

Автор статьи: Берилло Д.А., старший научный сотрудник,
Лаборатория Биосенсоров и Биоинструментов, Междисциплинарный
Инструментальный Комплекс, ЧУ "Nazarbaev University Research and
Inovation System"

Самоорганизация дипептидного производного в гидрогели и криогели для биомедицинских целей

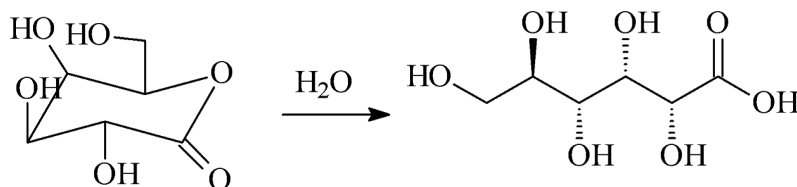
Способность биомолекул к молекулярному узнаванию в природных системах выработана в процессе эволюции. Недавние исследования выявили библиотеки пептидов с селективным сродством к самоструктурированию (самоорганизацией или самосборки) в супрамолекулярные структуры (нанотрубки, нанофибриллы) для создания новых искусственных биоразлагаемых материалов. Данные пептиды имеют регулярную структуру и могут распознавать двух- и трехмерное распределение функциональных групп на поверхности материала.[1-3]

В качестве объекта исследования для иммобилизации биологически активных веществ было выбрано соединение флуоренилметоксикарбонил (Fmoc)-фенилаланил-фенилаланин(Phe-Phe). FmocPhePhe обладает свойством самоструктурирования в нанотрубки, из которых в результате физических сплетений, гидрофобных взаимодействий и образования водородных связей формируются нанофибриллы, способные, в свою очередь, образовывать гидрогель. FmocPhePhe представляет собой пептидное производное, образованное из двух остатков аминокислот фенилаланина, где аминная компонента дипептида защищена флуоренилметоксикарбонильной группой. Ранее было показано, что самосборка пептидов характерна практически для всех производных ряда дипептидов содержащих Fmoc группу [1-3].

Нанофибрильные гидрогели стабильны в физиологических средах и биосовместимы, способны поддерживать трехмерный рост многих клеток млекопитающих и человека. Разработки в области получения и изучения и практического применения гидрогелей FmocPhePhe остается, одним из перспективных направлений на протяжении последнего десятилетия. Такой интерес к данному типу молекул обусловлено тем, что оно обладает высокой биологической совместимостью и не вызывает аллергических реакций, поэтому может применяться для различных медицинских исследований. Гидрогели FmocPhePhe являются биоразлагаемыми, так как супрамолекулярная архитектура образована за счет участия нековалентных взаимодействий: π - π взаимодействие флуоренильных и фенильных групп, водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Для превращения раствора дипептидного производного в гидрогель требуется только изменение или температуры, или pH раствора [1-3].

Нами осуществлен синтез FmocPhePhe в две стадии. Полученные соединения FmocPhePheTretBu и FmocPhePhe охарактеризованы

масс-спектрометрией. Ранние работы выявили, что резкое изменение pH раствора FmocPhePhe приводит к быстрому формированию гидрогеля, но с плохими механическими свойствами [2].



С целью создания более прочного и прозрачного гидрогеля Fmoc-Phe-Phe, был использован самопроизвольный гидролиз δ -глюконолактона, в результате чего снижение pH происходит в течение 60 мин и в данных условиях фибриллы, образованные соединением Fmoc-Phe-Phe, успевают сформироваться в цепи большей длины, в результате чего гидрогель обладает лучшими механическими свойствами.[3-4]

Одним из недостатков FmocPhePhe является его малая растворимость в воде около 1%. Для преодоления данной задачи был применен следующий подход. Одним из преимуществ использования Fmoc-Phe-Phe-Phe, по сравнению с соединением Fmoc-Phe-Phe, является большая растворимость в воде, вследствие чего образующиеся гидрогели обладают лучшими механическими свойствами [3].

