

TỔNG HỢP VÀ KHẢO SÁT ĐỘ BỀN CỦA DẪN XUẤT INK CÓ NGUỒN GỐC TỪ PEPTID TỰ NHIÊN INDOLICIDIN

Ngô Thu Hằng¹, Ngô Văn Hoà²
Lương Xuân Huy³, Cấn Văn Mão^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Tổng hợp và khảo sát độ bền của dẫn xuất INK được thiết kế dựa trên khung cấu trúc của peptid tự nhiên Indolicidin.

Phương pháp nghiên cứu: Tạo dẫn xuất INK bằng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn. Đánh giá độ bền của dẫn xuất INK với trypsin và các điều kiện nhiệt độ khác nhau bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

Kết quả: Đã tổng hợp được dẫn xuất INK có độ tinh sạch xấp xỉ 100%, độ bền với trypsin tốt hơn Indolicidin; đồng thời, dẫn xuất không bị ảnh hưởng bởi các mức nhiệt khảo sát từ 25-85°C.

Kết luận: Nghiên cứu đã tổng hợp thành công dẫn xuất INK cải thiện về độ bền với enzyme tiêu hóa so với Indolicidin.

Từ khóa: Indolicidin, độ bền nhiệt, enzyme tiêu hóa, peptid kháng khuẩn.

ABSTRACT

Objectives: To synthesize and evaluate the stability of the INK derivative, which was designed based on the structural framework of the natural peptide Indolicidin.

Subjects and methods: Solid-phase peptide synthesis was used to create INK, followed by the stability examination against trypsin and various temperatures using high performance liquid chromatography HPLC.

Results: The obtained INK had a purity of approximately 100%. Additionally, INK exhibited higher stability against trypsin. There was no significant change in the stability at various temperatures from 25°C to 85°C.

Conclusions: The INK derivative was successfully synthesized and showed improved stability against digestive enzyme compared to Indolicidin.

Keywords: Indolicidin, thermal stability, digestive enzyme, antimicrobial peptide.

Chịu trách nhiệm nội dung: Cấn Văn Mão, Email: canvanmao@vmmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/11/2024; mời phản biện khoa học: 11/2024; chấp nhận đăng: 26/11/2025.

¹Học viện Quân y.

²Bệnh viện Quân y 103.

³Trường Đại học Phenikaa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

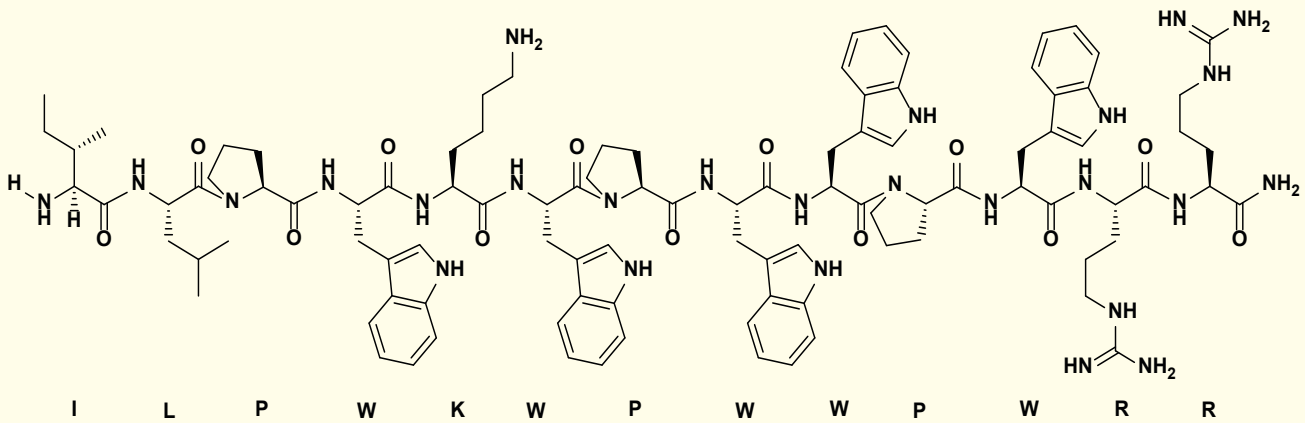
Indolicidin là một peptid tự nhiên thuộc họ cathelicidin, được phát hiện và phân lập từ bạch cầu trung tính của bò [1]. Đây là một peptid ngắn, chỉ gồm 13 axit amin, nhưng lại có cấu trúc đặc trưng của các peptid kháng khuẩn với tổng tích điện là +4. Indolicidin được tạo bởi 3 axit amin có side-chain tích điện dương (1 lysine và 2 arginine) cùng thiết kế đầu N tự do và đầu C được amide hóa [2]. Đây cũng là 3 axit amin thân nước duy nhất của phân tử peptid. Nhờ có đặc điểm lưỡng phần bao gồm cả axit amin thân dầu (chiếm 77%) và axit amin thân nước (chiếm 23%), Indolicidin có khả năng tương tác tốt với màng tế bào vi khuẩn, trực tiếp tạo ra các lỗ thủng và gây chết tế bào, có thể

