

Tổng hợp và đánh giá sơ bộ tác dụng kép kháng khuẩn - kháng nấm của peptid tự nhiên Polybia-MP1

Bùi Thị Phương Hải¹, Đinh Thị Ngọc Mai², Đoàn Ngân Hoa³,
Nguyễn Hồng Minh², Trương Thanh Tùng^{1,4}, Lương Xuân Huy^{1,4*}

¹ Khoa Dược, Đại học Phenikaa

² Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, Đại học Phenikaa

³ Đại học Y Hà Nội

⁴ Viện Nghiên cứu tiên tiến Phenikaa (PIAS), Đại học Phenikaa

Summary

Polybia-MP1 isolated from South American wasp Polybia paulista is a promising antimicrobial peptide for drug discovery. In this study, Polybia-MP1 was synthesized the first time in Vietnam by using solid-phase peptide synthesis with 99 % purity checked by the HPLC system. The molecular weight of the peptide was confirmed with over 99.99 % accuracy by the LC-MS system. Furthermore, the initial biological examination at 100 μ M concentration demonstrated the dual antibacterial and antifungal actions of Polybia-MP1 against all tested pathogens, which included Staphylococcus aureus, Pseudomonas syringae, and Candida albicans. The preliminary data from this study established the foundation for the future study on not only Polybia-MP1 but also antimicrobial peptides in Vietnam.

Keywords: Antimicrobial peptides, antifungal peptides, solid phase peptide synthesis, peptide therapeutics, Polybia-MP1, wasp venom.

Đặt vấn đề

Polybia-MP1 là một peptid kháng khuẩn nổi tiếng thuộc họ Mastoparan được tìm thấy trong nọc ong bắp cày Nam Mỹ *Polybia paulista*. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy Polybia-MP1 có khả năng kháng khuẩn phổ rộng cùng tác dụng kháng nấm và chống lại nhiều loại tế bào ung thư kháng thuốc mà hầu như không gây ảnh hưởng đến các tế bào khỏe mạnh [1-4]. Do vậy, Polybia-MP1 là một trong những peptid rất có triển vọng để phát triển các ứng dụng lâm sàng trong tương lai [5]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, đến nay chưa có công bố nào về việc tổng hợp được các peptid kháng khuẩn tinh sạch nói chung hay Polybia-MP1 nói riêng. Trên thực tế, chỉ có một số đơn vị nghiên cứu sản xuất peptid kháng khuẩn bằng con đường sinh tổng hợp thu lấy sinh khối, tuy nhiên, hàm lượng thu về thấp

và chi phí tinh chế cao. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào việc tổng hợp Polybia-MP1 bằng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn – một trong những kỹ thuật tiên tiến nhất trên thế giới hiện nay [6]. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng tiến hành các khảo sát ban đầu về tác dụng kép kháng khuẩn - kháng nấm nhằm mở đường cho các nghiên cứu tiếp theo về peptid này ở Việt Nam.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Nguyên liệu có độ tinh khiết cao được mua từ các nhà sản xuất nổi tiếng như Hãng AK Scientific (Mỹ), Hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Hãng Fisher Scientific (Mỹ).

Chịu trách nhiệm: Lương Xuân Huy
Email: huy.luongxuan@phenikaa-uni.edu.vn
Ngày nhận: 05/7/2021
Ngày phản biện: 22/7/2021
Ngày duyệt bài: 24/9/2021

- Xúc tác COMU
- DIPEA
- NMP
- DMF
- Trifluoroacetic acid (TFA)
- Triisopropylsilane (TIS)
- Các acid amin được bảo vệ bao gồm: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp (OtBu)-OH, Fmoc-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Trp (Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH
- Pha rắn: Rink amide MBHA resin
- Acetonitrile (tiêu chuẩn **HPLC**)
- Nước cất (tiêu chuẩn chạy **HPLC**)

Thiết bị

- Pipet và tip các loại
- Ống polypropylene
- Bơm chân không
- Máy thổi không khí
- Vortex mixer
- Cột phản ứng pha rắn.
- Hệ thống **HPLC** và cột sắc kí đi kèm.
- Hệ thống đo phổ khối **LC-MS**
- Thiết bị siêu âm.
- Thiết bị ly tâm.
- Bộ phản ứng Vacuum manifold
- Tip lọc

