assembly and anti-cancer properties, *Nanoscale*, **2017**, *9*, 11987–11993.
 85. Kotharangannagari, V. K.; Sánchez-Ferrer, A.; Ruokolainen, J. ja Mezzenga, R., Photoresponsive reversible aggregation and dissolution of rod-coil polypeptide diblock copolymers, *Macromolecules*, **2011**, *44*, 4569–4573.
 86. Liu, G. ja Dong, C. M., Photoresponsive poly(S-(o-nitrobenzyl)-l-cysteine)-b-PEO from a l-cysteine N-carboxyanhydride monomer: Synthesis, self-assembly, and phototriggered drug release, *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 1573–1583.
 87. Norouzi, M.; Nazari, B. ja Miller, D. W., Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy, *Drug Discov. Today*, **2016**, *21*, 1835–1849.
 88. Marchesan, S.; Qu, Y.; Waddington, L. J.; Easton, C. D.; Glattauer, V.; Lithgow, T. J.; McLean, K. M.; Forsythe, J. S. ja Hartley, P. G., Self-assembly of ciprofloxacin and a tripeptide into an antimicrobial nanostructured hydrogel, *Biomaterials*, **2013**, *34*, 3678–3687.
 89. Zhang, J.; Lin, W.; Yang, L.; Zhang, A.; Zhang, Y.; Liu, J. ja Liu, J., Injectable and pH-responsive self-assembled peptide hydrogel for promoted tumor cell uptake and enhanced cancer chemotherapy, *Biomater. Sci.*, **2022**, *10*, 854–862.
 90. Gao, F.; Jiao, C.; Yu, B.; Cong, H. ja Shen, Y., Preparation and biomedical application of injectable hydrogels, *Mater. Chem. Front.*, **2021**, *5*, 4912–4936.
 91. Koutsopoulos, S. ja Zhang, S., Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-Assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen i, *Acta Biomater.*, **2013**, *9*, 5162–5169.
 92. De Giglio, E.; Cometa, S.; Ricci, M. A.; Cafagna, D.; Savino, A. M.; Sabbatini, L.; Orciani, M.; Ceci, E.; Novello, L.; Tantillo, G. M. ja Mattioli-Belmonte, M., Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections, *Acta Biomater.*, **2011**, *7*, 882–891.

93. Marchesan, S.; Waddington, L.; Easton, C. D.; Winkler, D. A.; Goodall, L.; Forsythe, J. ja Hartley, P. G., Unzipping the role of chirality in nanoscale self-assembly of tripeptide hydrogels, *Nanoscale*, **2012**, *4*, 6752–6760.
94. Xie, Y.-Y.; Wang, X.-G.; Sun, M.-Y.; Qin, X.-T.; Su, X.; Ma, X.-F.; Liu, X.-Z.; Zhong, C. ja Jia, S.-R., Heterochiral peptide-based biocompatible and injectable supramolecular hydrogel with antibacterial activity, *J. Mater. Sci.*, **2022**, *57*, 5198–5209.
95. Veiga, A. S.; Sinthuvanich, C.; Gaspar, D.; Franquelim, H. G.; Castanho, M. A. R. B. ja Schneider, J. P., Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels, *Biomaterials*, **2012**, *33*, 8907–8916.
96. Wan, Y.; Liu, L.; Yuan, S.; Sun, J. ja Li, Z., pH-Responsive Peptide Supramolecular Hydrogels with Antibacterial Activity, *Langmuir*, **2017**, *33*, 3234–3240.
97. Nandi, N.; Gayen, K.; Ghosh, S.; Bhunia, D.; Kirkham, S.; Sen, S. K.; Ghosh, S.; Hamley, I. W. ja Banerjee, A., Amphiphilic Peptide-Based Supramolecular, Noncytotoxic, Stimuli-Responsive Hydrogels with Antibacterial Activity, *Biomacromolecules*, **2017**, *18*, 3621–3629.
98. Van Rossum, S. A. P.; Tena-Solsona, M.; Van Esch, J. H.; Eelkema, R. ja Boekhoven, J., Dissipative out-of-equilibrium assembly of man-made supramolecular materials, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 5519–5535.
99. Boekhoven, J.; Brizard, A. M.; Kowligi, K. N. K.; Koper, G. J. M.; Eelkema, R. ja van Esch, J. H., Dissipative Self-Assembly of a Molecular Gelator by Using a Chemical Fuel, *Chem. Int. Ed.*, **2010**, *122*, 4935–4938.
100. Mattia, E. ja Otto, S., Supramolecular systems chemistry, *Nat. Nanotechnol.*, **2015**, *10*, 111–119.
101. Sauve, G.; Rao, V. S.; Lajoie, G. ja Belleau, B., Backbone-modified oligopeptidic bioregulators. The synthesis and configuration of thioamide, amidoxime, cyanoamidine, and amidrazone analogs of the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-Met-Leu-Phe-OR), *Can. J. Chem.*, **1985**, *63*, 3089–3101.
102. Steemers, L. ja Van Maarseveen, J. H., Stereoselective C-terminal peptide elongation from Chan-Lam-Evans reaction generated isopropenyl esters, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 2103–2106.

103. Amenabar, I.; Poly, S.; Nuansing, W.; Hubrich, E. H.; Govyadinov, A. A.; Huth, F.; Krutokhvostov, R.; Zhang, L.; Knez, M.; Heberle, J.; Bittner, A. M. ja Hillenbrand, R., Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy, *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 1–9.
104. Kong, J. ja Yu, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **2007**, *39*, 549–559.
105. Gallagher, W., FTIR analysis of protein structure, *Course Man. Chem.*, **2009**, 1–8.
106. Yan, X.; Cui, Y.; He, Q.; Wang, K. ja Li, J., Organogels based on self-assembly of diphenylalanine peptide and their application to immobilize quantum dots, *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 1522–1526.
107. Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.; Khalil, M.; Knoester, J. ja Tokmakoff, A., Two-dimensional infrared spectroscopy of antiparallel β -sheet secondary structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 7981–7990.
108. Parker, F. S., Amides and Amines. Teoksessa: *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*, Springer US, Boston, MA, 1971, ss. 165–172.
109. Schnell, M.; Goikoetxea, M.; Amenabar, I.; Carney, P. S. ja Hillenbrand, R., Rapid Infrared Spectroscopic Nanoimaging with nano-FTIR Holography, *ACS Photonics*, **2020**, *7*, 2878–2885.
110. Schnitter, F.; Bergmann, A. M.; Winkeljann, B.; Rodon Fores, J.; Lieleg, O. ja Boekhoven, J., Synthesis and characterization of chemically fueled supramolecular materials driven by carbodiimide-based fuels, *Nat. Protoc.*, **2021**, *16*, 3901–3932.