tiêu diệt cả vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn Gram âm. Ngoài ra, hoạt chất tự nhiên này còn thể hiện hoạt tính chống nấm, chống ký sinh trùng và thậm chí là chống lại một số loại virus [5, 6]. Nhờ vào cấu trúc độc đáo và tính chất đa năng, Indolicidin được các nhà khoa học chú trọng nghiên cứu nhằm phát triển các liệu pháp mới chống lại nhiễm trùng và các bệnh khác liên quan đến vi sinh vật.

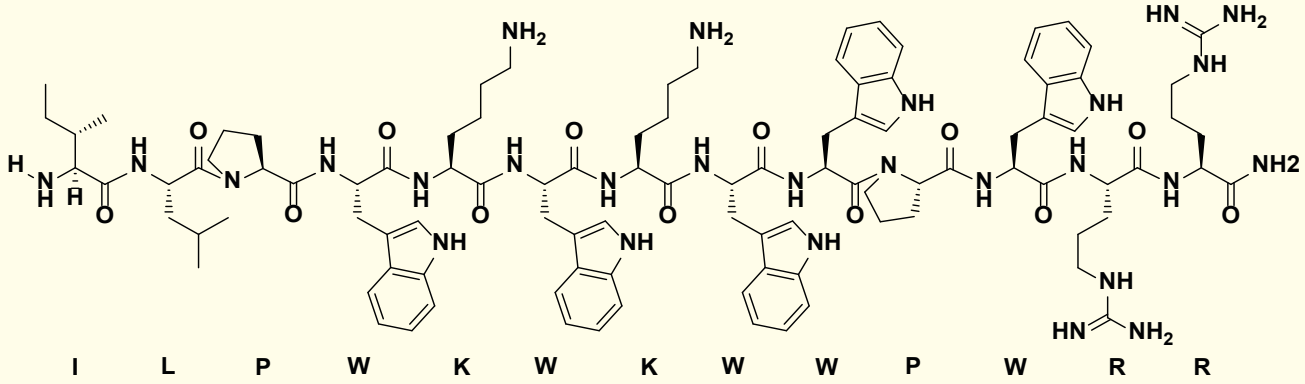
Tuy nhiên, Indolicidin có khả năng gây tan máu cao, đồng thời hoạt tính kháng khuẩn chỉ ở mức độ trung bình [8, 9]. Điều này có thể bắt nguồn từ nguyên nhân số lượng các axit amin thân dầu chiếm tỉ lệ quá lớn so với nhóm các axit amin thân nước. Do đó, dẫn xuất INK đã được thiết kế với sự thay thế axit amin thân dầu proline

ở vị trí số 7 bằng một axit amin thân nước tích điện dương lysine, giảm tỉ lệ số lượng axit amin thân dầu/thân nước từ 77%/23% xuống còn 69%/31%, đồng thời điện tích tăng lên +5, hơn 1 đơn vị so với Indolicidin (+4). Trong nghiên cứu chúng tôi thực hiện trước đây, INK đã cho thấy tác dụng kháng khuẩn tương đương với

Indolicidin trong khi gây tan máu thấp hơn, qua đó cho thấy mức độ chọn lọc tốt hơn Indolicidin [10]. Với mong muốn làm rõ hơn triển vọng ứng dụng của peptid này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm tổng hợp và khảo sát độ bền của dẫn xuất INK trong một số điều kiện mô phỏng khác nhau.