Phương pháp nghiên cứu

Nguyên tắc tổng hợp peptid pha rắn

Đầu cacboxyl của peptid ở amino acid cuối cùng được gắn vào pha rắn (resin), trong khi đầu amino còn lại và mạch nhánh (nhóm R) đã được bảo vệ để tránh sự phát triển mạch polypeptid không mong muốn. Tiếp theo loại nhóm bảo vệ của đầu amino, sau đó hoạt hóa bằng chất xúc tác và cho phản ứng với nhóm cacboxyl của amino acid thứ hai (cũng có nhóm amino và mạch nhánh được bảo vệ). Quá trình được tiếp diễn cho đến khi chuỗi peptid được hoàn thành, khi đó, phân tử sẽ cắt khỏi chất mang, loại nhóm bảo vệ ở các vị trí trong mạch và sau cùng peptid được tinh chế để loại các sản phẩm phụ.

Thực hiện chuỗi phản ứng tổng hợp

Pha rắn được sử dụng cho việc tổng hợp là Rink Amide MBHA resin.

Resin (60 μ mol) được ngâm trong DMF 10 phút trước khi dùng. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng cách sử dụng 20 % piperidin/DMF. Các amino acid theo thứ tự được gắn vào bằng xúc tác COMU (tỉ lệ resin/acid amin/COMU 1/5/5) với sự có mặt của DIPEA dư. Sau mỗi lần

gắn amino acid hay loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa lần lượt bằng các dung dịch theo thứ tự DCM, DMF.

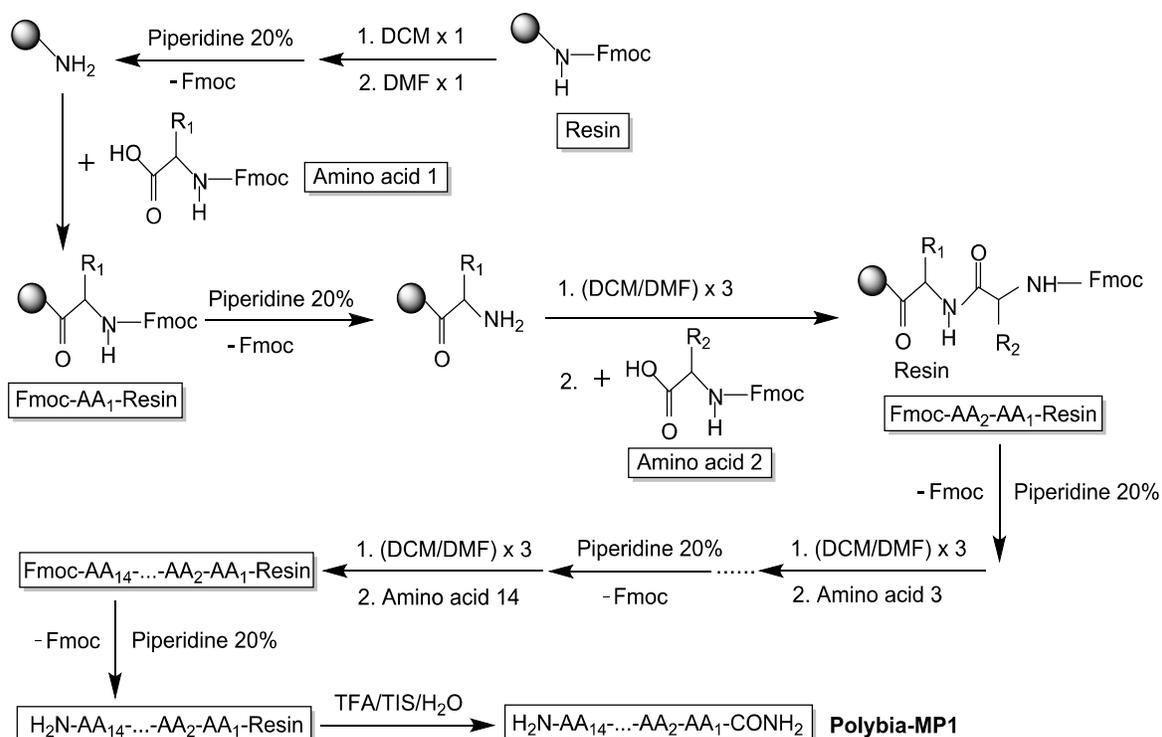
Phản ứng được theo dõi bằng thuốc thử Kaiser dưới đây:

Mục đích: Nhận biết amin bậc 1 tự do.

Thành phần:

- Dung dịch A: 40 g phenol pha trong 10 mL ethanol
- Dung dịch B: 1 g ninyhidrin pha trong 20 mL ethanol
- Dung dịch C: pyridin

Cách tiến hành: Lấy một lượng nhỏ hạt resin sau phản ứng. Rửa sạch hạt resin bằng DMF, DCM, MeOH. Cho resin vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 giọt dung dịch A, 2 giọt dung dịch B và 2 giọt pyridin (C). Đun nóng ống nghiệm lên 110 - 115 °C trong 2 phút. Nếu hạt resin không chuyển màu, dung dịch giữ nguyên màu vàng chứng tỏ không có amin bậc 1 tự do. Nếu hạt resin, dung dịch có màu xanh da trời nhẹ, chứng tỏ có amin bậc 1 tự do.



Hình 1. Minh họa quy trình tổng hợp Polybia-MP1

Tinh chế và kiểm tra độ tinh sạch

Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa với DCM nhiều lần rồi làm khô qua đêm. Sau đó, các resin được cho vào hỗn hợp TFA/TIS/H₂O (tỉ lệ 95/2,5/2,5) trong 2 giờ để cắt peptid ra khỏi resin và loại bỏ các nhóm bảo vệ khác rồi làm khô qua đêm. Peptid sau đó được hòa tan bằng hỗn hợp acetonitril - nước và lọc để loại resin. Các peptid tiếp tục được tinh chế bằng hệ thống **HPLC** với cột Zorbax C18 column (Agilent, 5 μm, 9,4 x 250 mm) và định tính bằng hệ thống **LC-MS** (Shimadzu LCMS-2020). Nhận biết peptid dựa vào bước sóng đặc trưng của Fmoc và tryptophan ở 280 nm^[6] hoặc 220 nm.

Các chương trình chạy phân tích và tinh chế

Các chương trình chạy phân tích và tinh chế bằng hệ thống **HPLC** và **LC-MS** được trình bày trong dưới đây.

Chương trình phân tích HPLC

• Cột sắc kí: C18 3,5 μm, 4,6*100 mm. Hãng sản xuất: Agilent, Mỹ.

• Dung môi: A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1 % TFA/ACN.

• Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
• Gradient nồng độ: 5 - 100 % B trong 10 phút, 100% B trong 5 phút, 100 - 5 % B trong 5 phút, 5 % B trong 2 phút.

• Thể tích tiêm: 5 - 50 μL.

• Bước sóng: 280 nm hoặc 220 nm.

Chương trình tinh chế HPLC

• Cột sắc kí: SB-C18 5 μm, 9,4*250 mm. Hãng sản xuất: Agilent, Mỹ.

• Dung môi: A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1% TFA/ACN.

• Tốc độ dòng: 4 mL/phút.

• Gradient nồng độ: 5 - 45 % B trong 12 phút, 45 - 100 % B trong 4 phút, 100 % B trong 10 phút, 100 - 5 % B trong 6 phút, 5 % B trong 2 phút.

• Thể tích tiêm: 5 - 900 μL.

• Bước sóng: 280 nm hoặc 220 nm.

Chương trình phân tích LC-MS

• Cột sắc kí: SB-C18 5 μm, 9,4*250 mm. Hãng sản xuất: Agilent, Mỹ.

- Dung môi: A: 0,1 % HCOOH/H₂O, B: 0,1 % HCOOH/ACN.

- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Gradient nồng độ: 30 - 80 % B trong 2 phút, 80 - 30 % B trong 2 phút.
- Thể tích tiêm: 1 - 20 µL.
- Chế độ chạy: Positive.
- Vùng khối quan sát: 400 - 2000 Dalton.

Thử nghiệm khả năng kháng vi sinh vật của Polybia-MP1

Polybia-MP1 được đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng trên các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* PU10203; *Pseudomonas syringae* PU10210 và nấm men *Candida albicans* KĐ301 dựa theo phương pháp của [7] với một số thay đổi nhỏ. Đầu tiên, vi khuẩn và nấm men kiểm định được nuôi cấy giống cấp 1 lần lượt trong 5 ml môi trường dịch thể LB (peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L,

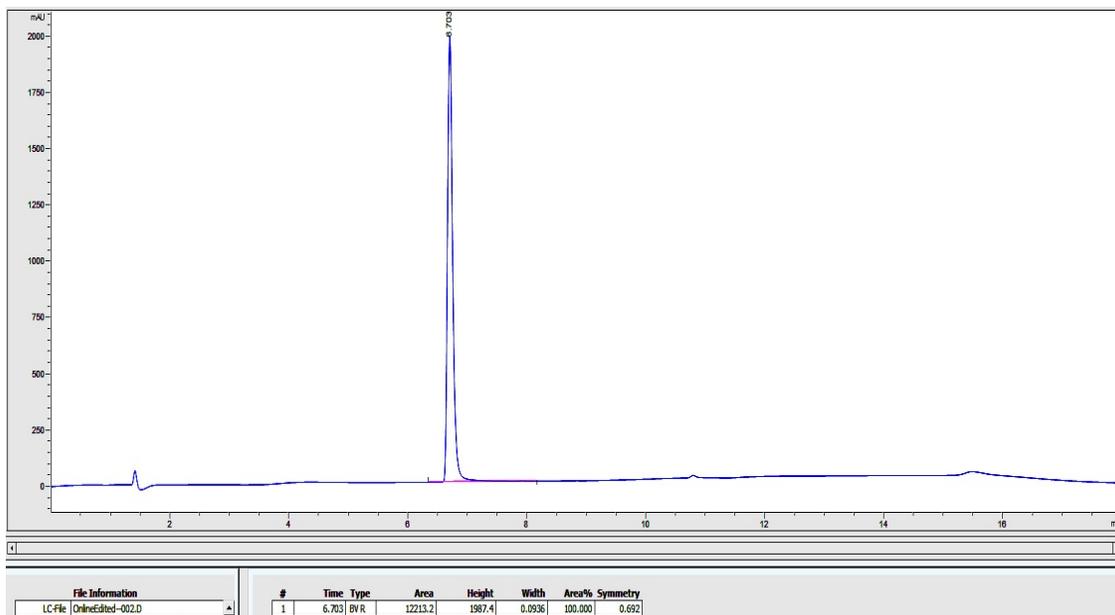
NaCl 10 g/L) và 5 ml môi trường dịch thể YM (glucose 10 g/L, peptone 5 g/L, cao nấm men 3 g/L, cao malt 3 g/L) ở 37 °C qua đêm. Sau đó, dịch nuôi cấy được pha loãng trong môi trường nuôi cấy tương ứng đã khử trùng để đạt được mật độ 10⁶ - 10⁸ CFU. Peptid được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đạt nồng độ 100 µM. Dịch nuôi cấy được chia vào đĩa 96 giếng và sự sinh trưởng của vi sinh vật kiểm định được theo dõi sau 24 giờ ở 37 °C bằng mắt thường kết hợp phương pháp đo OD tại 620 nm.

Kết quả

Hiệu suất thu được

Khối lượng MP1 tinh khiết thu được là 33,4 mg được xác định bằng phương pháp cân trực tiếp. Hiệu suất toàn quá trình là 33,7%.

Độ tinh khiết



Hình 2. Đánh giá độ tinh sạch của MP1 bằng hệ thống HPLC

Độ tinh khiết là phần trăm diện tích peak sản phẩm trong tổng diện tích các pic trên sắc ký đồ (không tính các pic tạp hệ thống). Theo đó, độ tinh khiết của Polybia-MP1 được xác định ở bước sóng 220 nm là trên 99 %.

