



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00465**

(22) Data de depozit: **05/08/2021**

(41) Data publicării cererii:
28/02/2023 BOPI nr. **2/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ 41A,
IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **NIȚĂ LOREDANA ELENA, BD.COPOU
NR.42, BL.A 3, SC.B, PARTER, AP.3, IAȘI,
IS, RO;**
• **CHIRIAC AURICA, STR.ALEXANDRU
VLAHUȚĂ NR.7B, AP.16, IAȘI, IS, RO;**

• **RUSU ALINA GABRIELA,
STR.1 DECEMBRIE 1918, NR.8, BL.B4BIS,
SC.A, ET.4, AP.20, PAȘCANI, IS, RO;**
• **CROITORU ALEXANDRA,
STR.PROF.NICOLAE OBLU, NR.20, AP.17,
IAȘI, IS, RO;**
• **SERBAN ALEXANDRU, STR.SEBESULUI,
NR.1, BL.K, SC.I, ET.1, AP.5, BRĂILA, BR,
RO;**
• **NEAMTU IORDANA,
STR.THEODOR PALLADY, NR.8, SC.B,
ET.3, AP.9, IAȘI, IS, RO;**
• **MUNTEANU CONSTANȚA,
STR. STRĂPUNGERE SILVESTRU, NR.56
BL.T3A, SC.B, ET.2, AP.9, IAȘI, IS, RO**

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNUI GEL AUTOASAMBLAT
PE BAZĂ DE PEPTIDE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui gel autoasamblat pe bază de peptide pentru aplicații biomedicale ca matrice pentru culturi celulare. Procedeu, conform invenției, constă într-o reacție de reticulare prin interacțiuni fizice necovalente cu autoasamblare, prin amestecarea unei soluții de lizină protejată la ambele grupe aminice Fmoc-Lys-Fmoc în dimetilsulfoxid cu o concentrație masică de 12,5...20,8% și pH ajustat la 7,4 pentru condiții fiziologice cu soluție salină tamponată cu fosfat, cu o soluție

Fmoc-Glu-Fmoc, sau Fmoc-Gly-Gly-Gly, respectiv, Fmoc-Ser, amestecarea lentă a celor două soluții în raport volumetric 1:1, păstrare în regim staționar timp de 24...48 h la temperatura de 22°C pentru definitivarea procesului de gelifiere, rezultând un gel autoasamblat care prezintă proprietăți fizico-chimice similare cu ale matricelor extracelulare.

Revendicări: 1



48

PROCEDEU DE PREPARARE A UNUI GEL AUTOASAMBLAT PE BAZA DE PEPTIDE

Invenția se referă la un procedeu de preparare a unui gel autoasamblat pe bază de peptide protejate cu N-(fluorenil-9-metoxicarbonil) Fmoc, ca matrice pentru culturi celulare.

Gelurile sunt materiale flexibile extrem de versatile, cu potențial enorm pentru aplicații biomedicale. Similaritatea cu multe elemente tipice proprii matricii extracelulare native (ECM) și cu proprietăți mecanice asemănătoare țesuturilor moi, este un factor cheie al performanței lor pentru regenerare celulară și tisulară. Gelurile sunt o opțiune promițătoare pentru culturile celulare 3D constituind o bază pentru aderența și creșterea celulelor cât și nutriției necesari acestora. Gelurile autoasamblate se formează prin agregarea spontană a componentelor monomerice în fibrile asemănătoare polimerilor prin interacțiuni necovalente și încălcirea ulterioară a acestor fibrile într-o rețea extinsă care provoacă gelificarea solventului.

Peptidele sunt biomolecule aplicate pentru a proiecta materiale inovative funcțional și structural moi de tipul gelurilor. Biomaterialele sub formă de geluri pe bază de peptide sunt rețele de lanțuri polimerice sau molecule de peptide de origine naturală sau sintetică. Datorită conținutului ridicat de apă gelurile posedă caracteristici biofizice similare țesuturilor naturale, respectiv mediului extracelular al celulelor ECM și servesc ca elemente structurale funcționale 3D pentru diferite tipuri de celule și pentru regenerarea tisulară.