Hình 1. Trình tự của Indolicidin.



Hình 2. Trình tự của INK.

Bảng 1. Đặc điểm cấu trúc của Indolicidin và INK

Đặc điểm	Indolicidin		INK	
	Cụ thể	Tỉ lệ (%)	Cụ thể	Tỉ lệ (%)
Cấu trúc không gian	Tự do	-	Tự do	-
Phân tử khối (g/mol)	1.906,33	-	1.937,3	-
Công thức phân tử	$C_{100}H_{132}N_{26}O_{13}$	-	$C_{101}H_{137}N_{27}O_{13}$	-
Số lượng axit amin	13	-	13	-
- L-axit amin	13	100	13	100
- Axit amin kỵ nước	10	77	9	69
- Axit amin ưa nước	3	23	4	31
- Mang điện tích dương	3	23	4	31
- Mang điện tích âm	0	0	0	0
- Số lượng Cysteine	0	0	0	0
- Số lượng Proline	3	23	2	15-
Đầu N	Tự do	-	Tự do	-
Đầu C	Amid hóa	-	Amid hóa	-
Tích điện (pH 7,0)	+4	-	+5	-

2. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, thiết bị

- Nguyên liệu: các α -axit amin được bảo vệ Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH; không được bảo vệ (Tryptophan) và hạt rắn Rink Amide MBHA resin (100-200 mesh) đều có độ tinh khiết $\geq 97\%$ (Angene, Trung Quốc).

- Dung môi: N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 99%), N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP, 99%), Dimethylformamide (DMF, 99%), Dichloromethane (DCM, 99,5%), Trifluoroacetic acid (TFA, 99%), Acetonitrile tiêu chuẩn HPLC (ACN 99,8%), Piperidin (99%), (Daejung, Hàn Quốc); Triisopropylsilane (TIS, 98%), Thioanisole (99%), (Sigma-Aldrich, Đức).

- Thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1260 và cột sắc ký đi kèm (Hoa Kỳ); hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ Shimadzu LC-MS/MS 8040 (Shimadzu, Nhật Bản); các máy li tâm, máy lắc, bộ phản ứng Vacuum manifold, bơm chân không, máy lắc (Trung Quốc), máy lắc Vortex (Ý), máy siêu âm (Đức); các thiết bị chính sử dụng trong quá trình tổng hợp: bộ tổng hợp pha rắn VM20 vacuum manifold Sigma và phụ kiện chắc ba; hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép bộ phân phát hiện đa sóng (HPLC-DAD) Agilent 1260 và cột sắc ký silica gel pha đảo C18 Zorbax column - Agilent, 5 μ m, kích thước 9,4x250 mm; hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS) Agilent 6400 Series Triple Quadrupole B.08.00 LC/MS System và cột C18 Agilent 959961-902, kích thước 3,5 μ m, 4,6x100 mm. Một số thiết bị khác: bơm chân không, máy thổi N_2 , thiết bị siêu âm, máy li tâm, vortex mixer, tủ hút, máy quay cất chân không, máy lắc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tổng hợp, tinh chế peptid: ngâm lắc Resin (120 μ mol) lần lượt trong DCM (3 phút), DMF (10 phút) trước khi dùng. Sử dụng 20% piperidin trong DMF để loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc. Gắn các axit amin vào theo thứ tự bằng tác nhân COMU (tỉ lệ resin/axit amin/COMU 1/5/5) với sự có mặt của DIEA. Sau mỗi lần gắn axit amin hay loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa lần lượt bằng các dung dịch theo thứ tự DCM, DMF, DCM, DMF, DMF. Khối lượng các nguyên liệu sử dụng được trình bày cụ thể trong bảng 2.

Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa với DCM nhiều lần rồi làm khô qua đêm, cho vào hỗn hợp TFA/TIS/ H_2O (tỉ lệ 95/2,5/2,5) trong 2 giờ để cắt peptid ra khỏi resin và loại bỏ các nhóm bảo vệ khác, tiếp tục làm khô qua đêm. Hòa tan peptid bằng nước và lọc để loại resin. Các peptid tiếp tục được tinh chế bằng hệ thống HPLC với cột Zorbax C18 column (Agilent, 5 μ m, 9,4x250 mm)

với 2-30% B (11 phút), 30-100% B (1 phút), 100% B trong 5 phút, 100-2% B (2 phút), 2% B (2 phút); A: 0,1% TFA/ H_2O , B: 0,1% TFA/Acetonitril (ACN), tốc độ dòng 3 mL/min.