Xác định khối lượng phân tử

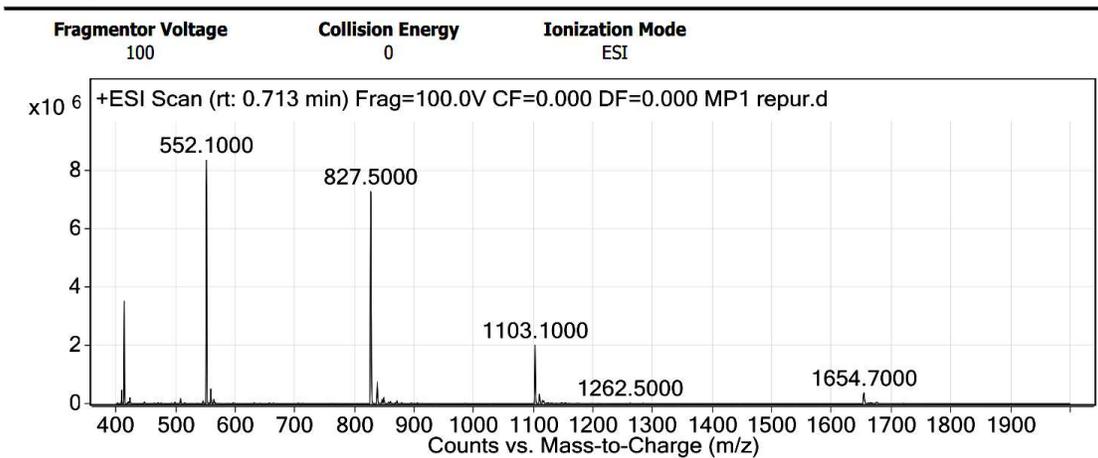
Khối lượng phân tử của sản phẩm trung gian (MP1-6aa – sau khi đã gắn 6 amino acid đầu tiên và MP1-14aa – sau khi đã gắn toàn bộ 14 amino acid) và sau tinh chế được tổng hợp trong bảng dưới đây.

Bảng 1. Kết quả xác định phổ khối của Polybia-MP1 và các chất trung gian

Sản phẩm	Công thức phân tử	Giá trị lý thuyết [M+2H]/2	Giá trị thu được [M+2H]/2	Sai số
MP1-6aa	C ₄₄ H ₆₅ N ₉ O ₉	864.4978	864.4000	0.0113%
MP1-14aa	C ₉₃ H ₁₄₂ N ₂₀ O ₂₁	938.5402	938.7000	0.0170%
Polybia-MP1	C ₇₈ H ₁₃₂ N ₂₀ O ₁₉	827.5062	827.5000	0.0007%

Dưới đây là hình ảnh kết quả xác định khối lượng phân tử của Polybia-MP1 bằng hệ thống **LC-MS** (peptid tinh khiết 99 % được xác định bằng hệ thống **HPLC**).

User Spectra



Hình 3. Kết quả xác định khối lượng phân tử của Polybia-MP1 sau khi tinh chế

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh thường gặp

Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy ở nồng độ thử nghiệm (100 µM), Polybia-MP1 có khả năng ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các vi sinh vật kiểm định như *Staphylococcus aureus* PU10203; *Pseudomonas syringae* PU10210 và nấm men *Candida albicans* KĐ301 (bảng 4). Kết quả này phù hợp với các công bố trước đây cho rằng MP1 có khả năng kháng

cả vi khuẩn gram âm, gram dương và nấm men. Ngoài ra, trong nghiên cứu này chỉ ra rằng Polybia-MP1 có thể ức chế hoàn toàn sinh trưởng của vi khuẩn *Pseudomonas syringae* PU10210 gây bệnh trên thực vật. Đây cũng là lần đầu tiên hoạt tính trên *Pseudomonas syringae* của peptid này được đánh giá. Kết quả này cho thấy MP1 có tiềm năng phát triển sản phẩm trong các lĩnh vực như bảo vệ thực vật trong tương lai.