În acest cadru, matricea oferă site-uri de atașare a celulelor, capacitatea celulelor de a crește în formă 3D și, pentru unele dintre ele, rigiditatea acestui mediu și factorii solubili asociați (factori de creștere, sistem imunitar). Ca matrice flexibilă 3D gelurile peptidice oferă un control complet asupra proprietăților biochimice și fizice, se pot personaliza pentru a se potrivi cu țesutul țintă și susțin creșterea unei game largi de celule, inclusiv celule stem

pluripotente induse de om și linii celulare de cancer uman. Ele pot fi utilizate pentru a construi modele relevante pentru diferite boli.

Gelurile peptidice autoasamblate folosite ca elemente structurale pentru cultura de celule au avantajul gelurilor pe bază de polimeri naturali, incluzând biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, și avantajele materialelor sintetice ca proprietăți mecanice și structurale controlate.

Adeziunea celulară și proliferarea diferitelor tipuri de celule poate fi crescută/redușă prin modificarea suprafeței gelului cu funcționalități chimice simple cum ar fi amină, carboxil și hidroxil. Prin introducerea de blocuri cu funcționalitate chimică este posibil să se creeze geluri care sunt potrivite cu cerințele unui anumit tip de celulă. De asemenea, liganzii bioactivi ce pot fi introduși cu ușurință în catena lanțului peptidic promovează bioactivități și controlează comportarea celulară.

Derivații peptidici de dimensiuni mici cum sunt peptidele modificate cu grupe aromatice cum este N-(fluorenil-9-metoxicarbonil) (Fmoc) se pot autoasambla formând geluri care se autosușțin. Aceste geluri prezintă similitudini cu matricile extracelulare datorită hidratării înalte, rigidității relative și arhitecturii nanofibroase subliniate de analizele fizico-chimice. De exemplu, Fmoc-difenilalanina (Fmoc-F(2)) oferă o matrice 3D destinată culturii celulare a condrocitelor primare la bovine. Compozițiile combinate de gel de Fmoc-F(2) cu alți aminoacizi protejați Fmoc, de exemplu lizina (cu grupa laterală $R=(CH_2)_4NH_2$), acid glutamic (cu grupa laterală $R=CH_2COOH$), serină (cu grupa laterală $R=CH_2OH$), produc elemente structurale de natură fibroasă cu diametru al fibrei de 32-65 nm evaluat prin microscopie crioelectronică și microscopie de forță atomică. Analiza FTIR identifică faptul că segmentele peptidice adoptă în principal o conformație β -sheet antiparalelă.

Compozițiile pe bază de peptide mici, biocompatibile și biodegradabile, ce pot fi ușor modificate, sunt aplicate în mod deosebit în medicină. În funcție de mediul biochimic se obțin

spontan geluri autoasamblate cu forme diferite, agregate ordonate, prin combinare de forțe fizice de tipul legăturilor de hidrogen, interacțiunilor hidrofobe, interacțiunilor electrostatice și a forțelor van der Waals, care mențin structurile autoasamblate peptidice într-o stare de energie joasă stabilă. Caracteristicile acestor geluri, cum ar fi: capacitatea ridicată de sorbție în microporii gelului și proprietățile reologice asemănătoare solidelor, condiții de lucru blânde, receptivitatea la stimuli externi, biocompatibilitatea *in vitro*, biodegradabilitatea și lipsa de citotoxicitate după degradare, le conferă proprietăți care permit utilizarea lor în domeniul biomedical ca biomateriale pentru ingineria tisulară, purtători de medicamente cu capacitate mare de încărcare, vindecarea rănilor, etc. Totodată tipul acesta de autoasamblare în rețele al peptidelor imită structurile fibroase ale matricii extracelulare (ECM), cum ar fi arhitectura nanofibroasă și hidratarea ridicată și formează geluri ca și matrici extracelulare (ECM) sintetice. Studii recente arată că secvențele peptidice protejate cu N-(fluorenil-9-metoxicarbonil) (Fmoc) și autoasamblate cu formare de geluri, permit dezvoltarea de microambiente celulare cu reglare fină, care promovează și reglează comportamentul celular, cum ar fi aderența, migrarea, proliferarea direcționată și diferențierea celulelor.

