

# DISSENY I SÍNTESE DE LIPOPÈPTIDS CÍCLICS I DE PÈPTIDS CONJUGATS DERIVATS DE BPC194 AMB ACTIVITAT ANTIMICROBIANA

**Sílvia VILÀ ROURA**

Dipòsit legal: Gi. 1369-2014  
<http://hdl.handle.net/10803/275967>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Tesi doctoral

**DISSENY I SÍNTESI DE LIPOPÈPTIDS CÍCLICS I DE  
PÈPTIDS CONJUGATS DERIVATS DE BPC194  
AMB ACTIVITAT ANTIMICROBIANA**

**Sílvia Vilà Roura**

**2014**

Programa de doctorat en Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Directores de tesi: Dra. Marta Planas Grabuleda i Dra. Lidia Feliu Soley

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la Universitat de Girona



Les doctores Marta Planas Grabuleda i Lidia Feliu Soley, professores de l'àrea de Química Orgànica de la Universitat de Girona,

DECLAREM:

Que el treball titulat "*Disseny i síntesi de lipopèptids cíclics i de pèptids conjugats derivats de BPC194 amb activitat antimicrobiana*", que presenta la Sra. Sílvia Vilà Roura per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció i que constitueix la seva memòria de Tesi Doctoral.

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, firmem el present document

Signatura

Dra. Marta Planas Grabuleda

Dra. Lidia Feliu Soley

Girona, 6 de Juny de 2014



El desenvolupament d'aquesta tesi ha estat finançat pel següent projecte de recerca del Ministerio de Ciencia e Innovación

“Control biotecnológico del fuego bacteriano. Utilización de péptidos antimicrobianos sintéticos derivados de bacteriocinas y de ciclolipopéptidos” (AGL2009-13255-C02-02/AGR)

Sílvia Vilà Roura agraeix a una beca de recerca de doctorat de la Generalitat de Catalunya (2013FI\_B2 00121)



## Llista completa de publicacions

Publicacions derivades de la tesi:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides. *Org. Biomol. Chem.* 2013, **11**, 3365-3374.

Factor d'impacte: 3.568 (2013)

Àrea, rang: Química Orgànica, posició 12 de 57 (1<sup>er</sup> quartil)

Nº vegades que es cita: 2 (18/05/14)

- ❖ S. Vilà, C. Camó, E. Figueras, E. Badosa, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 10.1002/ejoc.201402111R1.

Factor d'impacte: 3.344 (2013)

Àrea, rang: Química Orgànica, posició 14 de 57 (1<sup>er</sup> quartil)

Nº vegades que es cita: 0 (18/05/14)

Manuscrit derivat de la tesi enviat per la seva publicació:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides. *Org. Biomol. Chem.*

Manuscrit derivat de la tesi en preparació:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide **BPC194**.





*A la meva família, a en Marc i en especial en Rusqui*



## Agraïments

Sembla mentida que ja hagin passat 4 anys des de que vaig començar a embarcar-me en aquest món. Per mi, aquesta ha estat una de les parts més difícils d'escriure de la tesi, és difícil expressar tot el que sento amb simples paraules. Després de tant de temps i feina m'agradaria agrair a totes les persones i també a les meves mascotes que en algun moment o altre han estat al meu costat acompanyant-me.

Inicialment, voldria donar les gràcies a les meves directores de tesi, la Dra. Marta Planas i la Dra. Lidia Feliu, per haver-me permès realitzar la tesi doctoral sota la seva direcció, per haver confiat en mi des del primer dia i haver-me donat l'oportunitat de formar-me al seu costat. Els voldria agrair també l'ajuda que m'han proporcionat en tot moment i els coneixements que m'han aportat.

Així mateix, també m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Montse Heras, per tot el suport, l'efecte i bons consells que m'ha donat durant tot aquest temps i el Dr. Eduard Bardají, el qual m'ha permès incorporar-me en el grup LIPPSO, per totes les rialles i bons moments passats.

Voldria fer extensiu el meu agraïment a totes les persones que formen part del Serveis Tècnics de Recerca, especialment a la senyora Anna Costa per la seva dedicació i ajuda amb l'ESI/MS, a la Dra. Lluïsa Matas per la seva ajuda en les ressonàncies, el Dr. Vicenç Oliveras pel seu ajut amb el MALDI i a la Laura Gómez per la seva ajuda amb l'HRMS. A més, vull agrair a tots els membres del Grup de Patologia Vegetal de la UdG, els quals han realitzat les proves biològiques d'aquest treball, concretament a la Dra. Esther Badosa, per la gran dedicació i eficiència en la realització de la majoria d'assajos biològics i al Dr. Jordi Cabrefiga.

No m'oblido de tots els meus companys de grup, que han estat les persones amb les quals he passat més temps compartint feina, xerrades, grans moments al laboratori i, per suposat, els dinars i sopars de grup.

En primer lloc agrair a la Cristina Orozco, a l'Esther i en Robert, els quals han contribuït a la confecció d'aquesta tesi amb els seus treballs experimentals.

A l'Imma, l'Ana per la paciència que van haver de tenir amb mi al principi en ensenyar-me totes les coses i per tots els bons consells que em van donar.

La Montse T. i la Marta D., que tot i que eren al parc científic, sempre m'han ajudat.

A la Marta S., l'Alberto, l'Eduard, l'Àngel, la Cristina C. i la Nerea per tots els bons moments viscuts al laboratori i per totes les xerrades al despatx. A l'Àngel (un altre cop) pel seu gran optimisme, que sempre ajuda en els moments difícils, i no oblidar-me de les seves magdalenes de xocolata amb coco (mmm.... boníssimes!). A la Cristina Rosés (La Manguí!) per les bones estones passades juntes al laboratori 207 i a fora de la feina.

Per suposat que no m'oblido de l'Íteng, una de les persones més especials que he conegut durant aquest temps. Amb el temps, ha passat de ser una simple companya de feina a ser una gran amiga. Durant tots aquests anys, he pogut veure que és una gran persona que no dubta en ajudar als demés quan ho necessiten sense esperar res a canvi. Vull agrair-li tot el suport i recolzament que m'ha donat, sempre que ho he necessitat, fins i tot en els moments més difícils, ha tingut un moment per ajudar-me o simplement per escoltar-me. Gràcies per ser-hi, sé que sóc una mica complicada!

Voldria, també, donar les gràcies a tots els companys del Departament de Química, especialment a en Pep, l'Aida, l'Íngrid i a la Magda.

Arribat aquest punt també m'agradaria agrair a La Dra. Lluïsa per la confiança dipositada amb mi i a La Mafalda per tota la seva ajuda durant els mesos que vaig estar a Barcelona.

Vull agrair a la meva família, en especial a la meva mare (La Dolors) i la meva germana (Marta) per ajudar-me sempre que tenia un dubte amb l'anglès i per aguantar les meves presentacions orals. A la meva iaia (l'abuela) perquè sempre m'ha escoltat quan he tingut problemes i perquè sempre m'ha recolzat. En Marc per aguantar el meu mal humor, per ajudar-me sempre que ha pogut i per la paciència que ha tingut. Com no també vull agrair el meu pare (en Josep), el més especial de tots, simplement per estar sempre el meu costat.

Finalment, agrair en Rusqui (Xu) per tots els gran moments que vam passar junts perquè ha estat una part molt important de la meva vida i no l'oblidaré mai. En Rufus en Gussi i en Mi perquè m'han tornat l'alegria i m'han ajudat a tirar endavant en els moments més difícils.

A tots vosaltres moltes gràcies.



## ABREVIATURES

Aa	Aminoàcid
Ac	Acetil
ACN	Acetonitril
Ahx	Àcid 2-aminohexanoic
All	Al·lil
AMP	Pèptid antimicrobià
Bn	Benzil
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonil
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butil
CMI	Concentració mínima inhibidora
COMU	Hexafluorofosfat d'1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilideneaminoxi)dimetilaminomorfolino)]uroni
d	Doblet
Dap	Àcid 2,3-diaminopropanoic
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
dd	Doble doblat
Dde	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etil
DIEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
EDC	Hidroclorur d'1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
equiv	Equivalents
ESI/MS	Espectrometria de masses amb ionització per electrosprai
Et	Etil
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
<i>J</i>	Constant d'acoblament
HATU	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HBTU	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HCTU	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -(6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució
ivDde	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil
IR	Espectroscòpia d'infraroig
<i>J</i>	Constant d'acoblament
M	Molar



m	Multiplet
MALDI-TOF	Desorció/ionització làser assistida per matriu amb separació segons el temps de vol
$m/z$	Relació massa/càrrega
MBHA	Metilbenzhidrilamina
Me	Metil
mmol	Mil·limols
Mtt	4-Metiltritol
MW	Microones
NEM	<i>N</i> -Etilmaleimida
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidinona
Oxima	2-Ciano 2-(hidroxiimino)acetat d'etil
Pf	Punt de fusió
Ph	Fenil
pNZ	<i>p</i> -Nitrobenzil
Pra	Propargilglicina
PS	Poliestirè
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidin)fosfoni
PyOxima	Hexafluorofosfat de <i>O</i> -[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetiliden)amino]-oxitris (pirrolidin-1-il)fosfoni
Rf	Factor de retenció
Rink	Àcid 4'-{[ <i>R,S</i> ]- $\alpha$ -1-amino-2,4-dimetoxibenzil}-fenoxiacètic
RMN	Ressonància magnètica nuclear
s	Singlet
t	Triplet
t.a.	Temperatura ambient
TBTU	Tetrafluoroborat d' <i>N</i> -òxid d' <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazolil)(dimetilamino)-metilè]- <i>N</i> -metilamino
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofuran
TIS	Triisopropilsilà
TLC	Cromatografia de capa fina
$t_R$	Temps de retenció
Tr	Tritil
$\delta$	Desplaçament químic
$\lambda$	Longitud d'ona

## AMINOÀCIDS

<b>Nom</b>	<b>Codi 3 lletres</b>	<b>Codi 1 lletra</b>
Àcid aspàrtic	Asp	D
Àcid glutàmic	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteïna	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptòfan	Trp	W
Valina	Val	V



# ÍNDEX

## Resum General/General Abstract/Resumen General

RESUM GENERAL .....	3
GENERAL ABSTRACT .....	6
RESUMEN GENERAL.....	9
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>13</b>
1.1. Control de malalties de plantes .....	15
1.2. Pèptids antimicrobians.....	18
1.3. Pèptids cíclics antimicrobians .....	21
1.4. Ciclolipopèptids amb activitat antimicrobiana .....	25
1.5. Estratègies per al disseny de pèptids amb activitat antimicrobiana.....	31
1.5.1. Incorporació de D-aminoàcids .....	31
1.5.2. Incorporació d'un residu d'histidina.....	32
1.5.3. Incorporació d'un anell d'1,2,3-triazole .....	34
1.5.4. Pèptids multivalents .....	45
1.6. Síntesi de pèptids en fase sòlida .....	53
1.6.1. Estratègia general .....	53
1.6.2. Síntesi de pèptids cíclics en fase sòlida .....	60
1.7. Bibliografia.....	61
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>67</b>
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>73</b>
3.1. Convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides.....	75
3.1.1. Introduction .....	77

3.1.2. Results and discussion .....	78
3.1.2.1. Synthesis of cyclic lipopeptides <b>I</b> using a 4-methyltrityl (Mtt) group .....	79
3.1.2.2. Synthesis of cyclic lipopeptides <b>I</b> using a 1(4,4-dimethyl-2,6- diocyclohexylidene)-3-methylbutyl (ivDde) group .....	85
3.1.2.3. Biological activity .....	86
3.1.3. Conclusions .....	87
3.1.4. Experimental section .....	88
3.1.4.1. General .....	88
3.1.4.2. Synthesis of linear peptidyl resins <b>2</b> and <b>3a-b</b> .....	88
3.1.4.3. Synthesis of linear lipopeptides <b>7a-c</b> and <b>11a-c</b> .....	89
3.1.4.4. Synthesis of cyclic lipopeptides .....	91
3.1.4.4.1. Synthesis of cyclic peptidyl resins <b>1a</b> and <b>1b</b> .....	91
3.1.4.4.2. Synthesis of cyclic lipopeptides <b>5</b> , <b>BPC498</b> , <b>BPC500</b> , <b>BPC502</b> , <b>BPC524</b> and <b>BPC530</b> .....	92
3.1.4.5. Bacterial and fungal strains and growth conditions .....	94
3.1.4.6. Antibacterial and antifungal activity .....	94
3.1.4.7. Hemolytic activity .....	95
3.1.5. Acknowledgements .....	96
3.1.6. References .....	96
3.2. Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides .....	99
3.2.1. Introduction .....	101
3.2.2. Results .....	103
3.2.2.1. Design of the cyclolipopeptides .....	103
3.2.2.2. Solid-phase synthesis of the cyclolipopeptides .....	105
3.2.2.3. Antimicrobial activity .....	107
3.2.2.4. Hemolytic activity .....	111
3.2.2.5. Phytotoxicity in tobacco leaves .....	111
3.2.3. Discussion and conclusions .....	112
3.2.4. Experimental section .....	115
3.2.4.1. General .....	115

3.2.4.2. Synthesis of linear peptidyl resins.....	116
3.2.4.3. Synthesis of cyclic peptidyl resins .....	120
3.2.4.4. Synthesis of cyclolipopeptides .....	124
3.2.4.5. Bacterial and fungal strains and growth condition.....	138
3.2.4.6. Antibacterial and antifungal activity assays.....	139
3.2.4.7. Hemolytic activity .....	140
3.2.4.8. Phytotoxicity .....	140
3.2.5. Acknowledgements .....	141
3.2.6. References.....	141
<b>3.3. Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles.....</b>	<b>143</b>
3.3.1. Introduction .....	145
3.3.2. Results and discussion .....	147
3.3.2.1. Design of cyclic lipopeptidotriazoles.....	147
3.3.2.2. Synthetic approach to cyclic lipopeptidotriazoles.....	148
3.3.2.3. Synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles from peptidyl resin <b>1</b> (Strategies 1a and 1b) .....	148
3.3.2.4. Synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles from peptidyl resin <b>2</b> (Strategies 2a and 2b) .....	151
3.3.2.5. Extension of the methodology to the synthesis of a set of cyclic lipopeptidotriazoles.....	154
3.3.3. Conclusions .....	155
3.3.4. Experimental section .....	155
3.3.4.1. General methods.....	155
3.3.4.2. Synthesis of Fmoc-Lys-OH .....	156
3.3.4.3. Synthesis of Fmoc-Lys(pNZ)-OH .....	156
3.3.4.4. Synthesis of linear peptidyl resins <b>3</b> and <b>8</b> .....	157
3.3.4.5. Synthesis of cyclic peptidyl resins <b>1</b> and <b>2</b> .....	158
3.3.4.6. Synthesis of c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(CO-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) ( <b>4</b> ) .....	159
3.3.4.7. Synthesis of c(Lys(Boc)-Lys(CO-C≡CH)-Leu-Lys(Boc)-Lys(CO-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) ( <b>5</b> ) .....	160
3.3.4.8. Synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles .....	160

3.3.5. Acknowledgments .....	163
3.3.6. References.....	163
3.4. Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide <b>BPC194</b> .....	167
3.4.1. Introduction .....	169
3.4.2. Results and discussion .....	171
3.4.2.1. Design of the peptide conjugates .....	171
3.4.2.2. Synthesis of the cyclic alkynyl peptidyl resins <b>1-3</b> .....	173
3.4.2.3. Synthesis of azidopeptides <b>4-13</b> , <b>BPC794</b> and <b>BPC796</b> .....	176
3.4.2.4. Synthesis of peptide conjugates .....	178
3.4.2.5. Biological activity .....	181
3.4.3. Conclusions .....	182
3.4.4. Experimental section .....	183
3.4.4.1. General .....	183
3.4.4.2. Synthesis of Fmoc-Lys-OH .....	184
3.4.4.3. Synthesis of Fmoc-Lys(pNZ)-OH .....	184
3.4.4.4. Synthesis of Fmoc-Glu(NH-CH <sub>2</sub> -C≡CH)-O <sup>t</sup> Bu .....	185
3.4.4.5. Synthesis of Fmoc-Glu(NH-CH <sub>2</sub> -C≡CH)-OH .....	186
3.4.4.6. Synthesis of Fmoc-Nle(ε-N <sub>3</sub> )-OH .....	186
3.4.4.7. General method for the synthesis of linear peptidyl resins <b>14</b> , <b>15</b> and <b>17</b> .....	187
3.4.4.8. General method for the synthesis of cyclic peptidyl resins <b>1</b> , <b>2</b> and <b>16</b> .....	188
3.4.4.9. Synthesis of c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Ahx)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)- Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) ( <b>18</b> ) .....	189
3.4.4.10. Synthesis of c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Ahx-CO-C≡CH)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe- Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) ( <b>3</b> ) .....	190
3.4.4.11. General method for the solid-phase synthesis of linear <b>BP100</b> -derived azidopeptides <b>4-12</b> .....	190
3.4.4.12. Synthesis of N <sub>3</sub> -D-Dap(Fmoc)-Asn-D-Tyr-D-Asn-OAll ( <b>13</b> ) .....	192
3.4.4.13. Synthesis of azidopeptidyl resin <b>20</b> .....	192
3.4.4.14. Synthesis of linear azidopeptide <b>BPC794</b> .....	192
3.4.4.15. Synthesis of cyclic azidopeptide <b>BPC796</b> .....	193

3.4.4.16. Synthesis of peptide conjugates. General method for the 1,3-dipolar cycloaddition reaction .....	193
3.4.4.17. Bacterial and fungal strains and growth conditions .....	198
3.4.4.18. Antibacterial and antifungal activity .....	198
3.4.4.19. Hemolytic activity .....	199
3.4.5. Acknowledgments .....	200
3.4.6. References.....	200
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>203</b>
4.1. Ciclolipopèptids derivats de <b>BPC194</b> .....	205
4.1.1. Estudi d'una estratègia de síntesi en fase sòlida de ciclolipopèptids derivats de <b>BPC194</b> .....	206
4.1.2. Estudi de la influència de la introducció de modificacions en l'estructura de ciclolipopèptids derivats de <b>BPC194</b> .....	210
4.1.2.1. Influència de la llargada de la cadena hidrofòbica .....	211
4.1.2.2. Influència de la posició de la cadena hidrofòbica.....	213
4.1.2.3. Influència de la introducció d'un o dos D-aminoàcids.....	214
4.1.2.4. Incorporació d'un residu d'His .....	217
4.1.2.5. Estudi de la fitotoxicitat dels ciclolipopèptids sintetitzats .....	218
4.1.2.6. Ciclolipopèptids amb millor perfil biològic .....	219
4.2. Ciclolipeptidotriazoles derivats de <b>BPC194</b> .....	220
4.3. Pèptids conjugats derivats de BPC194 contenint un anell d'1,2,3-triazole .....	223
4.4. Bibliografia.....	231
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>233</b>
5.1. Materials i mètodes .....	235
5.1.1. Test de Ninhidrina o Test Kaiser .....	235
5.1.2. Test de Cloronil .....	236
5.1.3. Cromatografia .....	237
5.1.3.1. Cromatografia de capa fina (TLC).....	237



5.1.3.2. Cromatografia en columna .....	237
5.1.3.3. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).....	237
5.1.4. Espectrometria de masses.....	238
5.1.4.1. Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (ESI/MS) .....	238
5.1.4.2. Desorció/Ionització làser assistida per matriu amb separació segons el temps de vol (MALDI-TOF).....	238
5.1.4.3. Espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS).....	238
5.1.5. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN).....	239
5.1.6. Escalfament per irradiació micrones .....	239
5.1.7. Espectroscòpia d'infraroig (IR).....	239
5.2. Bibliografia.....	240

## **6. CONCLUSIONS..... 241**

**ANNEX: ESPECTRES I CROMATOGRAMES DELS PÈPTIDS SINTETITZATS (INCLÓS EN EL CD ADJUNT)**



Resums  
Generals



## Resum general

Les malalties causades per bacteris i fongs són responsables d'importants pèrdues en cultius, sent un dels principals factors que limiten la producció de cultius vegetals a tot el món. La protecció de les plantes enfront els bacteris es basa principalment en compostos derivats de coure i antibiòtics. No obstant, l'aparició de soques bacterianes resistents i les preocupacions mediambientals ha promogut l'interès en el desenvolupament de nous compostos terapèutics. Es considera que els pèptids antimicrobians naturals i sintètics són uns candidats prometedors gràcies al seu mecanisme d'acció diferent, que implica principalment la interacció amb la membrana bacteriana. Els pèptids antimicrobians tenen un paper molt important en el sistema immunològic innat de defensa d'una gran diversitat d'espècies com per exemple bacteris, plantes i mamífers. La majoria d'ells són catiónics i tenen la capacitat d'adoptar una conformació amfipàtica. A més, presenten un ampli espectre d'activitat, un elevat nivell de selectivitat enfront bacteris i una baixa citotoxicitat enfront les cèl·lules eucariotes. Malgrat això, els pèptids naturals presenten una elevada flexibilitat conformacional, associada a una baixa selectivitat, llargues seqüències, poca biodisponibilitat i una baixa estabilitat a la degradació per proteases. Malgrat aquests inconvenients, s'han desenvolupat pèptids cíclics amb una activitat biològica important. S'ha descrit que els pèptids cíclics presenten una millor estabilitat metabòlica, major selectivitat i biodisponibilitat que els seus anàlegs lineals.

Aquesta tesi doctoral es basa en el desenvolupament d'anàlegs del pèptid antimicrobià **BPC194** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) amb activitat antimicrobiana enfront fitopatògens i amb una baixa hemòlisi. En particular, aquesta tesi es centra en ciclolipopèptids i pèptids conjugats derivats de **BPC194**.

Anteriorment, s'ha observat que els lipopèptids presenten una activitat antibacteriana i antifúngica important. S'ha descrit que l'activitat biològica es determina per la seqüència peptídica i que pot ser modulada variant la cadena hidrofòbica. S'ha desenvolupat una estratègia adequada per la síntesi de ciclolipopèptids derivats de **BPC194**. Aquesta estratègia consisteix en la preparació de la peptidil resina cíclica protegida, la desprotecció selectiva d'un residu de Lys i la subseqüent acilació. Utilitzant aquest procediment general s'han preparat una col·lecció de ciclolipopèptids per estudiar la llargada de la cadena hidrofòbica i la seva posició en l'activitat biològica. Les seqüències contenint una cadena hidrofòbica de 4 a 6 carbonis a la Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> o Lys<sup>5</sup> han mostrat la major activitat antimicrobiana. No obstant, aquests compostos han presentat una elevada hemòlisi. **BPC500** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-

C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) i **BPC710** (c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) han mostrat el millor perfil biològic.

Per aconseguir reduir l'hemòlisi, s'han preparat ciclolipopèptids incorporant un o dos D-aminoàcids, o un residu de His en lloc de Phe. Els ciclolipopèptids contenint una D-Lys acilada han resultat ser més actius que els que contenien D-Phe, mentre que la introducció d'un residu de His ha proporcionat derivats amb una activitat antimicrobiana inferior. Concretament, les seqüències que incorporen un D-aminoàcid o un residu de His han mostrat una baixa hemòlisi. Els pèptids amb un millor perfil biològic i alhora poc fitotòxics han resultat ser **BPC672** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC674** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC702** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC706** (c(D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) i **BPC712** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)).

Altrament, també s'ha estudiat la síntesi de ciclolipeptidotriazoles derivats de **BPC194**. S'ha descrit que l'anell d'1,2,3-triazole és resistent a la degradació metabòlica, i es considera que és un potent farmacòfor. S'han explorat quatre estratègies per a la síntesi en fase sòlida d'aquests compostos incorporant un anell d'1,2,3-triazole a la Lys<sup>2</sup> i una cadena hexanoïl a la Lys<sup>5</sup> del pèptid **BPC194**. La millor estratègia ha consistit en: (i) la síntesi de la peptidil resina contenint Lys<sup>2</sup>(ivDde) i Lys<sup>5</sup>(pNZ); (ii) l'eliminació del grup pNZ; (iii) l'acilació amb l'àcid hexanoic; (iv) l'eliminació del grup ivDde; (v) l'acilació amb l'àcid propiòlic seguida de la reacció de cicloaddició 1,3-dipolar entre una azida i un alquí. Aquest protocol s'ha estès per la preparació d'una col·lecció de lipopeptidotriazoles cíclics que s'han obtingut amb elevades pureses.

Finalment, s'han desenvolupat una estratègia sintètica eficient per la síntesi de pèptids conjugats. S'ha descrit que la conjugació de dues seqüències peptídiques diferents o iguals pot reforçar l'activitat biològica individual d'aquestes, gràcies a la unió intermolecular de les dues seqüències peptídiques. Aquests pèptids conjugats s'han sintetitzat mitjançant la unió a través d'un anell d'1,2,3-triazole de **BPC194** amb un azidopèptid lineal o cíclic derivat del pèptid antimicrobià H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (**BP100**) o de la part cíclica de la iturina A (c(Gln-Pro-D-Asn-Ser-Itu-Asn-D-Tyr-D-Asn)) (Itu = àcid iturínic). Encara que, la conjugació de **BPC194** a les diferents seqüències peptídiques no ha conduït a una millora en l'activitat biològica de **BPC194**, s'han identificat pèptids conjugats amb activitat antimicrobiana

enfront patògens de plantes. Els pèptids amb un millor perfil d'activitat han resultat ser **BPC806 i BPC808**.

En resum, en aquesta tesi, s'han desenvolupat estratègies adequades per la síntesi en fase sòlida de ciclilipopèptids, ciclilipeptidotriazoles i pèptids conjugats derivats de **BPC194**. A més, s'han identificat ciclilipopèptids i pèptids conjugats amb activitat antimicrobiana enfront patògens de plantes.

## General abstract

Plant diseases caused by bacteria and fungi are responsible for significant losses in agriculture, being one of the major factors limiting worldwide crop production. Plant protection to bacteria is mainly based on copper derivatives and antibiotics. However, the emergence of antibiotic-resistant strains and environmental concerns has prompted interest in novel therapeutics compounds. Natural and synthetic antimicrobial peptides are considered as promising candidates due to their distinct mechanism of action, which primarily involves the interaction with the bacterial membrane. Antimicrobial peptides play an important role in the host defence system of majority of species such as bacteria, plants and mammals. Most of them are cationic and have the ability to adopt an amphipathic conformation. They show a broad spectrum of activity, a remarkable level of antibacterial selectivity and low eukaryotic cytotoxicity. Nevertheless, natural antimicrobial peptides present a high conformational flexibility, which is often associated to low target selectivity, long sequences, poor bioavailability and low stability towards protease degradation. In spite of these drawbacks, cyclic peptides with significant biological activities have been developed. It has been reported that cyclic peptides exhibit better metabolic stability, selectivity and bioavailability than linear peptides.

This thesis was centered on the development of analogues of the lead antimicrobial peptide **BPC194** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) with antimicrobial activity against phytopathogens and with low hemolysis. In particular, this thesis was focused on cyclolipopeptides and peptide conjugates derived from **BPC194**.

Lipopeptides have been shown to exhibit significant antibacterial and antifungal activity. It has been described that the spectrum of biological activity is determined by the peptide motif and that it can be modulated by varying the acyl chain. A suitable strategy for the synthesis of cyclolipopeptides derived from **BPC194** was developed. This strategy consisted on the preparation of a conveniently protected cyclic peptidyl resin, the selective deprotection of a Lys residue and its subsequent acylation. With this general procedure we prepared a library of cyclolipopeptides to study the fatty acid length and the position of the hydrophobic chain in the biological activity. Sequences bearing a hydrophobic chain between 4 and 6 carbons at Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> or Lys<sup>5</sup> showed the highest antimicrobial activity. However, in general, these compounds were highly hemolytic. **BPC500** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-

Gln)) and **BPC710** (c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) display the best biological activity profile.

To reduce the hemolysis, cyclolipopeptides incorporating one or two D-amino acids, or a His residue instead of the Phe were prepared. While cyclolipopeptides bearing an acylated D-Lys were more active than those containing a D-Phe, the introduction of a His residue rendered derivatives with reduced antimicrobial activity. Interestingly, sequences incorporating a D-amino acid or a His displayed low hemolysis. Peptide **BPC672** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC674** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC702** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC706** (c(D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), and **BPC712** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) showed an optimal biological profile and were not phytotoxic.

Additionally, the synthesis of cyclolipopeptidotriazoles derived from **BPC194** was also studied. 1,2,3-Triazoles have been reported to be resistant to metabolic degradation and they are considered as an important pharmacophore. Four strategies for the solid-phase synthesis of these compounds were explored by incorporating the 1,2,3-triazole ring at Lys<sup>2</sup> and an hexanoyl group at Lys<sup>5</sup> of **BPC194**. The best strategy included: (i) synthesis of a cyclic peptidyl resin bearing Lys<sup>2</sup>(ivDde) and Lys<sup>5</sup>(pNZ); (ii) pNZ group removal; (iii) acylation with hexanoic acid; (iv) ivDde group removal; and (v) acylation with propionic acid followed by an azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. This protocol was extended to the preparation of a set of cyclic lipopeptidotriazoles that were obtained in excellent purities.

Finally, it was developed an efficient synthetic approach for the synthesis of peptide conjugates. It has been described that the conjugation of two identical or different peptide sequences can reinforce the activity of the two individual chains due to the intermolecular bonding of the two peptide sequences. These peptide conjugates were designed by ligation through a 1,2,3-triazole of **BPC194** with a linear or cyclic azidopeptidyl sequence derived from the antimicrobial peptide H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (**BP100**) or the cyclooctapeptide moiety of iturin A (c(Gln-Pro-D-Asn-Ser-Itu-Asn-D-Tyr-D-Asn)) (Itu = Iturinic acid). Although conjugation of **BPC194** to the different peptide sequences did not led to an improvement of the biological activity of **BPC194**, peptide conjugates with antimicrobial activity against plant pathogens were identified. **BPC806** and **BPC808** were found to be the peptide conjugates with the best activity profile.



In summary, in this thesis, suitable strategies for the solid-phase synthesis of cyclolipopeptides, cyclolipopeptidotriazoles and peptide conjugates derived from **BPC194** were developed. Cyclolipopeptides and peptide conjugates with antimicrobial activity against plant pathogens were identified.

## Resumen general

Las enfermedades causadas por bacterias y hongos son responsables de importantes pérdidas en cultivos, siendo uno de los principales factores que limitan la producción de cultivos en todo el mundo. La protección de las plantas contra las bacterias se basa principalmente en compuestos derivados de cobre y antibióticos. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos y las preocupaciones medioambientales han promovido el interés en el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos. Se considera que los péptidos naturales y sintéticos son unos candidatos prometedores debido a su distinto modo de acción, que implica principalmente la interacción con la membrana bacteriana. Los péptidos antimicrobianos tienen un papel importante en el sistema inmunológico innato de defensa de una gran diversidad de especies como por ejemplo bacterias, plantas y mamíferos. La mayoría de ellos son catiónicos y tienen la capacidad de adoptar una conformación anfipática. Además presentan un amplio espectro de actividades, un elevado nivel de selectividad contra bacterias y una baja citotoxicidad contra células eucariotas. A pesar de estas desventajas, se han desarrollado péptidos cíclicos que presentan una mejor estabilidad metabólica, mejor selectividad y biodisponibilidad que sus análogos lineales.

Esta tesis doctoral se basa en el desarrollo de análogos del péptido antimicrobiano **BPC194** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) con actividad antimicrobiana contra fitopatógenos y con una baja hemólisis. En particular, esta tesis se centra en ciclolipopéptidos y péptidos conjugados derivados de **BPC194**.

Anteriormente, se ha observado que los lipopéptidos presentan una actividad antibacteriana y antifúngica importante. Se ha descrito que la actividad biológica se determina por la secuencia peptídica y que puede ser modulada variando la cadena hidrofóbica. Se ha desarrollado una estrategia adecuada para la síntesis de ciclolipopéptidos derivados de **BPC194**. Esta estrategia consiste en la preparación de la peptidil resina cíclica protegida, la desprotección selectiva de un residuo de Lys y la subsiguiente acialción. Utilizando esta estrategia general hemos preparado una colección de ciclolipopéptidos para estudiar la largada de la cadena hidrofóbica y su posición en la actividad biológica. Las secuencias conteniendo una cadena hidrofóbica de 4 a 6 carbonos en la Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> o Lys<sup>5</sup> han mostrado la mejor actividad antimicrobiana. Sin embargo, estos compuestos se han preparado una elevada hemólisis. **BPC500** (c(Lys-Lys-Leu-

Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) y **BPC710** (c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) han mostrado el mejor perfil biológico.

Para conseguir reducir la hemólisis, se han preparado ciclolipopéptidos incorporando uno o dos D-aminoácidos, o un residuo de His en vez de Phe. Los ciclolipopéptidos conteniendo una D-Lys acilada han resultado ser más activos que los que contenían una D-Phe, mientras que, la introducción de un residuo de His ha proporcionado derivados con una actividad antimicrobiana inferior. Concretamente, las secuencias que incorporan un D-aminoácido o un residuo de His han mostrado una baja hemólisis. Los péptidos con mejor perfil biológico y a la vez poco fitotóxicos han resultado ser **BPC672** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC674** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(LK-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC702** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)), **BPC706** (c(D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)) y **BPC712** (c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)).

También se ha estudiado la síntesis de ciclolipopéptidotriazoles derivados de **BPC194**. Se ha descrito que el anillo de 1,2,3-triazol es resistente a la degradación metabólica, y se considera un potente farmacóforo. Se han explorado cuatro estrategias para su síntesis en fase sólida incorporando un anillo de 1,2,3-triazol a la Lys<sup>2</sup> y una cadena de hexanoílo a la Lys<sup>5</sup> del péptido **BPC194**. La mejor estrategia ha consistido en: (i) la síntesis de la peptidil resina conteniendo Lys<sup>2</sup>(ivDde) y Lys<sup>5</sup>(pNZ); (ii) la eliminación del grupo pNZ; (iii) la acilación con ácido hexanoico; (iv) la eliminación del grupo ivDde; (v) la acilación con ácido propiólico seguida de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un alquín. Este protocolo se ha extendido para la síntesis de una colección de ciclolipopéptidotroazoles con elevadas purzas.

Finalmente, se ha desarrollado una estrategia sintética eficiente para la síntesis de péptidos conjugados. Se ha descrito que la conjugación de dos secuencias peptídicas diferentes o iguales puede reforzar la actividad biológica individual de éstas, debido a la unión intermolecular de las dos secuencias peptídicas. Estos péptidos conjugados se han sintetizado mediante la unión a través de un anillo de 1,2,3-triazol de **BPC194** con un azidopéptido lineal o cíclico derivado del péptido antimicrobiano H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (**BP100**) o de la parte cíclica de la iturina A (c(Gln-Pro-D-Asn-Ser-Itu-Asn-D-Tyr-D-Asn)) (Itu = ácido iturinico). Aunque la conjugación de **BPC194** a las diferentes secuencias peptídicas no ha conducido a una mejora en la actividad biológica de **BPC194**, se han identificado péptidos

conjugados con actividad antimicrobiana frente a patógenos de plantas. Los péptidos con un mejor perfil de actividades han sido **BPC806** y **BPC808**.

En resumen, en esta tesis, se han desarrollado estrategias para la síntesis en fase sólida de ciclolipopéptidos, ciclilipopeptidotriazoles y péptidos conjugados derivados de **BPC194**. Además, se han identificado ciclolipopéptidos y péptidos conjugados con actividad antimicrobiana frente a patógenos de plantas.





## Introducció



Aquesta tesi doctoral s'emmarca dins d'una de les línies de recerca del grup Laboratori d'Innovació en Processos i Productes de Síntesi Orgànica (LIPPSO) que realitza en col·laboració amb el grup de Patologia Vegetal de la Universitat de Girona (UdG) i que té per objectiu el desenvolupament d'agents efectius pel control de patògens responsables de malalties en plantes d'importància econòmica.

### **1.1. Control de malalties de plantes**

Els bacteris i fongs fitopatògens són responsables de malalties que causen importants pèrdues econòmiques en cultius de fruites i verdures. Per combatre'ls s'utilitzen plaguicides químics com ara derivats de coure o de sofre, antibiòtics com la kasugamicina o l'estreptomicina, o fungicides com l'imazalil. Tot i que aquests compostos són eficients, molts d'ells estan considerats contaminants mediambientals a causa de la seva persistència en el medi ambient i, per tant, el seu ús està sotmès a fortes restriccions i requeriments legals. A més, l'ús d'antibiòtics en agricultura està prohibit en molts continents i en nombrosos casos han aparegut soques de bacteris resistents que en disminueixen la seva eficàcia.<sup>1</sup>

Actualment, el grup LIPPSO i el grup de Patologia Vegetal de la UdG, estan investigant la cerca de mètodes efectius per al control dels bacteris fitopatògens *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, així com dels fongs *Penicillium expansum* i *Fusarium oxysporum*.