Phân tích mẫu peptid trước và sau khi tinh chế với 5-100% B (8 phút), 100% B (1 phút), 100-5% B (2 phút), 5% B (1 phút); A: 0,1% TFA/ H_2O , B: 0,1% TFA/Acetonitrile (ACN); tốc độ dòng 1 mL/min và định tính bằng hệ thống LC-MS/MS với 30-80% B (2 phút), 80-30% B (2 phút); A: 0,1% TFA/ H_2O , B: 0,1% TFA/ACN; tốc độ dòng 1 mL/phút; vùng khối 400-2000 Dalton.

Nhận biết INK dựa vào bước sóng 280 nm.

- Phương pháp khảo sát độ bền với trypsin: các peptid được hòa tan trong dung dịch đệm photphat pH 8,0. Nồng độ peptid được xác định dựa vào việc cân và pha trực tiếp. Chuẩn bị mẫu chứa peptid cần khảo sát và chất chuẩn nội là Tryptophan trong dung dịch đệm pH 8,0. Pha loãng trypsin 0,25% vào đệm pH 8,0 rồi thêm vào dung dịch trên sao cho nồng độ trypsin là 0,005%, nồng độ peptid là 40 μ M. Hỗn hợp được ủ duy trì ở 37°C và lắc 600 vòng/phút. Định lượng peptid tại thời điểm phút 0 và phút 30 bằng hệ thống HPLC-DAD tại bước sóng 280 nm, thể tích tiêm mẫu 40 μ L. Mỗi thí nghiệm được tiến hành hai lần với cùng một peptid.

- Phương pháp khảo sát độ bền với nhiệt độ: các peptid được hòa tan trong dung dịch đệm PBS pH 7,4. Nồng độ peptid được xác định dựa vào việc cân và pha trực tiếp. Chuẩn bị mẫu chứa peptid cần khảo sát và chất chuẩn nội là Tryptophan trong dung dịch đệm PBS pH 7,4. Pha loãng nồng độ peptid và chất chuẩn nội Tryptophan là 64 μ M. Hỗn hợp được ủ duy trì ở các nhiệt độ khảo sát là 25°C, 45°C, 65°C, 85°C và lắc với tốc độ 600 vòng/phút trong vòng 30 phút. Tiến hành định lượng các peptid tại mỗi nhiệt độ bằng hệ thống HPLC-DAD tại bước sóng 280 nm, thể tích tiêm mẫu 20 μ L. Mỗi thí nghiệm được tiến hành hai lần với cùng một peptid.

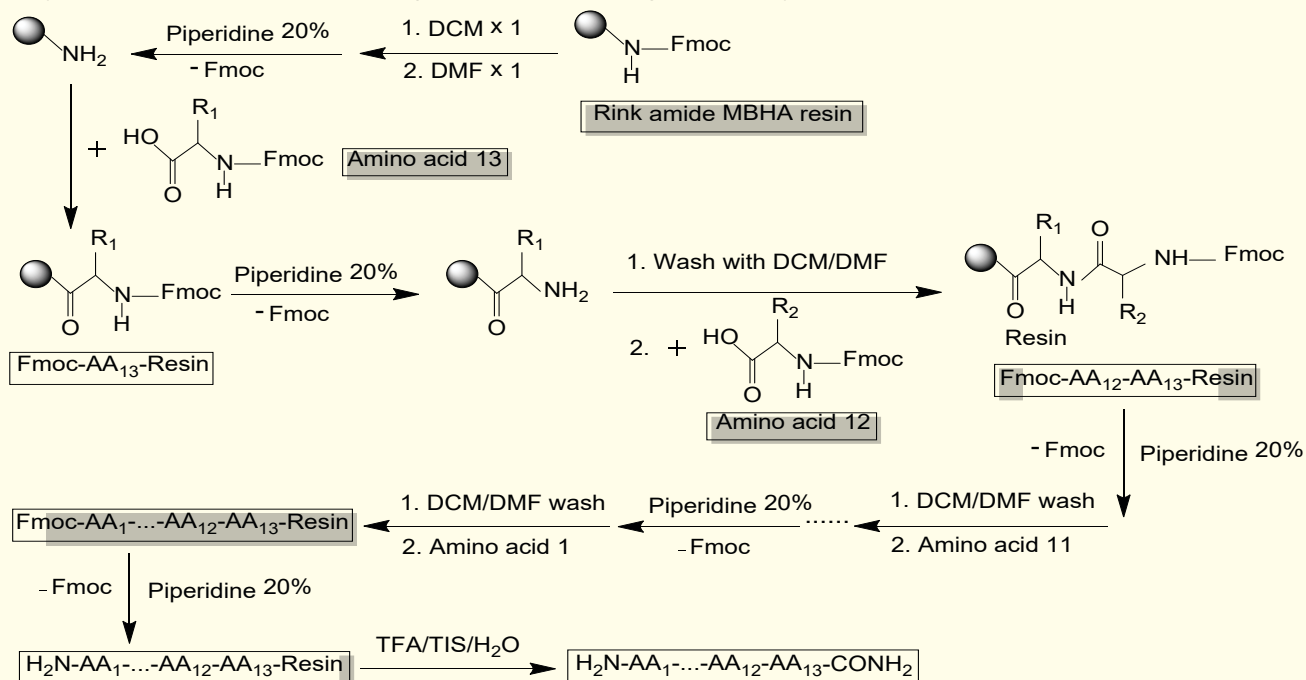
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tổng hợp và tinh chế INK