De exemplu în brevetul **EP 0811056 B1** din 1996 mediul de cultură pentru celule și țesuturi pe bază de peptide este un kit complet ce include un container în care se introduc celulele și mediul de cultură sub formă de amestec uscat la care se adaugă apa.

Mediul de cultură conform prezentei invenții conține ingredientele găsite în mod convențional în medii pentru cultivarea celulelor eucariote, adică vitamine, minerale, carbohidrați, promotori de creștere și aminoacizi. Mai includ hidrolizate proteice ca sursă de alți aminoacizi esențiali în mediul de cultură. Mediul de cultură astfel preparat a fost testat pe o linie celulară de mielom uman, o linie celulară de mielom de șoarece și o linie celulară de hibridom.

În brevetul **WO 138274 A1** din 2016 se descriu formulări de tip gel din peptide sintetice, pe bază de RADARADARADARADA (RADA 16-I), o peptidă amfifilică din 16 resturi de

aminoacizi, autoasamblabilă în mod controlat în fibrile cu structuri ordonate funcție de pH, folosită ca matrice extracelulară pentru culturi celulare. RADA 16-I constă din grupe repetate hidrofobe (alanină) și hidrofile (arginină și acid aspartic), cu tendința de a se autoasambla în β -structuri foarte stabile, bine organizate.

WO 046277 A1 din 2017 prezintă compoziții de tip gel îmbunătățite pe bază de doi derivați peptidici. Primul include un ligand aromatic și un diamino acid cu un ciclu aromatic. Al doilea include un ligand aromatic și o dipeptidă cu un aminoacid aromatic și un alt aminoacid care poate fi încărcat electric sau polar. Aminoacizii aromatici pot fi fenilalanina, tirozina și triptofanul. Aminoacizii încărcăți electric pot avea sarcină pozitivă: arginină, histidină și lizină, iar cei încărcăți negativ includ acidul aspartic și acidul glutamic. Aceste geluri pot funcționa ca suport și element structural pentru creșterea celulară.

Brevetul **US 8,420,605** din 2006 se referă la geluri pe bază de peptide sau derivați peptidici, cu pH fiziologic 7, cum ar fi Fmoc-difenilalanina Fmoc-Phe-Phe, sau combinații de difenil alanină cu alanina, valina, leucina sau fenilalanina. Gelul pe bază de Fmoc-Phe-Phe nu formează totuși un element structural potrivit pentru creșterea celulelor ancorate deoarece este prea hidrofob.

Pentru optimizarea și susținerea creșterii celulare astfel de compoziții trebuie să formeze un gel suficient de rigid sub pH-ul fiziologic. De asemenea gelul trebuie să fie transparent din punct de vedere optic pentru a ajuta la monitorizarea celulelor, să nu fie prea concentrat (deoarece concentrația scăzută a componentelor gelului sau dimensiunile mari ale porilor sunt benefice pentru creșterea și longevitatea celulelor).

Brevetul **US 0125611A1** din 2015 exemplifică un gel peptidic format prin autoasamblare cu rezistență mecanică adecvată care se compune dintr-o secvență de resturi de aminoacizi de tipul : $a_1b_1c_1b_2a_2b_3db_4a_3b_5c_2b_6a_4$ unde : a_1 până la a_4 reprezintă rest de aminoacid bazic, b_1 până la b_6 reprezintă rest de aminoacid polar neîncărcat și / sau un rest de aminoacid

hidrofob, c1 și c2 fiecare reprezintă rest de aminoacid acid iar d reprezintă rest de aminoacid hidrofob. Gelul conform invenției cu aplicare potențială ca suport pentru cultura celulară conferă celulelor o durată de supraviețuire satisfăcătoare.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui procedeu de preparare a unui gel autoasamblat pe bază de peptide protejate cu N-fluorenil-9-metoxicarbonil Fmoc, din di-N-fluorenil-9-metoxicarbonil-lizină reticulată prin interacțiuni fizice necovalente cu N-fluorenil-9-metoxicarbonil-acid glutamic, sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil-triglicina, sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil – serină, în soluție de dimetilsulfoxid, care extinde gama de aplicații biomedicale ca matrice pentru culturi celulare sau pentru alte tipuri de biomateriale.