*Erwinia amylovora* és un bacteri gram negatiu que causa el foc bacterià. Aquesta malaltia afecta a les plantes de la família de les rosàcies, com el pomer, el perer, el nesprer o el codonyer, així com a plantes ornamentals i silvestres, com el server o l'arç. *E. amylovora* penetra a la planta a través de les flors o de ferides i pot afectar pràcticament a tots els òrgans de la planta. Les flors i fulles s'ennegreixen, adquirint un aspecte de cremat, es marceixen i es mantenen a l'arbre sense caure (Imatge 1.1). El foc bacterià es pot propagar a llarga distància mitjançant corrents d'aire i ocells migratoris, a distàncies curtes a través d'insectes, eines, maquinària de podar i treballar, o també per la pluja i el vent. Aquesta ràpida propagació i la manca d'un tractament efectiu pel seu control fan que aquesta malaltia pugui causar danys econòmics elevats.<sup>1,2</sup>



## 1. Introducció

---



*Imatge 1.1: Pera i fulles afectades pel bacteri E. amylovora  
(Fotos: www.aspnet.org, M. Bulatovic-Danilovich i A. L. Jones)*

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* és un bacteri gram negatiu responsable de les anomenades necrosis bacterianes, malalties que afecten a moltes plantes de cultiu i fruiters (Imatge 1.2). Aquest microorganisme provoca la nucleació del gel i, en conseqüència, és responsable dels danys per gelada en plantes. Aquesta congelació causa taques sobre l'escorça, seguit de l'assecament de les fulles, del tronc o de les flors i, al final, degut a la manca de nutrients, evita el creixement del vegetal. Aquest bacteri es pot dispersar mitjançant la pluja i el vent.<sup>1</sup>



*Imatge 1.2: Tomàquets i fulla afectats pel bacteri P. syringae pv. syringae  
(Fotos: T.A. Zitter, Cornell University, Ithaca; M. Putnam Oregon State University)*

*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* és un bacteri gram negatiu que causa la taca bacteriana o taca negra, malaltia que afecta a plantes de la família de les solanàcies com el tomàquet i el pebrot (Imatge 1.3). Aquest bacteri infecta a les plantes a través de les llavors. Els símptomes que pateixen les plantes són l'aparició d'unes taques fosques i rugoses a les vores de les fulles. En els fruits apareixen petites taques de color blanc-marronós que sobresurten i que s'estenen fins a un diàmetre de 3-6 mm. A continuació, les taques canvien de color marronós a negre i la superfície del fruit es torna aspra i crostosa.<sup>1,3</sup>



*Imatge 1.3: Tomàquets i pebrots afectats pel bacteri X. axonopodis pv. vesicatoria*  
(Fotos: [www.aspnet.org](http://www.aspnet.org), D.F. Ritchie)

*Penicillium expansum* és el fong causant de la floridura blava, un dels processos de putrefacció més importants de post collita de fruites i hortalisses emmagatzemats (Imatge 1.4). Aquest patògen causa importants pèrdues econòmiques, perquè els fruits afectats no són aptes pel consum. La infecció provoca que les zones afectades tinguin una consistència tova i aquosa, a més d'una olor desagradable. *Penicillium* penetra en els teixits a través d'obertures en la escorça o la clova del fruit i es propaga per contacte.<sup>1</sup>



*Imatge 1.4: Pomes afectades pel fong P. expansum*  
(Fotos: Departament de Protecció Vegetal, Facultat de Agronomia-Universitat de la República-Uruguai; N. Cattlin, Visuals Unlimited, Inc.)

*Fusarium oxysporum* és una de les espècies més comunes del gènere *Fusarium*. És el fong causant del pansiment i putrefacció d'una àmplia varietat de plantes agrícoles. Els símptomes més habituals són la podridura de l'arrel i la tija, l'aparició d'un color groguenc i, finalment, la caiguda de la fulla (Imatge 1.5). *Fusarium* infecta a la planta a través de l'arrel o de ferides. Aquest fong és també un patògen humà important que causa una àmplia varietat d'infeccions a nivell superficial o local.<sup>1</sup>

## 1. Introducció

---



*Imatge 1.5: Tija i planta afectades pel fong F. oxysporum*  
(Fotos: Clemson University-USDA Cooperative Extension Slide Series, Bugwood.org; W. Martin, APS)

### 1.2. Pèptids antimicrobians

Els pèptids antimicrobians són considerats una bona alternativa als antibiòtics existents, tant en agricultura com en medicina, ja que són poc susceptibles a provocar l'aparició de soques bacterianes resistents i, a més, no són contaminants mediambientals. Aquest tipus de pèptids són un component clau del mecanisme de defensa de diferents organismes, incloent mamífers, amfibis, insectes i plantes, i presenten un gran nombre d'activitats biològiques com ara antifúngica, antitumoral, antimicrobiana o antivírica.<sup>4</sup>

Els pèptids antimicrobians són, generalment, seqüències de 6 a 59 aminoàcids. Tot i que presenten una gran diversitat d'estructures, mostren unes característiques comunes, com són la cationicitat i la capacitat d'adoptar una estructura amfipàtica formada per dos dominis, un hidrofòbic i l'altre hidrofílic. De fet, aquest tipus de pèptids contenen aminoàcids catiónics (Lys i Arg) i un 50% d'aminoàcids hidrofòbics (Ala, Leu, Phe o Trp).<sup>5</sup> La càrrega neta positiva que presenten oscil·la entre +2 i +9, i facilita la seva interacció amb les membranes microbianes. A més, la capacitat d'adoptar una estructura amfipàtica els permet inserir-se dins la membrana microbiana, ja que facilita la seva interacció amb les regions polars i apolars de la membrana. Pel que fa a l'estructura secundària, s'han descrit pèptids antimicrobians amb una estructura de tipus  $\alpha$ -hèlix o de tipus làmina  $\beta$ .

Actualment, el mecanisme d'acció d'aquests pèptids no és del tot conegut. Tot i això, s'han proposat diferents models. Tots ells suggereixen que en primer lloc es produeix la interacció electrostàtica dels pèptids amb la membrana citoplasmàtica, gràcies a la diferent càrrega entre les seqüències peptídiques i la superfície de la membrana.<sup>6</sup> A més, tots aquests models proposen que és necessari que hi hagi una concentració mínima de pèptid a la superfície de

la membrana per a què es produeixi la permeabilització d'aquesta, la qual provoca la mort de la cèl·lula.

Més concretament, en el model *barrel-stave*, els pèptids interaccionen electrostàticament amb la superfície de la membrana microbiana i s'hi insereixen perpendicularment, de manera que la part hidrofòbica de les seqüències peptídiques queden en contacte amb les cadenes lipídiques i la part hidrofílica forma la regió interior d'un porus (Figura 1.1A). Aquest porus pot contenir de 3 a 11 seqüències helicoidals en paral·lel. Tot i això, la composició dels lípids de la bicapa pot fer variar la concentració de pèptid i pot modular els equilibris d'agregació d'aquests.

El model *toroidal pore* prediu la formació de porus estructurats, però de vida curta (Figura 1.1B). Els pèptids es col·loquen paral·lelament a la superfície de la membrana, de manera que les regions polars de les seqüències interaccionen amb els grups aniònics dels lípids, mentre que les parts més hidrofòbiques s'insereixen dins la membrana. Això provoca una desestabilització de la bicapa lipídica i un desordre local. A partir d'una certa concentració, els pèptids es reorienten col·locant-se perpendicularment a la membrana. En conseqüència, la membrana adopta una curvatura local formant un porus cilíndric i hidrofílic, l'interior del qual està format parcialment pels caps dels fosfolípids de la membrana i pels pèptids. Aquests porus s'obren i es tanquen contínuament. El model *toroidal pore* difereix del *barrel-stave* en el fet que els pèptids estan sempre associats als caps polars dels lípids, fins i tot quan s'insereixen perpendicularment a la bicapa lipídica.

El model *disordered toroidal pore* és una modificació del model *toroidal pore* i proposa que inicialment els pèptids no es col·loquen paral·lelament a la superfície de la membrana, sinó que adopten una conformació i una orientació menys rígides (Figura 1.1C). A més, els porus que es formen estan vorejats per fosfolípids i no són cilíndrics.

El model *carpet* proposa la desintegració de la membrana mitjançant un mecanisme de tipus detergent (Figura 1.1D). Els pèptids catiónics són atrets electrostàticament pels fosfolípids aniònics de la membrana i s'orienten paral·lelament a la superfície de la bicapa lipídica, com una catifa, canviant la seva fluïdesa i les seves propietats. Un cop s'ha assolit una certa concentració de pèptid, la membrana es desintegra i es formen micelles.

## 1. Introducció

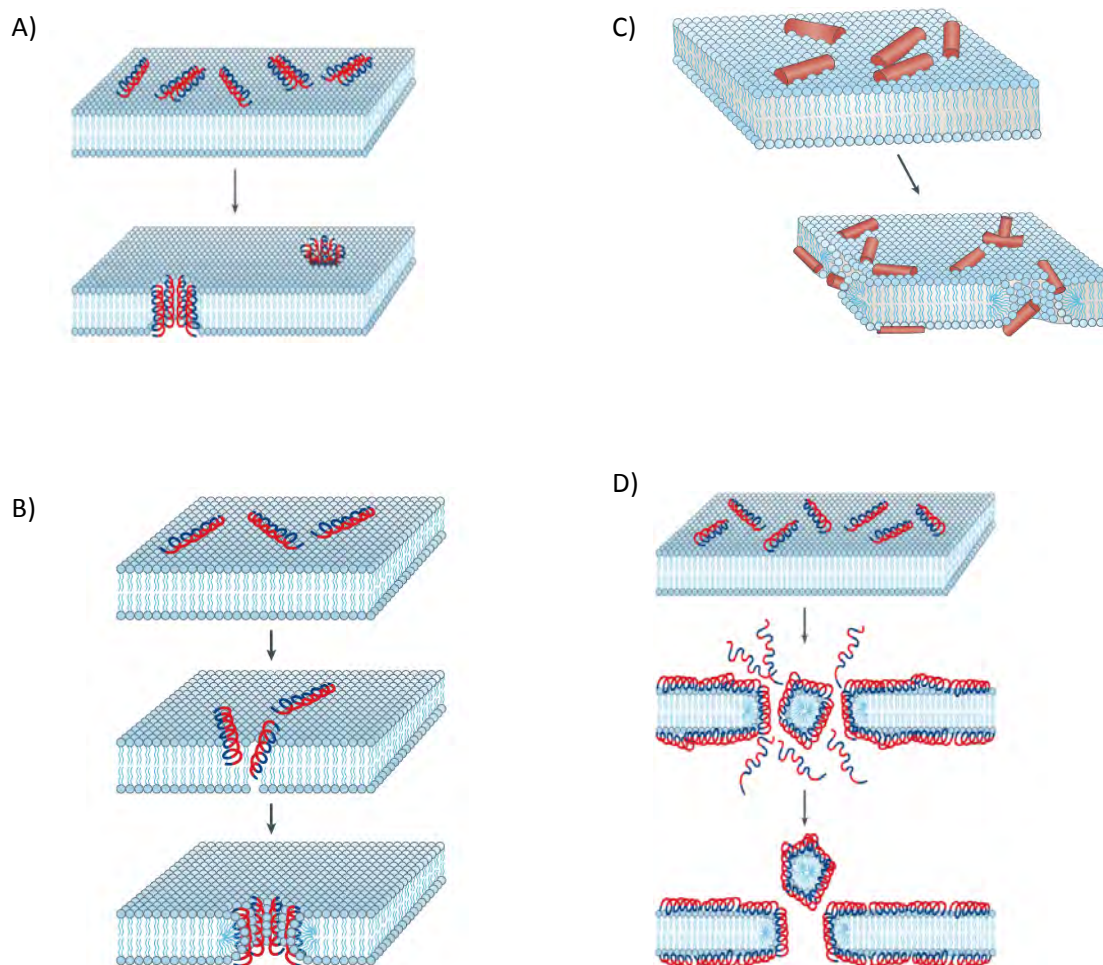


Figura 1.1: Representació dels diferents models del mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians: A) model barrel-stave; B) model toroidal pore; C) model disordered toroidal pore; i D) model carpet

Tal i com s'ha dit anteriorment, els pèptids antimicrobians són considerats bons candidats com a agents per combatre malalties causades per microorganismes perquè és difícil que causin l'aparició de soques bacterianes resistents. Això s'explica en base al seu mecanisme d'acció, ja que l'aparició de resistència implicaria un canvi en la composició dels fosfolípids de la membrana bacteriana, la qual cosa és difícil que tingui lloc.<sup>5d,7</sup> Una altra propietat que contribueix a l'aplicació dels pèptids antimicrobians com a potencial antibiòtics és la seva selectivitat pels bacteris enfront les cèl·lules eucariotes (Figura 1.2). Això és degut a la diferent composició de les membranes bacterianes i eucariotes. Mentre que les cèl·lules bacterianes presenten a la membrana fosfolípids aniònics com fosfatidilglicerol i cardiolipina,

la membrana de les cèl·lules eucariotes conté fosfolípids neutres juntament amb altres components hidrofòbics com, per exemple, colesterol.<sup>8</sup>

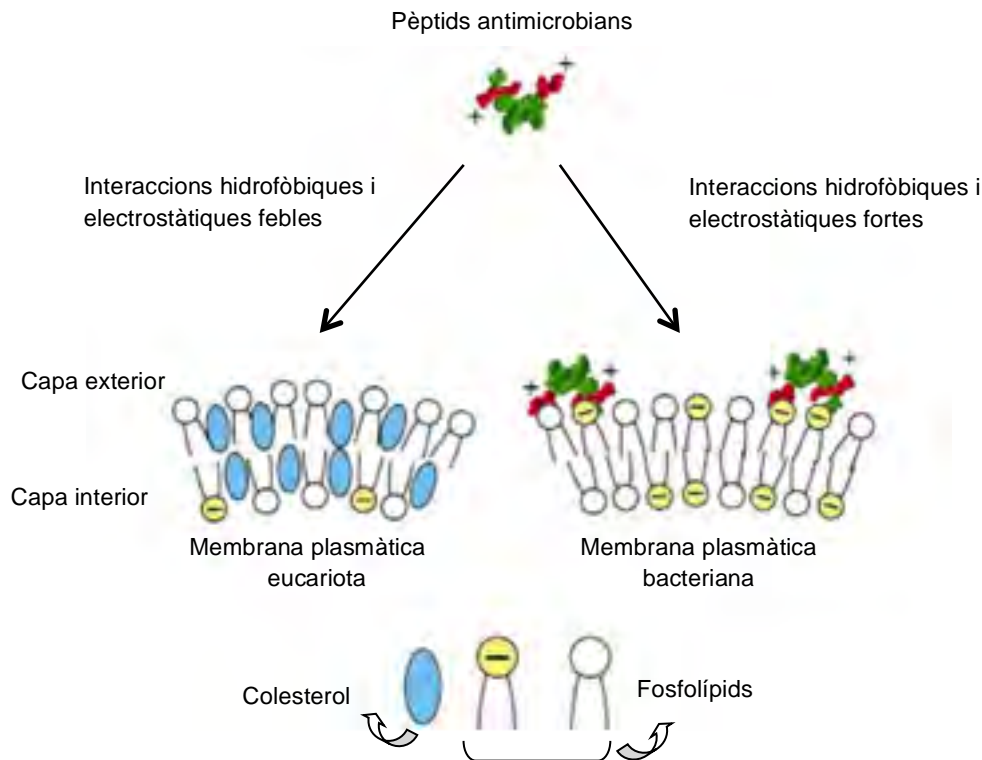


Figura 1.2: Interacció dels pèptids antimicrobians amb diferents membranes

### 1.3. Pèptids cíclics antimicrobians

Els pèptids lineals existeixen en solució com un equilibri ràpid de conformacions, la qual cosa porta a una falta de selectivitat davant els receptors i a una elevada susceptibilitat metabòlica.<sup>9</sup> La ciclació de seqüències lineals dóna lloc a anàlegs restringits conformacionalment que, generalment, presenten una major estabilitat a la degradació enzimàtica a causa de la limitada accessibilitat de les proteases, una major activitat i una elevada selectivitat per les membranes bacterianes enfront les cèl·lules eucariotes. De fet, la ciclació d'un pèptid lineal dóna lloc a una seqüència cíclica amb una amfipaticitat adequada que millora les interaccions electrostàtiques entre el pèptid i les membranes bacterianes carregades negativament. En conseqüència, les interaccions entre aquest tipus de pèptids i els lípids neutres de la membrana de les cèl·lules eucariotes es redueixen.<sup>10</sup>

## 1. Introducció

Segons com es formi el cicle els pèptids cíclics es classifiquen en (Figura 1.3):

- ❖ Cap-cua: aquest tipus de pèptid cíclic es forma per unió dels extrems C- i N-terminals de la cadena peptídica.
- ❖ Cadena lateral-cap o cadena lateral-cua: el pèptid cíclic es forma a través de la unió entre la cadena lateral d'un residu i un aminoàcid d'un extrem de la cadena.
- ❖ Cadena lateral-cadena lateral: el pèptid cíclic es forma per unió entre les cadenes laterals de dos aminoàcids no consecutius.
- ❖ Pèptids cíclics ramificats: el pèptid cíclic es forma per unió de grups amida de l'esquelet peptídic.

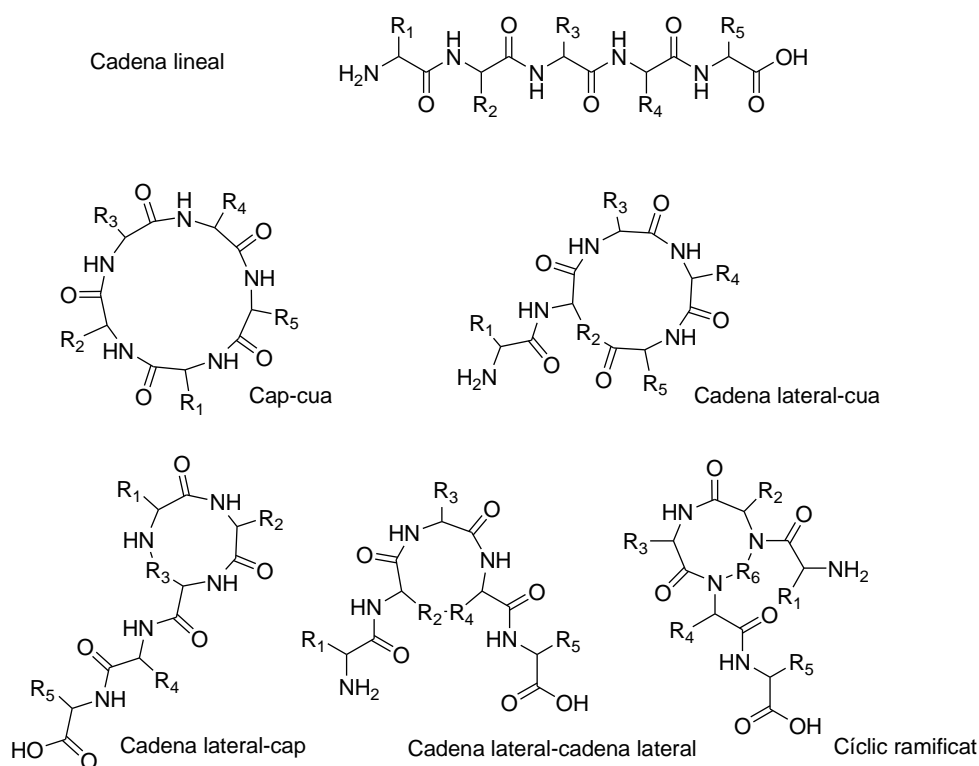


Figura 1.3: Representació dels diferents tipus de pèptids cíclics que es poden formar a partir de la seqüència lineal indicada

Els pèptids cíclics cap-cua són els més abundants i se n'han descrit nombrosos exemples que presenten una important activitat antimicrobiana, com per exemple l'antibiòtic gramicidina S o la ciclosporina (Figura 1.4).<sup>11</sup>

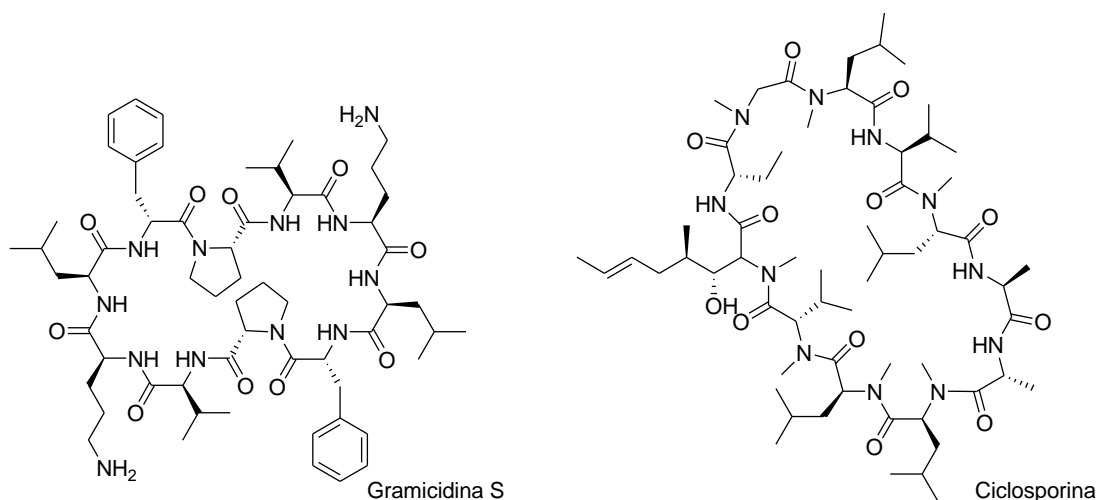


Figura 1.4: Estructura de la gramicidina S i la ciclosporina

El grup LIPSSO ha dissenyat i sintetitzat una família de pèptids cíclics cap-cua catiònics d'entre 4 i 10 residus.<sup>12</sup> Per al seu disseny, s'han alternat aminoàcids catiònics (Lys) i hidrofòbics (Phe i Leu), de manera que la seva fórmula general és  $c(X_n-Y-X_m-Gln)$ , on X és Lys o Leu, Y és L-Phe o D-Phe i  $m = n = 1$ , o  $m = 3$  i  $n = 0-5$ . El residu de glutamina resulta d'un àcid glutàmic que s'introdueix per facilitar l'etapa de ciclació en fase sòlida. S'ha evaluat l'activitat antimicrobiana d'aquests pèptids enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, i la seva toxicitat s'ha determinat mitjançant la mesura de l'activitat hemolítica. També s'ha avaluat la seva estabilitat enfront a la degradació per proteases. S'ha estudiat la influència de la ciclació, la mida de l'anell i la substitució de l'aminoàcid L-Phe per D-Phe. Els resultats han mostrat que els pèptids lineals són inactius contra els tres bacteris. Dels pèptids cíclics sintetitzats, la seqüència més activa ha estat el ciclodecapèptid  $c(KLKLKFKLKQ)$  (**BPC10L**). Aquest pèptid ha mostrat una concentració mínima inhibidora (CMI) compresa entre 12.5 i 25  $\mu\text{M}$  davant *P. syringae* pv. *syringae*, i entre 6.2 i 12.5  $\mu\text{M}$  davant *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Malauradament, aquest pèptid no ha mostrat activitat enfront *E. amylovora* i ha presentat una hemòlisi considerable, concretament del 81% a 375  $\mu\text{M}$ .



## 1. Introducció

Per tal de millorar les propietats biològiques de **BPC10L**, s'ha preparat una quimioteca de 56 decapeptids cíclics.<sup>13</sup> Aquestes seqüències incorporen una Phe i una Gln a les posicions 6 i 10, respectivament. Les altres posicions incorporen totes les possibles combinacions de 3 residus de Leu i 5 de Lys. Aquest estudi ha revelat que els pèptids amb la seqüència general c(X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>X<sup>4</sup>KFKKLQ), on X és Lys o Leu, han mostrat la major activitat antibacteriana. En base a aquest resultat, s'ha sintetitzat una segona quimioteca per comprovar la influència dels residus de les posicions 1 a 4 sobre l'activitat biològica mitjançant l'ús d'un disseny d'experiments (DOE). Aquesta quimioteca contenia 16 ciclodecapeptids que incorporen la subestructura K<sup>5</sup>FKKLQ<sup>10</sup> i totes les possibles combinacions de Leu i Lys en les posicions 1 a 4. L'avaluació de l'activitat antimicrobiana i hemolítica d'aquesta quimioteca ha portat a la identificació de pèptids actius contra *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae* i *E. amylovora* que, a més, han mostrat una baixa citotoxicitat a concentracions 30-120 vegades més grans que la CMI. Els pèptids amb les millors propietats biològiques han estat **BPC96**, **BPC98**, **BPC194** i **BPC198** (Taula 1.1). Aquests pèptids compleixen les regles definides a partir del DOE corresponents a una activitat antibacteriana elevada i una toxicitat baixa: X<sup>2</sup> ≠ X<sup>3</sup> i X<sup>4</sup> = Lys. Un dels ciclodecapeptids amb un millor perfil biològic ha estat c(KKLKKFKKLQ) (**BPC194**) amb valors de CMI entre 3.1 i 12.5 µM, i un percentatge d'hemòlisi molt baix (17% a 375 µM) (Figura 1.5).

Taula 1.1: Activitat antibacteriana (CMI) i citotoxicitat dels ciclodecapeptids dissenyats *de novo* pel grup LIPPSO

Pèptid	Seqüència	CMI <sup>a</sup> (µM)			Hemòlisi (%) <sup>c</sup>
		<i>Xav</i> <sup>b</sup>	<i>Pss</i> <sup>b</sup>	<i>Ea</i> <sup>b</sup>	
<b>BPC10L</b>	c(KLKLKFKLKQ)	6.2-12.5	12.5-25	> 100	84 ± 6.9
<b>BPC96</b>	c(LKLKKFKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	12.5-25	24 ± 4.3
<b>BPC98</b>	c(LLKKKFKKLQ)	1.6-3.1	6.2-12.5	12.5-25	28 ± 2.4
<b>BPC194</b>	c(KKLKKFKKLQ)	3.1-6.2	3.1-6.2	6.2-12.5	17 ± 1.7
<b>BPC198</b>	c(KLKKKFKKLQ)	3.1-6-2	3.1-6-2	12.5-25	14 ± 1.4

<sup>a</sup>Concentració mínima inhibidora.

<sup>b</sup>*Xav*: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*: *P. syringae* pv. *syringae*; *Ea*: *E. amylovora*.

<sup>c</sup>Percentatge d'hemòlisi a 375 µM amb interval de confiança (α=0.05).

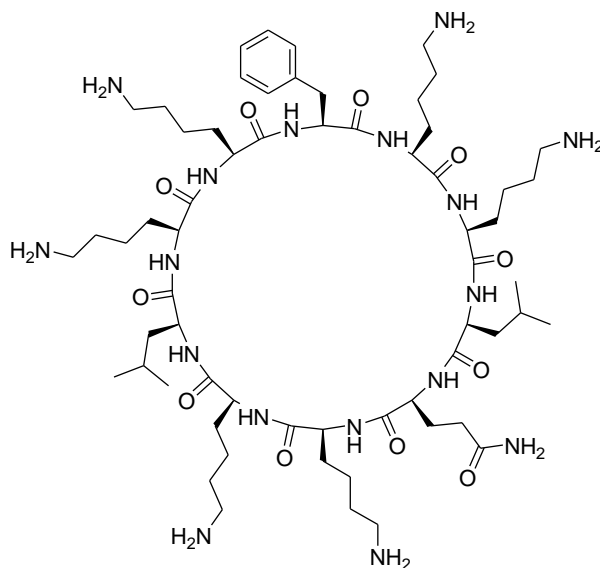


Figura 1.5: Estructura de **BPC194**

#### 1.4. Ciclolipèptids amb activitat antimicrobiana

En els últims anys, els lipopèptids han estat el centre d'atenció de molts estudis focalitzats en la cerca de nous agents bactericides per a fer front a l'aparició creixent de microorganismes multiresistents. Aquests tipus de productes estan formats per una seqüència peptídica cíclica o lineal (part hidrofílica) i una o més cadenes d'àcid gras (part hidrofòbica). A més, poden ser catiónics, com la polimixina B o la colistina, o aniónics, com la daptomicina o les surfactines.<sup>6e,11b,14</sup>

Anàlogament als pèptids antimicrobians, els lipopèptids actuen a nivell de la membrana bacteriana, tot i que també poden interferir en altres processos com seu la replicació de l'ADN.<sup>6a,14i,15</sup> En funció del mecanisme d'acció, es poden classificar en: (i) lipopèptids que inhibeixen la síntesi de macromolècules que componen la membrana cel·lular, i (ii) lipopèptids que degraden la membrana cel·lular interaccionant amb ella, i provocant la formació de porus i la seva despolarització.

Els pèptids i els lipopèptids antimicrobians comparteixen dues característiques.<sup>14c,14h</sup> La primera és la capacitat de plegar-se en una conformació amfipàtica en un ambient hidrofòbic. Aquesta propietat és important per a la seva activitat antimicrobiana. La segona consisteix en què presenten un mecanisme d'acció semblant, que implica la interacció electrostàtica del pèptid amb la membrana de la cèl·lula diana. Això provoca la

## 1. Introducció

desestabilització d'aquesta per dissipació del potencial transmembrana, produint-se la seva permeabilització i la conseqüent pèrdua del contingut cel·lular.

Una de les diferències més importants entre els pèptids i els lipopèptids antimicrobians és que aquests darrers interaccionen millor amb els fosfolípids de la membrana de la cèl·lula diana. De fet, la cadena d'àcid gras que presenten els lipopèptids facilita la seva inserció en la bicapa lipídica de les membranes bacterianes, la qual cosa, per tant, millora la seva activitat antimicrobiana. A més, la cadena d'àcid gras dificulta el desenvolupament de resistència microbiana i, d'altra banda, els lipopèptids presenten una millor estabilitat proteolítica.

En els darrers anys ha augmentat l'interès en el desenvolupament de lipopèptids a causa del gran nombre d'activitats que presenten com, per exemple, surfactant, antimicrobiana, antitumoral i citotòxica.<sup>6b,14a</sup> Alguns lipopèptids, com les polimixines amb activitat antibiòtica, van ser descoberts fa més de 50 anys, i altres, com la daptomicina o la micafungina, han estat descoberts recentment. A la taula 1.2 es mostren alguns lipopèptids que es troben en el mercat o en fase preclínica.<sup>14c</sup> D'entre els lipopèptids cíclics més rellevants hi trobem la daptomicina, les polimixines, les surfactines, les iturines, les amfomicines i les equinocandines.

Taula 1.2: Lipopèptids en desenvolupament preclínic o en el mercat

Nom compost (família)	Ús clínic	Mètode de producció	Organisme productor	Companyia	Fase
<b>Daptomicina</b>	Infeccions bacterianes de la pell	Fermentació	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379	Cubist	Mercat
<b>NAB739 i NAB7061 (polimixines)</b>	Infeccions bacterianes gram negatives	Semisíntesi	<i>Colistin</i> i <i>Bacillus polymyxa</i>	Northern antibiotics	Preclínica
<b>MX-2401 (amfomicines)</b>	Infeccions bacterianes gram positives	Semisíntesi	<i>Streptomyces canus</i> ATCC 1223	Migenix	Preclínica
<b>Micafungina (esquinocandines)</b>	Antifúngic	Semisíntesi	<i>Coleophoma empetri</i>	Astellas pharmaceuticals	Mercat

La daptomicina és un lipodepsipèptid cíclic aniónic de 13 aminoàcids que presenta una cadena de decanoïl unida a l'extrem N-terminal de la seqüència a través d'un enllaç amida (Figura 1.6). Va ser descoberta a principis dels anys 80 i mostra activitat contra una àmplia varietat de bacteris gram positius, però no contra gram negatius ni fongs. La daptomicina va ser aprovada als Estats Units per al tractament d'infeccions de pell causades per *Staphylococcus aureus*.<sup>14c,14h,14i</sup>

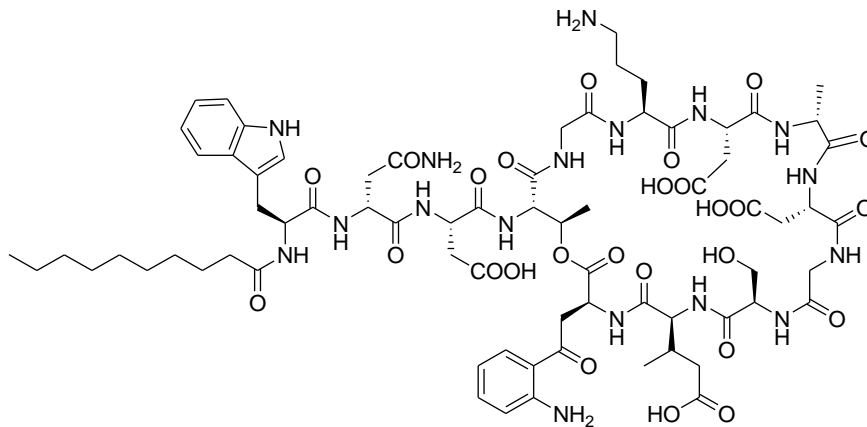


Figura 1.6: Estructura de la daptomicina

S'han proposat dos mecanismes d'acció diferents per la daptomicina.<sup>6e,14i,16</sup> El primer consisteix en la inhibició de la síntesi d'àcids lipotecoics en presència d'ions calci. Aquest mecanisme ha estat molt qüestionat. El segon mecanisme consisteix en la permeabilització de la membrana bacteriana en presència d'ions calci. En aquest cas, els ions calci provoquen un canvi de conformació del pèptid permetent una millor inserció en la doble capa de la membrana amb la consegüent formació de porus, la pèrdua de potencial de membrana deguda a la sortida de ions potassi a l'espai intracel·lular bacterià i la inhibició de la síntesi de peptidoglicà. Aquesta despolarització produeix una ràpida mort cel·lular.

Les polimixines són una família de lipopèptids cíclics catiónics, formats per 10 aminoàcids i una cadena hidrofòbica. Varen ser aïllades de *Bacillus polymyxa* al voltant del 1940. A la Figura 1.7 es mostra, com a exemple, l'estructura de la polimixina E o colistina i de la polimixina B. Aquests ciclolipopèptids presenten una activitat antibacteriana selectiva pels bacteris gram negatius. De totes maneres, les polimixines són relativament neurotòxiques i nefrotòxiques i, normalment, s'utilitzen només com a últim recurs si els antibiòtics d'ús comú són ineficaços o estan contraindicats. La seva indicació típica és el tractament d'infeccions causades per soques multiresistents de *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>14c,14k</sup>

## 1. Introducció

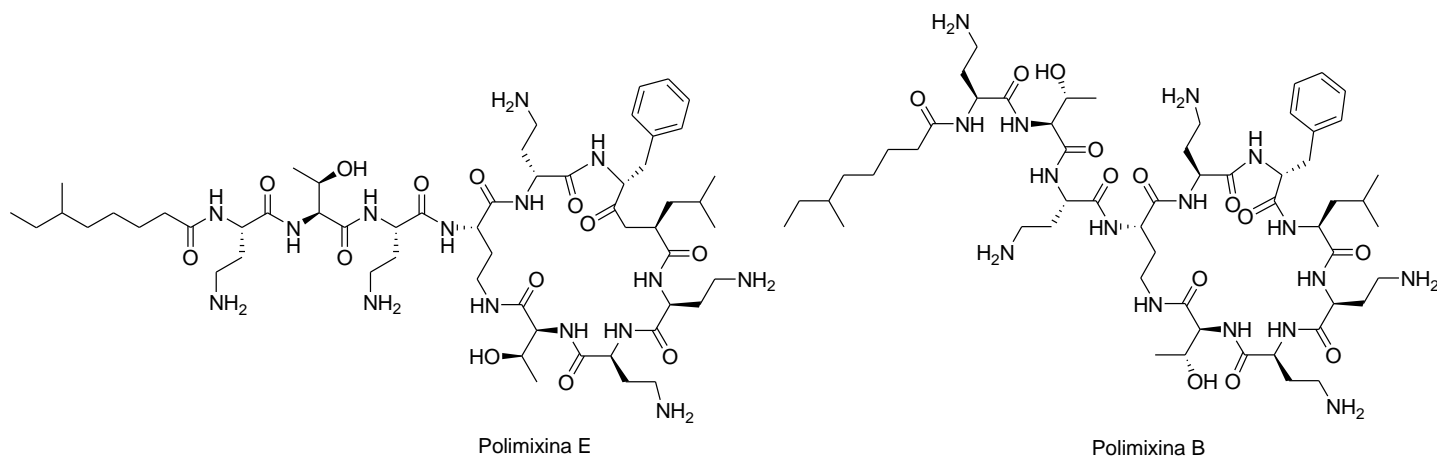


Figura 1.7: Estructura de la polimixina E (colistina) i de la polimixina B

El mecanisme d'acció de les polimixines involucra tant la membrana interior com l'exterior dels bacteris gram negatius. Les polimixines s'uneixen a la membrana exterior gràcies a la interacció electrostàtica entre la càrrega positiva d'aquests lipopèptids i la càrrega negativa dels lipopolisacàrids. A continuació, travessen aquesta membrana exterior a través d'un mecanisme d'autoabsorció i arriben a l'espai periplàsmic on interaccionen amb la membrana citoplasmàtica. El mecanisme de la mort bacteriana no és ben conegut, però s'ha descrit que no està relacionat amb la permeabilització de la membrana i que, en canvi, involucra la interacció entre les membranes externa i interna dels bacteris, la qual cosa provoca un intercanvi de lípids. Aquest procés resulta en una pèrdua de l'especificitat de la composició de la membrana i en una inestabilitat osmòtica que condueix a la mort cel·lular. La cua hidrofòbica és important per causar un dany a la membrana i es creu que té un efecte detergent.<sup>11b,14c,14f,17</sup>

Les surfactines són una família de lipopèptids cíclics de 7 aminoàcids i amb una cadena hidrofòbica de 13-15 carbonis, aïllats de *Bacillus subtilis* (Figura 1.8). Presenten un elevat poder surfactant i tensioactiu. La cadena hidrofòbica els hi confereix la capacitat d'inserir-se a la membrana cel·lular. Aquests ciclolipopèptids mostren activitat antibacteriana enfront bacteris gram negatius i gram positius per la qual cosa s'utilitzen com a antibiòtics. A més, també presenten activitat antivírica i antifúngica, i són hemolítics.<sup>18</sup>

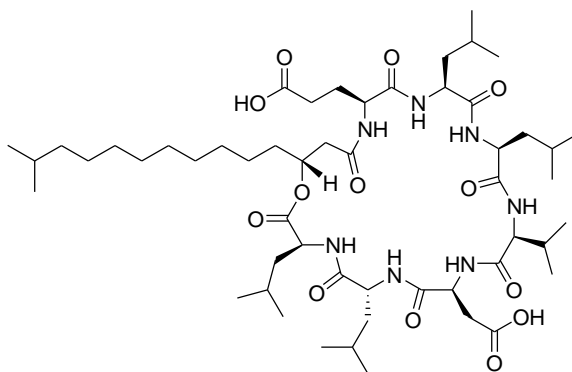


Figura 1.8: Estructura de la surfactina C-15

Les iturines són un grup de lipopèptids cíclics formats per 7 aminoàcids i una cadena hidrofòbica de 14-17 carbonis, aïllats de *Bacillus subtilis*, i amb activitat antifúngica i antibacteriana (Figura 1.9). Els estudis sobre el mecanisme d'acció d'aquesta família de compostos han revelat que augmenten la permeabilitat de la membrana cel·lular a través de la formació de porus conductors d'ions. La formació d'aquests porus és degut a la presència d'agregats entre els mateixos lipopèptids o bé entre els lipopèptids i els fosfolípids de la membrana. A més, s'ha observat que quan les iturines són actives interaccionen fortament amb els esterols.<sup>19</sup>