Синтетическим путем из Fmoc-Phe-Phe получен пептид - дифенилаланин PhePhe. Для осуществления вышеописанной реакции между соединениями Fmoc-Phe и Phe не синтетическим методом может быть применен ферментативный катализ. Так, используя термолизин, который катализирует реакцию образования пептидной связи между Fmoc-Phe и L-Phe-Phe, в результате чего образуется преимущественно флуоренилметоксикарбонил-три-фенилаланин (Fmoc-Phe-Phe-Phe). В зависимости от соотношения Fmoc-Phe и Phe-Phe могут образовываться более длинные полипептидные цепи. Данное трипептидное соединение, так же как и FmocPhePhe, обладает способностью к самоорганизации с образованием гидрогелей и криогелей. Одновременно с ферментативным синтезом Fmoc-Phe-Phe-Phe происходит его самоорганизация при комнатной температуре [3].

С целью создания механически прочной матрицы с дозированной доставки биологически активного вещества (БАВ), нами была исследована самосборка гидрогеля Fmoc-Phe-Phe в присутствии БАВ в водной среде при температурах +25 и -12C [3].

Впервые была осуществлена самосборка Fmoc-Phe-Phe в криоусловиях с одновременной иммобилизацией биологически активного вещества. Показана кинетика дозированного выделения БАВ из гидрогелей и криогелей. Установлено, что механически устойчивые криогели из соединения и FmocPhePhe образуются в диапазоне концентраций Fmoc-Phe-Phe в растворе от 2 до 20 мМ. При сравнении механических

свойств гидрогеля и криогеля, сформированных из раствора производного дипептида, установлено, что гидрогель Fmoc-Phe-Phe является в 2-3 раза более прочным по сравнению с криогелем Fmoc-Phe-Phe, полученным при -12°C в эквивалентных концентрациях. С увеличением концентрации Fmoc-Phe-Phe в растворе увеличивается и механическая прочность [3-4].

Структуры полученных криогелей и гидрогелей Fmoc-Phe-Phe были охарактеризованы с помощью методов анализа TEM, SEM (Рисунок 2) и CLSM (Рисунок 1). При сравнении фотоснимков TEM найдено, что в криоусловиях механизм образования фибрилл Fmoc-Phe-Phe не изменяется. На основании данных CLSM (рисунок 1) доказано, что криогель, в отличие от гидрогеля, является пористым и имеет взаимопроникающие поры, что было так же показано в эксперименте с протеканием жидкости через криогель [3-4].

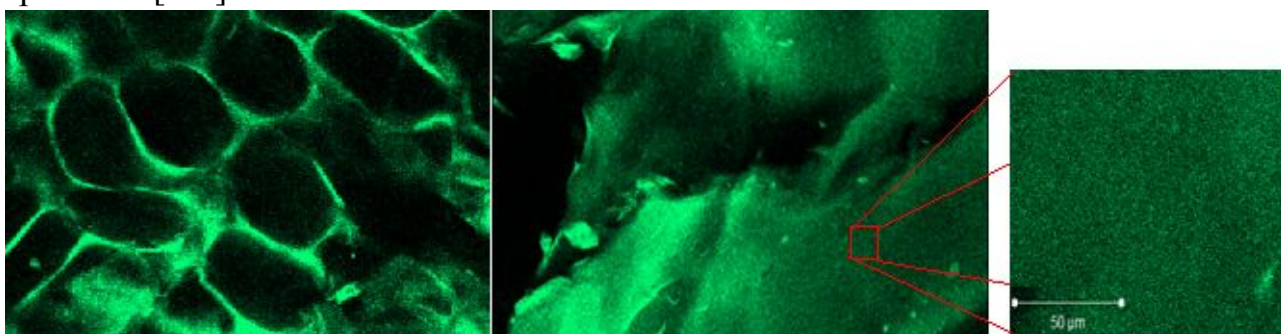


Рисунок 1 - Микрофотографии CLSM криогеля (слева) и гидрогеля (справа) FmocPhePheOH .