Procedeu de preparare al unui gel autoasamblat cu aplicații biomedicale ca matrice pentru culturi celulare conform invenției, din di-N-fluorenil-9-metoxicarbonil-lizină reticulată prin interacțiuni fizice necovalente cu N-fluorenil-9-metoxicarbonil-acid glutamic, sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil-triglicina, sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil-serină, se realizează printr-o reacție de autoasamblare în soluție de dimetilsulfoxid, la rapoarte volumetrice 1 : 1, la temperatura ambientală de 22 °C timp de 24 ore, în regim staționar.

Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- este un procedeu ecologic, fără emanații toxice și energo-economic;
- este simplu de realizat în condiții de laborator dotate cu vase și ustensile de sticlă, sigur în exploatare;
- necesită un număr redus de faze tehnologice;
- stabilitate la stocare cât și operațională în decursul unei potențiale utilizări a gelului preparat.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu

În prima fază, chiar înainte de utilizare, separat în flacoane de sticlă se prepară soluțiile de stocare în dimetilsulfoxid (DMSO) din peptidele selectate protejate cu N-fluorenil-9-metoxicarbonil (Fmoc) la grupele aminice. Peptidele de puritate mai mare de 95% și păstrate la -20°C , au fost folosite fără purificare ulterioară. **Soluția de stocare 1** pe bază de: di-N-fluorenil-9-metoxicarbonil - Lizină (Fmoc-Lys-Fmoc) și **Soluția de stocare 2** pe bază de: N-fluorenil-9-metoxicarbonil - Acid glutamic (Fmoc - Glu), sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil-Triglicina (Fmoc - Gly-Gly-Gly), sau N-fluorenil-9-metoxicarbonil - Serină (Fmoc - Ser).

Preparare soluție de stocare 1 (pe bază de Fmoc-Lys-Fmoc) : într-un flacon de laborator în sine cunoscut se plasează 0,0125 g Fmoc-Lys-Fmoc și se adaugă 0,06 ml DMSO pentru o concentrație gravimetrică de 20,8 %. Se amestecă cu o baghetă de sticlă până când solvirea este completă. Se ajustează pH-ul la 7,4 pentru condiții fiziologice, prin adaus treptat cu picătura de 2,44 ml soluție salină tamponată cu fosfat (soluție PBS). Rezultă 2,5 ml soluție de stocare 1. Soluția PBS este o soluție de sare echilibrată utilizată pentru diferite faze în cultura celulară, cum ar fi spălarea celulelor înainte de disociere, transportul celulelor sau țesuturilor, diluarea celulelor pentru numărare și pregătirea reactivilor. Inițial soluția de Fmoc-Lys-Fmoc este opacă, după aproximativ 2-3 minute devine translucidă apoi transparentă.

Preparare soluție de stocare 2 (pe bază de Fmoc-Glu, sau Fmoc - Gly-Gly-Gly, sau Fmoc - Ser) : într-un flacon de laborator în sine cunoscut se plasează 0.0025 g Fmoc-Glu-Fmoc, sau Fmoc - Gly-Gly-Gly, sau Fmoc - Ser și se adaugă 0.02 ml DMSO pentru o concentrație gravimetrică de 12,5 %. Se amestecă cu o baghetă de sticlă până când solvirea este completă. Se ajustează pH-ul la 7,4 pentru condiții fiziologice, prin adaus treptat cu picătura de 2,48 ml soluție salină tamponată cu fosfat (soluție PBS). Rezultă 2,5 ml soluție de stocare 2. Soluția obținută este ușor translucidă.

În faza a doua se prepară gelul autoasamblat pe bază de peptide prin amestecarea în raport volumetric 1 : 1, a soluției de stocare 1 de 2,5 ml cu soluția de stocare 2 de 2,5 ml. În Tabelul 1 se prezintă codificarea probelor de gel preparate prin autoasamblarea peptidelor selectate.