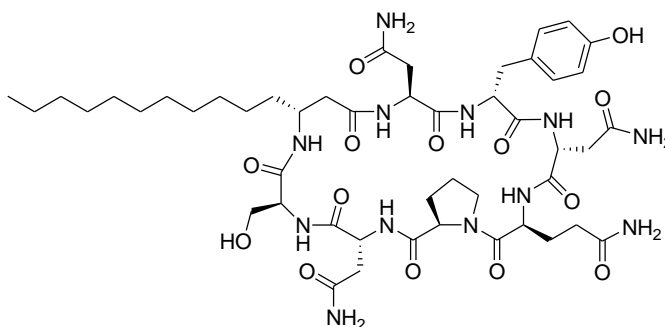


Figura 1.9: Estructura de la iturina A2

Les amfomicines són un grup de lipopèptids cíclics formats per 11 aminoàcids i una cadena hidrofòbica de 12 carbonis, aïllats de *Streptomyces canus* (Figura 1.10). Aquests lipopèptids s'utilitzen pel tractament d'infeccions bacterianes gram positives, com algunes infeccions de la pell. La seva activitat bactericida està correlacionada amb el seu efecte despolaritzador de la membrana que depèn de la presència d'ions calci. El canvi en el potencial de membrana dels bacteris és relativament petit comparat amb el que provoca la daptomicina. Per aquest motiu es creu que el mecanisme d'acció és diferent del de la daptomicina, tot i tenir en comú la dependència de calci.<sup>14c</sup>

## 1. Introducció

---

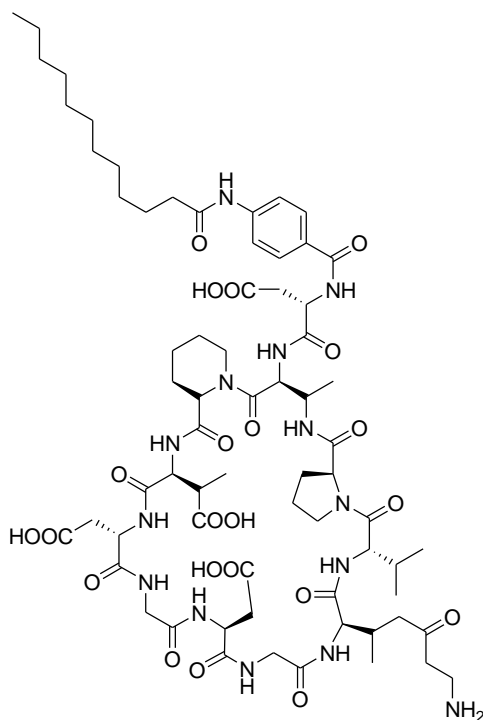


Figura 1.10: Estructura de l'amfomicina MX2401

Les equinocandines constitueixen una nova classe de lipopèptids aïllats de soques d'*Aspergillus ruglosus* i *Aspergillus nidulans*, que actuen com a agents antifúngics. Es tracta d'una família d'hexapèptids cíclics amfifílics que presenten una cadena hidrofòbica ramificada o no ramificada, d'entre 14 i 18 carbonis, i unida a un grup amino (Figura 1.11). Se sap que aquesta cadena hidrofòbica té molta importància en el mode d'acció d'aquests lipopèptids. Concretament, les equinocandines actuen bloquejant la síntesi d'1,3-β-D-glucà, un component de les parets dels fongs. Això causa la pèrdua de la integritat de la membrana i la seva disrupció osmòtica, la qual és la responsable de l'activitat antifúngica.<sup>14c,20</sup>

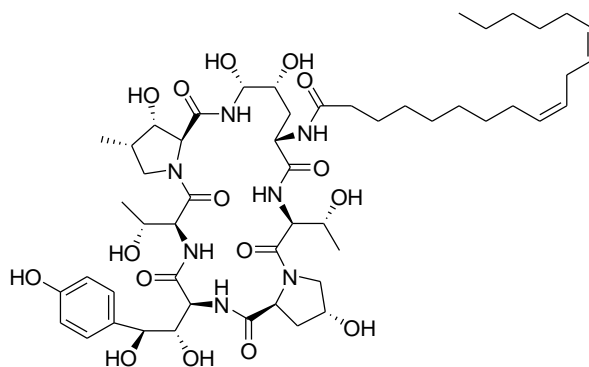


Figura 1.11: Estructura de l'equinocandina B

### 1.5. Estratègies per al disseny de pèptids amb activitat antimicrobiana

Existeixen diferents estratègies per millorar el perfil biològic dels pèptids antimicrobians adreçades, d'una banda, a augmentar la seva biodisponibilitat i estabilitat a la degradació per proteases i, d'altra banda, a reduir-ne la seva toxicitat. D'entre aquestes estratègies es pot destacar la introducció en les seqüències peptídiques d'aminoàcids no naturals, concretament D-isòmers, d'histidines o d'heterocicles que continguin nitrogen. La síntesi de pèptids multivalents també és una bona estratègia que pot millorar la unió dels pèptids a les membranes i, en conseqüència, millorar-ne l'activitat biològica.<sup>21</sup>

#### 1.5.1. Incorporació de D-aminoàcids

La introducció de D-aminoàcids en una seqüència peptídica constitueix una estratègia per a reduir la toxicitat del pèptid i, també, per augmentar la seva estabilitat a la degradació per proteases.<sup>22</sup> De fet, s'ha observat que la introducció de D-aminoàcids a la cara hidrofòbica de l'estructura amfipàtica d'un pèptid trenca la seva estructura secundària, la qual cosa provoca una disminució del nombre d'interaccions entre el pèptid i els eritròcits i, per tant, una reducció de l'activitat hemolítica (toxicitat).<sup>23</sup> Tot i que la introducció de D-aminoàcids desestabilitza l'estructura secundària del pèptid, altres propietats, com la hidrofobicitat i la distribució de càrrega, es mantenen.<sup>24</sup> Pel que fa a la millora de l'estabilitat d'un pèptid amb D-aminoàcids a la degradació per proteases, aquesta es deu al fet que són pocs els enzims capaços de trencar els enllaços amida que involucren D-aminoàcids. D'altra banda, alguns estudis mostren que la millora en l'estabilitat i la disminució de l'hemòlisi depenen del nombre de D-aminoàcids introduïts a la seqüència i de la seva posició. Així, per exemple, Hong va millorar l'estabilitat del pèptid KKVVFVKVFKK-NH<sub>2</sub> sense afectar la seva activitat antibacteriana i antifúngica, mitjançant la introducció de D-aminoàcids als extrems N- i C-terminals.<sup>25</sup> A més, Shai i Oren van publicar que la seqüència, la llargada i la posició dels D-aminoàcids en el pèptid KLLLLLKKLLK-NH<sub>2</sub> afecten la seva citotoxicitat, però no l'activitat antibacteriana.<sup>26</sup>

El grup LIPPSO ha sintetitzat una quimioteca de pèptids derivats de l'undecapèptid antimicrobià KKLFFKILKYL-NH<sub>2</sub> (**BP100**) per estudiar la influència d'intercanviar un L-aminoàcid pel seu corresponent D-isòmer en el perfil biològic d'aquest pèptid (Taula 1.3).<sup>22</sup> D'entre els 11 pèptids sintetitzats contenint un D-aminoàcid, s'han identificat seqüències amb un bon perfil biològic. Concretament, **BP143**, **BP145** i **BP147** han mostrat uns valors de CMI similars a **BP100** (<7.5 µM) enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis*



## 1. Introducció

pv. *vesicatoria*. Excepte **BP147**, la resta de seqüències han mostrat uns valors d'hemòlisi més baixos que **BP100** i tots ells han resultat ser més estables a la degradació per proteases.

Taula 1.3: Activitat antibacteriana (CMI), citotoxicitat i estabilitat a la degradació per proteases dels undecapèptids lineals derivats de **BP100** contenint un D-aminoàcid

Pèptid	Seqüència <sup>a</sup>	CMI <sup>b</sup> (µM)			Hemòlisi (%) <sup>d</sup>	Digestió (%) <sup>e</sup>
		<i>Xav</i> <sup>c</sup>	<i>Pss</i> <sup>c</sup>	<i>Ea</i> <sup>c</sup>		
<b>BP100</b>	KKLFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	5 - 7.5	2.5 - 5	2.5 - 5	54 ± 0.1	75
<b>BP138</b>	KKLFKKILKyL-NH <sub>2</sub>	>7.5	>7.5	>7.5	7 ± 0.1	53
<b>BP139</b>	KKLFKKILKYI-NH <sub>2</sub>	>7.5	>7.5	>7.5	23 ± 0.9	6
<b>BP140</b>	KKLFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	5 - 7.5	>7.5	0 ± 0	1
<b>BP141</b>	KKLFKKIIKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	2.5 - 5	2.5 - 5	4 ± 0.3	1
<b>BP142</b>	KKLFkKILKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	2.5 - 5	5 - 7.5	3 ± 0.6	35
<b>BP143</b>	KKLFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	5 - 7.5	2.5 - 5	2.5 - 5	5 ± 0.8	18
<b>BP144</b>	KKIFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	2.5 - 5	>7.5	7 ± 0.4	50
<b>BP145</b>	KkLFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	5 - 7.5	2.5 - 5	2.5 - 5	51 ± 0.5	61
<b>BP146</b>	KKLFKkILKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	2.5 - 5	>7.5	53 ± 1.1	24
<b>BP147</b>	kKLFKKILKYL-NH <sub>2</sub>	2.5 - 5	2.5 - 5	2.5 - 5	71 ± 0.4	47
<b>BP148</b>	KKLFKKiLKYL-NH <sub>2</sub>	>7.5	>7.5	>7.5	0 ± 0	0

<sup>a</sup>Els aminoàcids amb minúscula són D-enantiòmers.

<sup>b</sup>Concentració mínima inhibidora.

<sup>c</sup>*Xav*: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*: *P. syringae* pv. *syringae*; *Ea*: *E. amylovora*.

<sup>d</sup>Percentatge d'hemòlisi a 375 µM amb interval de confiança ( $\alpha=0.05$ ).

<sup>e</sup>Percentatge de degradació del pèptid determinat per HPLC.

### 1.5.2. Incorporació d'un residu d'histidina

El grup LIPPSO també ha observat que la presència d'un residu d'His en la seqüència d'undecapèptids lineals amb activitat antimicrobiana disminueix l'hemòlisi (Taula 1.4).<sup>27</sup> Aquest estudi s'ha centrat en els pèptids **BP15**, **BP21**, **BP22**, **BP34** i **BP66**, prèviament descrits com a antimicrobians,<sup>28</sup> i s'han dissenyats derivats intercanviant un o més residus de Phe per His. Els resultats han mostrat que els pèptids amb residus d'His són menys citotòxics que les seqüències de partida. Aquesta reducció de la citotoxicitat s'ha atribuït a la presència de l'anell d'imidazole de la histidina, el qual confereix el pèptid una menor hidrofobicitat que

## 1. Introducció

l'anell de benzè d'un residu de Phe. Aquesta menor hidrofobicitat implica una menor interacció del pèptid amb les cèl·lules eucariotes, com són els eritròcits, els quals es caracteritzen per presentar components hidrofòbics, com esterols.<sup>29</sup>

Taula 1.4: Activitat antibacteriana i antifúngica (CMI), i citotoxicitat dels undecapèptids lineals derivats de **BP15**, **BP21**, **BP22**, **BP34** i **BP66**, contenint un residu d'histidina

Pèptid	Seqüència	$X_{av}^b$	$P_{ss}^b$	CMI <sup>a</sup> (µM)			H (%) <sup>c</sup>
				$Ea^b$	$Fo^b$	$Pe^b$	
<b>BP15</b>	KKLFKKILKVL-NH <sub>2</sub>	12.5 - 25	3.1 - 6.2	3.1 - 6.2	<3.1	12.5 - 25	16 ± 2.9
<b>BP270</b>	KKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	>50	12.5 - 25	>50	6.2 - 12.5	>50	0 ± 1.1
<b>BP21</b>	Ac-FKLFKKILKVL-NH <sub>2</sub>	3.1 - 6.2	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	3.1 - 6.2	<6.2	85 ± 1.4
<b>BP272</b>	Ac-HKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	>50	12.5 - 25	>50	6.2 - 12.5	>50	0 ± 0.1
<b>BP273</b>	Ac-FKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	25 - 50	12.5 - 25	>50	6.2 - 12.5	>50	0 ± 0.5
<b>BP22</b>	Ts-FKLFKKILKVL-NH <sub>2</sub>	3.1 - 6.2	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	3.1 - 6.2	6.2 - 12.5	73 ± 1.5
<b>BP274</b>	Ts-HKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	25 - 50	3.1 - 6.2	>50	0 ± 0.1
<b>BP275</b>	Ts-FKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	3.1 - 6.2	3.1 - 6.2	12.5 - 25	3.1 - 6.2	>50	4 ± 1.3
<b>BP34</b>	Ac-LKLFKKILKVL-NH <sub>2</sub>	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	3.1 - 6.2	<6.2	45 ± 2.8
<b>BP271</b>	Ac-LKLHKKILKVL-NH <sub>2</sub>	>50	12.5 - 25	>50	12.5 - 25	>50	0 ± 0.3
<b>BP66</b>	FKLFKKILKFL-NH <sub>2</sub>	3.1 - 6.2	3.1 - 6.2	6.2 - 12.5	3.1 - 6.2	25 - 50	63 ± 5.9
<b>BP284</b>	HKLFFKILKFL-NH <sub>2</sub>	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	6.2 - 12.5	<3.1	25 - 50	16 ± 5.4
<b>BP285</b>	FKLFKKILKHL-NH <sub>2</sub>	>50	>25	>25	3.1 - 6.2	>50	26 ± 0.8
<b>BP305</b>	HKLFFKILKHL-NH <sub>2</sub>	12.5 - 25	12.5 - 25	>25	<3.1	>50	0 ± 0.2
<b>BP306</b>	HKLHKKILKHL-NH <sub>2</sub>	>50	>25	>25	6.2 - 12.5	>50	0 ± 0.3

<sup>a</sup>Concentració mínima inhibidora.

<sup>b</sup> $X_{av}$ : *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*;  $P_{ss}$ : *P. syringae* pv. *syringae*;  $Ea$ : *E. amylovora*;  $Fo$ : *F. oxysporum*;

$Pe$ : *P. expansum*.

<sup>c</sup>Percentatge d'hemòlisi a 150 µM amb interval de confiança ( $\alpha=0.05$ ).

## 1. Introducció

### 1.5.3. Incorporació d'un anell d'1,2,3-triazole

Una altra estratègia per millorar el perfil biològic dels pèptids antimicrobians consisteix en incorporar un anell nitrogenat a la seva seqüència. En els darrers anys, l'anell d'1,2,3-triazole ha guanyat interès degut a què presenta característiques favorables gràcies a les quals pot interaccionar amb sistemes biològics, actuant com un farmacòfor important.<sup>30</sup> Les propietats fisicoquímiques i biològiques de l'anell d'1,2,3-triazole fan d'aquest un excel·lent mimètic de l'enllaç peptídic. Aquest anell presenta un moment dipolar alt (al voltant de 5.0 D), molt semblant al moment dipolar de l'enllaç amida (3.7-4.0 D), i, per tant, és capaç de participar en ponts d'hidrogen (Figura 1.12). Aquest elevat moment dipolar també permet a l'anell de triazole participar en interaccions dipol-dipol i  $\pi$ -stacking.<sup>30h</sup> A més, els nitrògens de les posicions 2 i 3 confereixen a l'hidrogen de la posició 5 una considerable acidesa, fet que augmenta encara més l'equivalència electrònica amb la funció amida de l'enllaç peptídic. La diferència estructural més gran entre un anell d'1,2,3-triazole i un grup amida és la major distància entre els àtoms de les posicions 1 i 4 del triazole (5.0 Å) respecte la distància de l'enllaç amida (3.9 Å). Un dels avantatges de l'anell de triazole respecte l'enllaç amida és que és estable a la hidròlisi enzimàtica, a la hidròlisi àcida i bàsica, així com a condicions d'oxidació i reducció. A més, la presència d'aquest anell en seqüències peptídiques imposa restriccions conformacionals, fet que comporta una major selectivitat i especificitat.<sup>30d,31</sup>

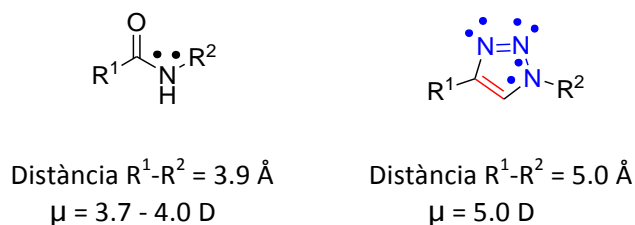


Figura 1.12: Característiques estructurals i electròniques d'un enllaç amida i d'un anell d'1,2,3-triazole

A la literatura existeixen molts exemples de compostos que incorporen un anell d'1,2,3-triazole i que presenten activitats biològiques importants. Així, s'han aïllat d'organismes marins compostos amb un anell de d'1,2,3-triazole, essent alguns d'ells eficients per tractar infeccions greus.<sup>30b</sup> També s'han descrit compostos amb activitat antifúngica, com el 4-(4-metoxifenil)-5-nitro-1,2,3-triazole,<sup>32</sup> o amb activitat antitumoral, com els derivats de 4-(4-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)-1,8-naftalimida (Figura 1.13).<sup>33</sup> També s'han descrit pèptids que contenen un anell de 1,2,3-triazole amb activitat antibacteriana o que actuen com inhibidors, alguns exemples es troben en els esquemes 6, 7 i 4.

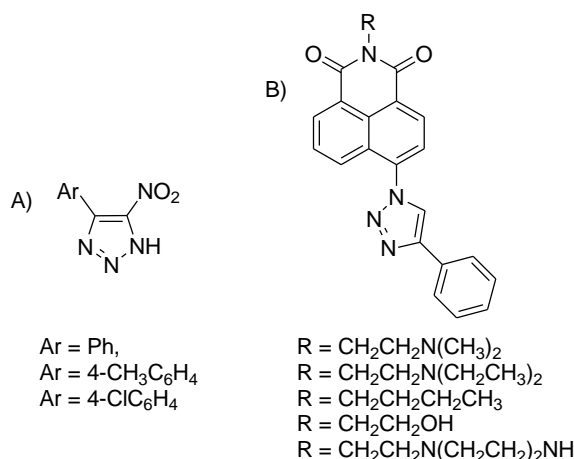
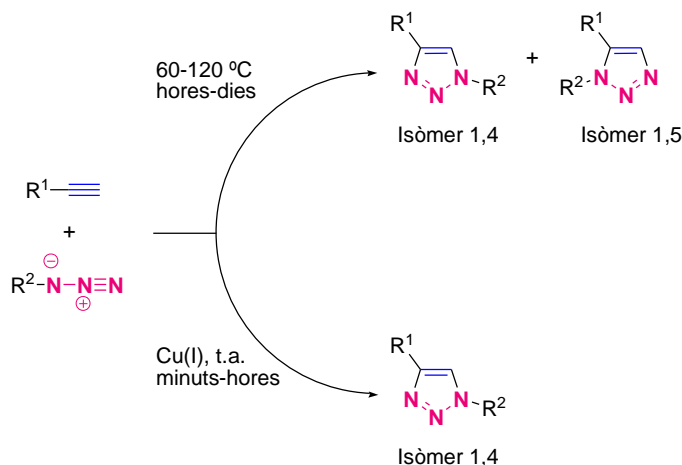


Figura 1.13: Estructura dels derivats de A) 4-(4-metoxifenil)-5-nitro-1,2,3-triazole i B) 4-(4-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)-1,8-naftalimida

La cicloaddició 1,3-dipolar entre alquins i azides, anomenada reacció de Huisgen, és una de les rutes més efectives i utilitzades per a la síntesi d'1,2,3-triazoles. Inicialment, aquesta reacció requeria temperatures altes, temps de reacció llargs i, en la majoria de casos, donava una mescla dels dos possibles triazoles regioisomèrics 1,4 i 1,5-disubstituïts (Esquema 1.1).<sup>34</sup> A l'any 2001, Meldal i col·laboradors van descriure la síntesi d'1,2,3-triazoles a partir d'un alquí immobilitzat en un suport sòlid a temperatura ambient utilitzant quantitats catalítiques de CuI.<sup>35</sup> En el mateix any, Sharpless, Fokin i col·laboradors van descriure l'ús de sulfat de coure (I) pentahidratat i ascorbat sòdic en aigua per dur a terme la reacció de cicloaddició entre alquins terminals i azides alquíliques o aníliques.<sup>36</sup> L'ús d'un catalitzador de Cu(I) en les reaccions de cicloaddició no només augmenta la velocitat de la reacció 10<sup>7</sup> vegades i disminueix els temps de reacció, sinó que, a més, dóna lloc a la formació exclusiva de l'isòmer 1,4. A més, aquestes reaccions es poden fer en diferents tipus de dissolvents, tant pròtics com apròtics, inclús en aigua en un rang ampli de valors de pH. Així mateix, la reacció presenta una elevada tolerància a una àmplia varietat de grups funcionals. En base a

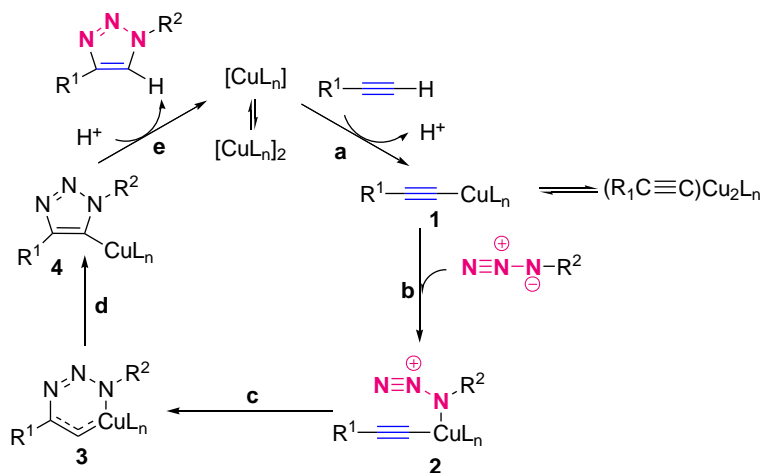
## 1. Introducció

aquestes característiques, actualment, aquest tipus de cicloaddicions són considerades com una reacció *click*. Segons Sharpless, les reaccions *click* són aquelles que presenten unes condicions de reacció simples, són estereoespecífiques, donen rendiments elevats, els reactius són fàcilment accessibles, els solvents són fàcils d'eliminar, els productes finals són fàcils d'aïllar i els subproductes generats són innocus.<sup>36</sup>



Esquema 1.1: Cicloaddició 1,3-dipolar entre azides i alquins sota condicions tèrmiques i catalitzades per Cu(I)

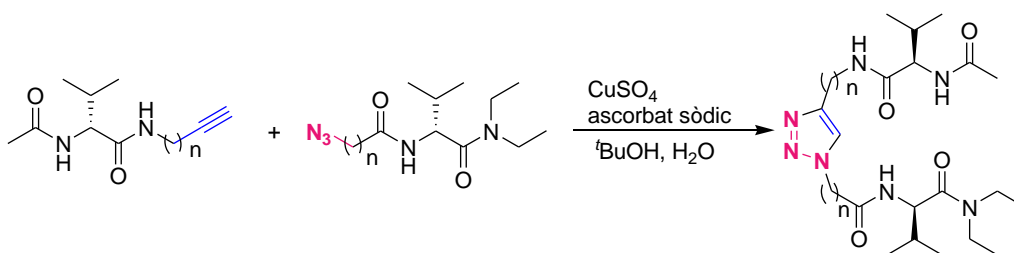
Tot i l'aparent simplicitat de la reacció de cicloaddició anterior catalitzada per Cu(I), el seu mecanisme inclou múltiples passos reversibles on intervenen complexos de coordinació de tipus acetilur de Cu(I) de diferent nuclearitat (Esquema 1.2).<sup>30f,34</sup> En una primera etapa (a) es forma el complex acetilur de Cu(I) **1**. Probablement, la formació d'aquest té lloc a través d'un complex intermedi Cu(I)- $\pi$ -alquí. La  $\pi$ -coordinació de l'alquí al coure augmenta significativament l'acidesa de l'hidrogen terminal de l'alquí, que permet la seva desprotonació en sistemes aquosos sense la necessitat d'addicionar una base, i que resulta en la formació del complex **1**. Després de la formació d'**1**, el desplaçament d'un lligand per part de l'azida genera el complex **2** (b). La complexació de l'azida promou l'atac nucleofílic del nitrogen terminal d'aquesta azida sobre un dels carbonis de l'acetilur, generant així el metalocicle de 6 membres **3** i formant-se un enllaç C-N (c). D'aquesta manera, l'azida queda posicionada favorablement per a una posterior contracció transanular que proporciona el metalocicle **4** (d). Finalment, una etapa de protonació allibera el triazole i regenera el catalitzador (e).



Esquema 1.2: Cicle catalític proposat per la reacció de cicloaddició entre una azida i un alquí, catalitzada per Cu(I)

En la literatura s'ha descrit la síntesi d'una gran varietat de compostos contenint un anell d'1,2,3-triazole. Concretament, la cicloaddició 1,3-dipolar catalitzada per Cu(I) de formació d'aquest anell s'ha emprat per a preparar peptidotriazoles lineals i també per a la macrociclació de seqüències lineals per a obtenir peptidotriazoles cíclics. A més, aquesta reacció s'ha adaptat a la síntesi en fase sòlida gràcies a la seva elevada regioselectivitat, les condicions suaus en les que es realitza, els elevats rendiments i la seva compatibilitat amb una gran varietat de grups funcionals. A continuació es mostren alguns exemples de preparació de peptidotriazoles.

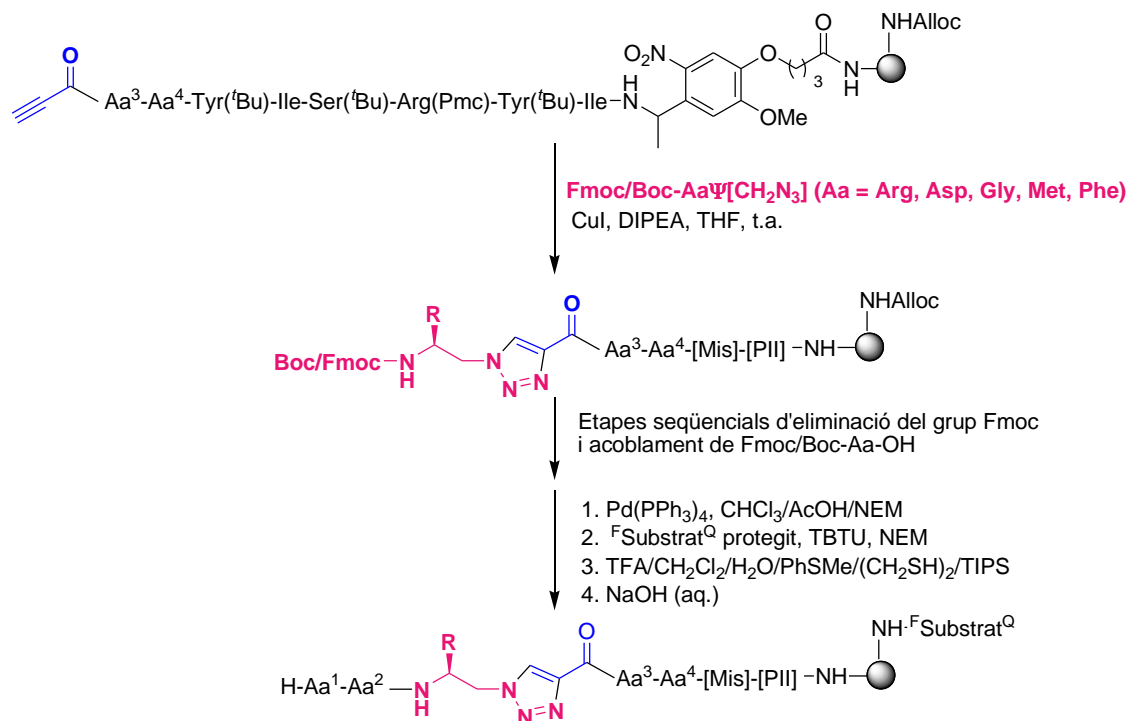
Pedersen i Abell han descrit la síntesi en solució de peptidotriazoles lineals incorporant l'1,2,3-triazole en l'esquelet peptídic (Esquema 1.3).<sup>37</sup> Aquests compostos s'han obtingut mitjançant una reacció de cicloaddició entre dues cadenes peptídiques derivatitzades en un extrem amb un alquí o una azida, respectivament. Degut a la formació de l'anell de triazole, els peptidotriazoles resultants han presentat una geometria de gir  $\beta$ . La formació del gir  $\beta$  s'ha avaluat mitjançant RMN i FTIR.



Esquema 1.3: Síntesi de peptidotriazoles amb una geometria de gir  $\beta$

## 1. Introducció

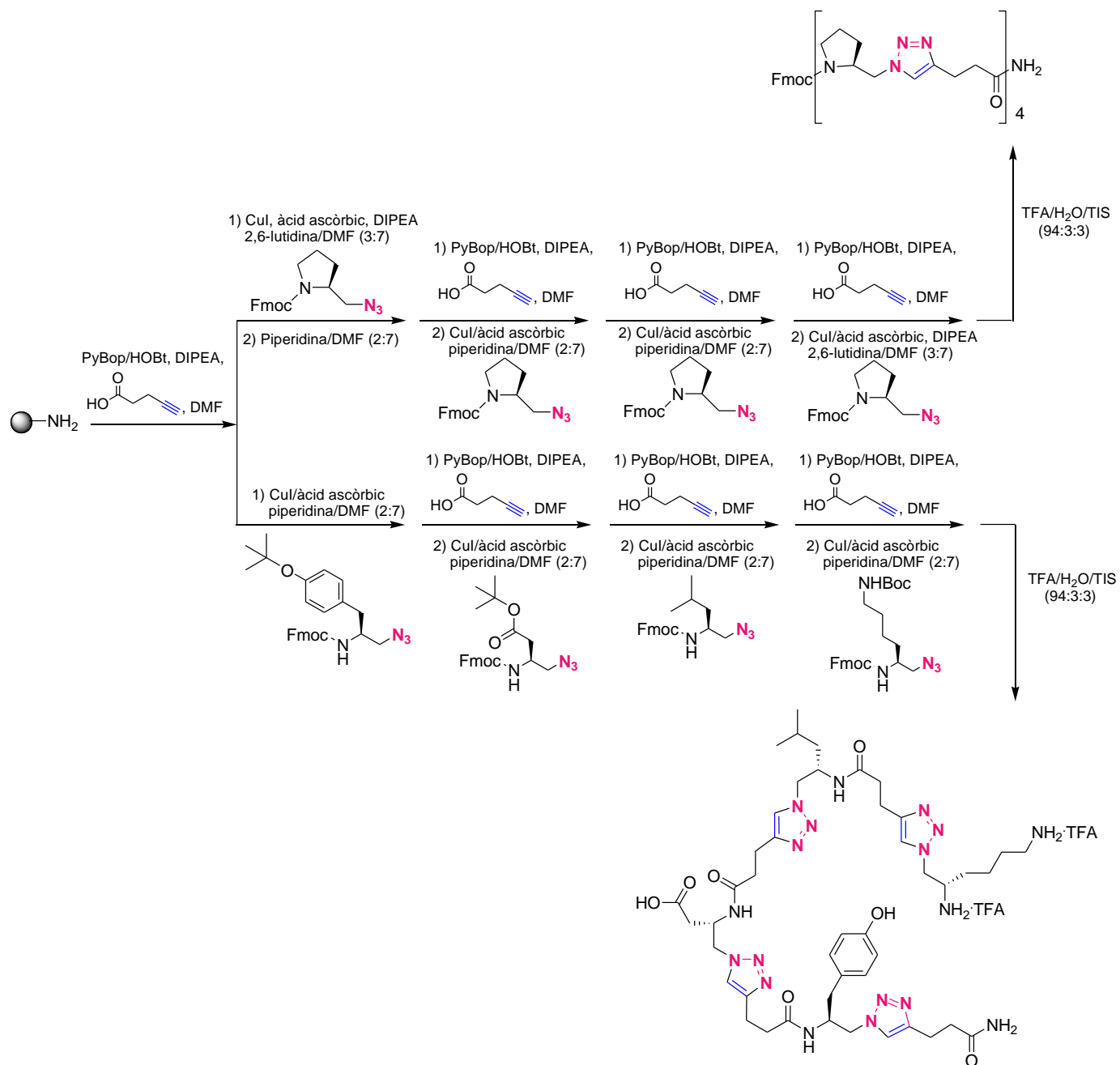
Meldal i col·laboradors han sintetitzat en fase sòlida una quimioteca de peptidotriazoles, contenint també un anell de triazole en l'esquelet peptídic, per tal d'identificar inhibidors de *Leishmania mexicana* (Esquema 1.4).<sup>31b</sup>



Esquema 1.4: Síntesi d'una quimioteca de peptidotriazoles lineals, on <sup>F</sup>substrat<sup>Q</sup> = Boc-Y(NO<sub>2</sub>)-E(<sup>t</sup>Bu)-K(Boc)-F-R(Pmc)-R(Pmc)-G-K(Boc)-K(Abz)-G-OH; F= fluoròfor; Q= quencher; PII= linker fotolàbil; MiS= espaiador masa/ionització; Aa<sup>1</sup>= Trp, Lys, Glu, His, Leu Ala, PyA, Thr, Pro, Asp, Gly; Aa<sup>2</sup>= Ala, Thr, PyA, Ala, Thr, Asp, Glu, Ser, Lys; Aa<sup>3</sup>= Arg, Leu, ClF, Met; i Aa<sup>4</sup>= Leu, Ile, Phe, Lys, Phe, Asn

## 1. Introducció

Zang i col·laboradors han descrit una metodologia per la síntesi en fase sòlida de pèptids lineals amb varis triazoles al seu esquelet peptídic. En aquests, es van alternant un enllaç amida i un anell de triazole entre els diferents aminoàcids (Esquema 1.5).<sup>38</sup>

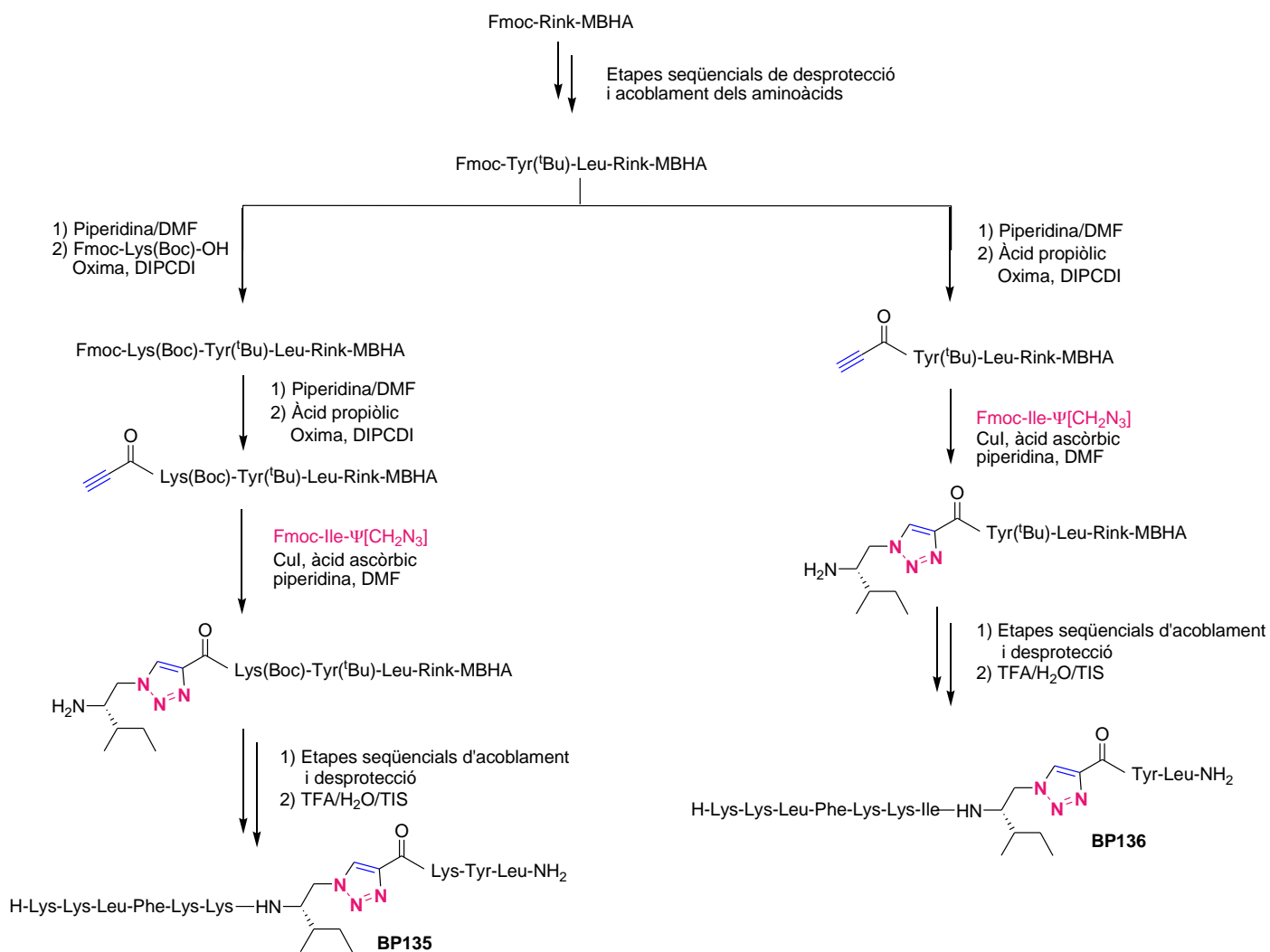


Esquema 1.5: Síntesi de seqüències peptídiques alternant un anell de triazole i un enllaç amida



## 1. Introducció

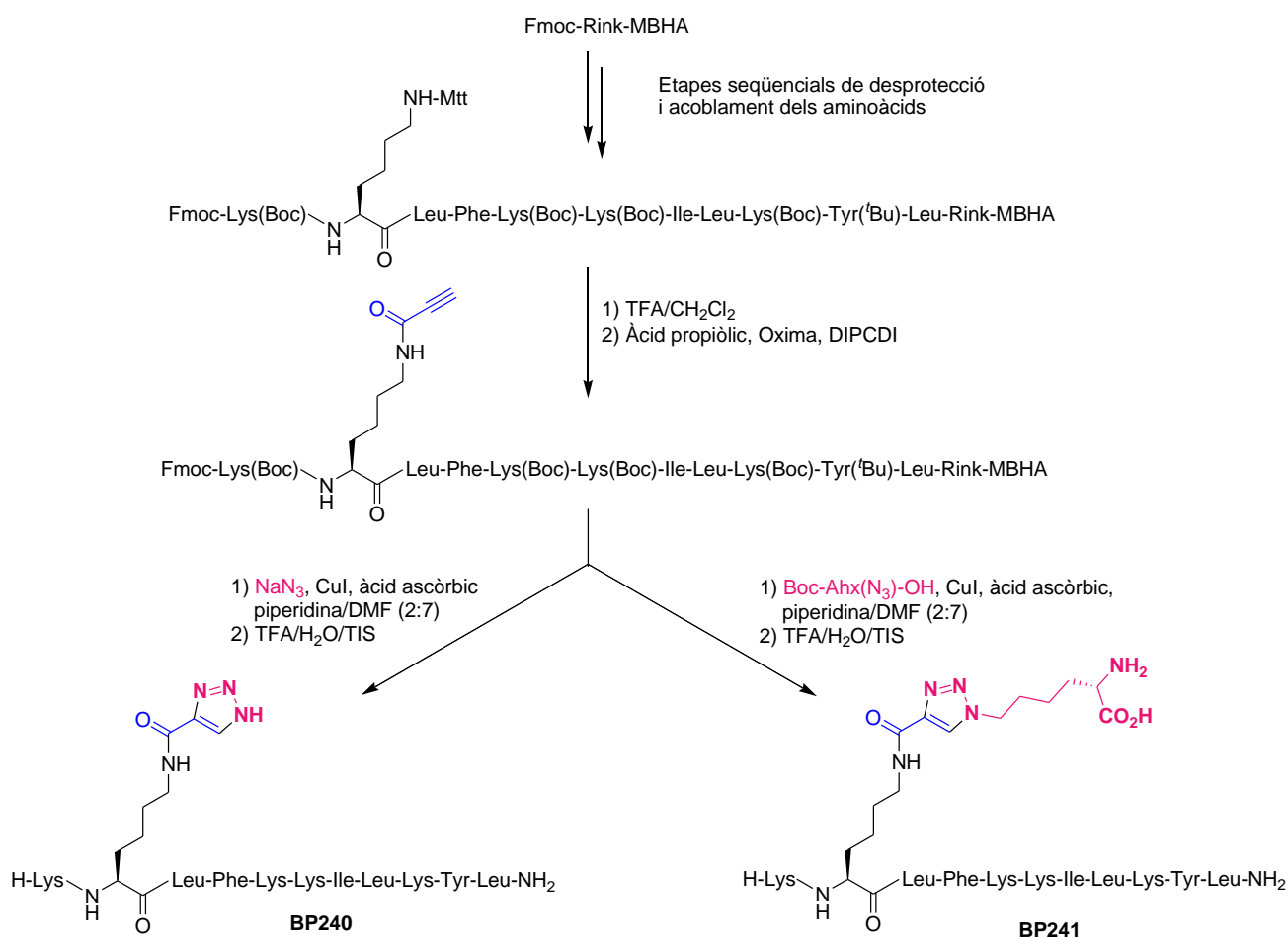
Recentment, Güell i col·laboradors han descrit la síntesi en fase sòlida de peptidotriazoles lineals derivats de l'undecapèptid antimicrobià **BP100** (Esquema 1.6).<sup>39</sup> Dos d'aquests peptidotriazoles incorporen un anell de triazole en l'esquelet peptídic. L'etapa clau de la síntesi va ser la reacció de cicloaddició catalitzada per Cu(I) entre un alquí unit a la resina i l'azida Fmoc-Ile-ψ[CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>].