Bảng 2. Khả năng ức chế sinh trưởng các vi sinh vật của Polybia-MP1

STT	Chủng vi sinh vật	Đặc điểm	Khả năng ức chế
1	<i>Staphylococcus aureus</i> PU10203	Vi khuẩn Gram dương	+++
2	<i>Pseudomonas syringae</i> PU10210	Vi khuẩn Gram âm	+++
3	<i>Candida albicans</i> KĐ301	Nấm men	+++

(+++ : ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng)

Kết luận

Peptid tự nhiên Polybia-MP1 đã được tổng hợp thành công bằng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Cụ thể, peptid thu được có độ tinh khiết 99 % xác định bằng hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao (**HPLC**). Khối lượng phân tử của Polybia-MP1 thu được chỉ sai lệch 0,0007 % được đánh giá ở 3 thời điểm: Sau khi gắn được ~ 50 % số amino acid, sau khi gắn amino acid cuối cùng và sau khi đã tinh chế. Quy trình đưa ra có thể áp dụng được trong điều kiện Việt Nam với sự hạn chế về thiết bị và kinh phí hơn các nước phát triển. Ví dụ, nghiên cứu này sử dụng chủ yếu dung môi DMF và hạn chế NMP là một dung môi đắt tiền hơn nhiều lần.

Bên cạnh đó, thử nghiệm ban đầu khả năng chống nhiễm khuẩn, nhiễm nấm cho thấy Polybia-MP1 có khả năng ức chế hoàn toàn hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (Gram dương) và *Pseudomonas syringae* (Gram âm) cùng chủng nấm *Candida albicans* ở nồng độ 100 μ M.

Nghiên cứu này mở ra khả năng ứng dụng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn vào việc tạo ra các peptid phục vụ cho công tác sàng lọc hoạt tính và thử nghiệm trên thực địa với các đối tượng khác nhau. Đồng thời, các kết quả nghiên cứu thu được cũng tạo tiền đề cho việc phát triển các ứng dụng của Polybia-MP1 nói riêng và các peptid kháng khuẩn nói chung trong tương lai.

Tài liệu tham khảo

1. Natália B. Leite, A. Aufderhorst-Roberts, Mario S. Palma, Simon D. Connell, João R. Neto, Paul A. Beales (2015), "PE and PS lipids synergistically enhance membrane poration by a peptide with anticancer properties", *Biophysical Journal*, 109 (5), pp. 936-947.
2. M. P. dos Santos Cabrera, S. T. B. Costa, B. M. de Souza, M. S. Palma, J. R. Ruggiero, J. Ruggiero Neto (2008), "Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1", *European Biophysics Journal*, 37 (6), pp. 879.
3. K. R. Wang, B. Z. Zhang, W. Zhang, J. X. Yan, J. Li, R. Wang (2008), "Antitumor effects, cell selectivity and structure - activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MP1", *Peptides*, 29 (6), pp. 963-968.
4. K. R. Wang, J. X. Yan, B. Z. Zhang, J. J. Song, P. F. Jia, R. Wang (2009), "Novel mode of action of polybia-MP1, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells", *Cancer Letters*, 278 (1), pp. 65-72.
5. H. L. Xuan, T. D. Duc, A. M. Thuy, P. M. Chau, T. T. Tung (2021), "Chemical approaches in the development of natural nontoxic peptide Polybia-MP1 as a potential dual antimicrobial and antitumor agent", *Amino Acids*, 53 (6), pp. 843-852.
6. H. X. Luong, D. H. Kim, B. J. Lee, Y. W. Kim (2017), "Antimicrobial activity and stability of stapled helices of polybia-MP1", *Archives of Pharmacal Research*, 40 (12), pp. 1414-1419.
7. W. K. Woodburn, J. Jaynes, E. L. Clemens (2020), "Designed antimicrobial peptides for topical treatment of antibiotic resistant acne vulgaris", *Antibiotics*, 9 (1). DOI: 10.3390/antibiotics9010018.