Tabelul 1. Codificare probelor de gel preparate

Proba	Sistem
Proba 1	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Glu
Proba 2	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc – Gly-Gly-Gly
Proba 3	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc – Ser

Se omogenizează cele două soluții prin amestecare lentă cu bagheta de sticlă și se transferă pentru cultură celulară pe plăci cu godeuri. Se verifică păstrarea pH-ului la nivel fiziologic de 7,4. Se păstrează în continuare în regim staționar pentru 24 de ore la temperatura ambientală de 22° C pentru definitivarea procesului de gelificare pentru probele 1 și 2. În cazul probei 3 sunt necesare 48 de ore pentru gelificare completă. În Tabelul 2 se prezintă unele observații preliminare asupra procesului de gelificare spontană a probelor de gel preparate.

Tabelul 2. Observații preliminare asupra procesului de gelificare

Proba	Sistem	Creștere vâscozitate	Timp gelificare	Aspect
1	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Glu	După 20 min	24 ore	translucid
2	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc – Gly-Gly-Gly	După 20 min	24 ore	ușor translucid
3	Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc – Ser	După 45-60 min	48 ore	transparent

Abilitatea de a gelifia este confirmată de formarea de probe de gel care se autosusțin, fără elemente structurale ajutătoare când se inversează cu 180° prin răsturnare.

În concordanță cu cerințele impuse de aplicațiile biomedicale potențiale ca matrice pentru culturi celulare, probele de gel preparate au fost pregătite prin spălare repetată cu soluție salină tamponată cu fosfat (soluție PBS) și uscate prin liofilizare, pentru caracterizarea structurală prin spectroscopie FT-IR, comportarea termică prin analiza termogravimetrică, difracția luminii laser (DLS) pentru determinarea razei hidrodinamice, a indicelui de polidispersitate, potențialului zeta și a conductivității.

Structura chimică a gelurilor rezultate a fost confirmată prin spectroscopie FT-IR. Spectrele aliniat corepunzător ale tuturor probelor sintetizate sunt ilustrate în Figura 1 iar în Tabelul 3 sunt înregistrate pozițiile peak-urilor de frecvență IR atribuite peptidelor protejate Fmoc din structura gelurilor preparate.

Grupările C=O și N-H din structura peptidelor sunt implicate în mod direct în conformația și formarea legăturilor de hidrogen din lanțurile peptidice. Frecvența benzilor din regiunea 3300cm^{-1} este atribuită grupării N-H de întindere asimetrică din structura amidei secundare. Prezența benzilor amidă I se observă la 1689 cm^{-1} și amidă II (N-H și C-N) la 1530 cm^{-1} , regiuni ce indică o posibilă autoaranjare a nanofibrelor peptidice de tip β -sheet în structura secundară a gelurilor supramoleculare. Grupările aromatice din structura N-fluorenil-9-metoxicarbonil Fmoc sunt predispuse la formarea interacțiunilor intermoleculare apărute între electronii π din inelele fluorenil aromatice. O altă regiune importantă în spectrul FT-IR al gelurilor peptidice este banda amidă III ce se observă la $1250\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$. Intensitatea acestei benzi (C-N și N-H) se reduce în cazul structurilor supramoleculare autoasamblate, în timp ce intensitatea benzii din spectrul FT-IR al Fmoc-Lys-Fmoc este evident mai mare.