Esquema 1.6: Síntesi de peptidotriazoles lineals derivats de **BP100** continent un anell de triazole a l'esquelet peptídic

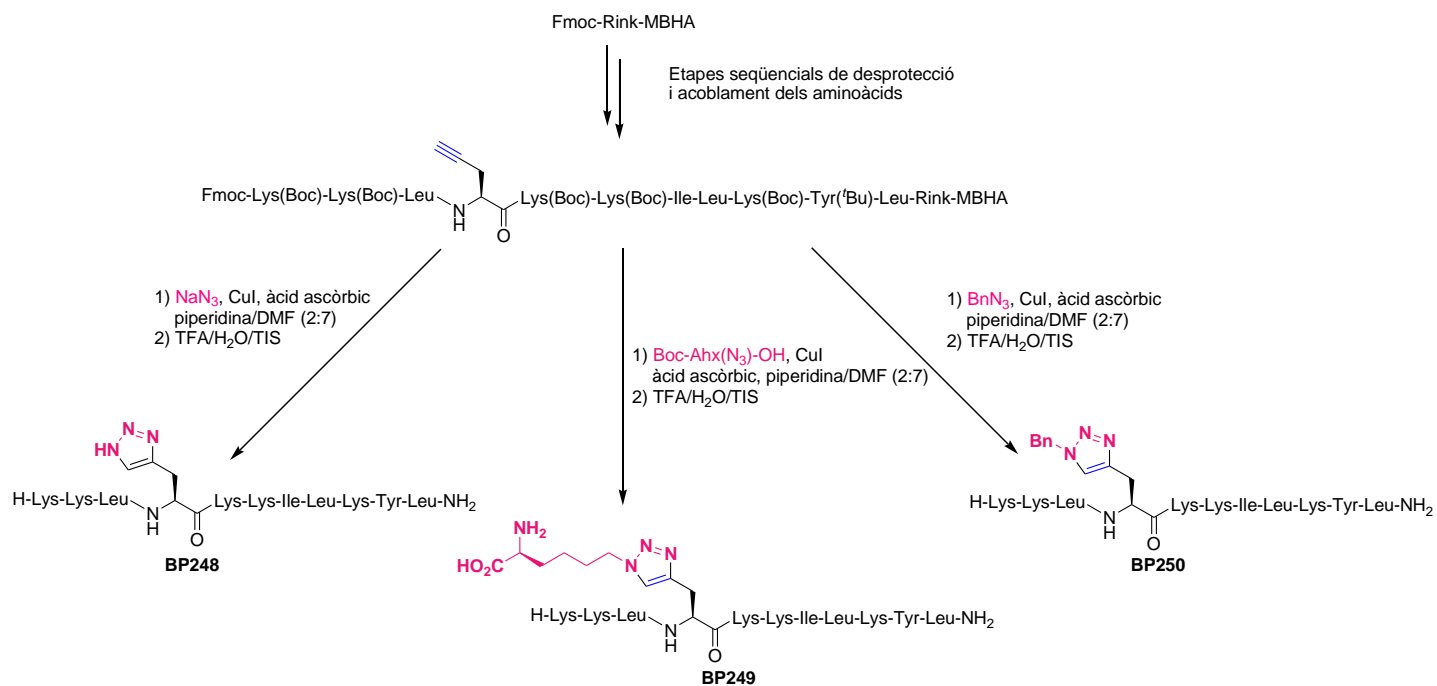
## 1. Introducció

Dins d'aquest mateix estudi també s'ha descrit la síntesi en fase sòlida de peptidotriazoles lineals derivats de **BP100** contenint un anell de triazole a la cadena lateral d'un aminoàcid. D'una banda, s'han modificat la cadena lateral de cada residu de Lys amb un anell de triazole no substituït o bé substituït amb àcid 2-aminohexanoic (Ahx) (Esquema 1.7).<sup>39</sup> D'altra banda, s'ha reemplaçat l'anell de benzè del residu de Phe de la posició 4 de **BP100** per un anell de triazole no substituït o bé substituït amb Ahx o amb un grup benzil (Esquema 1.8). L'etapa clau d'aquestes síntesis ha estat la reacció de cicloadició catalitzada per Cu(I) entre un alquí unit a la resina i les corresponents azides en solució, respectivament. S'ha avaluat l'activitat antibacteriana i la citotoxicitat de tots els peptidotriazoles preparats i s'han identificat seqüències actives amb una baixa citotoxicitat.



Esquema 1.7: Síntesi de peptidotriazoles lineals derivats de **BP100** contenint un anell de triazole a la cadena lateral d'un residu de Lys

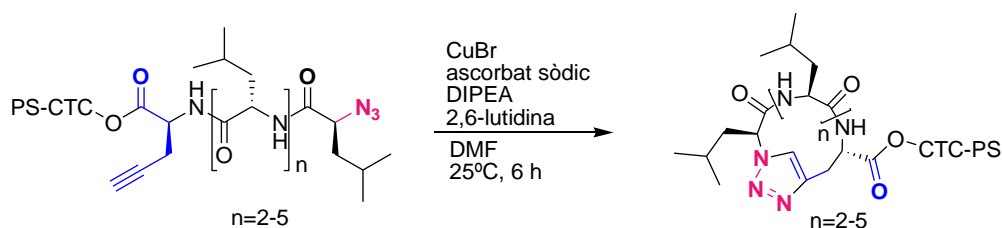
## 1. Introducció



Esquema 1.8: Síntesi de peptidotriazoles lineals derivats de **BP100** contint una triazolilalanina

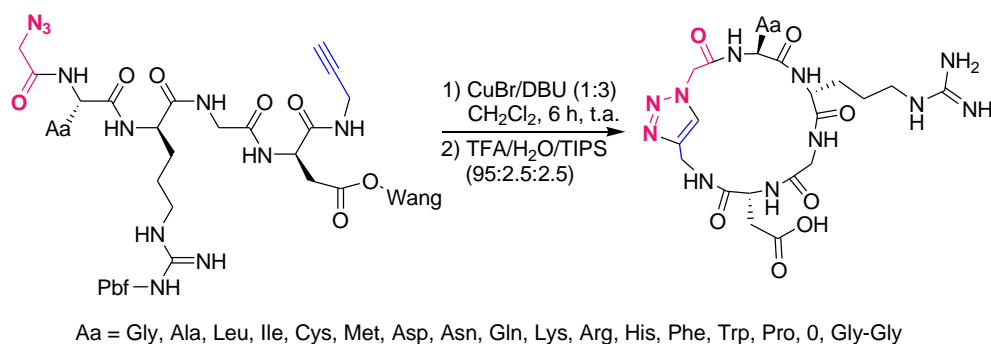
La reacció de cicloadició entre un alquí i una azida també ha permès la síntesi de peptidotriazoles cíclics. En aquest cas, la formació de l'anell de triazole pot tenir lloc entre els extrems N- i C-terminal del corresponent pèptid lineal (ciclació cap-cua), entre dos residus de la cadena principal o entre la cadena lateral d'un aminoàcid i l'extrem N- o C-terminal del pèptid.

Així, per exemple, Turner i col·laboradors han demostrat la utilitat d'aquesta reacció *click* en l'etapa de ciclació cap-cua en fase sòlida de tetra, penta, hexa i heptaciclopeptidotriazoles (Esquema 1.9).<sup>40</sup>



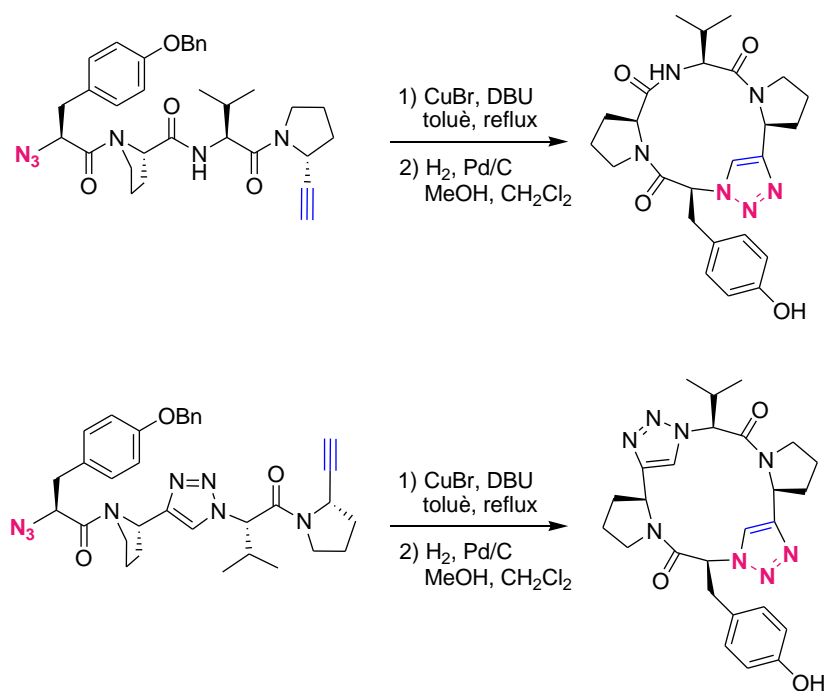
Esquema 1.9: Ciclació cap-cua a través de la formació d'un anell de triazole, on CTC-PS = resina 2-clorotritil.

Seguint una estratègia similar, Liu i col·laboradors han descrit la síntesi en fase sòlida d'una sèrie de peptidomimètics cíclics com a potencials lligands d'integrines, una família de proteïnes d'adhesió a la membrana que tenen un paper important en l'apoptosi induïda en tumors (Esquema 1.10).<sup>30c</sup>



Esquema 1.10: Síntesi d'una sèrie de peptidotriazoles cíclics

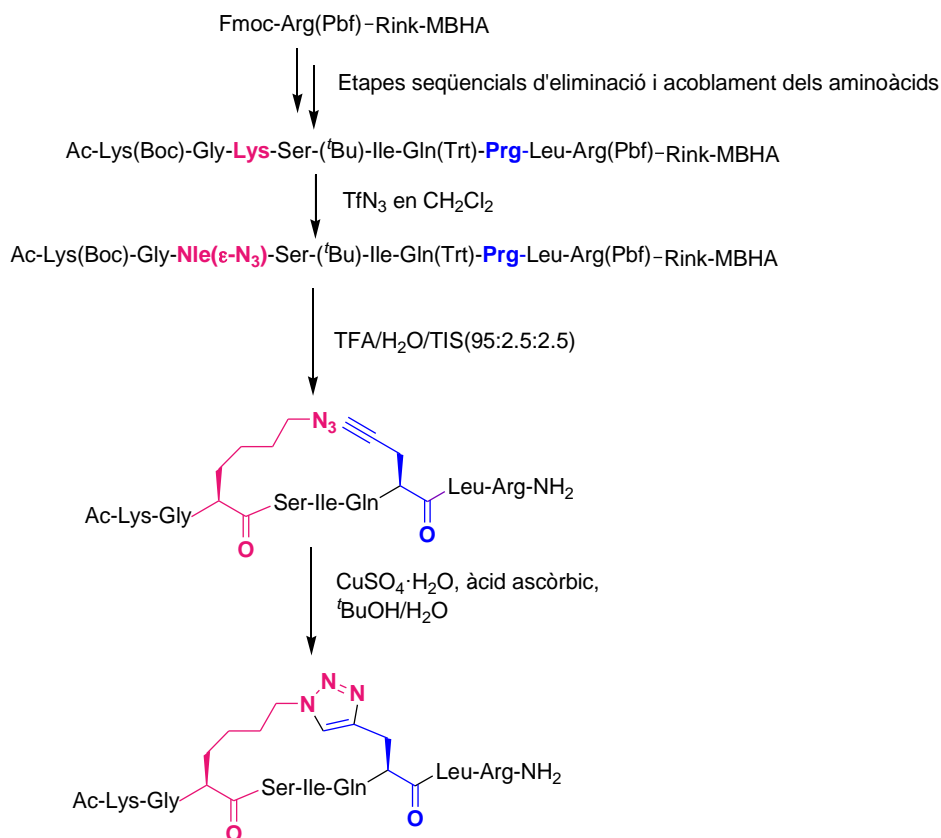
Anàlogament, també s'han preparat peptidotriazoles cíclics en solució. Per exemple, s'han sintetitzat anàlegs de l'inhibidor de la tirosinasa d'origen natural c[Pro-Val-Pro-Tyr] contenint un anell de triazole. S'ha observat que aquests anàlegs mantenen l'activitat inhibidora, demostrant així l'eficàcia de l'isòmer 1,4 de l'anell d'1,2,3-triazole com a isòster de l'enllaç peptídic (Esquema 1.11).<sup>30e</sup>



Esquema 1.11: Síntesi d'anàlegs del pèptid natural c[Pro-Val-Pro-Tyr]

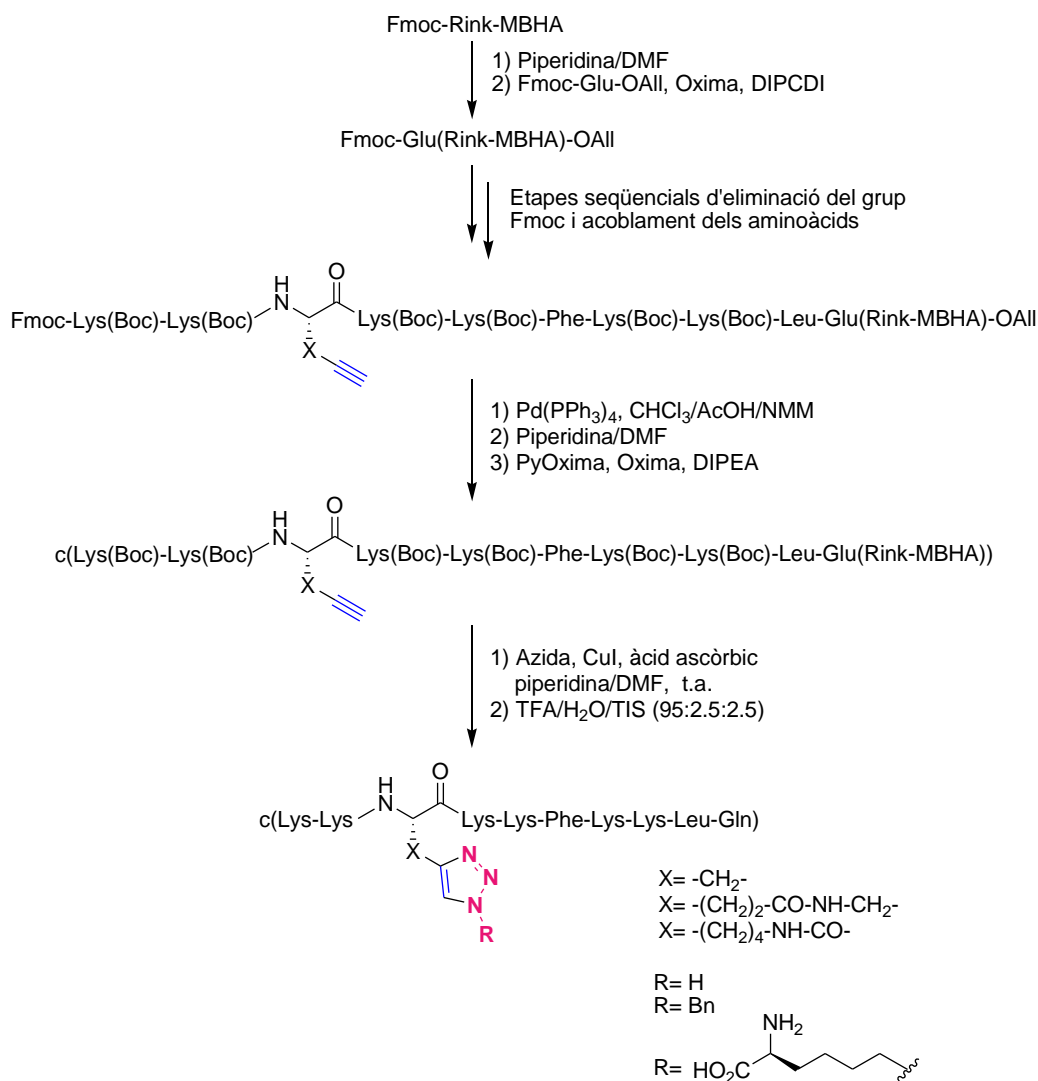
## 1. Introducció

L'any 2008, Cantel i col·laboradors han descrit la síntesi de peptidotriazoles cíclics a través d'una reacció de cicloadició 1,3-dipolar intramolecular en solució entre una azida i un alquí no situats als extrems de la seqüència peptídica. Es va observar que l'orientació de les cadenes laterals dels residus de Ser, Gln i Ile no es veu afectada per la introducció de l'anell de triazole (Esquema 1.12).<sup>41</sup>



Esquema 1.12: Síntesi de peptidotriazoles cíclics per formació d'un anell de triazole entre les cadenes laterals de dos aminoàcids no situats als extrems de la seqüència

Güell i col·laboradors han descrit la síntesi en fase sòlida de peptidotriazoles cíclics derivats de c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) incorporant un triazolil aminoàcid a la posició 3 (Esquema 1.13).<sup>42</sup> L'etapa clau d'aquesta síntesi és la cicloadició 1,3-dipolar catalitzada per Cu(I) entre una alquinil o una azido peptidil resina i diferents azides o alquins en solució, respectivament. Els peptidotriazoles resultants han estat testats *in vitro* enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. S'ha vist que la incorporació d'un anell de triazole a la cadena lateral d'un aminoàcid de la seqüència peptídica, en general, manté o disminueix en un grau l'activitat antibacteriana i redueix la toxicitat enfront cèl·lules eucariotes.



Esquema 1.13: Síntesi de peptidotriazoles cíclics derivats de **BPC194** per reacció d'una alquiniil peptidil resina i diferents azides en solució

#### 1.5.4. Pèptids multivalents

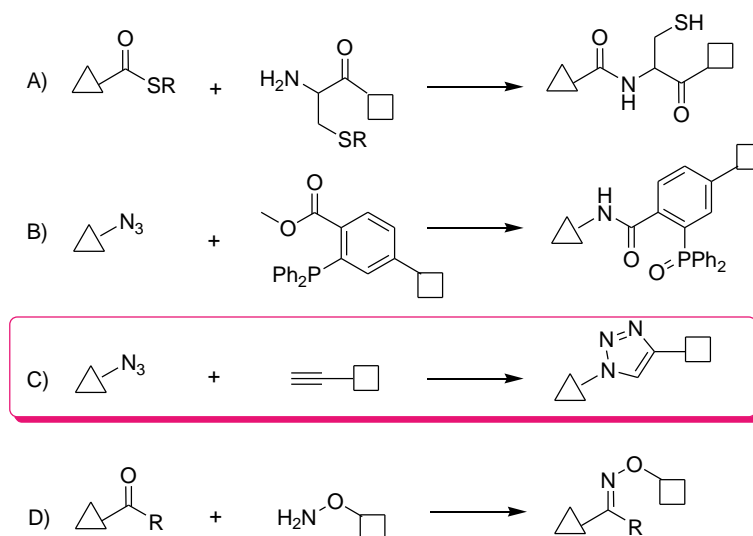
Un dels principals problemes associats als pèptids antimicrobians és el fet que són necessàries dosis molt elevades per assolir una adequada activitat biològica. Això és degut, d'una banda, a la seva limitada estabilitat als enzims proteolítics *in vivo*. D'altra banda, per a què els pèptids actuïn de manera eficient a nivell de membrana microbiana es requereix la presència d'una elevada concentració de pèptid. Una estratègia per evitar l'ús de quantitats altes de pèptids consisteix en unir diverses còpies de les seqüències peptídiques per formar espècies multimèriques o multivalents. Es proposa que aquests pèptids multivalents interactuen més fàcilment amb la membrana que el monòmer corresponent, la qual cosa significa que la concentració mínima necessària per l'activitat es redueix.<sup>43</sup> En els darrers

## 1. Introducció

anys, s'ha estudiat la combinació de lligands de baixa afinitat per una diana biològica, com pèptids, carbohidrats o proteïnes, per donar espècies multivalents amb elevada afinitat i que poden ser considerades com a nous candidats terapèutics.<sup>43d</sup>

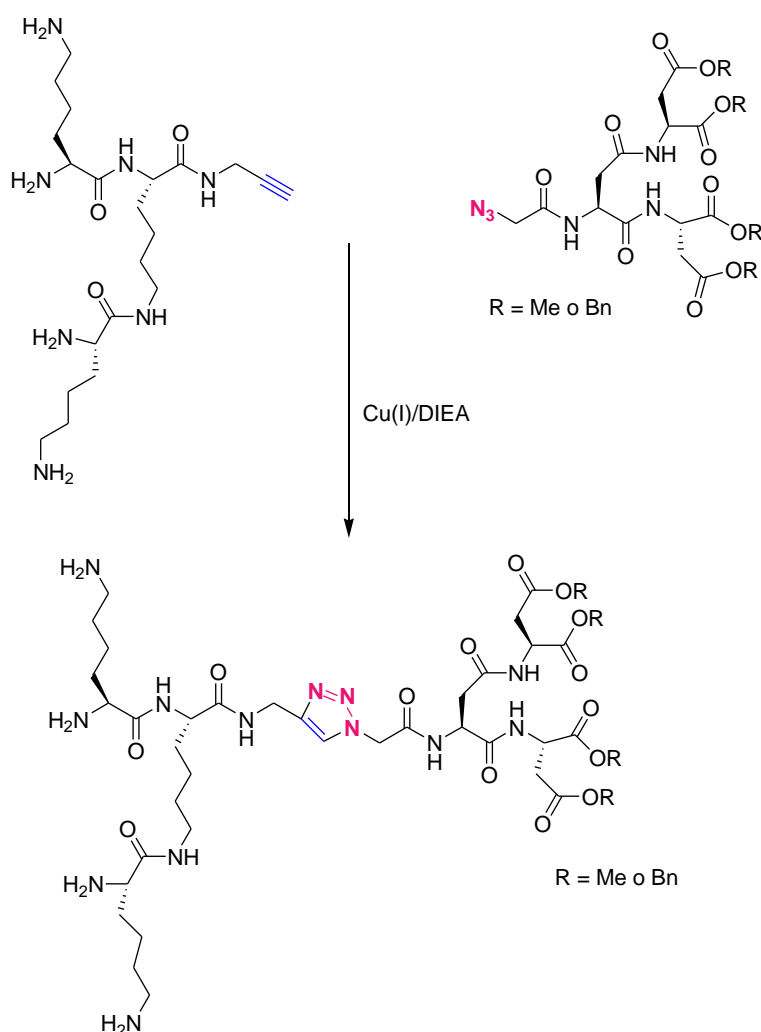
La preparació de biomolècules amb un cert grau de complexitat, com són els compostos multivalents, requereixen sistemes de protecció molt eficients. Per tal de facilitar la síntesi d'aquests tipus de compostos, els científics han desenvolupat estratègies basades en reaccions quimioselectives. Aquestes reaccions permeten la formació selectiva d'un enllaç covalent entre determinats grups funcionals de molècules biològiques complexes sense haver-ne de protegir la resta. Gràcies al desenvolupament d'aquestes reaccions, la síntesi de compostos multivalents a partir de fragments desprotegits ha esdevingut sintèticament més fàcil.<sup>44</sup>

Les reaccions quimioselectives més àmpliament utilitzades en la conjugació de biomolècules són la reacció entre un residu de cisteïna i un tioèster, coneguda com *native chemical ligation* (Esquema 1.14A), la reacció de Staudinger entre una azida i una triarilfosfina (Esquema 1.14B), la cicloadició catalitzada per Cu(I) entre una azida i un alquí per formar un anell de triazole (Esquema 1.14C) i la reacció de formació d'una d'oxima entre un aldehyd o cetona i un grup aminooxi (Esquema 1.14D).<sup>45</sup>



Esquema 1.14: Reaccions quimioselectives per a la conjugació de biomolècules

En aquesta tesi s'ha emprat la reacció *click* de cicloaddició [3+2] entre una azida i un alquí catalitzada per Cu(I) per a la preparació de pèptids multivalents. A la literatura existeixen molts exemples de l'aplicació d'aquesta reacció per la síntesi d'estructures biomimètiques complexes. Per exemple, l'any 2011, Haridas i col·laboradors han descrit la síntesi de dendrímers peptídics asimètrics per conjugació de dos dendrons peptídics, l'un basat en l'àcid aspàrtic i que incorpora un grup azida en l'extrem N-terminal, i l'altre basat en l'aminoàcid Lys i que incorpora una propargilamina a l'extrem C-terminal (Esquema 1.15).<sup>46</sup> La unió d'aquests dendrons a través d'una reacció de cicloaddició s'ha dut a terme amb els residus de Lys desprotegits.

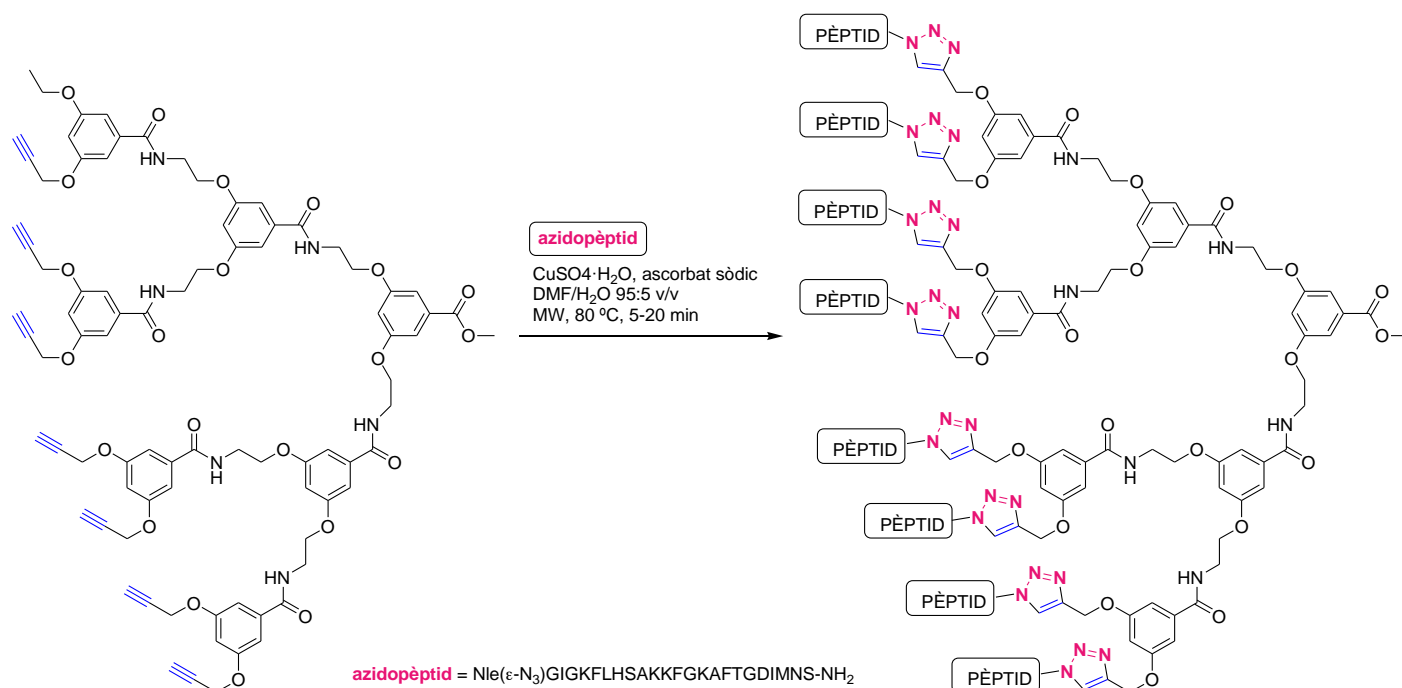


Esquema 1.15: Síntesi de dendrímers asimètrics



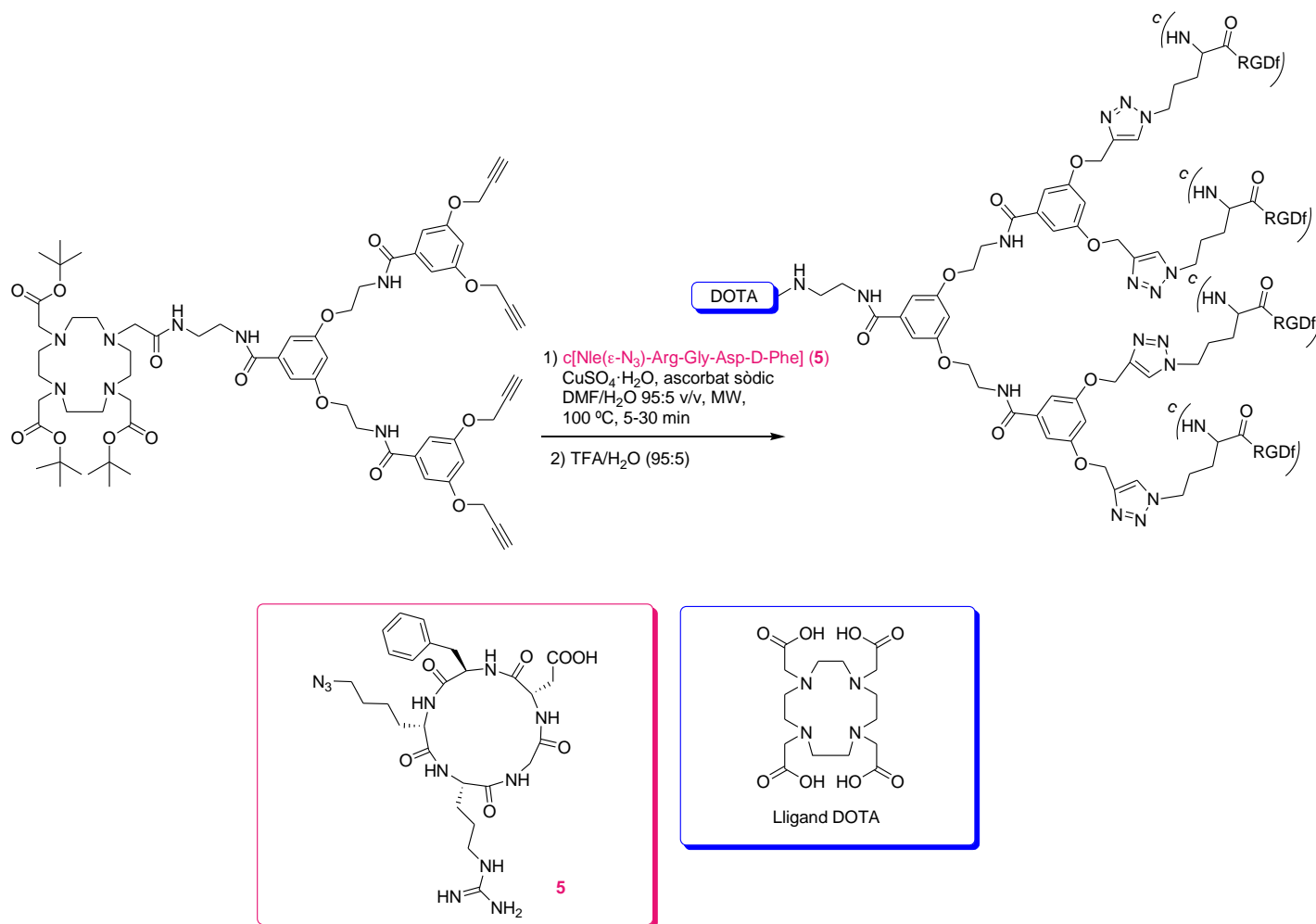
## 1. Introducció

Arnusch i col·laboradors, l'any 2007, han sintetitzat formes divalents, tetravalents i octavalents de la magainina 2 utilitzant dendrímers consistents en unitats repetides derivades de l'àcid 3,5-di(2-aminoetoxi)benzoic i que incorpora grups propargílics (Esquema 1.16).<sup>43b,47</sup> Les molècules de nucli dendrític s'uneixen covalentment al pèptid gràcies a un acoblament regió i quimiosselectiu entre els grups alquí del nucli dendrític i un grup azida present a la magainina. S'ha analitzat l'eficàcia d'aquests dendrímers per formar porus en vesícules unilaminars.