Hình 3 minh họa tóm tắt sơ đồ tổng hợp INK: INK sau tinh chế được loại bỏ bớt dung môi bằng hệ thống cất quay và tiến hành đông khô. Sản phẩm thu được ở dạng bột trắng xốp, không mùi; được kiểm tra độ tinh sạch bằng hệ thống HPLC với kết quả thể hiện trong hình 5. Độ tinh sạch là phần trăm diện tích peak sản phẩm trong tổng diện tích các peak trên sắc ký đồ (không tính các peak tạp hệ thống). Theo đó, độ tinh sạch của sản phẩm theo HPLC là xấp xỉ 100%.

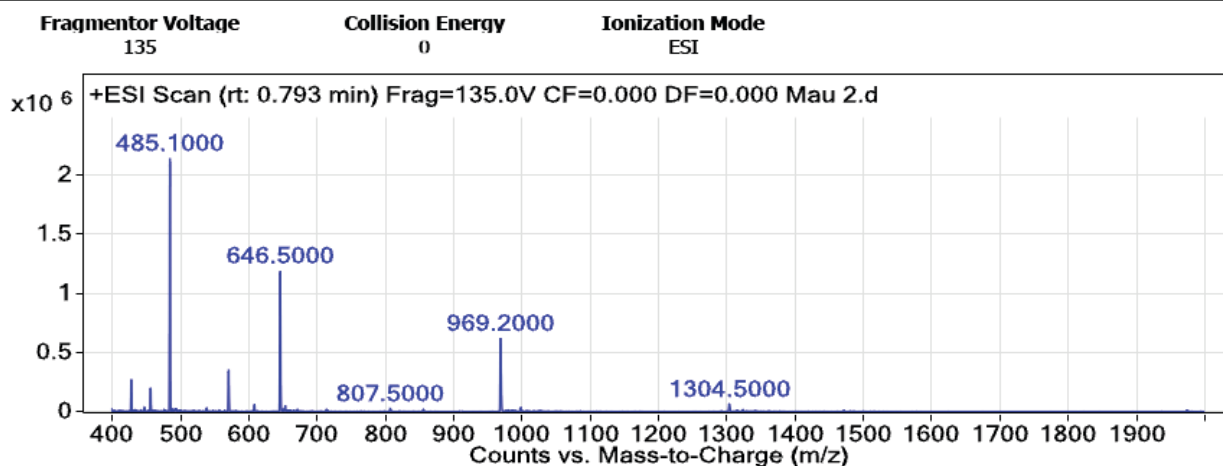
Sau đó, mẫu peptid đã được tinh chế và đánh giá độ tinh sạch bằng HPLC được đem đi xác định

khối lượng phân tử bằng hệ thống phổ khối LC-MS. Kết quả được trình bày trong hình 5 và bảng 2 cho thấy sản phẩm thu được INK có giá trị phù hợp với giá trị lý thuyết.