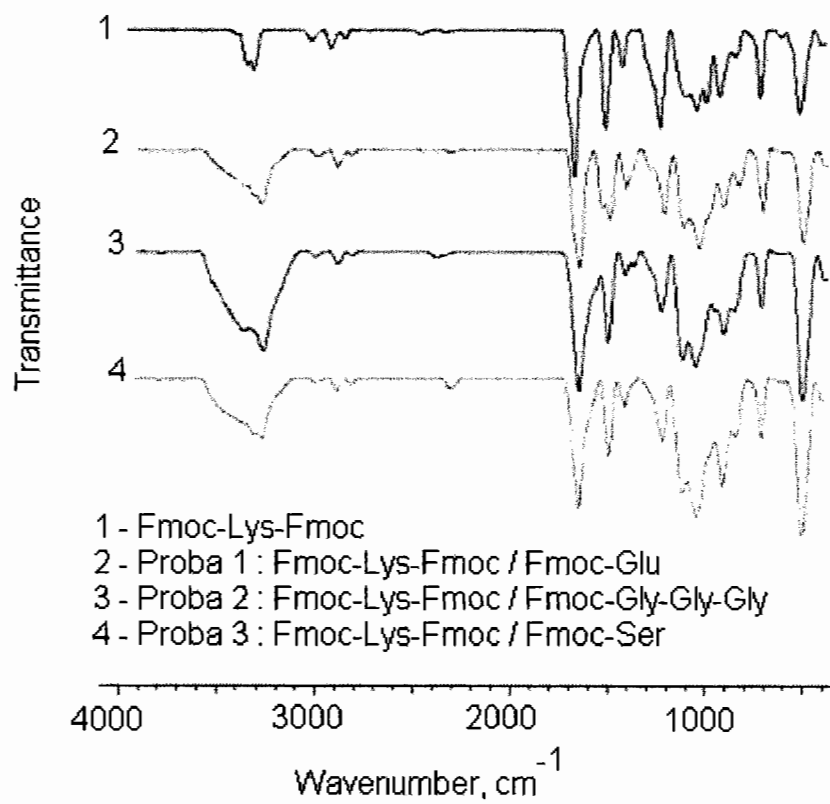


Figura 1. Spectre FT-IR ale probelor de gel preparate pe bază de peptide protejate Fmoc

Tabelul 3. Peak-urile de frecvență IR atribuite peptidelor protejate Fmoc

	Fmoc-Lys	Proba 1	Proba 2	Proba 3
N-H	3343 , 3379	3339	3331 , 3433	3343
amidă primară/ amidă secundară				
C-H întindere	2947 , 2876	2945	2945	2947, 2357
C=O întindere	1689	1693	1689	1689
Bandă amidă I				
N-H	-	1574	-	-
amină primară				
C-N	1531	1533	1537	1533
Bandă amidă II				
CH ₂	1448	1450	1406 , 1448	1448
C-N	1250	1252	1261	1253
Bandă amidă III				
C-O întindere	1062	1151	1151	1151
C-O	1012	1070	1084	1072
C=C	945	943	937	939
C-C	864	862	-	868
C-H	736	738	738	736

Analiza termică a structurilor preparate a fost realizată pe sistemul simultan TG/FT-IR/MS tip Jupiter STA 449 F1 (Netzsch). Probele au fost menținute anterior 24 ore în atmosferă de umiditate controlată în prezență de CaCl_2 . 7.5–8 mg probă se încălzește în creuzet deschis de aluminiu în curent de azot cu un debit de 50 ml/min^{-1} . Rulările au fost efectuate în modul dinamic de la temperatura camerei până la 600°C la o viteză de încălzire de $10^\circ \text{C} / \text{min}$.

Tabelul 4. Analiza termogravimetrică a variantelor de gel preparate ^{X)}

Proba	Etapa de degradare	T _i , °C	T _{max} , °C	T _f , °C	ΔW(%)	T ₁₀ (°C)	T ₂₀ (°C)
Fmoc-	I	62	144	172	10.44	178	193
Lys-Fmoc	II	182	189	196	33.00		
ca	III	262	280	307	8.77		
martor	IV	316	322	350	6.85		
	V	361	365	398	6.76		
Proba 1	I	27	97	109	3.98	183	208
	II	115	132	174	5.73		
	III	194	211	240	34.55		
	IV	270	311	334	17.57		
Proba 2	I	62	74	80	1.71	195	208
	II	89	128	172	6.04		
	III	188	201	220	26.18		
	IV	283	307	335	11.49		
Proba 3	I	27	138	183	9.82	190	202
	II	187	197	204	15.10		
	III	213	280	303	21.03		
	IV	305	323	357	11.28		

x) - T_i , T_{max} , T_f – temperatura inițială, temperatura vitezei maxime de pierdere în greutate și temperatura finală a proceselor principale de descompunere termică; ΔW - pierderi în greutate pe intervalul $T_i - T_f$; T_{10} și T_{20} —temperatura corespunzătoare pierderilor în greutate de 10 %, respectiv 20%.