Esquema 1.16: Síntesi de derivats octavalents de magainina 2

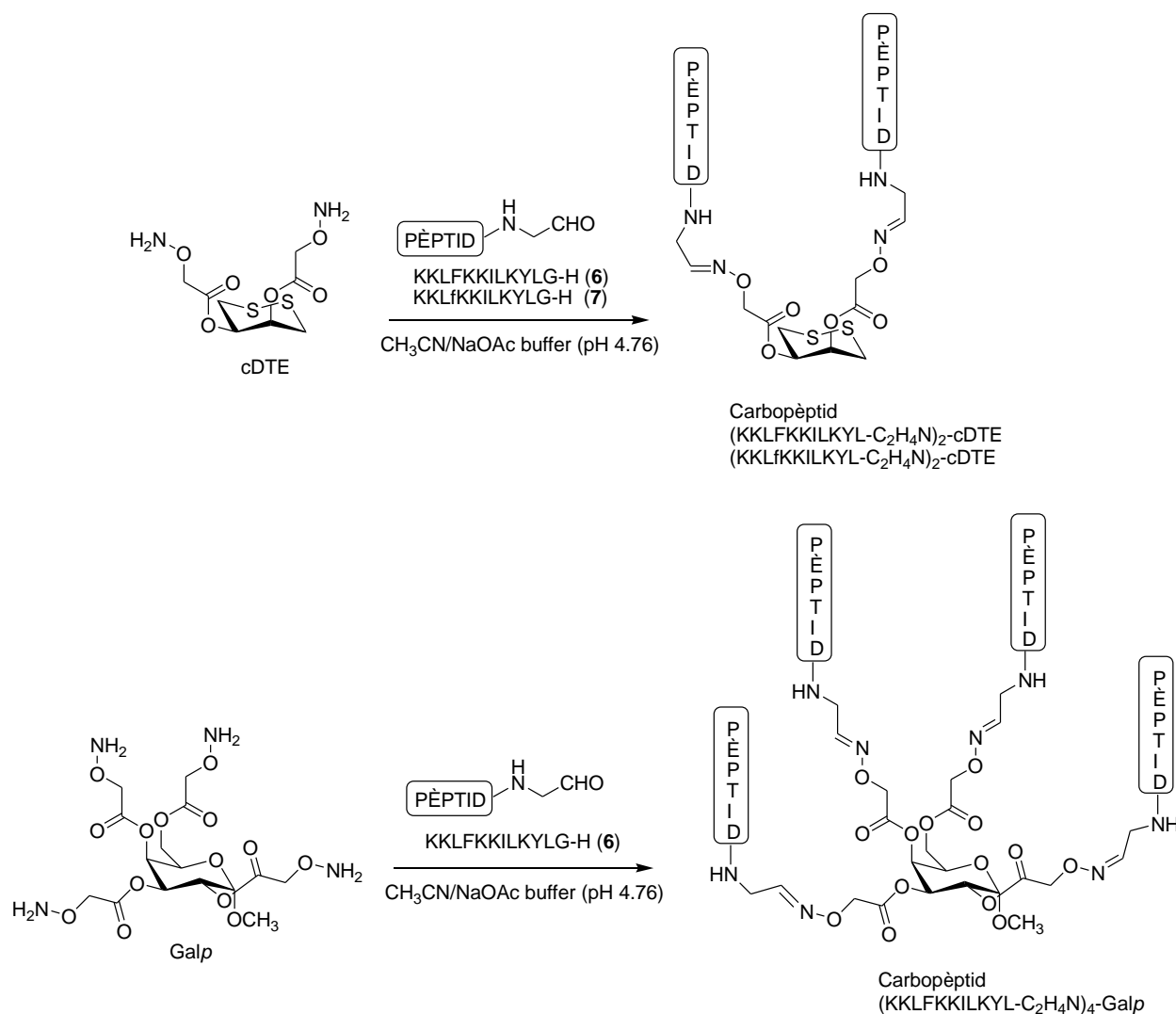
Dijkgraaf i col·laboradors han descrit el disseny i la síntesi d'una sèrie de dendrímers peptídics monomèrics, dimèrics i tetramèrics contenint el lligand DOTA i unitats del pèptid cíclic c(Lys-Arg-Gly-Asp-D-Phe) (Esquema 1.17).<sup>48</sup> Aquests dendrímers s'han preparat per reacció d'un dendrímer incorporant el lligand DOTA i grups alquil terminal amb el grup azido del pèptid c[Nle(ε-N<sub>3</sub>)-Arg-Gly-Asp-D-Phe] (**5**) mitjançant una cicloadició 1,3-dipolar catalitzada per Cu(I) i assistida per irradiació microones. El lligand DOTA s'ha unit al dendrímer per formació d'un enllaç amida entre un dels grups àcid carboxílic d'aquest lligand i el grup amino del nucli dendrític.



Esquema 1.17: Síntesi d'un dendrímer tetraivalent contenint unitats de  $c(\text{KRGDf})$  i el lligand DOTA

L'any 2012, Güell i col·laboradors han descrit el disseny i la síntesi d'estructures quimèriques contenint dues o quatre còpies dels pèptids antimicrobians  $\text{KKLFKKILKYL-NH}_2$  (**BP100**) o  $\text{KKLfKKILKYL-NH}_2$  (**BP143**) unides a una unitat de cicloditioeritritol (cDTE) o de galactopiranososa (Galp).<sup>49</sup> La síntesi ha implicat la preparació dels corresponents pèptids aldehid **6** i **7** i derivats de **BP100** i **BP143**, respectivament. Aquests pèptids aldehid  $\text{KKLFLILKYL-G-H}$  (**6**) i  $\text{KKLfKKILKYL-G-H}$  (**7**) s'han acoblat al corresponent carbohidrat funcionalitzat amb un grup aminoòxi per formació d'un enllaç oxima (Esquema 1.18). Els carbopèptids resultants s'han testat enfront bacteris fitopatògens humans i s'ha avaluat la seva citotoxicitat enfront cèl·lules eucariotes. Els compostos han mostrat valors de CMI més baixos que els pèptids de partida enfront els bacteris analitzats. Els carbopèptids derivats de cDTE i Galp contenint dues o quatre còpies de **BP100**, respectivament han resultat ser de dues a vuit vegades més actius que el corresponent pèptid monomèric.

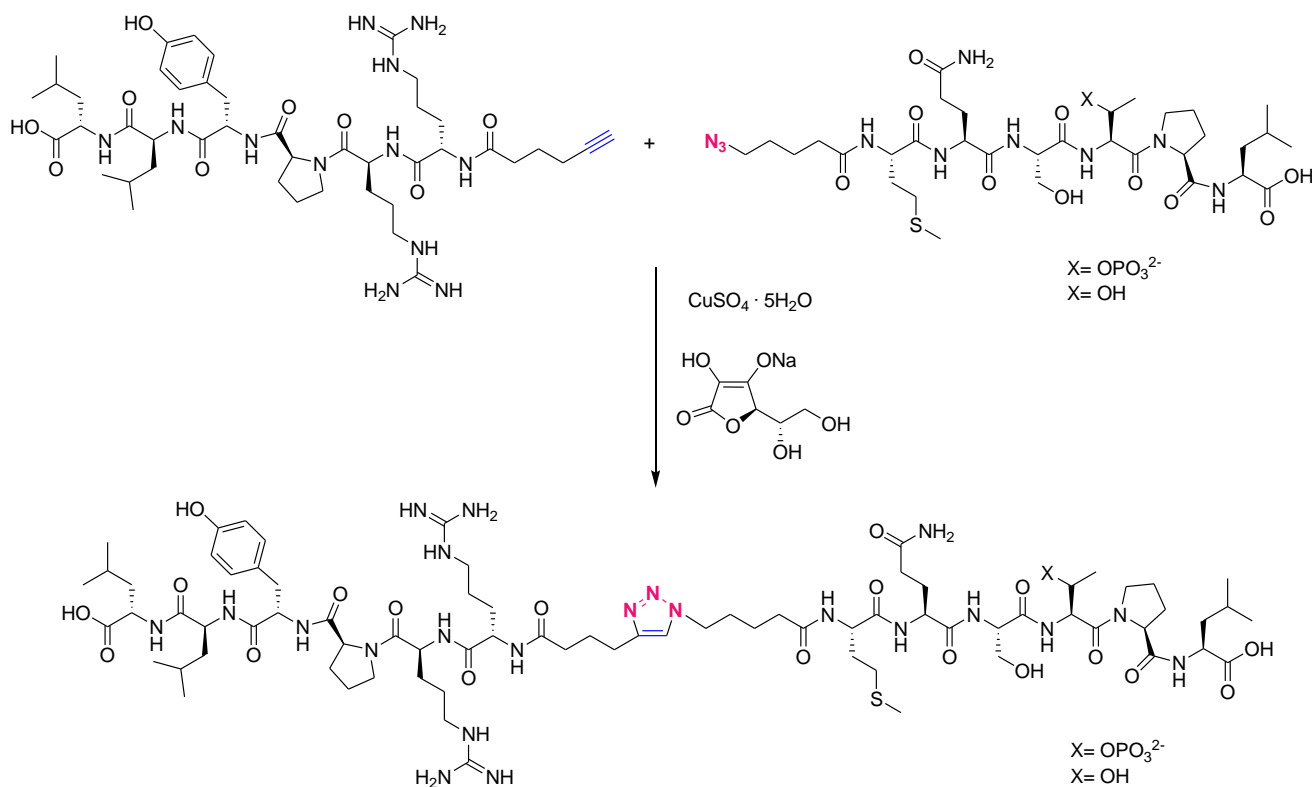
## 1. Introducció



Esquema 1.18: Síntesi de carbopéptids contenint dues o quatre còpies dels pèptids antimicrobians **BP100** i **BP143**

D'altra banda, s'han descrit pèptids homo i heterodimèrics que resulten de la unió de dues seqüències peptídiques iguals o diferents. S'ha observat que la unió covalent entre dues cadenes reforça l'efecte individual d'aquestes, millorant-ne l'activitat biològica, i augmenta l'estabilitat enfront la degradació per proteases i la solubilitat.<sup>50</sup> Com a exemple, Ritche i col·laboradors han descrit la síntesi de fosfopèptids heterodimèrics contenint neurotensina(8-13) mitjançant una reacció *click* (Esquema 1.19). S'ha determinat l'afinitat d'unió d'aquests dímers al receptor-1 de la neurotensina (NTR1), un diana biològica important pel diagnòstic i tractament del càncer.<sup>50a</sup>

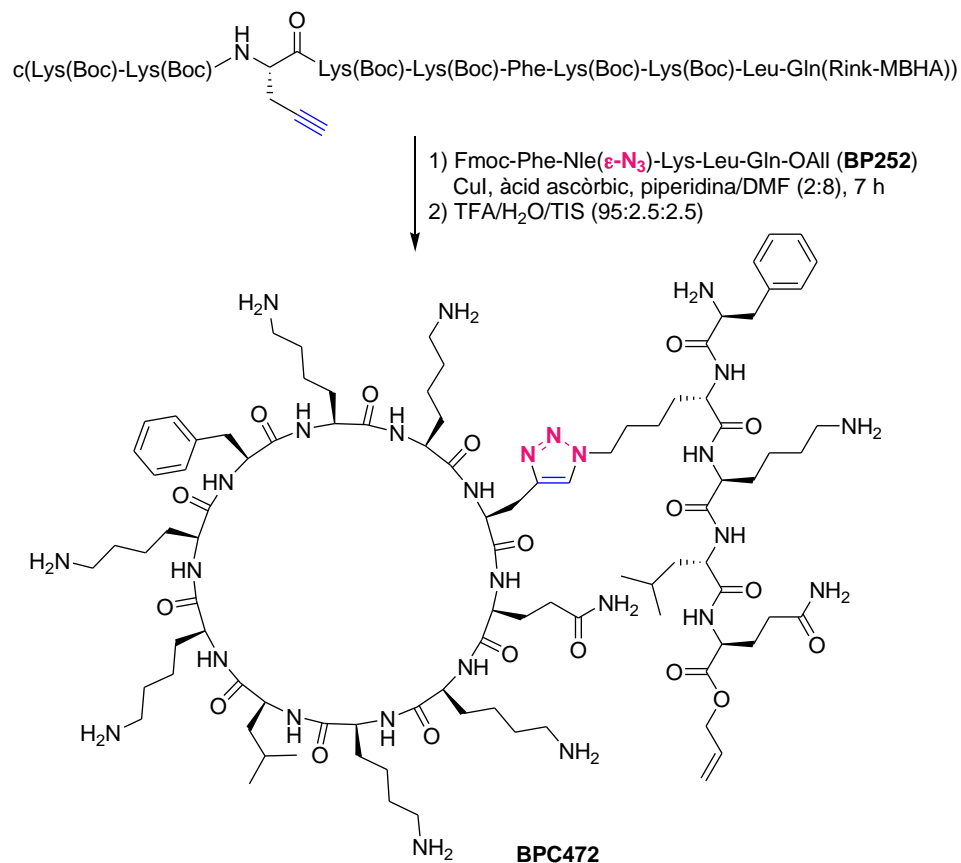
## 1. Introducció



Esquema 1.19: Exemple de síntesi de dos pèptids heterodimèrics mitjançant una reacció click

Un altre exemple de pèptid heterodimèric és **BPC472**, descrit l'any 2013 per Güell i col·laboradors (Esquema 1.20). La seva síntesi ha consistit en la unió d'una alquínil peptidil resina cíclica i la seqüència lineal **BP252** a través d'un anell d'1,2,3-triazole.<sup>42</sup> La formació d'aquest anell s'ha realitzat mitjançant una reacció de cicloadició en presència d'àcid ascòrbic i CuI en piperidina/DMF (2:8) sota agitació a temperatura ambient durant 7 h. S'ha avaluat l'activitat de **BPC472** enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, i els resultats s'han comparat amb els del ciclodecapèptid **BPC194**. El pèptid conjugat **BPC472** ha resultat ser tan actiu com **BPC194** enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (CMI entre 3.1 i 6.2  $\mu\text{M}$ ), però menys actiu enfront *E. amylovora* i *P. syringae* pv. *syringae* (CMI >50  $\mu\text{M}$ ). A més, **BPC472** ha mostrat una menor citotoxicitat que **BPC194** enfront les cèl·lules eucariotes (6% d'hemòlisi a 375  $\mu\text{M}$ ).

## 1. Introducció



Esquema 1.20: Síntesi del pèptid conjugat **BPC472**

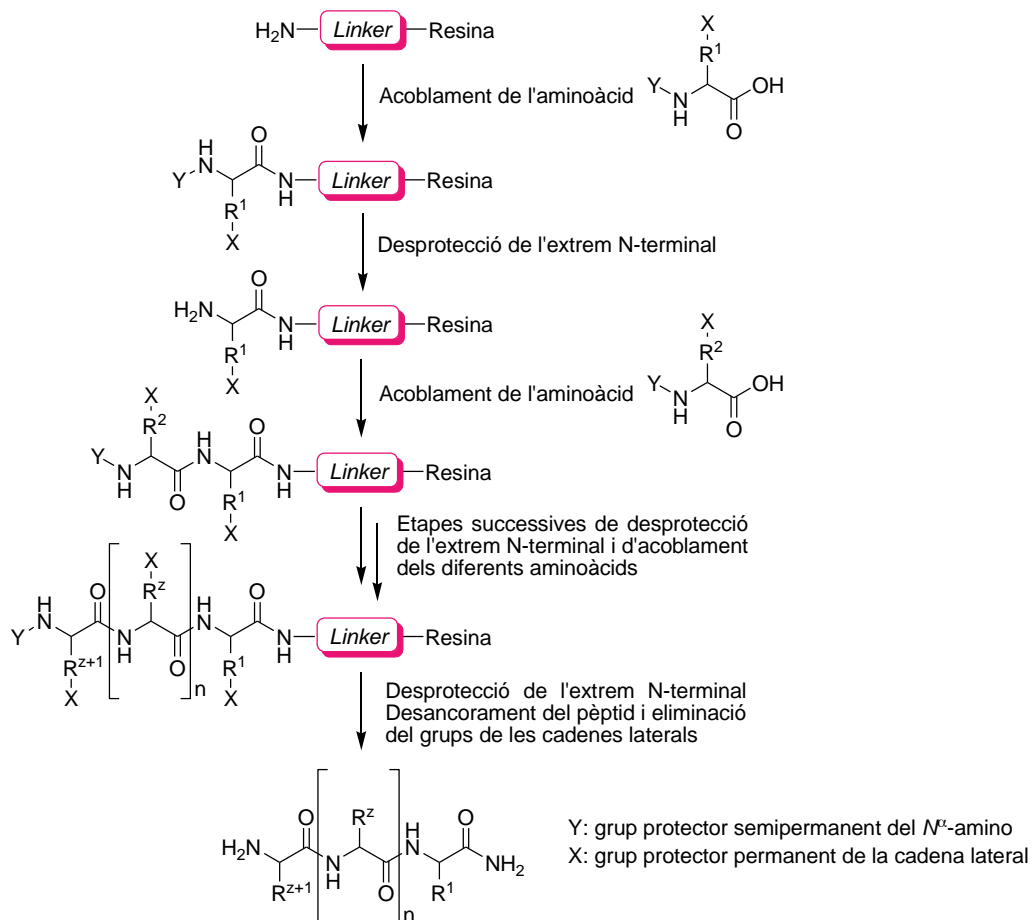
### 1.6. Síntesi de pèptids en fase sòlida

#### 1.6.1. Estratègia general

La síntesi en fase sòlida, desenvolupada per Robert Bruce Merrifield (Premi Nobel 1984), és el mètode més utilitzat actualment per a preparar pèptids.<sup>51</sup> Aquesta metodologia sintètica presenta uns certs avantatges respecte la síntesi en dissolució. En ella s'utilitza un excés de reactius, cosa que permet que les reaccions siguin quantitatives. Aquest excés de reactius i els subproductes solubles es poden separar de la mescla de reacció mitjançant una senzilla filtració. Segons aquesta metodologia, es poden utilitzar dissolvents amb punts d'ebullició alts sense necessitat d'haver d'evaporar-los, com *N*-metilpirrolidina (NMP), *N,N'*-dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfòxid (DMSO). A més, les reaccions es realitzen sempre dins del mateix recipient, cosa que evita pèrdues de pèptid per manipulació. D'altra banda, la síntesi en fase sòlida es pot automatitzar fàcilment i és un mètode convenient per ser utilitzat en química combinatòria.<sup>52</sup>

La síntesi de pèptids en fase sòlida es comença a partir de l'extrem C-terminal del pèptid i es basa en la unió seqüencial d'aminoàcids a un suport polimèric insoluble a través d'etapes successives d'acoblament dels aminoàcids i d'eliminació del grup protector del grup  $\alpha$ -amino (Esquema 1.21). Un cop completada la cadena peptídica, el pèptid es desancora del suport sòlid per trencament de l'enllaç entre el pèptid i el suport polimèric. En aquesta etapa, també es desprotegeixen les cadenes laterals dels aminoàcids, obtenint-se el pèptid desitjat.

## 1. Introducció



Esquema 1.21: Esquema general de síntesi de pèptids lineals en fase sòlida

El suport sòlid és una matriu polimèrica insoluble sobre la qual es realitzen les diferents reaccions de síntesi en fase sòlida. Aquest suport ha de ser inert als reactius i dissolvents usats; ha de ser estable físicament per permetre l'agitació i centrifugació; ha d'estar format per partícules d'una mida i forma que permetin la seva manipulació i la ràpida filtració dels líquids i, a més, cal que tinguin un bon inflament en els dissolvents utilitzats per a què les posicions reactives siguin més accessibles i, per tant, que la síntesi sigui més efectiva. Existeixen diferents tipus de polímers usats en la síntesi en fase sòlida: polímers orgànics, com, per exemple, poliestirè entrecruat amb divinilbenzè o polietilenglicol, i suports inorgànics, com grafit, sílica o alumina.<sup>53</sup>

Una de les resines més utilitzades en la síntesi d'amines i amides, i que presenta un bon grau d'inflament en diclorometà, acetonitril, DMF i NMP, és la 4-metilbenzidrilamina (MBHA) (Figura 1.14). Es tracta d'un suport microporós, basat en un copolímer de poliestirè amb un 1% de divinilbenzè funcionalitzat amb un grup 4-metilbenzidrilamino.

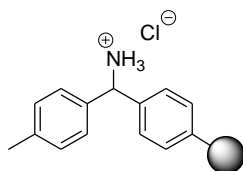


Figura 1.14: Resina MBHA

El *linker* és un compost bifuncional que s'uneix, d'una banda, al suport sòlid polimèric i, de l'altra, al primer aminoàcid de la seqüència peptídica. La unió del *linker* amb el suport ha de ser estable a les condicions de síntesi i de desancorament, mentre que la seva unió amb el pèptid ha de ser làbil en les condicions de desancorament.<sup>52,54</sup> S'ha descrit una gran varietat de *linkers* i la seva elecció depèn de les condicions de desancorament que es vulguin utilitzar i del grup funcional desitjat a l'extrem C-terminal del pèptid. El *linker* utilitzat en aquest treball ha estat l'àcid 4-[(*R,S*)- $\alpha$ -[1-(9*H*-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil] fenoxiacètic (Fmoc-Rink) (Figura 1.15). Aquest *linker* és àcid làbil i permet el desancorament del pèptid del suport per tractament amb àcid trifluoroacètic (TFA)/H<sub>2</sub>O/triisopropilsilà (TIS) (95:2.5:2.5). La utilització d'aquest *linker* porta a l'obtenció de pèptids amb l'extrem C-terminal derivatitzat en forma d'amida.

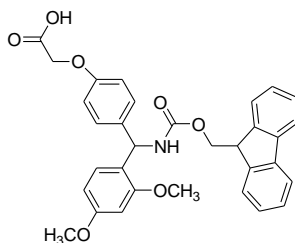


Figura 1.15: Linker Fmoc-Rink

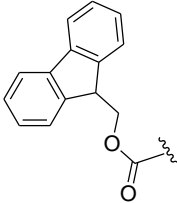

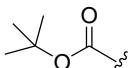

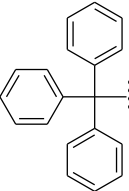
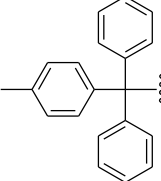
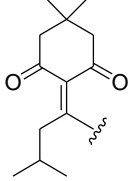
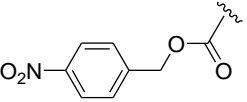
En la síntesi de pèptids en fase sòlida és necessari que els aminoàcids estiguin protegits adequadament per tal de dirigir la formació de l'enllaç amida entre el grup  $\alpha$ -amino d'un aminoàcid i l' $\alpha$ -carboxílic del següent. Una de les estratègies de protecció més usual és la 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)/*tert*-butil (*t*Bu). Aquests dos grups protectors són ortogonals, és a dir, s'eliminen a través de mecanismes de reacció diferents i, per tant, es pot eliminar un sense modificar l'altre, i en qualsevol ordre (Taula 1.5). El grup Fmoc actua com a grup protector temporal del grup  $\alpha$ -amino dels aminoàcids, de manera que s'elimina després de cada etapa d'acoblament per tractament en medi bàsic (piperidina/DMF). El grup *t*Bu actua com a grup protector permanent que s'elimina al final de la síntesi, quan es desancora el pèptid del suport sòlid. S'usa per la protecció de grups hidroxil i carboxil en forma d'èter i



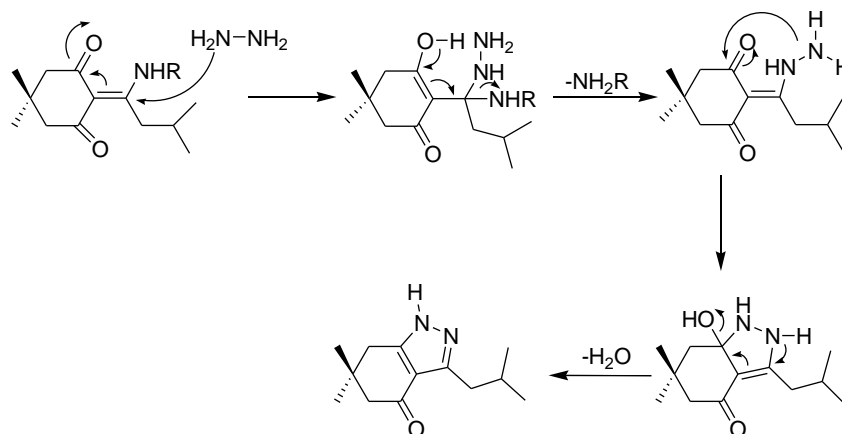
## 1. Introducció

ester, respectivament. També s'utilitza per protegir el grup amino de la cadena lateral d'aminoàcids com la Lys en forma de carbamat, concretament, en forma de *tert*-butiloxicarbonil (Boc). Els grups <sup>t</sup>Bu i Boc s'eliminen en medi àcid per tractament amb un 95% de TFA.<sup>55</sup>

Taula 1.5: Grups protectors utilitzats en aquesta tesi i les seves condicions d'eliminació

Nom del grup protector	Estructura	Condicions d'eliminació
9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)		30% Piperidina
<i>tert</i> -Butil ( <sup>t</sup> Bu)		95% TFA
<i>tert</i> -Butiloxicarbonil (Boc)		95% TFA
Al·lil (All)		Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>
Tritil (Tr)		1% TFA
4-Metiltritil (Mtt)		1% TFA
1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil (ivDde)		2% Hidrazina
<i>p</i> -Nitrobenzil (pNZ)		SnCl <sub>2</sub>

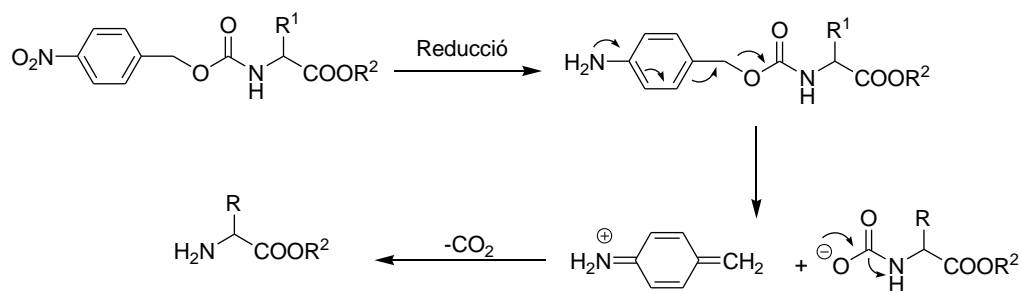
En alguns casos, la síntesi de pèptids requereix l'ús de grups protectors que s'eliminin de manera selectiva. En aquesta tesi s'han utilitzat els grups 4-metiltritol (Mtt), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil (ivDde) i *p*-nitrobenzil (pNZ) per a la protecció del grup  $N^\epsilon$ -amino de residus de Lys. El grup Mtt és més àcid làbil que el grup Boc, de manera que s'elimina amb un 1% de TFA, sense afectar el grup Boc ni provocar el desancorament del pèptid del suport.<sup>55,56</sup> El grup protector ivDde s'elimina amb un 2% d'hidrazina i és estable en les condicions d'eliminació del grup Fmoc (Esquema 1.22).<sup>55,57</sup> El grup ivDde és un derivat estèricament impedit del grup 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etil (Dde). Aquest derivat s'ha desenvolupat per tal d'evitar les migracions del grup Dde cap a grups amino lliures de les cadenes laterals de residus de Lys o Orn de la seqüència peptídica. Aquestes migracions s'han observat quan s'elimina el grup Fmoc de pèptids que contenen múltiples Lys o Orn no protegides.<sup>58</sup>



Esquema 1.22: Mecanisme d'eliminació del grup ivDde

El grup *p*-nitrobenzil (pNZ) és ortogonal amb la resta de grups protectors i s'elimina per reducció amb  $\text{SnCl}_2$  en condicions pràcticament neutres en presència de quantitats catalítiques d'àcid. La combinació d'aminoàcids protegits amb Fmoc i pNZ evita les principals reaccions secundàries de l'estratègia Fmoc/<sup>t</sup>Bu associades a l'ús de piperidina, com, per exemple, la formació de dicetopiperazines i aspartamides (Esquema 1.23).<sup>55,59</sup>

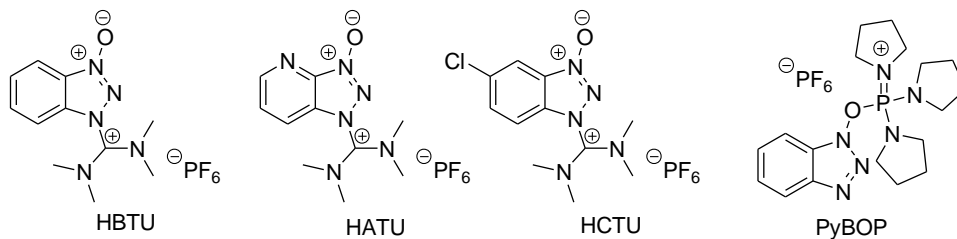
## 1. Introducció



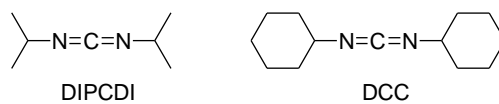
Esquema 1.23: Mecanisme d'eliminació del grup pNZ

La formació d'enllaços amida entre el grup  $\alpha$ -carboxílic d'un aminoàcid i l' $\alpha$ -amino del següent es realitza a temperatura ambient utilitzant reactius d'acoblament que activen *in situ* el grup  $\alpha$ -carboxílic. Un dels tipus de reactius més utilitzats són els derivats de benzotriazole com l'hexafluorofosfat d'*O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni (HBTU), l'hexafluorofosfat d'*O*-(6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni (HCTU), l'hexafluorofosfat d'*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni (HATU) o l'hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-*N*-oxitris(pirrolidin)fosfoni (PyBOP) (Figura 1.16). Tambè s'empren carbodiimides com, per exemple, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) i *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida (DCC).<sup>60</sup> Els derivats que contenen l'anell de benzotriazole són explosius i poden causar reaccions al·lèrgiques com dermatitis o asma.<sup>61</sup> Recentment, s'han descrit alternatives més segures que contenen 2-ciano-2(hidroxiimino)acetat d'etil enlloc de l'anell de benzotriazole, com l'hexafluorofosfat d'1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilaminomorfolino)]uroni (COMU) i l'hexafluorofosfat de *O*-[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetiliden)amino]-oxitris(pirrolidin-1-il)fosfoni (PyOxima).<sup>62</sup> Els acoblaments dels aminoàcids amb aquests darrers reactius es realitzen en presència de l'additiu 2-ciano 2-(hidroxiimino) acetat d'etil (Oxima) (Figura 1.16).

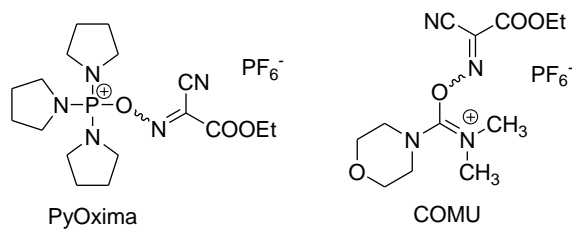
## Derivats de benzotriazole



## Carbodiimides



## Nous reactius d'acoblament



## Additiu

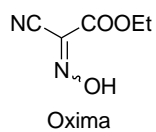
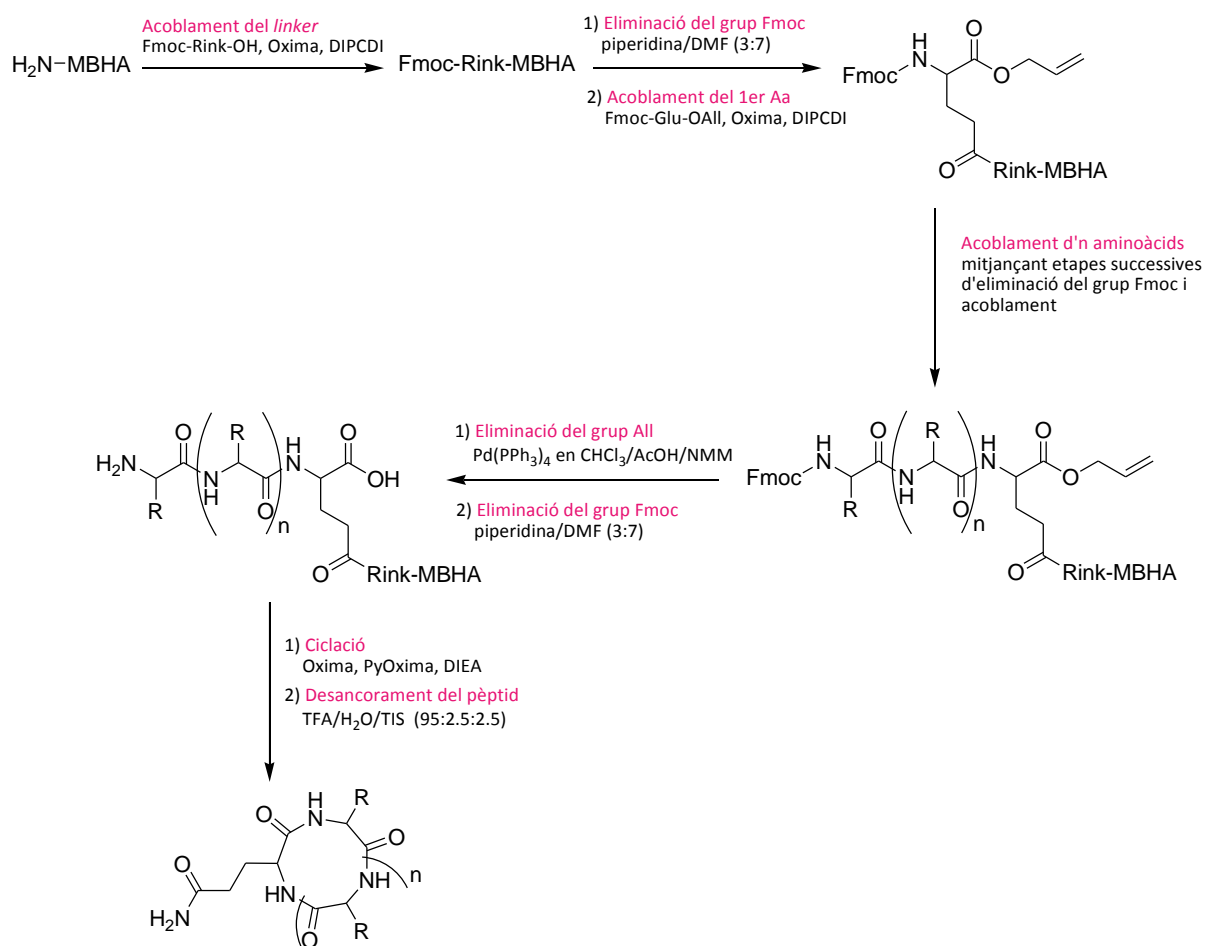


Figura 1.16: Estructura de diferents reactius d'acoblament

## 1. Introducció

### 1.6.2. Síntesi de pèptids cíclics en fase sòlida

Per la síntesi de pèptids cíclics en fase sòlida s'utilitza una estratègia Fmoc/<sup>t</sup>Bu/All. Aquesta estratègia parteix de la unió al suport sòlid d'un aminoàcid trifuncional, com Fmoc-Glu-OAll, a través del grup funcional de la seva cadena lateral (Esquema 1.24). Un cop sintetitzada la corresponent seqüència lineal es procedeix a l'eliminació dels grups protector All i Fmoc dels extrems C- i N-terminals, respectivament. Tot seguit es procedeix a la ciclació per formació d'un enllaç amida entre el grup  $\alpha$ -amino de l'aminoàcid de l'extrem N-terminal i el grup  $\alpha$ -carboxílic del residu d'àcid glutàmic de l'extrem C-terminal.<sup>63</sup> Aquesta etapa es realitza habitualment tractant la resina amb reactius d'acoblament de tipus sal de fosfoni com PyOxima, en presència d'Oxima com additiu i DIEA com a base.



Esquema 1.24: Esquema general de síntesi de pèptids cíclics en fase sòlida

**1.7. Bibliografia**

1. G. N. Agrios, *Plant pathology*, Academic Press, San Diego, California, 5th edn., 2005.
2. J. Cabrefiga, E. Montesinos, *Bacteriology*, 2005, **95**, 1430-1437.
3. V.K. Bajpai, M. J. Cho, S. C. Kang, *J. Phytopathology*, 2010, **158**, 479-486.
4. (a) S. A. Baltzer, M. H. Brown, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **20**, 228-235; (b) K. Ajesh, K. Sreejith, *Peptides*, 2009, **30**, 999-1006; (c) H. Jenssen, P. Hamil, R. E. W. Hancock, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19**, 491-511.
5. (a) V. Teixeira, M. J. Feio, M. Bastos, *Prog. Lipid Res.*, 2012, **51**, 149-177; (b) M. Rahnamaeian, *Plant Signal. Behav.*, 2011, **6**, 1325-1332; (c) P. Nicolas, *FEBS J.*, 2009, **276**, 6483-6496; (d) R. E. W. Hancock, H. G. Sahl, *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**, 1551-1557.
6. (a) M. L. Mangoni, Y. Shai, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2011, **68**, 2267-2280; (b) S. M. Mandal, A. E. A. D. Barbosa, O. L. Franco, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, 338-345; (c) T. Schneider, H. G. Sahl, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2010, **11**, 157-164; (d) T. Schneider, H. G. Sahl, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010, **300**, 161-169; (e) Y. Shai, A. Makovitzky, D. Avrahami, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2006, **7**, 479-486; (f) K. A. Brogden, *Nature Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 238-250.
7. M. R. Yeaman, N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, 2003, **55**, 27-55.
8. (a) S. Rotem, A. Mor, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 1582-1592; (b) O. Toke, *Biopolymers*, 2005, **80**, 717-735.
9. (a) A. Wessolowski, M. Bienert, M. Dathe. *J. Peptide Res.*, 2004, **64**, 159-169; (b) V. Frecer, B. Ho, J. L. Ding, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 3349-3357; (c) S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. J. Hruby, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 2785-2798; (d) Z. Oren, Y. Shai., *Biochemistry*, 2000, **39**, 6103-6114; (e) C. Toniolo, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1990, **35**, 287-300.
10. C. Adessi, C. Soto, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 963-978.
11. (a) D. S. Pedersen, A. Abell, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, **13**, 2399-2411; (b) T. Mogi, K. Kita. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009, **66**, 3821-3826.
12. S. Monroc, E. Badosa, E. Besalú, M. Planas, E. Bardají, E. Montesinos, L. Feliu, *Peptides*, 2006, **27**, 2575-2584.
13. S. Monroc, E. Badosa, L. Feliu, M. Planas, E. Montesinos, E. Bardají, *Peptides*, 2006, **27**, 2567-2574.
14. (a) G. Laverty, M. McLaughlin, C. Shaw, S. P. Gorman, B. F. Gilmore, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2010, **75**, 563-569; (b) M. Strieker, M. A. Marahiel, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 607-

## 1. Introducció

---

- 617; (c) G. Pirri, A. Giuliani, S. F. Nicoletto, L. Pizzuto, A. C. Rinaldi, *Cent. Eur. J. Biol.*, 2009, **4**, 258-273; (d) G. N. Serrano, G. G. Zhanel, F. Schweizer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 2215-2217; (e) A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **60**, 1206-1215; (f) A. Clausell, M. Garcia-Subirats, M. Pujol, M. A. Busquets, F. Rabanal, Y. Cajal, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 551-563; (g) J. Yao, H. Liu, T. Zhou, H. Chen, Z. Miao, C. Sheng, W. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **50**, 196-208; (h) R. Jerala, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2007, **16**, 1159-1169; (i) S. K. Straus, R. E. W. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1215-1223; (j) R. H. Baltz, V. Miao, S. K. Wrigley, *Nat. Prod. Rep.*, 2005, **22**, 717-741; (k) D. Landman, C. Georgescu, D. A. Martin, J. Quale, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008, **21**, 449-465.
15. (a) R. E. W. Hancock, D. S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, **43**, 1317-1323; (b) R. M. Eppard, H. J. Vogel, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1462**, 11-28.
16. R. H. Baltz, *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 2009, **13**, 144-151.
17. (a) M. Vaara, *Curr. Opin. Pharma.*, 2009, **9**, 571-576; (b) P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **60**, 1206-1215; (c) L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, R. E. W. Hancock, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 3317-3321.
18. J.M. Raaijmakers, I. de Bruijn, O. Nybroe, M. Ongena, *FEMS Microbiol.*, 2010, **34**, 1037-1062.
19. (a) E. Arrebola, R. Jacobs, L. Korsten, *J. Appl. Microbiol.*, 2010, **108**, 386-395; (b) L. Rodrigues, I. M. Banat, J. Teixeira, R. Oliveira, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, **57**, 609-618; (c) R. Maget-Dana, F. Peypoux, *Toxicology*, 1994, **87**, 151-174.
20. (a) R. E. Schwartz, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2001, **11**, 1761-1772; (b) P. Diomedi, *Rev. Chil. Infect.*, 2004, **21**, 89-101; (c) D. Chappelletty, K. Eiselstein-Mckitrick, *Pharmacotherapy*, 2007, **27**, 369-388.
21. I. Ng-Choi, M. Soler, I. Güell, E. Badosa, J. Cabrefiga, E. Bardají, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, *Prot. Pept. Lett.*, 2014, **21**, 357-367.
22. I. Güell, J. Cabrefiga, E. Badosa, R. Ferre, M. Talleda, E. Bardají, M. Planas, L. Feliu, E. Montesinos, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 2667-2675.
23. Z. Oren, Y. Shai, *Biochemistry*, 1997, **36**, 1826-1835
24. K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 1687-1692.
25. S. Y. Hong, J. E. Oh, K. H. Lee, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, **58**, 1775-1780.
26. Z. Oren, J. Hong, Y. Shai, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 14643-14649.
27. I. Ng-Choi, M. Soler, V. Cerezo, E. Badosa, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, **23**, 4321-4332.