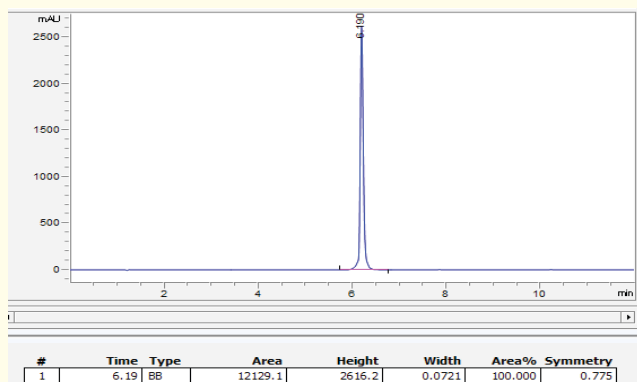


Hình 3. Sơ đồ tổng hợp INK.

User Spectra



Hình 4. Phổ khối của dẫn xuất INK sau tinh chế (kết quả được tổng hợp lại trong bảng 2).



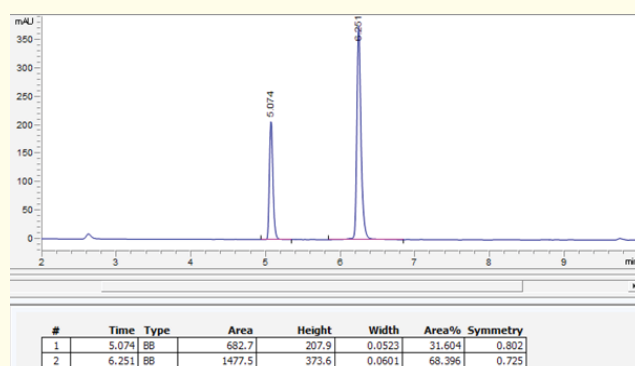
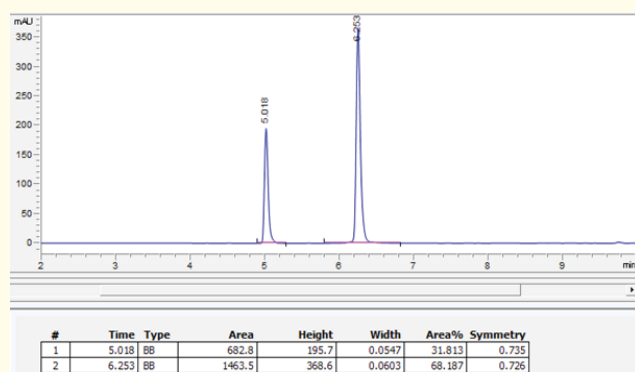
Hình 5. Sắc ký đồ phân tích mẫu INK sau tinh chế bằng hệ thống HPLC.

Bảng 2. So sánh giá trị m/z thực nghiệm và lý thuyết của INK

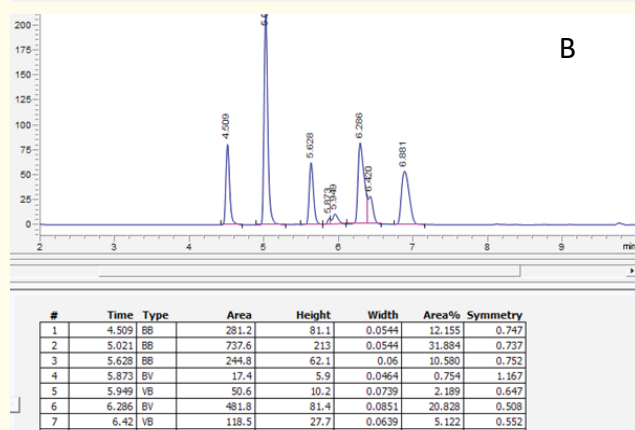
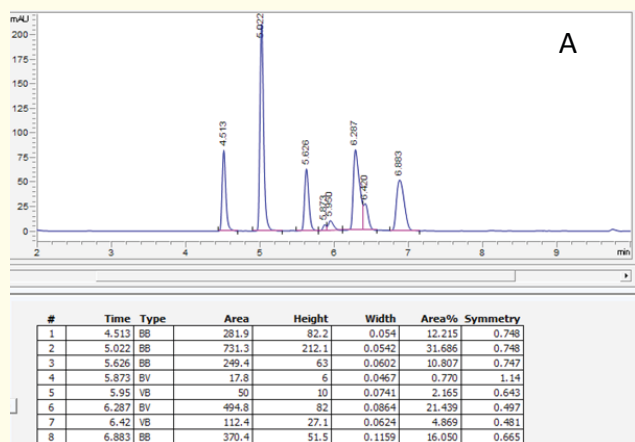
Công thức phân tử INK	m/z	Giá trị lý thuyết	Giá trị thu được
$\text{C}_{101}\text{H}_{137}\text{N}_{27}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+2\text{H}]/2$	969,0520	969,2000
	$[\text{M}+3\text{H}]/3$	646,3710	646,5000
	$[\text{M}+3\text{H}]/4$	485,0260	485,1000