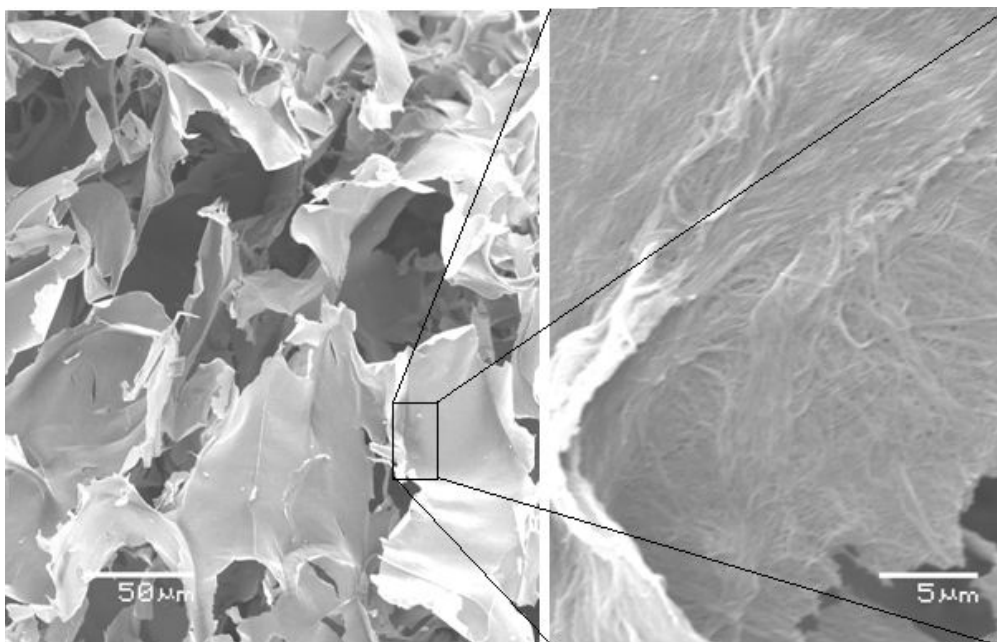


Рисунок 2 Микрофотографии SEM поверхности среза криогеля Fmoc-Phe-Phe

Методом спектрофотометрии была изучена зависимость растворения криогелей и гидрогелей Fmoc-Phe-Phe от pH раствора. Согласно данным спектрофотометрического исследования установлено, что при pH 7 растворение гидрогеля и криогеля происходит значительно быстрее, чем при

pH 5.8, что связано с ослаблением водородных связей, которые вносят существенный вклад в стабилизацию структур нанофибрилл Fmoc-Phe-Phe. С увеличением pH раствора происходит и увеличение доли диссоциированных молекул Fmoc-Phe-Phe в составе фибрилл, в результате этого и происходит ускорение растворимости гелей в воде. В случае криогеля Fmoc-Phe-Phe наблюдается более быстрый процесс растворения по сравнению с гидрогелем, так как криогель обладает развитой внутренней поверхностью и через взаимопроникающие макропоры криогеля Fmoc-Phe-Phe насыщение раствора происходит в 3 раза быстрее [3].

Таким образом, были созданы различные биоразрушаемые и биосовместимые матрицы, которые представляют интерес как для иммобилизации биологически активных веществ, так и в медицине для выращивания на их структуре разных типов человеческих клеток [3-4].

Недавно методом молекулярной динамики были получены дополнительные данные по самоорганизации флуоренилметоксикарбонил диаланина Fmoc-Ala-Ala и флуоренилметоксикарбонил-аланинил-лактоновой кислоты Fmoc-Ala-Lac. Например, было посчитано, что замена амидной группы на сложноэфирную приводит к сокращению количества поверхности молекулу доступной для растворителя. Для Fmoc-Ala-Ala характерно образование 4-х и для Fmoc-Ala-Lac 3,3 водородных связей [5].

Литература

1. Smith, Andrew M., et al. "Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on π - π Interlocked β -Sheets." *Advanced Materials* 20.1 (2008): 37-41.
2. Adams, Dave J., et al. "A new method for maintaining homogeneity during liquid-hydrogel transitions using low molecular weight hydrogelators." *Soft Matter* 5.9 (2009): 1856-1862.
3. Берилло Д. А. Синтез, строение и свойства гидразидов В-аминопропановой кислоты и их производных: дис.на соиск. д-ра философии (Ph.D.) - Алматы, 2010. – с 141-150. Регистр. №: 0610PK00009, МРНТИ 31.21.27.
4. Berillo, Dmitriy, et al. "Formation of macroporous self-assembled hydrogels through cryogelation of Fmoc-Phe-Phe." *Journal of colloid and interface science* 368.1 (2012): 226-230. doi:10.1016/j.jcis.2011.11.006
5. Eckes, Kevin Michael, et al. " β -sheets not required: combined experimental and computational studies of self-assembly and gelation of the ester-containing analog of an Fmoc-dipeptide hydrogelator." *Langmuir* (2014).