28. R. Ferre, E. Badosa, L. Feliu, M. Planas, E. Montesinos, E. Bardají, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 3302-3308.
29. S. E. Blondelle, K. Lohner, *Biopolymers*, 2000, **55**, 74-87.
30. (a) W. Q. Fan, A. R. Katritzky, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 4 (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, V. E. F. B. Scriven), Elsevier Science, Oxford, 1996, 1-126; (b) M. Aufort, J. Herscovici, P. Bouhours, N. Moreau, C. Girard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1195-1198; (c) Y. Liu, L. Zhang, J. Wang, Y. Li, Y. Xu, Y. Pan, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 10728-10734; (d) G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.*, 2008, **28**, 278-308; (e) V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 971-975; (f) D. D. Díaz, M. G. Finn, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, C. J. Hawker, *An. Quim.*, 2008, **104**, 173-180; (g) H. Li, R. Aneja, I. Chaiken, *Molecules*, 2013, **18**, 9797-9817; (h) J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1325-1337.
31. (a) M. Scrima, A. Chevalier-Isaad, P. Rovero, A. M. Papini, M. Chorev, A. M. D'Ursi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **3**, 446-457; (b) C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. J. Meldal, *Comb. Chem.*, 2004, **6**, 312-324.
32. E. A. Sheremet, R. I. Tomanov, E. V. Trukhin, V. M. Berestovitskaya, *Russian J. Org. Chem.*, 2004, **40**, 594-595.
33. X. Li, Y. Lin, Q. Wang, Y. Yuan, H. Zhang, X. Qian, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 1274-1279.
34. J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302-1315.
35. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057-3064.
36. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596-2599.
37. S. Pedersen, A. Abell, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, **13**, 2399-2411.
38. Z. Zhang, E. Fan, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 665-669.
39. I. Güell, Ll. Micaló, L. Cano, E. Badosa, R. Ferre, E. Montesinos, E. Bardají, L. Feliu, M. Planas, *Peptides*, 2012, **33**, 9-17.
40. A. Turner, A. Oliver, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 5011-5014
41. S. Cantel, I. A. Chevalier, M. Scrima, J. J. Levy, R. D. DiMarchi, P. Rovero, J. A. Halperin, A. M. D'Ursi, A. M. Papini, M. Chorev, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5663-5674.
42. I. Güell, S. Vilà, Ll. Micaló, L. Cano, E. Badosa, E. Montesinos, E. Bardají, M. Planas, L. Feliu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, **22**, 4933-4943.
43. (a) L. Liu, Z. Y. Hong, C. H. Wong, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 429-432; (b) C. J. Arnusch, H. Branderhorst, B. de Kruijff, R. M. J. Liskamp, E. Breukink, R. J. Pieters, *Biochemistry*,



## 1. Introducció

---

- 2007, **46**, 13437-13442; (c) R. J. Pieters, C. J. Arnusch, E. Breukink, *Protein Pept. Lett.*, 2009, **16**, 736-742; (d) V. Martos, P. Castreno, J. Valero, J. Mendoza, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 698-706.
44. J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 3893-3899.
45. R. W. Hoffmann, *Synthesis*, 2006, **21**, 3531-3541.
46. V. Haridas, Y. L. Sharma, S. Sahu, R. P. Verma, S. Sadanandan, B. G. Kacheshwar, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 1873-1884.
47. S. P. Liu, L. Zhou, R. Lakshminarayanan, R. W. Beuerman, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2010, **16**, 199-213.
48. I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. W. van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkersa, R. M. J. Liskamp, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 935-944.
49. I. Güell, R. Ferre, K. K. Sørensen, E. Badosa, I. Ng-Choi, E. Montesinos, E. Bardají, L. Feliu, K. J. Jensen, M. Planas, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2012, **8**, 2106-2117.
50. (a) S. Richter, T. Ramenda, R. Bergmann, T. Kniess, J. Steinbach, J. Pietzsch, F. Wuest, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 3306-3309; (b) E. N. Lorenzón, G. F. Cespedes, E. F. Vicente, L. G. Nogueira, T. M. Bauab, M. S. Castro, E. M. Cilli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, **56**, 3004-3010; (c) J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, P. G. Wang, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, **7**, 489-501; (d) J. Xiao, T. Tolbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 6046-6051.
51. (a) L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers*, 2000, **55**, 217-226; (b) D. Andreu, R. B. Merrifield, H. Steiner, H. G. Boman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 6475-6479.
52. S. A. Kates, F. Albericio, *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*, M. Dekker, Inc., 2000.
53. G. A. Grant, *Synthetic Peptides. A User's Guide*, W.H. Freeman and Company: New York, 1992.
54. (a) I. W. James, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 4855-4946; (b) F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2091-2157.
55. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2455-2504.
56. (a) A. Aletras, K. Barlos, D. Gatos, S. Koutsogianni, P. Mamos, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1995, **45**, 488-496; (b) L. Bourel, O. Carion, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *J. Peptide Sci.*, 2000, **6**, 264-270.
57. (a) W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, P. D. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, **21**, 2209-2210; (b) S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1603-1606.

58. (a) S. R. Chhabra, A. N. Khan, B. W. Bycroft, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3585- 3588; (b) K. Augustyns, W. Kraas, G. Jung, *J. Pept. Res.*, 1998, **51**, 127–133; (c) B. Rohwedder, Y. Mutti, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1175-1178; (d) S. R. Ctdaabra, A. N. Khan, B. W. Bycroft, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3585-3588; (e) A. Rai, W.G. Gutheil, *J. Peptide Sci.*, 2005, **11**, 69–73.
59. (a) S. Peluso, P. Dumy, C. Nkubana, Y. Yokokawa, M. Mutter, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 7114–7120; (b) A. Isidro-Llobet, J. Guash-Camell, M. Álvarez, F. Albericio, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, **14**, 3031–3039.
60. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 606-631.
61. K. D. Wehrstedt, P. A. Wandrey, D. Heitkamp, *J. Hazard. Mater.*, 2005, **A126**, 1-7.
62. (a) A. El-Faham, R. Subirós-Funosas, R. Prohens, F. Albericio, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 9404-9416; (b) A. El-Faham, F. Albericio, *J. Pept. Sci.*, 2010, **16**, 6-9; (c) R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 9394-9403.
63. (a) S. A. Kates, N. A. Solé, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1549; (b) L. Feliu, G. Oliveras, A. D. Cirac, E. Besalú, C. Rosés, R. Colomer, E. Bardají, M. Planas T. Puig, *Peptides*, 2010, **31**, 2017.



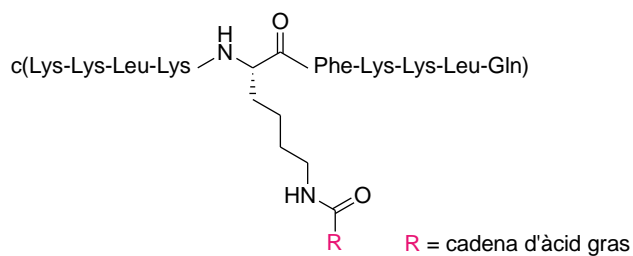


Objectius



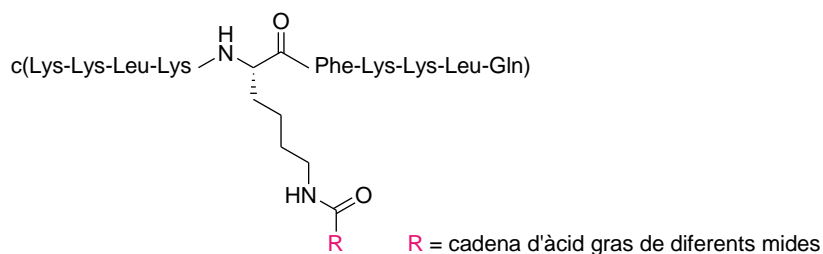
L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat la síntesi en fase sòlida de ciclolipopèptids i pèptids conjugats derivats de c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) amb activitat antimicrobiana enfront a patògens vegetals i que, alhora, mostrin una baixa hemòlisi. Concretament, els objectius han estat:

1. L'estudi d'una estratègia de síntesi en fase sòlida de ciclolipopèptids derivats de **BPC194**.

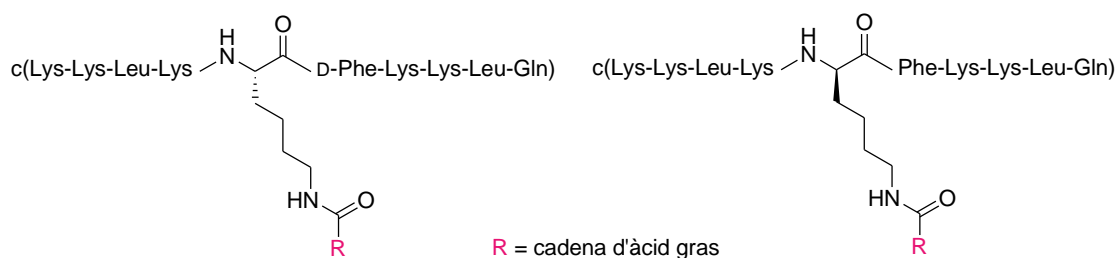


2. La introducció de modificacions en l'estructura de ciclolipopèptids derivats de **BPC194** per a millorar-ne el seu perfil biològic, com ara àcids grassos de diferent mida, D-aminoàcids i un residu d'His, així com la variació de la posició de la cadena d'àcid gras.

❖ Incorporació d'àcids grassos de diferent mida

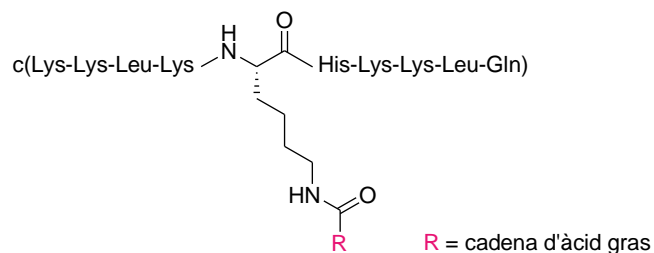


❖ Incorporació de D-aminoàcids

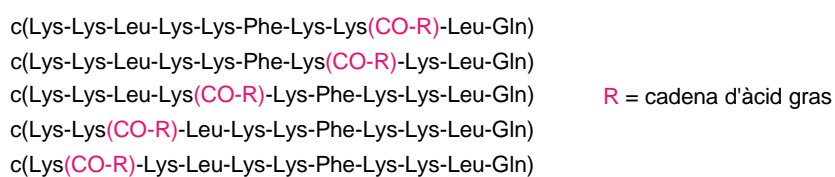


## 2. Objectius

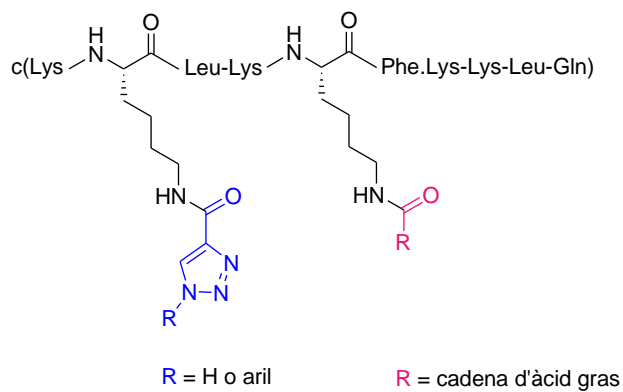
- ❖ Incorporació d'un residu d'His



- ❖ Variació de la posició de la cadena d'àcid gras

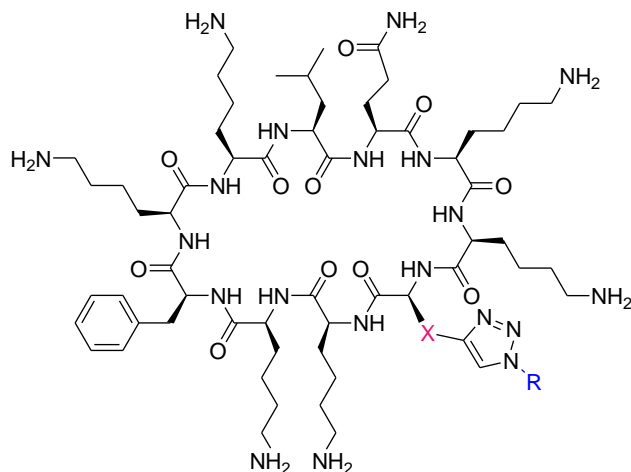


3. L'estudi d'una estratègia de síntesi de lipopeptidotriazoles cíclics en fase sòlida contenint un anell d'1,2,3-triazole i una cadena d'àcid gras a la cadena lateral de dos residus de Lys.



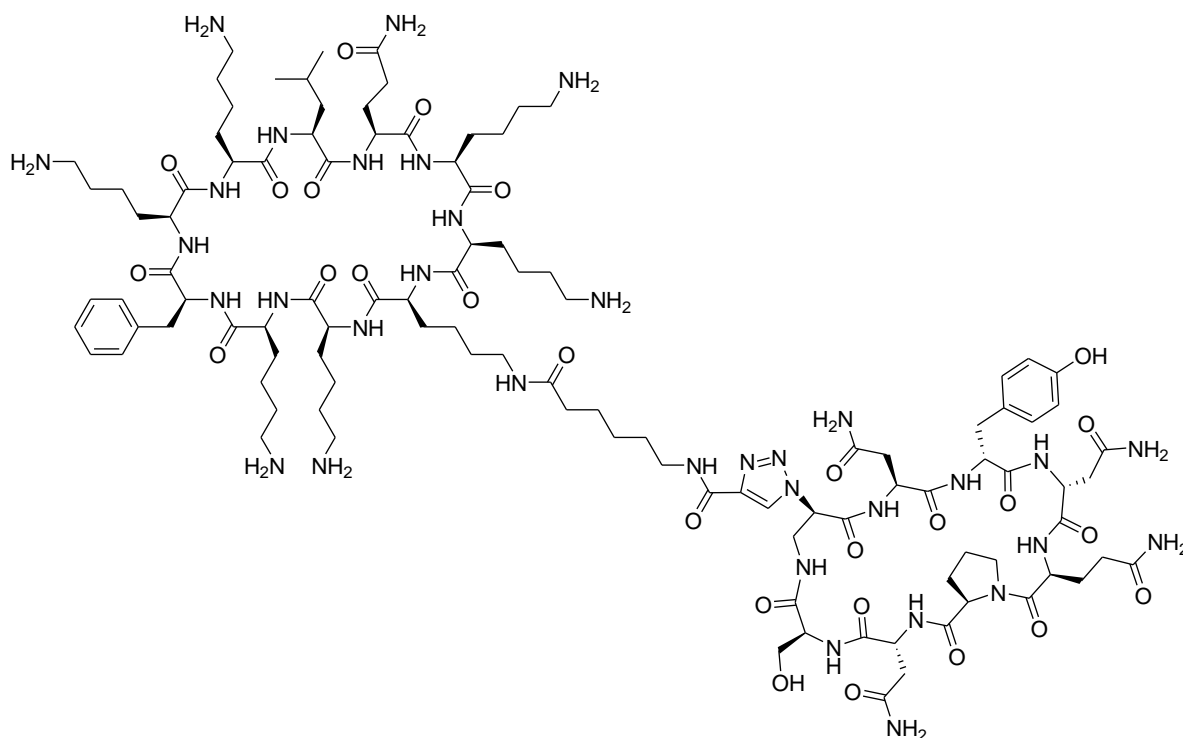
## 2. Objectius

4. La conjugació de **BPC194** a través d'un anell d'1,2,3-triazole amb (i) seqüències lineals derivades del pèptid antimicrobià **BP100** o de la bacteriocina iturina A, i (ii) la part cíclica de la iturina A.



X =  $-\text{CH}_2-$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$  o  $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$

R = seqüència peptídica lineal derivada de **BP100** o d'iturina A



5. Avaluació de l'activitat antibacteriana, antifúngica i hemolítica dels pèptids sintetitzats.







Resultats



**3.1. A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides**

The work of this section led to the following publication:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides. *Org. Biomol. Chem.* 2013, **11**, 3365-3374.

#### **3.1. A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides**

A concise solid-phase synthesis of cyclic lipopeptides derived from the antimicrobial peptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) was accomplished. Three different synthetic routes were explored. Best results were obtained using a protocol that includes as key steps: (i) synthesis of the cyclic peptidyl resin incorporating the Lys residue to be acylated protected at the  $N^\epsilon$ -amino group with an ivDde group, (ii) selective removal of the ivDde group, and (iii) acylation. These compounds were screened for their *in vitro* growth inhibition of bacterial and fungal phytopathogens and for their cytotoxic effects on eukaryotic cells. A sequence with high antimicrobial activity and low hemolysis was identified, constituting a good candidate for the design of new antimicrobial agents.

##### **3.1.1. Introduction**

Plant diseases caused by bacteria and fungi are responsible for significant losses in agriculture, being one of the major factors limiting worldwide crop production.<sup>1</sup> The negative effects arising from the use of chemical substances to treat plant diseases have raised the need to study safer compounds. Natural and synthetic antimicrobial peptides are considered as promising candidates due to their distinct mechanism of action which primarily involves the interaction with the bacterial membrane.<sup>2</sup>

A subfamily of antimicrobial peptides that has emerged in recent years includes lipopeptides.<sup>3</sup> They consist of a linear or cyclic peptide sequence, either anionic or cationic, to which a fatty acid moiety is covalently attached. Lipopeptides have been shown to exhibit significant antibacterial and antifungal activity. It has been described that the spectrum of biological activity is determined by the peptide motif and that it can be modulated by varying the acyl chain.<sup>3c,4</sup>

Acylation of synthetic or natural antimicrobial peptides with fatty acids has been demonstrated to be a useful strategy to improve their antimicrobial activity.<sup>3a,4,5</sup> In fact, it has been reported that the presence of an acyl chain enhances peptide-membrane interactions and it has been attributed to the changes in peptide overall hydrophobicity and organization in membranes.<sup>4,5</sup>

### 3. Resultats

---

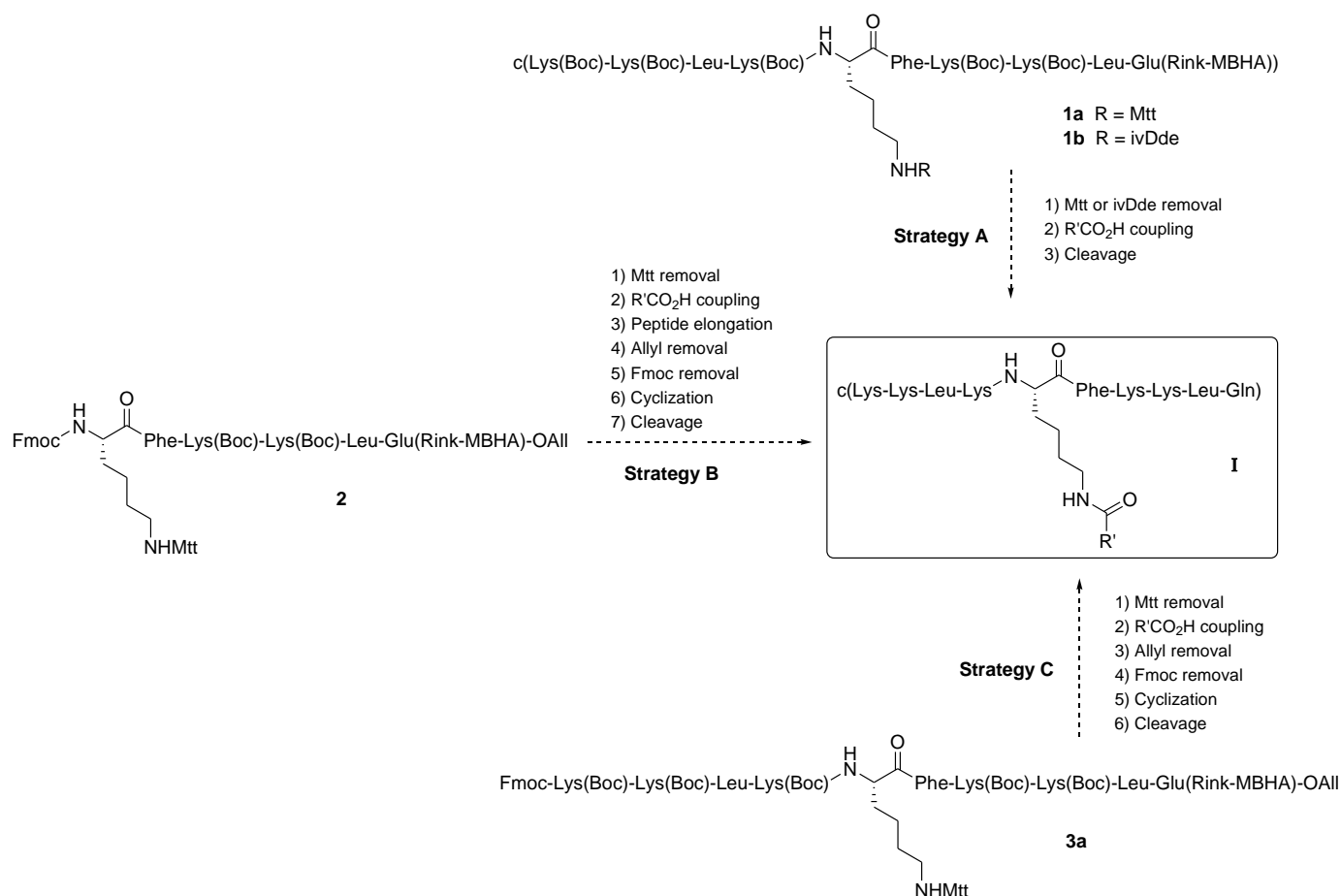
Within our efforts of finding new agents to control plant pathogens, in a previous study we designed and synthesized a library of cyclic decapeptides with general structure c(X<sub>5</sub>-Phe-X<sub>3</sub>-Gln) where X is Lys or Leu.<sup>6</sup> From this library we identified c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) with high activity against the plant pathogenic bacteria *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas pv. vesicatoria* and *Pseudomonas pv. syringae* (MIC of 3.1 to 12.5 μM). This peptide also exhibited a low hemolysis, 17% at 375 μM.

The antimicrobial activity of **BPC194** and the excellent biological properties described for lipopeptides prompted us to design and synthesize lipopeptides derived from this cyclic decapeptide. Herein, we describe the evaluation of different strategies for the solid-phase synthesis of such compounds. We also report the analysis of their biological activity.

#### 3.1.2. Results and discussion

The goal of this work was to develop an efficient solid-phase synthetic approach to lipopeptides with general structure **I** depicted in Scheme 3.1.1. These lipopeptides derived from the antimicrobial cyclic decapeptide c(Lys<sup>1</sup>-Lys-Leu-Lys-Lys<sup>5</sup>-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln<sup>10</sup>) (**BPC194**)<sup>6</sup> and incorporated a fatty acid at the N<sup>ε</sup>-amino group of Lys<sup>5</sup>. This residue was selected because previous studies showed that it is involved in the interaction of **BPC194** with negatively charged model membranes.<sup>7</sup> The incorporation of a fatty acid chain at this position could favour peptide insertion into the hydrophobic core of the membrane increasing the antimicrobial activity.<sup>3a,4,5</sup>

In the present work, we have explored three potentially useful synthetic approaches A–C which are based on a standard three-dimensional orthogonal 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/*tert*-butyl (<sup>t</sup>Bu)/allyl (All) protocol (Scheme 3.1.1).<sup>8</sup> Strategy A would involve the direct acylation of the cyclic peptidyl resin **1**. In strategy B, we planned the acylation of the linear hexapeptidyl resin **2** followed by peptide elongation and cyclization. In strategy C, the acylation would be attempted on the linear decapeptidyl resin **3** which would be then cyclised. All these three strategies require the selective derivatization of the N<sup>ε</sup>-amino group of Lys<sup>5</sup>. Therefore, this residue must be protected with a group that could be removed without affecting the other protecting groups of the sequence and without causing a premature release of the peptide from the support. Taking into account these considerations, the key features to be analyzed in these strategies are the protecting group of Lys<sup>5</sup>, its selective removal and the fatty acid coupling step.



Scheme 3.1.1: Solid-phase synthetic strategies for cyclic lipopeptides of general structure I

### 3.1.2.1. Synthesis of cyclic lipopeptides I using a 4-methyltrityl (Mtt) group

Our initial studies relied on the use of the highly acid-labile Mtt group as  $N^\epsilon$ -amino protection of Lys<sup>5,9</sup>. This group can be cleaved selectively in the presence of *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) groups using low concentrations of trifluoroacetic acid (TFA). We first centred our attention on strategy A and evaluated the selective deprotection of the cyclic peptidyl resin **1a** (Scheme 3.1.2). This peptidyl resin was constructed from an Fmoc-Rink-MBHA resin by carrying out the solid-phase synthesis of the linear sequence followed by on-resin cyclization.<sup>8b</sup>

Synthesis started by Fmoc removal with piperidine/DMF (3:7) and subsequent coupling of Fmoc-Glu-OAll using *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) in DMF for 1 h. Sequential deprotection and coupling steps afforded the linear peptidyl resin **3a**. Side-chain protection for the Lys residues was as Boc,



### 3. Resultats

---

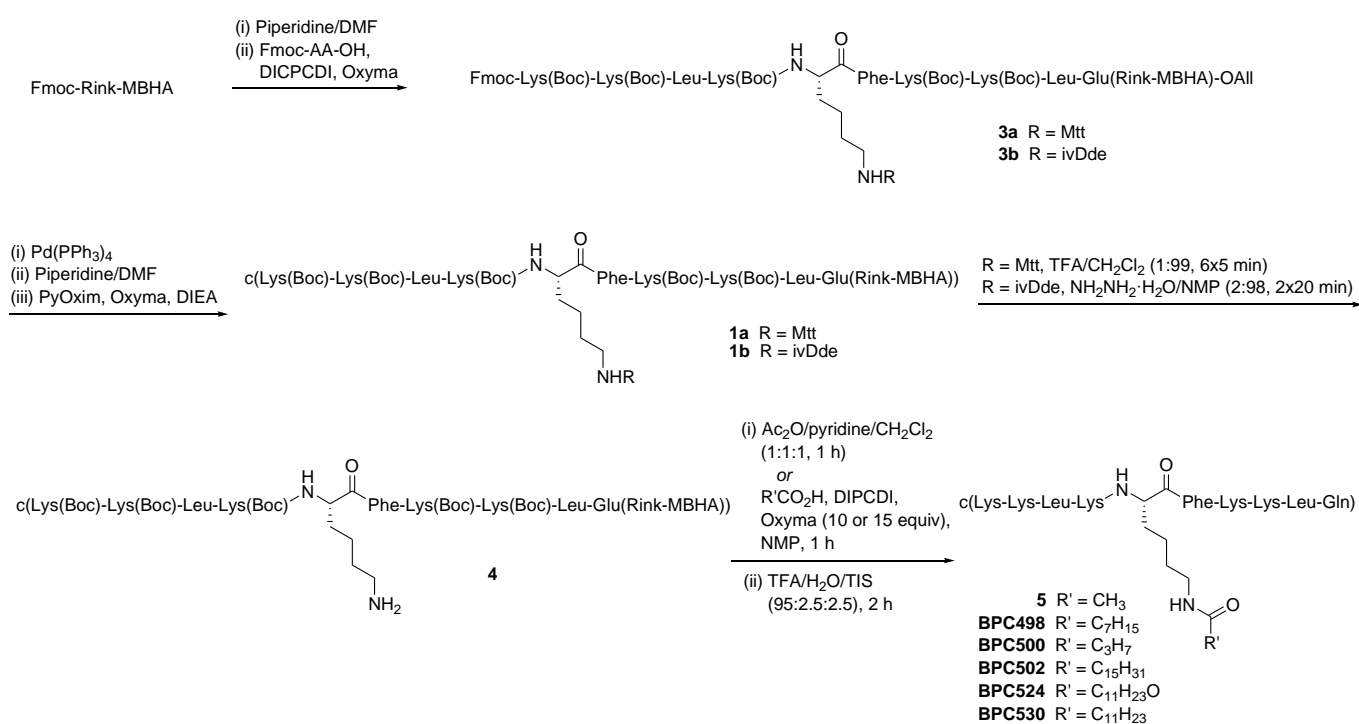
except for Lys<sup>5</sup> which was incorporated as Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Acidolytic cleavage of an aliquot of **3a** afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll in 99% purity. The C-terminal allyl ester cleavage of **3a** was achieved by treatment with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in CHCl<sub>3</sub>/AcOH/*N*-methylmorpholine (NMM) (3:2:1) and it was followed by *N*<sup>α</sup>-Fmoc group removal. Cyclization was then performed using [ethyl cyano(hydroxyimino)acetato-*O*<sup>2</sup>]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate (PyOxim), Oxyma and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) in *N*-methylpyrrolidinone (NMP) for 24 h. An aliquot of the resulting cyclic peptidyl resin **1a** was cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O/triisopropylsilane (TIS) (95:2.5:2.5) for 2 h, affording c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) the sequence of which was confirmed by ESI/MS.

With the peptidyl resin **1a** in hand, we set up to examine the Mtt group removal (Scheme 3.1.2). The deprotection was assayed under standard conditions by treating resin **1a** with a solution of TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99, v/v).<sup>9,10</sup> The reaction time, the number of treatments, and the effect of stirring were evaluated. The completion of the deprotection was visually monitored by the disappearance of the yellow colour generated upon addition of the acidic solution. Moreover, the deprotection was checked by acetylation of the resulting peptidyl resin **4** with Ac<sub>2</sub>O/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:1) for 1 h followed by cleavage of the resin and ESI/MS analysis of the crude reaction mixture. Best results were obtained when **1a** was treated 6 times of 5 min each with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99, v/v) under stirring. These conditions led to the expected acetylated peptide **5** as the major product ([M + H]<sup>+</sup> = 1312.7). Only traces of the non-acetylated compound **BPC194** ([M + H]<sup>+</sup> = 1270.7) were detected indicating that the Mtt group removal was achieved. An increase of the time and of the amount of treatments resulted in the formation of diacetylated and triacetylated peptides ([M + H]<sup>+</sup> = 1354.7 and 1396.7, respectively) revealing that a premature removal of one or two Boc groups occurred. When the reaction was carried out without stirring, the amount of the acetylated peptide **5** decreased, suggesting that the Mtt removal was less efficient.

Once the conditions for the Mtt group removal were established, we studied the acylation of the free *N*<sup>ε</sup>-amino group in resin **4** with a fatty acid (Scheme 3.1.2). Fatty acids of different chain lengths were chosen, in particular, butyric, octanoic, lauric, and palmitic acids. 12-Hydroxylauric acid was also included. Couplings were mediated by DIPCDI and Oxyma in NMP for 1 h. Reactions were carried out using 10 or 15 equivalents of fatty acid and of coupling reagents. After acidolytic cleavage of the resulting resins, the crude reaction mixtures were analyzed by ESI/MS. In the case of butyric, octanoic, lauric and palmitic acids, best results

### 3. Resultats

were obtained using 10 equivalents of reagents which afforded the corresponding cyclic lipopeptides **BPC500**, **BPC498**, **BPC530** and **BPC502**, respectively, as the major products. The acylation of resin **4** with 12-hydroxy lauric acid by treatment with 10 equivalents of reagents for 1 h was not completed, and a considerable amount of **BPC194** was observed in the ESI/MS spectrum. The use of 15 equivalents of reagents prompted the formation of the expected cyclic lipopeptide **BPC524** as the major product. It should be noted that all the crude reaction mixtures resulting from the acylation of resin **4** with the above fatty acids contained traces of a diacylated compound. The formation of this compound pointed out that a premature removal of a Boc group during the previous Mtt removal step took place.



Scheme 3.1.2: Synthesis of cyclic lipopeptides following strategy A

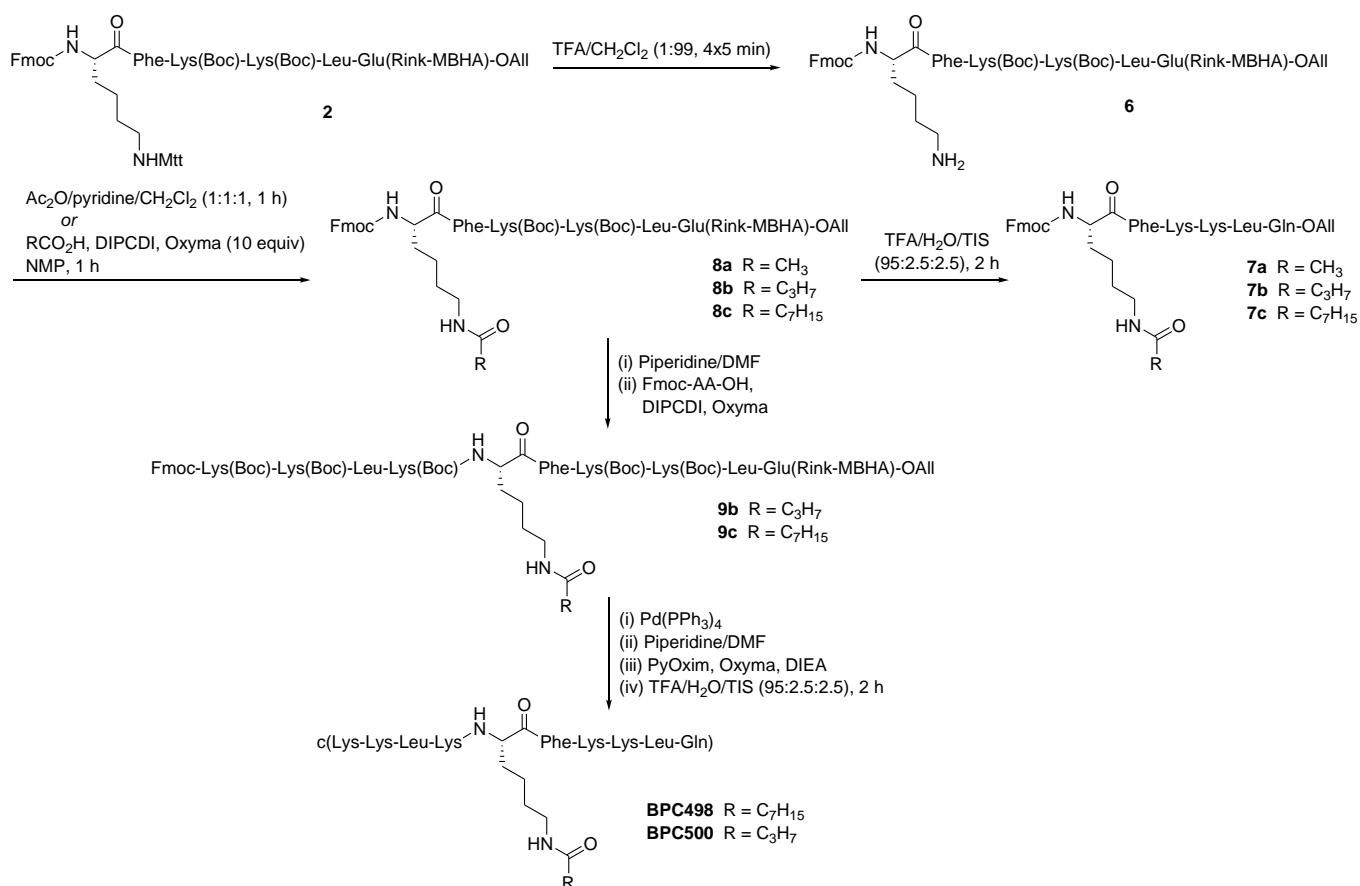
To study the alternative strategy B, we prepared the hexapeptidyl resin Fmoc-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu-(Rink-MBHA)-OAll (**2**) starting from an Fmoc-Rink-MBHA resin following the deprotection and coupling steps described for strategy A (Scheme 3.1.3). An aliquot of this resin was cleaved affording Fmoc-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll in 99% HPLC purity, which was characterized by ESI/MS. The removal of the Mtt protecting group of the N-terminal Lys was attempted under the conditions optimized for resin **1a** (TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99, 6 × 5 min), under stirring). The resulting resin **6** was then acetylated by treatment with Ac<sub>2</sub>O/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:1) for 1 h. Subsequent acidolytic cleavage and analysis by HPLC and

### 3. Resultats

---

ESI/MS of the crude reaction mixture showed the presence of the desired acetylated hexapeptide **7a** together with a diacetylated analogue. The formation of the latter compound indicated that these conditions prompted the removal of a Boc group. Reducing the number of treatments to 4 × 5 min, the amount of diacetylated peptide decreased and **7a** was obtained as the major peak (81% purity). Next, we assayed the acylation of resin **6** with butyric acid (10 equiv.) in the presence of DIPCDI and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. After TFA cleavage, HPLC and ESI/MS analysis showed the expected lipopeptide **7b** (81% purity) together with two main byproducts (15% purity). One of these byproducts incorporated two butanoyl groups at the side-chain of two lysine residues ( $[M + H]^+ = 1193.3$ ). The molecular weight of the other byproduct ( $[M + H]^+ = 971.5$ ) indicated that two butanoyl groups were coupled and that the N-terminal Fmoc group was removed. The formation of this compound was attributed to an undesired loss of the N-terminal Fmoc group, during or after the Mtt removal step, followed by the introduction of an extra butanoyl chain. In fact, it has been previously described that during solid-phase synthesis the  $N^\alpha$ -Fmoc-protecting group of a peptidyl resin can be prematurely removed by a primary amine of sufficient basicity, such as the  $\epsilon$ -amino group of a Lys residue.<sup>11</sup> Similar results were observed for the acylation of resin **6** with octanoic acid (10 equiv.). Lipopeptide **7c** was obtained in 91% purity and the corresponding diacylated compounds of  $[M + H]^+ = 1083.5$  and  $1305.4$  were also detected in 7% purity. Finally, the acylated peptidyl resins **8b** and **8c** were elongated to provide the linear decapeptidyl resins **9b** and **9c**. An aliquot of these resins was cleaved and the crude products were analyzed by HPLC and ESI/MS. The HPLC chromatogram showed the presence of a major peak in 70-80% purity, but in the ESI/MS spectra we observed the expected lipopeptides together with a mixture of nonidentified products. Allyl and Fmoc removal of resins **9b** and **9c** followed by cyclization and TFA cleavage yielded the corresponding cyclic lipopeptides **BPC498** and **BPC500**, respectively, as minor products.