Dẫn xuất INK của peptide tự nhiên Indolicidin đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp peptide pha rắn và tinh chế bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

3.2. Khảo sát độ bền với trypsin



Hình 6. Kết quả phân tích hai mẫu INK không có trypsin.



Hình 7. Kết quả phân tích hai mẫu INK sau 30 phút bổ sung trypsin.

Kết quả phân tích mẫu INK không có trypsin cho thấy thời gian lưu của Tryptophan là khoảng 5,018-5,074 phút, thời gian lưu của Indolicidin là khoảng 6,251-6,253 phút. Khi cho thêm trypsin vào mẫu peptid, sau 30 phút, INK bị cắt ra nhiều mảnh bởi trypsin, xuất hiện thêm nhiều peak mới trên sắc kí đồ (hình 7).

Sau khi đối chiếu sắc kí đồ trước (hình 6) và sau khi cho trypsin (hình 7), nhận thấy peak của Tryptophan (W) vẫn giữ nguyên, tuy nhiên peak của INK đã nhỏ hơn trước với vị trí thời gian lưu 6,287 phút (hình 7A) và 6,286 phút (hình 7B). So với peak ban đầu (100%), tỉ lệ còn lại của INK là $31,9 \pm 1,1\%$. Đáng chú ý, kết quả thí nghiệm tương tự được thực hiện trên Indolicidin cho thấy peak sắc kí của Indolicidin đã không còn sau 30 phút; qua đó cho thấy tỉ lệ còn lại của Indolicidin là xấp xỉ 0%.

3.3. Khảo sát độ bền ở các mức nhiệt khác nhau

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ bền của INK ở các mức nhiệt khác nhau

Nhiệt độ	Tryptophan		INK	
	Thời gian lưu (phút)	D.tích peak*	Thời gian lưu (phút)	D.tích peak*
25 °C	5,076	562,3	6,249	1170,8
	5,051	543,4	6,239	975,1
45 °C	5,074	563,3	6,254	1282,5
	5,049	571,1	6,254	1127,6
65 °C	5,050	552,8	6,249	1247,4
	5,047	546,7	6,258	1151,1
85 °C	5,046	548,3	6,251	1037,1
	5,049	552,5	6,259	1151,5

*: Diện tích peak, đơn vị mAU/s

Nghiên cứu được tiến hành trên hai mẫu khác nhau ở mỗi mức nhiệt, kết quả cho thấy ở tất cả các mẫu thu được, peak của Tryptophan và INK đều còn gần như nguyên vẹn ở các mức nhiệt từ 25°C đến 85°C trong 30 phút.

4. BÀN LUẬN

Kết quả phân tích bằng hệ thống HPLC cho thấy sản phẩm thu được có một peak nhọn, cân đối, chứng tỏ độ tinh sạch của INK đạt xấp xỉ 100%. Đồng thời, kết quả LC-MS xác nhận khối lượng phân tử thực nghiệm phù hợp với giá trị lí thuyết, khẳng định rằng dẫn xuất INK đã được tổng hợp và tinh chế thành công [12].