Proba Fmoc-Lys-Fmoc ca probă martor prezintă patru procese principale de degradare termică (II, III, IV, V) cu pierderi în greutate mari (33, 8.77, 6.85, 6.76) în timp ce probele de gel preparate 1,2 și 3 prezintă câte 3 procese principale de degradare termică cu pierdere în greutate totală de 45% în medie. În funcție de temperatura la care apar 10 % pierderi în greutate (T_{10}) și 20% pierderi în greutate (T_{20}) gelul pe bază de Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Gly-Gly-Gly prezintă stabilitatea termică mai bună.

Difuzia dinamică a luminii (DLS) este intens aplicată în domeniul formulărilor și a analizei de laborator a peptidelor. Intensitatea difuziei în soluție a unei peptide este proporțională cu pătratul greutății moleculare. Din acest motiv, DLS este extrem de sensibil la apariția agregării moleculelor cauzată de procesare, tensiuni induse și depozitare, fiind astfel utilizată pentru monitorizarea și detectarea agregării.

Raza hidrodinamică, distribuția dimensiunii particulelor, potențialul zeta și conductivitatea au fost estimate prin folosirea tehnicii de difuzie dinamică a luminii DLS, pe dispozitivul Zetasizer model Nano ZS, cu laser He - Ne de 633 nm de la Malvern Instruments, UK.

Tabelul 5. Analiza DLS a probelor de gel preparate

Proba	R_H (nm)	PDI	ZP (mV)	μ (mS/cm)
Fmoc- Lys - Fmoc	327	0.533	-50	1.15
Proba 1	626	0.607	-73	1.48
Proba 2	715	0.691	-60.8	1.29
Proba 3	800	0.758	-69.6	2.53

x) – R_H – raza hidrodinamică (nm); PDI - distribuția dimensiunii particulelor; ZP - potențialul zeta (mV); μ – conductivitatea (mS/cm)

Se observă creșterea evidentă a razei hidrodinamice prin autoasamblarea Fmoc- Lys – Fmoc cu Fmoc-Glu, Fmoc – Gly-Gly-Gly și Fmoc – Ser, în bună corelare cu valorile PDI. Totodată ansamblul de grupe funcționale generat de aminoacizii din structura gelului determină micșorarea potențialului zeta de la -50 mV pentru lizina funcționalizată Fmoc la: -73 mV pentru Fmoc-Lys-Fmoc reticulată cu Fmoc-Glu, -60.8 mV la Fmoc-Lys-Fmoc reticulată cu Fmoc – Gly-Gly-Gly și la -69 mV la Fmoc-Lys-Fmoc reticulată cu Fmoc-Ser. Scăderea potențialului zeta în valori negative evidențiază mărirea stabilității datorită forțelor de respingere electrostatice dintre particule. În același tip conductivitatea are valori mai mari ca o măsură a prezenței grupelor funcționale cu încărcare electrică de pe suprafața gelului.

Revendicare

Procedeu de preparare a unui gel autoasamblat pe bază de peptide protejate cu N-fluorenil-9-metoxycarbonil Fmoc ca matrice pentru culturi celulare, caracterizat prin aceea că se realizează printr-o reacție de reticulare prin interacțiuni fizice necovalente cu autoasamblare, prin amestecarea unei soluții de lizină protejată la ambele grupe aminice Fmoc-Lys-Fmoc în dimetilsulfoxid cu o concentrație gravimetrică de 20,8 % și cu pH ajustat la 7,4 pentru condiții fiziologice cu soluție salină tamponată cu fosfat, cu o soluție de acid glutamic protejat Fmoc-Glu, sau cu o soluție de triglicină protejată Fmoc-Gly-Gly-Gly, sau cu o soluție de serină protejată Fmoc-Ser, în dimetilsulfoxid cu o concentrație gravimetrică de 12,5 % și cu pH ajustat pentru condiții fiziologice la 7,4 cu soluție salină tamponată cu fosfat, cu amestecarea lentă a celor două soluții în raport volumetric 1 : 1, păstrare în regim staționar pentru 24 de ore la temperatura ambientală de 22° C pentru definitivarea procesului de gelificare pentru probele cu Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Glu-Fmoc și Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Gly-Gly-Gly și 48 ore pentru Fmoc-Lys-Fmoc / Fmoc-Ser, pregătire pentru analize prin spălare repetată cu soluție salină tamponată cu fosfat și uscare prin liofilizare.