### 3. Resultats



Scheme 3.1.3: Synthesis of cyclic lipopeptides following strategy B

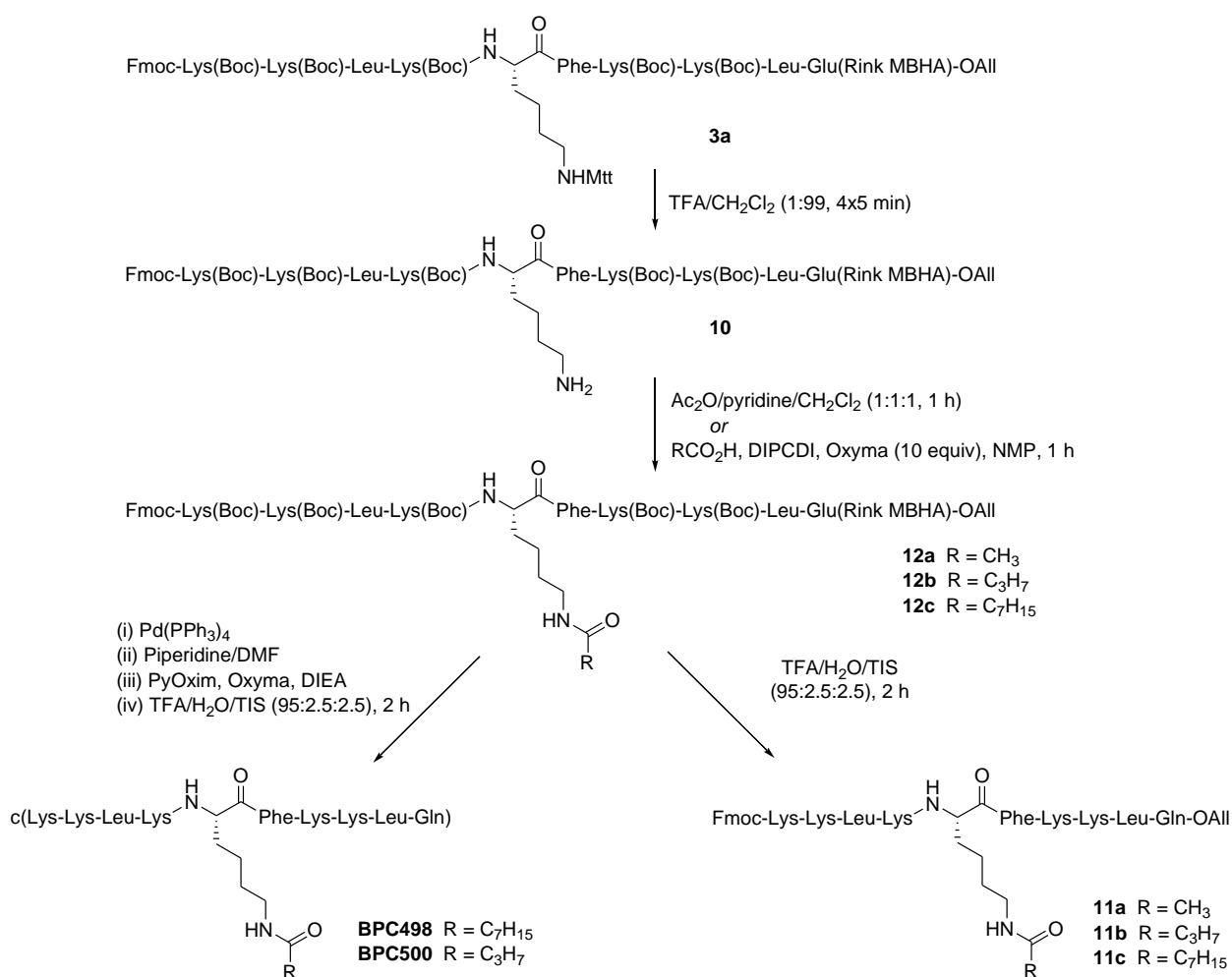
Strategy C also involved the synthesis of the linear decapeptidyl resin **3a** (Scheme 3.1.4). Then, resin **3a** was subjected to TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) treatments of either 4 × 5 min or 6 × 5 min under stirring. As above, the resulting resin **10** was acetylated. The 6 × 5 min treatment assay led to the formation of the acetylated peptide **11a**, but a high amount of diacetylated and triacetylated peptides was also observed by mass spectrometry. Similarly to resin **2**, the highest purity of **11a** was obtained for the 4 × 5 min treatment assay (57% purity). Thus, our results showed that the optimization of the Mtt group removal is not straightforward and that, in agreement with previous studies, it was dependent on the sequence.<sup>9b</sup> In our hands, the linear Mtt-protected peptidyl resins were more easily deprotected than the cyclic ones. We then investigated the acylation of the peptidyl resin **10** with butyric and octanoic acid employing the same conditions (10 equiv.) described for resins **4** and **6**.

Acidolytic cleavage of an aliquot of the resulting resins **12b** and **12c** provided the expected lipopeptides **11b** and **11c** in 52 to 67% purity. The two corresponding diacylated byproducts resulting from the introduction of an extra acyl group at a sidechain Lys residue or at the N-

### 3. Resultats

terminus were also observed. Finally, the linear lipopeptidyl resins **12b** and **12c** were deprotected at the N- and at the C-terminus and then cyclised affording, after cleavage, **BPC498** and **BPC500**, respectively, as minor products.

In view of the results obtained for the three synthetic routes, strategy A, involving the Mtt removal of the cyclic peptidyl resin **1a** and its subsequent acylation, turned out to be the most satisfactory. This approach provides the cyclic lipopeptide as the major product and avoids the undesired acylation of the N-terminus due to a premature loss of the N-terminal Fmoc group.



Scheme 3.1.4: Synthesis of cyclic lipopeptides following strategy C

### 3.1.2.2. Synthesis of cyclic lipopeptides I using a 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl (ivDde) group

To improve the previous results and as an alternative for Lys side-chain protection, the ivDde group was investigated. The removal of this group can be achieved by treatment with hydrazine and it is stable towards the conditions used to remove Fmoc and allyl groups in peptide synthesis.<sup>12</sup>

Accordingly, following the procedure previously described for **1a**, we prepared the linear peptidyl resin **3b**, incorporating Lys<sup>5</sup> as Fmoc-Lys(ivDde)-OH. Resin **3b** was then cyclised to yield **1b** (Scheme 3.1.2). Acidolytic cleavage of an aliquot of this resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln), which was characterized by ESI/MS.

For cleaving the ivDde protecting group, **1b** (25 mg) was treated with hydrazine/NMP (2:98) four times of 20 min each affording resin **4** (Scheme 3.1.2). After TFA cleavage of one aliquot of this resin, ESI/MS analysis showed only the presence of the peak corresponding to **BPC194** ( $[M + H]^+ = 1270.7$ ) indicating that the ivDde group was completely removed. The subsequent butyric acid coupling to resin **4**, using **10** equivalents of fatty acid and coupling reagents, followed by TFA cleavage yielded **BPC500**. These conditions were extended to the coupling of octanoic, lauric and palmitic acids leading to cyclic lipopeptides **BPC498**, **BPC530** and **BPC502**, respectively. The coupling of 12-hydroxylauric acid required the use of 15 equivalents of the corresponding reagents to give **BPC524**. When the synthesis was scaled up to 300 mg of resin, the ivDde protecting group removal was achieved after five treatments of 20 min each with hydrazine/NMP (2:98).

The identity of the resulting cyclic lipopeptides was verified using ESI/MS and HRMS. Unlike when using the Mtt group, the formation of diacylated byproducts was not observed. Therefore, this study shows that the base labile ivDde protection of the  $\epsilon$ -amino group of Lys<sup>5</sup> is better suited for the solid-phase synthesis of cyclic lipopeptides derived from **BPC194**.

### 3. Resultats

---

#### 3.1.2.3. Biological activity

Cyclic lipopeptides synthesized were screened for their antimicrobial activity against *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae*, *F. oxysporum* and *P. expansum* (Table 3.1.1). The results were compared to those obtained for **BPC194**. Regarding the antibacterial activity, except for **BPC502**, these compounds were active against the three bacteria tested, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* being the most sensitive bacterium to these peptides. Against this bacterium, one lipopeptide, **BPC500**, displayed MIC <3.1 µM, being more active than **BPC194**, and three sequences showed MIC values of 6.2 to 12.5 µM. Against *P. syringae* pv. *syringae*, **BPC500** was also the most active lipopeptide (MIC of 6.2 to 12.5 µM) and three analogues displayed MIC values of 12.5 to 25 µM.

*E. amylovora* was the least sensitive bacteria to these compounds, but two peptides (**BPC500** and **BPC530**) exhibited MIC values of 12.5 to 25 µM. In the case of the antifungal activity, the cyclic lipopeptides were not active against *P. expansum*. However, except for **BPC502**, they showed significant activity against *F. oxysporum* with four analogues displaying MIC <25 µM. Notably, **BPC500** was as active as **BPC194** (MIC <3.1 µM).

Analysis of these results reveals that the length of the hydrophobic chain influences both the antibacterial and antifungal activities. The incorporation of a long hydrophobic chain is associated with a decrease of the antimicrobial activity. Thus, whereas **BPC500** bearing a butanoyl moiety was the cyclic lipopeptide displaying the highest antimicrobial activity, **BPC502** containing a palmitoyl group was not active against any of the pathogens tested. Sequences containing an 8- or a 12-carbon chain (**BPC498**, **BPC524** and **BPC530**) were significantly active but less than **BPC500**.

The hemolytic activity of the cyclic lipopeptides was also tested (Table 3.1.1). Analysis of the percent hemolysis at 50 and 150 µM points out that the derivatization of **BPC194** with a hydrophobic chain results in an increase of the hemolytic activity. Thus, all cyclic lipopeptides exhibited a higher hemolysis than **BPC194**. These results are in good agreement with previous studies reporting that an increase of the peptide hydrophobicity is related to an increase in the cytotoxicity.<sup>13</sup> Interestingly, the most active analogue **BPC500** was the less hemolytic (15 and 28% hemolysis at 50 and 150 µM, respectively). Thus, **BPC500** displayed an excellent balance between antimicrobial activity and cytotoxicity.

Table 3.1.1: Antimicrobial activity (MIC) against plant pathogenic bacteria and fungi, and cytotoxicity

Peptide	<i>Xav</i> <sup>a</sup>	<i>Pss</i> <sup>a</sup>	MIC ( $\mu$ M)			Hemolysis <sup>b</sup> (%)	
			<i>Ea</i> <sup>a</sup>	<i>Fo</i> <sup>a</sup>	<i>Pe</i> <sup>a</sup>	50 $\mu$ M	150 $\mu$ M
<b>BPC194</b>	3.1-6.2	3.1-6.2	6.2-12.5	<3.1	>50	3 $\pm$ 0.6	4 $\pm$ 0.7
<b>BPC498</b>	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	>50	67 $\pm$ 17	78 $\pm$ 4
<b>BPC500</b>	<3.1	6.2-12.5	12.5-25	<3.1	>50	15 $\pm$ 3	28 $\pm$ 5
<b>BPC502</b>	>50	>50	>50	>50	>50	52 $\pm$ 2	78 $\pm$ 1
<b>BPC524</b>	6.2-12.5	12.5-25	25-50	12.5-25	>50	67 $\pm$ 15	100 $\pm$ 8
<b>BPC530</b>	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	6.25-12.5	>50	62 $\pm$ 2	89 $\pm$ 7

<sup>a</sup>*Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Pe*, *Penicillium expansum*

<sup>b</sup>Percent hemolysis at 50 and 150  $\mu$ M plus confidence interval ( $\alpha = 0.05$ )

### 3.1.3. Conclusions

In the present work, we have explored three potentially useful synthetic routes for the preparation of cyclic lipopeptides and settled for one which in our hands has turned out to be the most efficient. The key features of this route are the synthesis of a conveniently protected cyclic peptidyl resin, the selective deprotection of a Lys residue and its subsequent acylation. The use of the ivDde as a protecting group of the *N*<sup>ε</sup>-amino group of the Lys to be acylated has shown to be essential to ensure the effectiveness of this approach. This strategy represents a general procedure that could be easily applied to the preparation of a variety of cyclic lipopeptides in a combinatorial manner.

The screening of these compounds for their antimicrobial activity and their cytotoxicity revealed that the length of the hydrophobic chain influenced both activities. Moreover, it allowed the identification of a sequence with an excellent biological activity profile. Therefore, we expect that these results could provide a way to rationally design novel antimicrobial agents.



### 3. Resultats

---

#### 3.1.4. Experimental section

##### 3.1.4.1. General

Commercially available reagents were used throughout without purification. Solvents were purified and dried by passing them through an activated alumina purification system (MBraun SPS-800) or by conventional distillation techniques.

All compounds were analyzed under standard analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) conditions with a Dionex liquid chromatography instrument or with an Agilent Technologies 1200 Series HPLC. Detection was performed at 220 nm. Method A: Analysis was carried out using the Dionex instrument with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (40 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column with a 2-100% B linear gradient over 7 min at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Method B: Analysis was carried out using the Agilent instrument with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column with a 2-100% B linear gradient over 28 min at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Solvent A was 0.1% aqueous TFA, and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN.

ESI-MS analyses were performed with an Esquire 6000 ESI ion Trap LC/MS (Bruker Daltonics) instrument equipped with an electrospray ion source. The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode. Samples (5 μl) were introduced into the mass spectrometer ion source directly through an HPLC autosampler. The mobile phase (80:20, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O at a flow rate of 100 μl min<sup>-1</sup>) was delivered by a 1100 Series HPLC pump (Agilent). Nitrogen was employed as both the drying and nebulizing gas. HRMS were recorded under conditions of ESI with a Bruker MicroTOF-Q IITM instrument using a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (University of Girona). Samples were introduced into the mass spectrometer ion source by direct infusion through a syringe pump and were externally calibrated using sodium formate. The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode.

##### 3.1.4.2. Synthesis of linear peptidyl resins 2 and 3a–b

These peptidyl resins were synthesized manually by the solidphase method using standard Fmoc chemistry. The Fmoc-Rink-MBHA resin (0.4 mmol g<sup>-1</sup>) was used as solid support. Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Phe-OH or Fmoc-Glu-OAll were used as amino acid derivatives. Couplings of the Fmoc-amino acids (4 equiv.) were mediated by ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) (4 equiv.), *N,N'*-

diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) (4 equiv.) in DMF at room temperature for 1 h. The completion of the reactions was checked by the Kaiser test.<sup>14</sup> Fmoc group removal was achieved with piperidine/DMF (3:7, 2 + 10 min). After each coupling and deprotection step, the resin was washed with DMF (6 × 1 min), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 min), and air dried. An aliquot of each resulting peptidyl resin was treated with trifluoroacetic acid (TFA)/H<sub>2</sub>O/triisopropylsilane (TIS) (95:2.5:2.5) for 2 h. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude peptides were dissolved in H<sub>2</sub>O, lyophilized, analyzed by HPLC, and characterized by mass spectrometry.

#### **Fmoc-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (2).**

This peptidyl resin was prepared from an Fmoc-Rink-MBHA resin (0.4 mmol g<sup>-1</sup>, 50 mg) following the procedure described above. Acidolytic cleavage of an aliquot of this peptidyl resin afforded Fmoc-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll in 99% purity.  $t_R = 7.11$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 527.3 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1053.5 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (3a)**

This peptidyl resin was prepared from an Fmoc-Rink-MBHA resin (0.4 mmol g<sup>-1</sup>, 100 mg) following the procedure described above. Acidolytic cleavage of an aliquot of this peptidyl resin afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll in 99% purity.  $t_R = 6.42$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 776.1 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1551.1 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (3b)**

This peptidyl resin was prepared from an Fmoc-Rink-MBHA resin (0.4 mmol g<sup>-1</sup>, 100 mg) following the procedure described above. Acidolytic cleavage of an aliquot of this peptidyl resin afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll in 88% purity.  $t_R = 7.14$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 879.1 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1758.2 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **3.1.4.3. Synthesis of linear lipopeptides 7a–c and 11a–c**

Peptidyl resins **2** or **3a** were treated with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99, 4 × 5 min). After these treatments, a disappearance of the yellow colour generated upon addition of the acidic solution was observed. The resulting resins **6** or **10** were washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), *N*-

### 3. Resultats

---

methylpyrrolidinone (NMP) (6 × 1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA)/NMP (5:95, 3 × 2 min). Then, the resins were acetylated with Ac<sub>2</sub>O/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:1) for 1 h or were acylated by treatment with the corresponding fatty acid (10 or 15 equiv.), DIPCDI (10 or 15 equiv.) and Oxyma (10 or 15 equiv.) in NMP for 1 h. Resins were washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min) and air dried. Completion of the reactions was checked with the Kaiser test.<sup>14</sup> Each resulting peptidyl resin was treated with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2.5:2.5) for 2 h. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude linear lipopeptides were dissolved in H<sub>2</sub>O, lyophilized, analyzed by HPLC, and characterized by mass spectrometry.

#### **Linear lipopeptide Fmoc-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (7a)**

This lipopeptide was prepared from resin **2** (25 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acetylation of **6**. Acidolytic cleavage of the resulting resin **8a** afforded Fmoc-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**7a**) in 81% purity.  $t_R = 7.28$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1095.8 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Linear lipopeptide Fmoc-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln- OAll (7b)**

This lipopeptide was prepared from resin **2** (50 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acylation of **6** with butyric acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.) and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin **8b** afforded Fmoc-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**7b**) in 81% purity.  $t_R = 7.35$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 562.3 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1123.4 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Linear lipopeptide Fmoc-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (7c)**

This lipopeptide was prepared from resin **2** (50 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acylation of **6** with octanoic acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.) and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin **8c** afforded Fmoc-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**7c**) in 91% purity.  $t_R = 7.97$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 590.5 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1179.4 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Linear lipopeptide Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (11a)**

This lipopeptide was prepared from resin **3a** (25 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acetylation of **10**. Acidolytic cleavage of the resulting resin **12a** afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**11a**) in 57% purity.  $t_R =$

15.43 min (method B). MS(ESI)  $m/z$ : 797.0  $[M + 2H]^{2+}$ , 1592.7  $[M + H]^+$ .

#### Linear lipopeptide Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**11b**)

This lipopeptide was prepared from resin **3a** (50 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acylation of **10** with butyric acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.) and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin **12b** afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**11b**) in 52% purity.  $t_R$  = 6.70 min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1620.5  $[M + H]^+$ .

#### Linear lipopeptide Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**11c**)

This lipopeptide was prepared from resin **3a** (50 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acylation of **10** with octanoic acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.) and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin **12c** afforded Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (**11c**) in 67% purity.  $t_R$  = 7.05 min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 839.4  $[M + 2H]^{2+}$ , 1677.5  $[M + H]^+$ .

### 3.1.4.4. Synthesis of cyclic lipopeptides

#### 3.1.4.4.1. Synthesis of cyclic peptidyl resins **1a** and **1b**

Peptidyl resins **1a** and **1b** were prepared from resins **3a** and **3b**, respectively. The C-terminal allyl ester of **3a** or **3b** was cleaved by treatment with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (5 equiv.) in CHCl<sub>3</sub>/AcOH/*N*-methylmorpholine (NMM) (3:2:1) under nitrogen for 3 h, and the resins were washed with tetrahydrofuran (3 × 2 min), NMP (3 × 2 min), DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:19, 3 × 2 min), sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate (0.03 M in NMP, 3 × 15 min), NMP (10 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 2 min). Fmoc was removed with piperidine/DMF (3:7, 2 + 10 min) followed by washes with DMF (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 min). Cyclization was carried out by treating the resulting resin with [ethyl cyano(hydroxyimino) acetato-*O*<sup>2</sup>]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate (PyOxim) (5 equiv.), Oxyma (5 equiv.), and DIEA (10 equiv.) in NMP under stirring for 24 h. Following washes with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 min), an aliquot of each cyclic peptidyl resin was cleaved by treatment with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2.5:2.5) for 2 h. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude peptides were dissolved in H<sub>2</sub>O, lyophilized, and characterized by mass spectrometry.

### 3. Resultats

---

#### **c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (1a)**

This peptidyl resin was prepared from **3a** (100 mg) following the procedure described above. Acidolytic cleavage of an aliquot of this peptidyl resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**). MS(ESI) *m/z*: 1271.0 [M + H]<sup>+</sup>, 1293.0 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### **c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (1b)**

This peptidyl resin was prepared from **3b** (100 mg) following the procedure described above. Acidolytic cleavage of an aliquot of this peptidyl resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln). MS(ESI) *m/z*: 1477.1 [M + H]<sup>+</sup>, 1499.1 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### **3.1.4.4.2. Synthesis of cyclic lipopeptides 5, BPC498, BPC500, BPC502, BPC524, and BPC530**

When starting from **1a**, this resin was first treated with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99, 6 × 5 min). The resulting resin **4** was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), NMP (6×1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and DIEA/NMP (5:95, 3 × 2 min). When starting from **1b**, this resin was first treated with NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O/NMP (2:98, 5 × 20 min) under stirring. The resulting resin **4** was washed with NMP (2 × 1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 1 min), MeOH (2×1 min), and NMP (2 × 1 min). Then, resin **4** was acetylated with Ac<sub>2</sub>O/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:1) for 1 h or was acylated by treatment with the corresponding fatty acid (10 or 15 equiv.), DIPCDI (10 or 15 equiv.) and Oxyma (10 or 15 equiv.) in NMP for 1 h. Resins were washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min) and air dried. Completion of the reactions was checked with the Kaiser test.<sup>14</sup> Each resulting peptidyl resin was treated with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2.5:2.5) for 2 h. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude cyclic lipopeptides were dissolved in H<sub>2</sub>O and lyophilized. Cyclic lipopeptides were characterized by mass spectrometry.

#### **Cyclic lipopeptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (5)**

This lipopeptide was prepared from resin **1a** (25 mg) following the above procedure through Mtt group removal and acetylation. Acidolytic cleavage of the resulting resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**5**). MS(ESI) *m/z*: 1312.7 [M + H]<sup>+</sup>.

#### **Cyclic lipopeptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC498)**

This lipopeptide was prepared from resin **1b** (300 mg) following the above procedure through ivDde group removal and acylation with octanoic acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.)

and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC498**) in 87% purity.  $t_R = 7.12$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1397.0 [M + H]<sup>+</sup>, 1419.0 [M + Na]<sup>+</sup>, 1548.9 [M + TFA + K]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd for C<sub>70</sub>H<sub>129</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 349.9996, found 350.0004; calcd for C<sub>70</sub>H<sub>128</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 466.3304, found 466.3312 and calcd for C<sub>70</sub>H<sub>127</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 698.9920; found 698.9919.

#### **Cyclic lipopeptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC500)**

This lipopeptide was prepared from resin **1b** (300 mg) following the above procedure through ivDde group removal and acylation with butyric acid (10 equiv.), DIPCDI (10 equiv.) and Oxyma (10 equiv.) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC500**) in 96% purity.  $t_R = 6.53$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1340.9 [M + H]<sup>+</sup>, 1362.9 [M + Na]<sup>+</sup>, 1492.8 [M + TFA + K]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd for C<sub>66</sub>H<sub>121</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 335.9840, found 335.9843; calcd for C<sub>66</sub>H<sub>120</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 447.6429, found 447.6436 and calcd for C<sub>66</sub>H<sub>119</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 670.9607; found 670.9596.

#### **Cyclic lipopeptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>OH)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC524)**

This lipopeptide was prepared from resin **1b** (300 mg) following the above procedure through ivDde group removal and acylation with 12-hydroxylauric acid (15 equiv), DIPCDI (15 equiv) and Oxyma (15 equiv) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>OH)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC524**) in 82% purity.  $t_R = 8.04$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1469.2 [M+H]<sup>+</sup>, 1491.2 [M+Na]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>137</sub>N<sub>17</sub>O<sub>13</sub> 368.0140, found 368.0149; calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>136</sub>N<sub>17</sub>O<sub>13</sub> 490.3496, found 490.3497 and calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>135</sub>N<sub>17</sub>O<sub>13</sub> 735.0207; found 735.0226.

#### **Cyclic lipopeptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>23</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC530)**

This lipopeptide was prepared from resin **1b** (300 mg) following the above procedure through ivDde group removal and acylation with lauric acid (10 equiv), DIPCDI (10 equiv) and Oxyma (10 equiv) in NMP for 1 h. Acidolytic cleavage of the resulting resin afforded c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>23</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC530**) in 83% purity.  $t_R = 8.01$  min (method A). MS(ESI)  $m/z$ : 1453.0 [M+H]<sup>+</sup>, 1475.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 1604.9 [M+TFA+K]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>137</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 364.0153, found 364.0168; calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>136</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 485.0179, found 485.0197 and calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>135</sub>N<sub>17</sub>O<sub>12</sub> 727.0233; found 727.0237.

### 3. Resultats

---

#### 3.1.4.5. Bacterial and fungal strains and growth conditions

The following plant pathogenic bacterial strains were used: *Erwinia amylovora* PMV6076 (Institut National de la Recherche Agronomique, Angers, France), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, Spain) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 2133-2 (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Spain). All bacteria were stored in Luria Bertani (LB) broth supplemented with glycerol (20%) and maintained at -80 °C. *E. amylovora* and *Pss* were scrapped from LB agar after growing for 24 h and *Xav* after growing for 48 h at 25 °C. The cell material was suspended in sterile water to obtain a suspension of  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>.

The following plant pathogenic fungal strains were used: *Penicillium expansum* EPS 26 (INTEA, University of Girona), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* FOL 3 race 2 (ATCC 201829, American Type Culture Collection). Strains were cultured on potato dextrose agar (PDA) plates (Difco) using aseptic procedures to avoid contamination. Conidia from fungal mycelium for *P. expansum* were obtained from 5-day-old PDA cultures of the fungus incubated at 25 °C. Inoculum was prepared by scraping spore material from the culture surfaces with a wet cotton swab and resuspending it in distilled water containing 0.5% of Tween 80. Microconidia of *F. oxysporum* were obtained from 1-week-old potato dextrose broth (PDB) cultures (Oxoid) of the fungus incubated at 25 °C in the dark in a rotary shaker at 125 rpm. After incubation, the culture was filtered through several layers of sterile cheesecloth to eliminate macroconidia and mycelial growth of the fungus. Then, the effluent was centrifuged at  $8000 \times g$  for 20 min at 4 °C, and the pellet was resuspended in sterile water. The concentration of conidia was determined using a hemacytometer and adjusted to  $10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> for *F. oxysporum*, and  $10^3$  conidia mL<sup>-1</sup> for *P. expansum*.

#### 3.1.4.6. Antibacterial and antifungal activity

Lyophilized compounds were solubilized in sterile Milli-Q water to a final concentration of 1000 µM and filter sterilized through a 0.22 µm pore filter. For minimum inhibitory concentration (MIC) assessment, dilutions of the compounds were made to obtain a stock concentration of 500, 250, 125, 62.5 and 31.125 µM. For antibacterial activity twenty microlitres of each dilution were mixed in a microtiter plate well with 20 µl of the corresponding suspension of the bacterial indicator, 160 µl of Trypticase Soy Broth (TSB) (BioMérieux, France) to a total volume of 200 µl. For antifungal activity twenty microlitres of

each stock solution were mixed in a microtiter plate well with 80  $\mu\text{l}$  of the corresponding suspension of the fungal pathogen and 100  $\mu\text{l}$  of double concentrated PDB to a total volume of 200  $\mu\text{l}$  containing 0.003% w/v of chloramphenicol.

Three replicates for each strain, compound and concentration were used. Positive controls contained water instead of compound and negative controls contained compounds without bacterial suspension. Microbial growth was automatically determined by optical density measurement at 600 nm (Bioscreen C, LabSystem, Helsinki, Finland). For antibacterial activity microplates were incubated at 25°C with 20 sec shaking before hourly absorbance measurement for 48 h. For antifungal activity microplates were incubated at 20 °C with 1 min shaking before absorbance measurement that were done every two hours during seven days. The experiment was repeated twice. The MIC was taken as the lowest compound concentration with no growth at the end of the experiment.

#### 3.1.4.7. Hemolytic activity

The hemolytic activity of the compounds was evaluated by determining hemoglobin release from erythrocyte suspensions of fresh human blood (5% vol/vol). Blood was aseptically collected using a BD vacutainer K2E System with EDTA (Belliver Industrial State, Plymouth, U.K.) and stored for less than 2 hours at 4°C. Blood was centrifuged at 6000g for 5 min, washed three times with TRIS buffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2) and diluted. Compounds were solubilized in TRIS buffer to a stock concentration of 500, 300 and 100  $\mu\text{M}$  (final concentrations tested were 250, 150 and 50  $\mu\text{M}$ ). Sixty five microliters of human red blood cells were mixed with 65  $\mu\text{l}$  of the compound solution and incubated under continuous shaking for 1 h at 37°C. Then, the tubes were centrifuged at 3500g for 10 min. Eighty microliter aliquots of the supernatant were transferred to 100-well microplates (Bioscreen) and diluted with 80  $\mu\text{l}$  of Milli-Q water. Hemolysis was measured as the absorbance at 540 nm with a Bioscreen plate reader. Complete hemolysis was determined in TRIS buffer plus melittin at 100  $\mu\text{M}$  final concentration (Sigma-Aldrich Corporation, Madrid, Spain) as a positive control. The percentage of hemolysis (H) was calculated using the equation:  $H = 100 \times [(O_p - O_b) / (O_m - O_b)]$ , where  $O_p$  was the density for a given compound concentration,  $O_b$  for the buffer, and  $O_m$  for the melittin positive control.



### 3. Resultats

---

#### 3.1.5. Acknowledgements

S. Vilà was the recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya. This work was financed by grants AGL2009-13255-C02-02/AGR and AGL2009-13255-C02-01/AGR. LIPPSO and CIDSAV groups are recognized as 2009SGR182 and 2009SGR812, respectively, by the Catalanian Government. We also acknowledge the Serveis Tècnics de Recerca of the University of Girona for the ESI-MS and HRMS analyses.

#### 3.1.6. References

1. G. N. Agrios, *Plant pathology*, Academic Press, San Diego, California, 5th edn., 2005.
2. (a) B. Bechinger, K. Lohner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1529-1539; (b) R. E. W. Hancock, H. G. Sahl, *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**, 1551-1557; (c) H. W. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1292-1302; (d) E. Montesinos, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **270**, 1-11; (e) K. Keymanesh, S. Soltani, S. Sardari, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **25**, 933-944; (f) J. F. Marcos, M. Gandía, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2009, **4**, 659-671.
3. (a) Y. Shai, A. Makovitzky, D. Avrahami, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2006, **7**, 479-486; (b) S. K. Strauss, R. E. W. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1215-1229; (c) R. Jerala, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2007, **16**, 1159-1169; (d) G. Pirri, A. Giuliani, S. F. Nicoletto, L. Pizzuto, A. C. Rinaldi, *Cent. Eur. J. Biol.*, 2009, **4**, 258-273; (e) M. Strieker, M. A. Marahiel, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 607-617.
4. M. L. Mangoni, Y. Shai, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2011, **68**, 2267-2280.
5. G. Laverty, M. McLaughlin, C. Shaw, S. P. Gorman, B. F. Gilmore, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2010, **75**, 563-569.
6. S. Monroc, E. Badosa, E. Besalú, M. Planas, E. Bardají, E. Montesinos, L. Feliu, *Peptides*, 2006, **27**, 2575-2584.
7. J. T. Mika, G. Moiset, A. D. Cirac, L. Feliu, E. Bardají, M. Planas, D. Sengupta, S. J. Marrink, B. Poolman, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1808**, 2197-2205.
8. (a) S. A. Kates, N. A. Solé, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 1993, **34**, 1549-1552; (b) L. Feliu, G. Oliveras, A. D. Cirac, E. Besalú, C. Rosés, R. Colomer, E. Bardají, M. Planas, T. Puig, *Peptides*, 2010, **31**, 2017-2026.
9. (a) A. Aletras, K. Barlos, D. Gatos, S. Koutsogianni, P. Mamos, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1995, **45**, 488-496; (b) L. Bourel, O. Carion, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *J. Peptide Sci.*, 2000, **6**, 264-270.

10. (a) D. Li, D. L. Elbert, *J. Peptide Res.*, 2002, **60**, 300-303; (b) S. Flemer, A. Wurthmann, A. Mamai, J. S. Madalengoitia, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 7593-7602.
11. (a) J. Farrera-Sinfreu, M. Royo, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 7813-7815; (b) B. S. Vig, T. F. Murray, J. V. Aldrich, *Biopolymers*, 2003, **71**, 620-637; (c) E. Gorrea, D. Carbajo, R. Gutiérrez-Abad, O. Illa, V. Branchadell, M. Royo, R. M. Ortuño, *Org. Biol. Chem.*, 2012, **10**, 4050-4057.
12. (a) W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, P. D. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 2209-2210; (b) S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1603-1606.
13. (a) S. E. Blondelle, K. Lohner, *Biopolymers*, 2000, **55**, 74-87; (b) D. Oh, S. Y. Shin, S. Lee, J. H. Kang, S. D. Kim, P. D. Ryu, K. S. Hahm, Y. Kim, *Biochemistry*, 2000, **39**, 11855-11864.
14. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. Cook, *Anal. Biochem.* 1970, **34**, 595-598.



**3.2. Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides**

### 3. Resultats

---

The work of this section has been submitted to *Org. Biomol. Chem.*:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides. *Org. Biomol. Chem. Submitted.*

#### **3.2. Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides**

Cyclolipopeptides derived from the antimicrobial peptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) were prepared on solid-phase by incorporating fatty acids of different length at Lys<sup>5</sup> and screened against four plant pathogens. Best derivatives incorporated an acyl substituent of 4 to 6 carbon atoms. The influence on the antimicrobial activity of the Lys residue that is derivatized was evaluated. In general, acylation of Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> or Lys<sup>5</sup> rendered the sequences with the highest activity. Incorporation of a D-amino acid maintained the antimicrobial activity while significantly reduced the hemolysis. Replacement of Phe with a His also yielded cyclolipopeptides with low hemolytic activity. Furthermore, the best derivatives exhibited low phytotoxicity in tobacco leaves.

##### **3.2.1. Introduction**

In the last decades the use of antimicrobial peptides in plant protection has been widely studied due to their excellent biological properties. This family of peptides display a wide spectrum of activity against bacteria and fungi,<sup>1</sup> selectivity towards microbial targets, and a low frequency in developing microbial resistance.<sup>2</sup> Despite being structurally diverse, antimicrobial peptides have some features in common. They are typically linear or cyclic sequences, contain around 10-50 amino acids, are cationic and have up to 50% of hydrophobic residues, and are able to adopt an amphipathic structure. These structural characteristics govern the mechanism of action of these peptides, which mainly target the microbial membrane.<sup>3</sup>

A subfamily of antimicrobial peptides includes native lipopeptides which mainly consist of a short (six to seven D- and L-amino acids) linear or cyclic peptide sequence, with either a net positive or a negative charge, and containing a lipid tail.<sup>4</sup> They differ on the length and composition of the fatty acid tail and on the number, type and configuration of the amino acids in the peptide moiety. Lipopeptides also show a wide range of biological activities, such as antimicrobial, cytotoxic and surfactant.

The general mechanism described for lipopeptides is similar to that of antimicrobial peptides. They also target the microbial membrane and mainly act by (i) inhibiting the synthesis of cell

**3.3. Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles**

The work of this section led to the following publication:

- ❖ S. Vilà, C. Camó, E. Figueras, E. Badosa, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 10.1002/ejoc.201402111R1.



Vilà, S., Camó, C., Figueras, E., Badosa, E., Montesinos, E., Planas, M. and Feliu, L. "Solid-Phase Synthesis of Cyclic Lipopeptidotriazoles". *European journal of organic chemistry*. Vol. 2014, issue 22 (August 2014) : 4785–4794.