Đáng chú ý, INK thể hiện độ bền vượt trội so với Indolicidin khi bị thủy phân bởi trypsin. Proline vốn được biết đến là amino axit làm tăng tính linh động trong chuỗi peptid kháng khuẩn, do đó việc thay

thể proline bằng lysine có thể đã góp phần làm ổn định cấu trúc không gian của INK, giúp giảm khả năng nhận diện và cắt bởi enzyme tiêu hóa. Kết quả khảo sát độ bền ở các mức nhiệt độ khác nhau cũng cho thấy INK duy trì được cấu trúc ổn định, chứng tỏ khả năng chịu nhiệt tốt [10].

Điều này có ý nghĩa quan trọng đối với quá trình bào chế và tiết khuẩn được phẩm, bởi hầu hết các dạng bào chế như dung dịch tiêm hoặc dung dịch uống đều phải trải qua giai đoạn xử lý nhiệt. Nhờ đặc tính ổn định về nhiệt và enzyme, INK có tiềm năng được ứng dụng trong phát triển các chế phẩm peptid kháng khuẩn có độ bền cao [13].

Trong tương lai, cần tiếp tục tập trung nghiên cứu đánh giá độ bền của INK trong huyết thanh người. Đồng thời tiến hành phân tích cấu trúc không gian bằng các kỹ thuật quang phổ lưỡng sắc tròn hoặc mô phỏng động lực học phân tử (MD) nhằm làm sáng tỏ cơ chế ổn định vượt trội của INK so với Indolicidin, từ đó mở rộng hướng ứng dụng của peptid này trong dược phẩm và y sinh học.

5. KẾT LUẬN

Dẫn xuất INK được tổng hợp thành công và cho thấy sự cải thiện độ bền với enzyme tiêu hóa trypsin so với Indolicidin. Kết quả đạt được giúp tạo tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển các hoạt chất kháng khuẩn phổ rộng có nguồn gốc peptid trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A.S Ladokhin, M.E Selsted, S.H White (1999), "CD Spectra of Indolicidin Antimicrobial Peptides Suggest Turns, Not Polyproline Helix", *Biochemistry*, 38(38), 12313-12319.
2. H Bui Thi Phuong, H Doan Ngan, B Le Huy, H Vu Dinh, H Luong Xuan (2024), "The amphipathic design in helical antimicrobial peptides", *Chem Med Chem*, 19(7), e202300480.
3. D.I Chan, E.J Prenner, H.J Vogel, (2006), "Tryptophan and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202.
4. C.H Hsu, C Chen, M.L Jou, A.Y.L Lee, Y.C Lin, Y.P Yu, W.T Huang, S.H Wu (2005), "Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, Indolicidin: evidence for multiple conformations involved in Indolicidin to membranes and DNA", *Nucleic Acids Res*, 33(13), 4053-4064.
5. C.L Friedrich, A Rozek, A Patrzykat, R.E. Hancock (2001), "Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria", *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24015-24022.
6. W.E Robinson, Jr B McDougall, D Tran, M.E Selsted (1998), "Anti-HIV-1 activity of Indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils", *Journal of Leukocyte Biology*, 63(1), 94-100.
7. H.X Luong, T.T Thanh, T.H Tran, (2020), "Antimicrobial peptides - Advances in development of therapeutic applications", *Life Sciences*, 260, 118407.
8. S.M Kim, J.M Kim, B.P Joshi, H Cho, K.H Lee (2009), "Indolicidin-derived antimicrobial peptide analogs with greater bacterial selectivity and requirements for antibacterial and hemolytic activities", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(2), 185-192.
9. C Subbalakshmi, E Bikshapathy, N Sitaram, R Nagaraj, (2000), "Antibacterial and hemolytic activities of single Tryptophan analogs of Indolicidin", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(3), 714-716.
10. Hang N.T, Hoa N.V, Mao C.V, (2025), "The importance role of central proline to the antimicrobial potency and selectivity of Indolicidin", *Archives of Microbiology*, 207:97
11. I Coin M Beyermann, M Bienert, (2007), "Solid - phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences", *Nature Protocols*, 2(12), 3247-3256.
12. Bùi, T. P. H., Lương, X. H., Đoàn, Nguyễn, M. Đ. (2025), tổng hợp và đánh giá tác dụng sinh học của peptide Cn-AMP3. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, 50(7), 62-71.
13. Pei, J., Gao, X., Pan, D., Dang, Y. (2022) *Advances in the stability challenges of bioactive peptides and improvement strategies*, *Current Research in Food Science* 5, 2162–2170. □