<http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201402111>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.201402111/full>

Article first published online: 24 JUN 2014

Copyright © 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

## ABSTRACT

The solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles derived from the cyclic decapeptide c(Lys-Lys<sup>2</sup>-Leu-Lys-Lys<sup>5</sup>-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194), incorporating a triazolyl ring at Lys<sup>2</sup> and a hexanoyl group at Lys<sup>5</sup>, was studied. Four different strategies that required the use of five orthogonal protecting groups (Fmoc, *t*Bu, All, pNZ, ivDde) were explored. The influence of the side-chain protection of Lys<sup>2</sup> and Lys<sup>5</sup> with the ivDde and pNZ groups was evaluated by incorporating Lys<sup>2</sup>(ivDde)/Lys<sup>5</sup>(pNZ) or Lys<sup>2</sup>(pNZ)/Lys<sup>5</sup>(ivDde). The order of removal of these protecting groups and of the introduction of the hexanoyl and triazolyl moieties was also studied. The best strategy included: (i) synthesis of a cyclic peptidyl resin bearing Lys<sup>2</sup>(ivDde) and Lys<sup>5</sup>(pNZ); (ii) pNZ group removal; (iii) acylation with hexanoic acid; (iv) ivDde group removal; and (v) acylation with propiolic acid followed by an azide–alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. By using this protocol, a set of cyclic lipopeptidotriazoles was prepared in high purities.

## KEYWORDS

- Synthetic methods;
- Solid-phase synthesis;
- Peptides;
- Lipopeptides;
- Protecting groups;
- Nitrogen heterocycles



**3.4. Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide BPC194**

The work of this section correspond to a mansucrpt in preparation:

- ❖ S. Vilà, E. Badosa, E. Montesinos, L. Feliu, M. Planas, Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide **BPC194**. *In preparation*.

#### **3.4. Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide BPC194**

The solid-phase conjugation of the antimicrobial peptide c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) to linear and cyclic sequences through a 1,2,3-triazole ring is described. Cyclic alkynyl peptidyl resins derived from **BPC194** were reacted with azidopeptides derived from the antimicrobial peptide **BP100** or the bacteriocin iturin A. The cyclic alkynyl peptidyl resins incorporated at position 3 a propargylglycine, a glutamic acid residue derivatized with propargyl amine or a lysine bearing a propioloyl group. The cycloaddition reaction of the cyclic alkynyl resins with the BP100-derived azidopeptides depended on the length and the sequence of the azidopeptides. Reactions were performed by treatment of the alkynyl resin with CuI and ascorbic acid, and required the presence of piperidine/DMF or of DIEA in 2,6-lutidine/DMF. The latter conditions also allowed the conjugation of the alkynyl peptidyl resin bearing a propioloyl lysine residue to a linear azidotetrapeptide as well as to a linear and a cyclic azidooctapeptide derived from the cyclic moiety of iturin A. Although peptide conjugates displayed lower antimicrobial activity than **BPC194**, sequences active against the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, and the fungus *Fusarium oxysporum* were identified. The linkage of **BPC194** to the BP100-derived sequences increased the hemolysis of the parent peptide, while its ligation to iturin A-derived peptides rendered conjugates as low hemolytic as **BPC194**.

##### **3.4.1. Introduction**

In recent years, the increasing emergence of multidrug-resistant bacterial strains has become a serious threat in medicine and agriculture, and has resulted in an intense research effort to identify antibiotics with new modes of action. Moreover, the use of antibiotics in agriculture is hampered by environmental concerns evidencing the need for novel antimicrobial agents.<sup>1</sup> In this context, antimicrobial peptides (AMPs) are considered as promising agents for the treatment of plant diseases caused by microorganisms.<sup>2</sup> To date, a very large number of AMPs have been isolated from natural sources, and most of them exhibit a broad spectrum of activity and a low frequency in developing microbial resistance.<sup>2b,2d,3</sup>

Despite their interesting properties, natural AMPs usually display poor bioavailability, are prone to protease degradation and might show cytotoxic effects to animal and plants.

### 3. Resultats

---

Different strategies have been pursued to increase the effectiveness of AMPs. Among them, synthetic AMPs based on the structure of natural peptides have been developed and sequences with comparable or improved activity have been identified.<sup>4</sup> An alternative approach is the conjugation of two identical or different peptide sequences. In these homo and heterodimeric peptides it has been shown that the intermolecular bonding of the sequences can reinforce the activity of the two individual chains.<sup>5</sup>

One effective method for the conjugation of biomolecules is the copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition reaction (CuACC).<sup>6</sup> In particular, since first reported by Meldal and co-workers,<sup>7</sup> the CuACC reaction has been extensively used to covalently link two peptide fragments bearing azide and alkyne groups through a stable triazole moiety. This reaction is ideally suited for the synthesis of peptide dimers due to its high reactivity and selectivity. For example, it has been applied to the preparation of ubiquitin dimers,<sup>8</sup> dimeric HIV fusion inhibitor peptides<sup>9</sup> and neurotensin(8-13)-phosphopeptide heterodimers.<sup>10</sup>

Within our efforts of finding new agents to control plant pathogens, in a previous study we designed peptidotriazoles derived from the antimicrobial cyclic decapeptide c(Lys-Lys-Leu<sup>3</sup>-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) by incorporating a 1,2,3-triazole at the side-chain of the residue at the 3-position.<sup>11</sup> Peptidotriazoles were synthesized via a cycloaddition reaction between an alkynyl or an azidoresin and an azide or an alkyne in solution, respectively. A peptide conjugate was also prepared by linking an alkynyl resin derived from **BPC194** and an azidopeptide through a triazolyl moiety. Peptide sequences with high activity against plant pathogenic bacteria and low hemolysis were identified.

Based on these results, we planned to extend the above methodology to the synthesis of peptide conjugates derived from **BPC194** and the antimicrobial linear peptide **BP100** or the bacteriocin iturin A. **BP100** (H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub>) displays an interesting antimicrobial activity against phytopathogens and is low hemolytic.<sup>12</sup> Regarding iturin A, this lipopeptide consists of a peptide ring with seven  $\alpha$ -amino acids and the unusual  $\beta$ -amino fatty acid iturinic acid.<sup>13</sup> Iturin A behaves as a notable biosurfactant, exhibits strong antifungal activity, and displays antibacterial activity against a few species. Taking into account the properties of these sequences, we envisaged that the synthesis of peptide conjugates derived from **BPC194** and **BP100** or iturin A could provide compounds with an interesting biological activity profile.





Discussió  
General





La creixent aparició de soques bacterianes resistents als antibiòtics ha provocat la cerca i desenvolupament de nous compostos bactericides. En els recents anys, els pèptids antimicrobians han atret una gran atenció ja que, degut al seu mecanisme d'acció, són poc susceptibles de provocar resistència bacteriana, i a més, no són contaminants mediambientals. Malgrat l'existència d'un ampli rang de pèptids antimicrobians naturals amb una activitat biològica elevada, aquests han mostrat alguns desavantatges que limiten el seu ús. Presenten seqüències llargues, una baixa biodisponibilitat, són fàcilment degradables per les proteases i poden ser tòxics enfront animals i plantes. Per poder resoldre aquests inconvenients s'han utilitzat diferents estratègies. Una d'elles ha consistit en el disseny de nous pèptids antimicrobians sintètics basats en l'estructura de pèptids naturals. S'han identificat pèptids més curts, potents, estables i menys tòxics.<sup>1</sup>

En particular, el grup LIPPSO, amb l'objectiu de trobar nous agents per combatre patògens de plantes, ha dissenyat i sintetitzat una quimioteca de decapeptids cíclics amb estructura general  $c(X_5\text{-Phe-X}_3\text{-Gln})$  on X és Lys o Leu. D'aquesta quimioteca s'ha identificat  $c(\text{Lys-Lys}^2\text{-Leu}^3\text{-Lys-Lys}^5\text{-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln})$  (**BPC194**), amb una elevada activitat enfront els bacteris fitopatògens *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (CMI entre 3.1 i 12.5  $\mu\text{M}$ ). Aquest ciclodecapeptid també ha mostrat una baixa hemòlisi, 17% a 375  $\mu\text{M}$ .<sup>2</sup> En aquesta tesi doctoral, amb l'objectiu de preparar nous agents antimicrobians, s'ha estudiat la síntesi de ciclolipopeptids, ciclolipopeptidotriazoles i de pèptids conjugats derivats de **BPC194**.

### 4.1. Ciclolipopeptids derivats de BPC194

L'acilació de pèptids antimicrobians naturals o sintètics amb àcids grassos constitueix una estratègia útil per millorar l'activitat antimicrobiana d'aquests pèptids. S'ha descrit que la presència d'una cadena d'àcid gras millora la interacció del pèptid amb la membrana, degut a la seva hidrofobicitat.<sup>3</sup> L'elevada activitat antimicrobiana de **BPC194** i les excel·lents propietats biològiques descrites pels lipopeptids ens han portat a dissenyar i sintetitzar lipopeptids derivats de **BPC194** amb l'estructura general que es mostra a la Figura 4.1. Aquests lipopeptids contenen una cadena d'àcid gras al grup  $N^{\epsilon}$ -amino del residu de Lys<sup>5</sup>. Aquest residu ha estat seleccionat perquè en estudis anteriors ha mostrat que està involucrat en la interacció de **BPC194** amb membranes model carregades negativament.<sup>4</sup> La incorporació de la cadena d'àcid gras a aquesta posició podria afavorir la inserció del pèptid a la membrana i, per tant, millorar l'activitat biològica d'aquest.

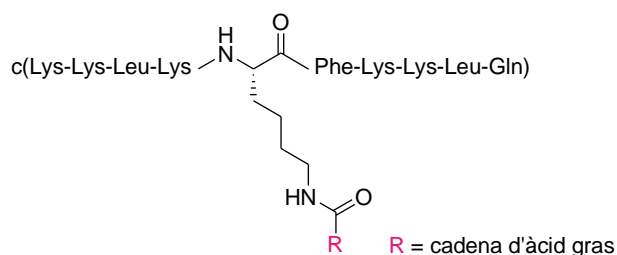


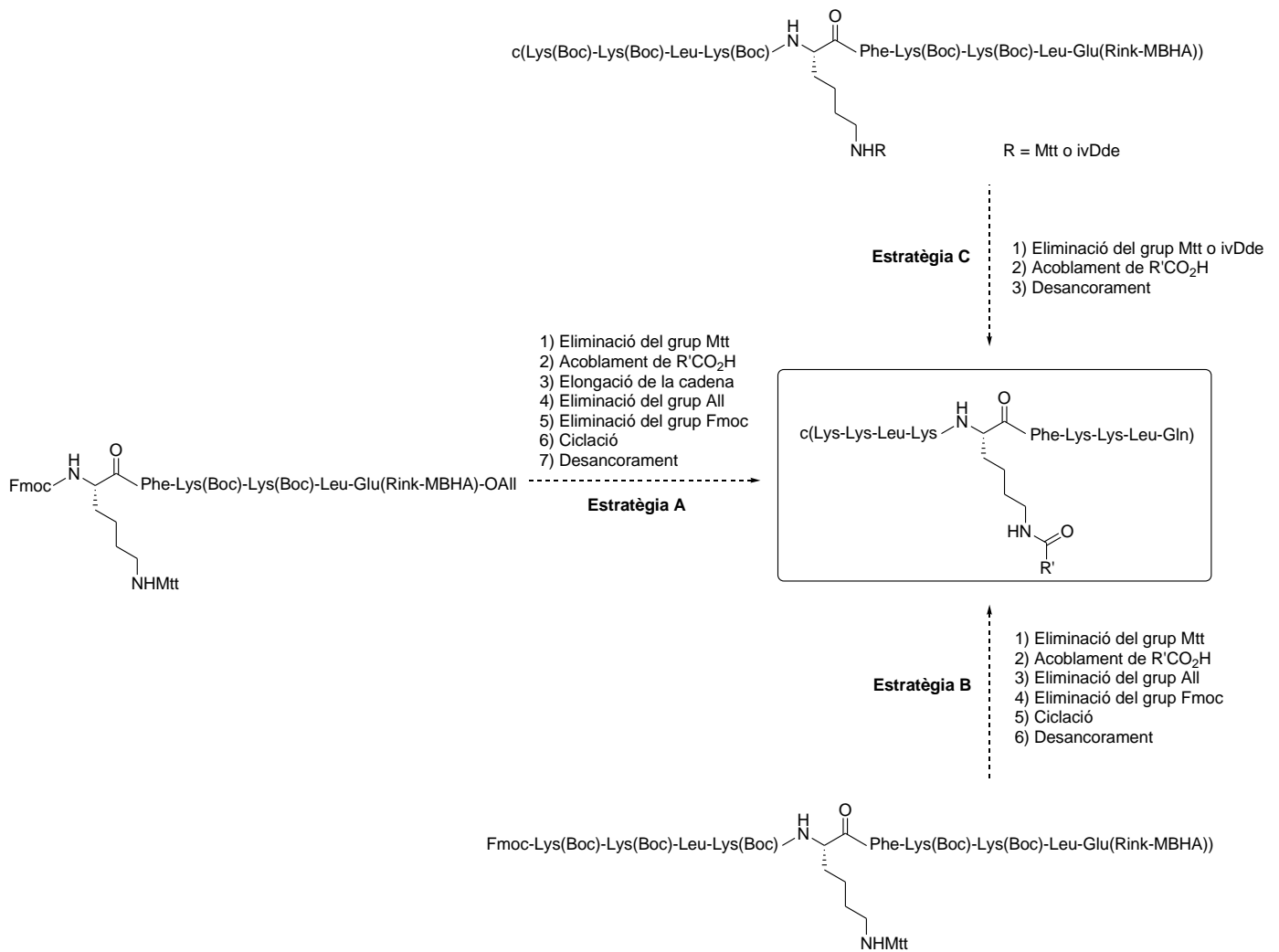
Figura 4.1: Estructura general dels ciclolipopèptids

### 4.1.1. Estudi d'una estratègia de síntesi en fase sòlida de ciclolipopèptids derivats de BPC194

La síntesi dels ciclolipopèptids derivats de **BPC194** s'ha avaluat seguint tres estratègies diferents, basades en un protocol Fmoc/<sup>t</sup>Bu/All. En aquestes estratègies l'acilació selectiva del grup  $N^{\epsilon}$ -amino de la Lys<sup>5</sup> ha requerit l'ús d'un grup protector que es pugui eliminar sense afectar els altres grups de la seqüència i que no causi l'alliberació prematura del pèptid del suport sòlid. Per aquest motiu, s'ha estudiat l'ús del grup Mtt, un grup àcid làbil, i del grup ivDde, el qual s'elimina en medi bàsic. L'altra etapa clau d'aquestes tres estratègies ha estat l'acilació del grup  $N^{\epsilon}$ -amino lliure de la Lys<sup>5</sup> amb un àcid gras ( $R'CO_2H$ ).

La primera estratègia (Estratègia A, Esquema 4.1) ha consistit en sintetitzar la seqüència lineal fins el residu de lisina que es vol derivatitzar, acilar aquest residu de Lys, elongar la cadena peptídica fins a obtenir la seqüència lineal i, finalment, ciclar el lipopèptid lineal resultant. La segona estratègia (Estratègia B, Esquema 4.1) ha implicat la síntesi de la seqüència lineal, l'acilació selectiva de la Lys<sup>5</sup> i, finalment, la ciclació del lipopèptid lineal resultant. La tercera estratègia (Estratègia C, Esquema 4.1) ha consistit en sintetitzar el pèptid cíclic i acilar la Lys<sup>5</sup>.

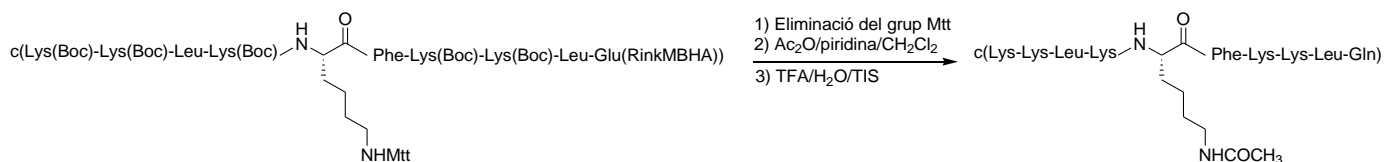
## 4. Discussió general



Esquema 4.1: Estratègies per la síntesi en fase sòlida dels ciclolipopeptids

Inicialment, s'han estudiat les condicions d'eliminació del grup Mtt de la corresponent peptidil resina cíclica (Esquema 4.2) per tractament amb  $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:99). S'ha avaluat el temps de reacció i el número de tractaments. Tenint en compte que el grup Mtt s'elimina en les condicions àcides de l'etapa de desancorament, ha estat necessari acètilar la resina resultant de cada assaig per a poder comprovar que l'eliminació del grup Mtt hagi estat completa. D'aquest estudi, s'ha conclòs que les condicions més favorables per a l'eliminació del grup Mtt d'un residu de lisina present en una peptidil resina cíclica consisteixen en 6 tractaments de 5 minuts cadascun amb una solució de  $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:99) sota agitació a temperatura ambient. Aquestes condicions proporcionen el pèptid acetilat com a producte majoritari i només traces de subproducte no acilat.

## 4. Discussió general



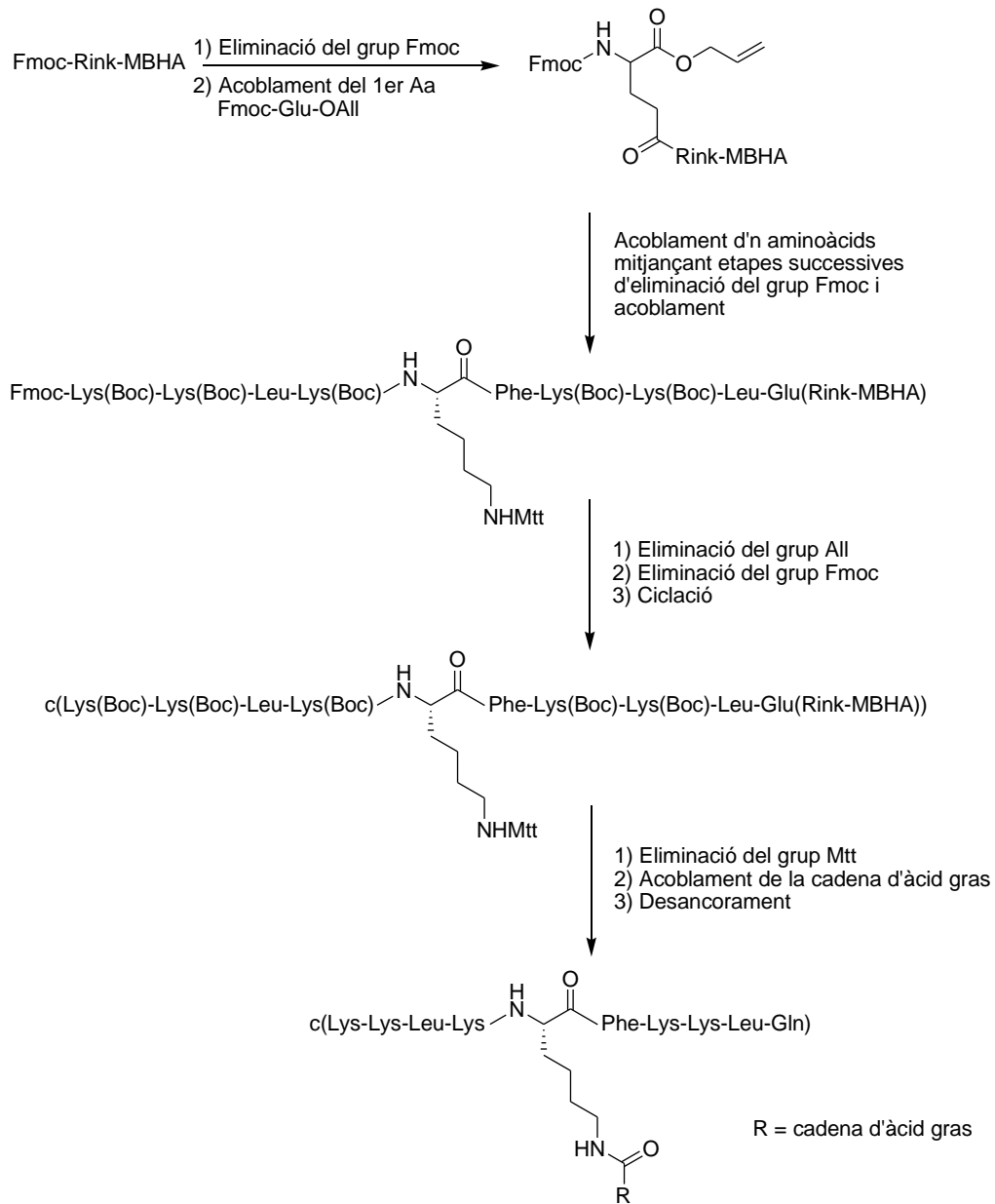
Esquema 4.2: Estudi de l'eliminació del grup Mtt

En el cas de l'eliminació del grup Mtt de les peptidil resines lineals (Estratègies A i B, Esquema 4.1) els millors resultats s'han obtingut quan aquestes resines s'han sotmès a 4 tractaments de 5 minuts cadascun amb TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99). Aquestes condicions han proporcionat els pèptids acetilats desitjats però amb una puresa inferior a l'obtinguda a partir de la peptidil resina cíclica.

Després de l'etapa d'eliminació del grup Mtt, s'ha estudiat l'acilació de les peptidil resines anteriors amb un àcid gras. S'han assajat diverses condicions i s'ha observat que els millors resultats s'obtenen utilitzant 10 o 15 equivalents de l'àcid gras en presència de DIPCDI i Oxima en NMP durant 1 h. Pel que fa a les peptidil resines lineals (Estratègia A i B, Esquema 4.1) els pèptids acilats esperats s'han obtingut juntament amb dos subproductes diacilats. Un d'aquests dos subproductes incorpora dos grup acil a la cadena lateral de dos residus de Lys. L'altre subproducte presenta un grup acil a la cadena lateral d'una Lys i un segon grup acil a l'extrem N-terminal de la cadena peptídica. Aquest darrer subproducte resulta de l'eliminació del grup Fmoc N-terminal per part del grup amino de la cadena lateral d'un residu de Lys.<sup>5</sup> En canvi, l'acilació de la peptidil resina cíclica proporciona el ciclolipopèptid desitjat amb bona puresa, però s'observen traces de producte diacilat. Malgrat això aquesta estratègia té l'avantatge respecte a l'estratègia A i B que evita l'acilació de l'extrem N-terminal. Per tal de millorar aquests resultats, s'ha estudiat l'ús del grup protector ivDde enlloc del grup Mtt. Les condicions més favorables per l'eliminació del grup ivDde consisteixen en sotmetre la peptidil resina cíclica a 4 tractaments de 20 min cadascun amb hidrazina·H<sub>2</sub>O/NMP (2:98) sota agitació. L'acilació del grup amino lliure resultant amb un àcid gras ha portat a l'obtenció del ciclolipopèptid esperat i no s'ha detectat la formació de subproducte diacilats.

L'anàlisi de les tres rutes mostra que la millor estratègia sintètica ha resultat ser la C consistent en l'acilació de la corresponent seqüència cíclica unida al suport sòlid amb el residu de Lys a derivatitzar protegit amb el grup ivDde (Esquema 4.3). L'estudi de l'eliminació del grup Mtt de les peptidil resines lineals (estratègia B i C) ha proporcionat el producte desitjat amb una puresa inferior juntament amb els dos subproductes anteriorment descrits per la estratègia A i a més, el subproducte diacilat provinent de l'eliminació del grup Fmoc de

l'extrem N-terminal pel grup  $\epsilon$ -amino d'un residu de lisina i posterior acilació d'aquests dos grups amino.



Esquema 4.3: Síntesi dels ciclolipopèptids a partir de l'estratègia C

## 4. Discussió general

### 4.1.2. Estudi de la influència de la introducció de modificacions en l'estructura de ciclolipopèptids derivats de BPC194

La segona part d'aquesta tesi doctoral s'ha centrat en la introducció de modificacions en l'estructura dels ciclolipopèptids i en l'anàlisi de la seva influència en l'activitat biològica. Concretament, s'ha estudiat la incorporació d'àcids grassos de diferent mida i la variació de la seva posició en la seqüència peptídica. De fet a la literatura s'ha descrit que la llargada de la cadena d'àcid gras té una gran influència en l'activitat antimicrobiana dels lipopèptids. En general, la introducció d'una cadena de 10-16 carbonis en una seqüència peptídica dóna lloc a lipopèptids amb elevada activitat antimicrobiana.<sup>3,6</sup> D'altra banda, s'ha analitzat l'efecte de la incorporació de D-aminoàcids o d'un residu d'His ja que, prèviament, el grup LIPPSO ha observat que la presència d'aquests residus generalment millora el perfil biològic dels pèptids reduint la seva citotoxicitat.<sup>7</sup>

Per al desenvolupament d'aquest estudi s'han preparat un total de 51 ciclolipopèptids seguint l'estratègia C descrita en l'apartat anterior. L'estructura general d'aquests compostos es mostra a la Figura 4.2.

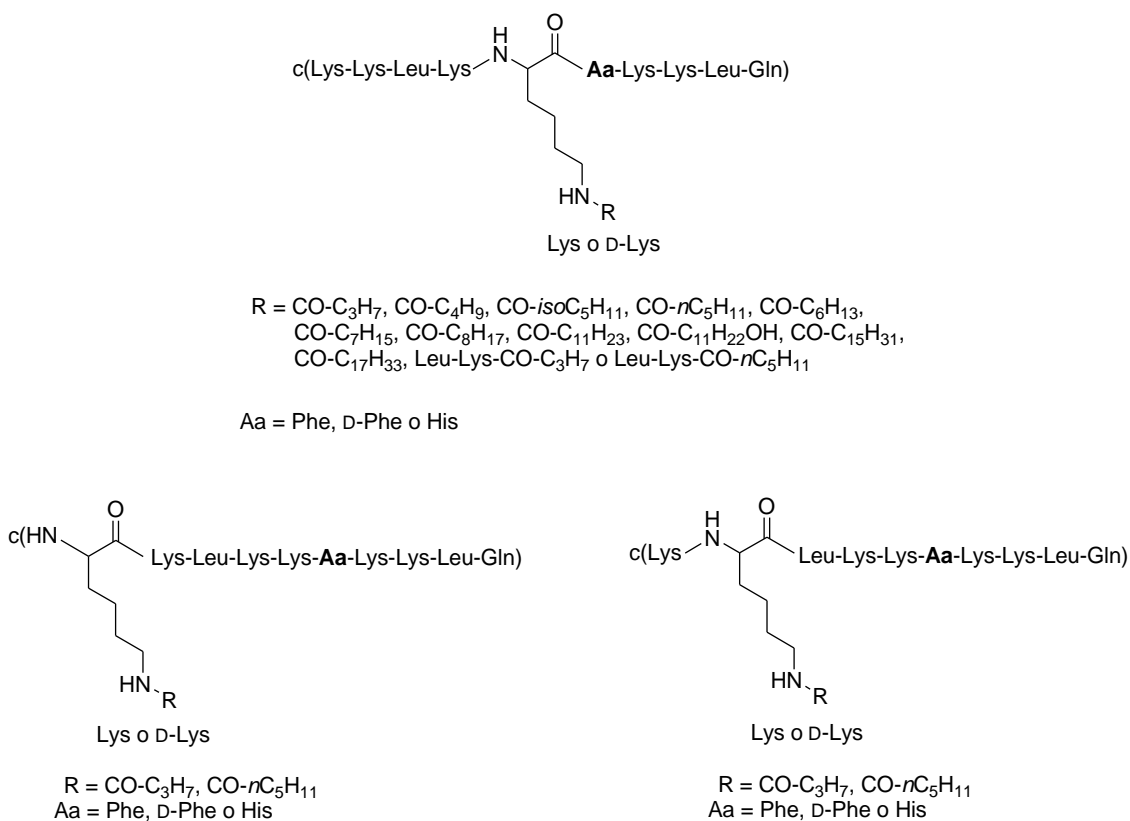


Figura 4.2: Estructura dels ciclolipopèptids sintetitzats derivats de BPC194

### 4.1.2.1. Influència de la llargada de la cadena hidrofòbica

Per avaluar la influència de la llargada de la cadena hidrofòbica, **BPC194** s'ha acilat amb àcids grassos de 4 a 18 àtoms de carboni (Taula 4.1). A més, tenint en compte que l'estructura de molts ciclolipopèptids conté una cadena lipopeptídica unida a l'anell, s'ha derivatitzat la Lys<sup>5</sup> amb el dipèptid Leu-Lys acilat amb àcid hexanoic (**BPC596**). En la síntesi d'aquest ciclolipopèptid després de l'eliminació del grup ivDde s'han acoblat seqüencialment els aminoàcids Fmoc-Leu-OH i Fmoc-Lys(Boc)-OH, s'ha eliminat el grup Fmoc i s'ha acilat amb àcid hexanoic.

Amb la col·laboració del grup CIDSAV de la Universitat de Girona s'ha avaluat l'activitat antibacteriana i antifúngica dels ciclolipopèptids sintetitzats enfront els bacteris *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, i enfront el fong *F. oxysporum*. Els valors s'han comparat amb els del pèptid de partida **BPC194** (Taula 4.1). S'ha determinat la concentració mínima inhibidora (CMI), és a dir, la mínima concentració de pèptid necessària per tal de què no hi hagi creixement dels microorganismes al final de l'experiment. La toxicitat dels ciclolipopèptids enfront cèl·lules eucariotes s'ha mesurat per mitjà de la capacitat que tenen aquests per a trencar els glòbuls vermells de la sang humana, i els resultats s'han comparat amb la melitina, pèptid que es caracteritza per presentar un grau d'hemòlisi molt elevat.



#### 4. Discussió general

Taula 4.1: Activitat antimicrobiana (CMI) enfront bacteris i fongs fitopatògens, i citotoxicitat dels ciclolipopeptids incorporant una cadena d'àcid gras de diferent mida

Pèptid	Seqüència <sup>a</sup>	CMI (µM)				Hemòlisi (%) <sup>c</sup>
		<i>Xav</i> <sup>b</sup>	<i>Pss</i> <sup>b</sup>	<i>Ea</i> <sup>b</sup>	<i>Fo</i> <sup>b</sup>	
<b>BPC194</b>	c(KKLKFKKLQ)	3.1-6.2	3.1-6.2	6.2-12.5	<3.1	4 ± 1
<b>BPC498</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	78 ± 4
<b>BPC500</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )FKKLQ)	<3.1	6.2-12.5	12.5-25	<3.1	28 ± 5
<b>BPC502</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> )FKKLQ)	>50	>50	>50	>50	78 ± 1
<b>BPC504</b>	c(KKLKK(CO- <i>iso</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )FKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	89 ± 2
<b>BPC524</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> OH)FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	100 ± 8
<b>BPC526</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )FKKLQ)	<3.1	12.5-25	12.5-25	3.1-6.2	62 ± 2
<b>BPC528</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )FKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	12.5-25	6.2-12.5	98 ± 7
<b>BPC530</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> )FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	6.2-12.5	89 ± 7
<b>BPC592</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	12.5-25	100 ± 4
<b>BPC594</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )FKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	25-50	6.2-12.5	93 ± 11
<b>BPC596</b>	c(KKLKK(LK-CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )FKKLQ)	<3.1	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	93 ± 5
<b>BPC622</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> )FKKLQ)	3.1-6.2	25-50	>50	>50	91 ± 2

<sup>a</sup> CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butanoïl; CO-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, pentanoïl; CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, hexanoïl; CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, 4-metilpentanoïl; CO-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, 2-metilhexanoïl; CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, octanoïl; CO-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>, 4-metiloctanoïl; CO-C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>OH, 12-hidroxilauroïl; CO-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>, lauroïl; CO-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>, palmitoïl; CO-C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, oleoïl.

<sup>b</sup> *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*.

<sup>c</sup> Percentatge d'hemòlisi a 150 µM més l'interval de confiança ( $\alpha = 0.05$ ).

Les seqüències que incorporen una cadena hidrofòbica entre 4 i 6 carbonis han presentat un millor perfil d'activitat essent les seqüències més actives les que incorporen un grup butanoïl (**BPC500**), 4-metilpentanoïl (**BPC504**), pentanoïl (**BPC526**) i hexanoïl (**BPC528**) juntament amb la seqüència que conté el dipèptid Leu-Lys amb un grup hexanoïl (**BPC596**) amb valors de CMI entre <3.1 a 25 µM. A diferència del que s'ha descrit a la literatura<sup>6</sup> s'ha observat que la presència de cadenes hidrofòbiques de 12-18 carbonis (**BPC502**, **BPC524**, **BPC530** i **BPC622**) està associada a una activitat antimicrobiana inferior.

Pel que fa a l'hemòlisi, excepte **BPC500** (28% d'hemòlisi a 150µM), tots els pèptids han resultat ser hemolítics amb valors compresos entre 62 i 100%. En la majoria d'articles s'ha

descriu que els lipopeptids presenten una elevada citotoxicitat, ja que no són tan selectius enfront les cèl·lules eucariotes degut a la seva elevada hidrofobicitat.<sup>3,6</sup>

#### 4.1.2.2. Influència de la posició de la cadena hidrofòbica

Per avaluar la influència de la posició de la cadena hidrofòbica en l'activitat biològica i en l'hemòlisi, cada residu de Lys del peptid **BPC194** ha estat derivatitzat amb àcid hexanoic i els residus de Lys<sup>1</sup> i Lys<sup>2</sup> amb àcid butíric. S'ha avaluat l'activitat biològica dels ciclolipopeptids enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i enfront el fong *F. oxysporum*. També s'ha avaluat la seva activitat hemolítica (Taula 4.2).<sup>3a,3b</sup>

Taula 4.2: Activitat antimicrobiana (CMI) enfront bacteris i fongs fitopatògens, i citotoxicitat de ciclolipopeptids que incorporen una cadena d'àcid gras a diferents posicions

Pèptid	Seqüència <sup>a</sup>	CMI (µM)				Hemòlisi (%) <sup>c</sup>
		<i>Xav</i> <sup>b</sup>	<i>Pss</i> <sup>b</sup>	<i>Ea</i> <sup>b</sup>	<i>Fo</i> <sup>b</sup>	
<b>BPC194</b>	c(KKLKFKKLQ)	3.1-6.2	3.1-6.2	6.2-12.5	<3.1	4 ± 1
<b>BPC528</b>	c(KLKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )FKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	12.5-25	6.2-12.5	98 ± 7
<b>BPC582</b>	c(KLKKFKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )LQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	92 ± 3
<b>BPC584</b>	c(KLKKFK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )KLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	25-50	72 ± 5
<b>BPC586</b>	c(KLKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )KFKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	12.5-25	12.5-25	92 ± 9
<b>BPC588</b>	c(KK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )LKKFKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	12.5-25	6.2-12.5	95 ± 4
<b>BPC590</b>	c(K(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )KLKKFKKLQ)	3.1-6.2	6.2-12.5	6.2-12.5	12.5-25	100 ± 9
<b>BPC500</b>	c(KLKK(CO- <i>n</i> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )FKKLQ)	<3.1	6.2-12.5	12.5-25	3.1-6.2	28 ± 5
<b>BPC708</b>	c(KK(CO- <i>n</i> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )LKKFKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	<3.1	2 ± 0.5
<b>BPC710</b>	c(K(CO- <i>n</i> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )KLKKFKKLQ)	3.1-6.2	12.5-25	25-50	12.5-25	7 ± 1

<sup>a</sup> CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butanoil; CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, hexanoil.

<sup>b</sup> *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*.

<sup>c</sup> Percentatge d'hemòlisi a 150 µM més l'interval de confiança (α = 0.05).

## 4. Discussió general

---

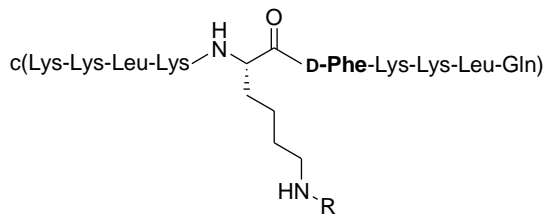
L'avaluació dels resultats ha mostrat que la posició de la cadena hidrofòbica té influència en l'activitat d'aquests ciclolipopèptids. Pel que fa als ciclolipopèptids amb un grup hexanoil, els que han presentat una elevada activitat han estat els obtinguts per acilació de la Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> o Lys<sup>5</sup> (**BPC590**, **BPC588**, i **BPC528**, respectivament). La derivatització dels residus de Lys<sup>1</sup> o Lys<sup>5</sup> amb una cadena de butanoil (**BPC710** i **BPC500**, respectivament) ha proporcionat seqüències amb una activitat important.

En referència a l'hemòlisi, la presència d'una cadena de 6 carbonis dóna lloc a seqüències molt hemolítiques (72-100% d'hemòlisi a 150µM). D'altra banda, els ciclolipopèptids que contenen una cadena de 4 carbonis a les posicions 1 i 2 (**BPC708** i **BPC710**) han mostrat una menor citotoxicitat (2 i 7% a 150 µM, respectivament) que el derivat amb aquesta cadena a la posició 5 (**BPC500**).

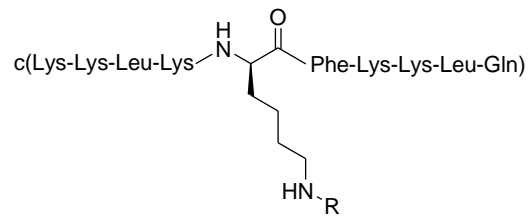
### 4.1.2.3. Influència de la introducció d'un o dos D-aminoàcids

S'han sintetitzat 22 ciclolipopèptids derivats de **BPC194** que incorporen un o més D-aminoàcids (D-Lys, D-Phe) (Figura 4.3). Aquests derivats s'han dissenyat en base a l'activitat biològica observada en els apartats anteriors. S'han escollit seqüències acilades en els residus de Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> i Lys<sup>5</sup>. En aquestes seqüències, d'una banda, s'ha substituït la Phe pel seu D-enantiòmer. D'altra banda, s'han preparat seqüències on el residu de Lys acilat s'ha reemplaçat per una D-Lys. A més, s'han sintetitzat dos ciclolipopèptids que contenen una D-Lys acilada a la posició 5 i una D-Phe. Pel que fa a la cadena hidrofòbica, la Lys<sup>5</sup> s'ha acilat amb àcid butíric, hexanoic, 4-metilpentanoic, octanoic i el dipèptid Leu-Lys juntament amb una cadena d'àcid hexanoic o butíric. Les Lys<sup>1</sup> i Lys<sup>2</sup> s'han derivatitzat amb l'àcid butíric i hexanoic. Per aquests compostos, s'ha avaluat l'activitat hemolítica, l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i l'activitat antifúngica enfront *F. oxysporum* (Taula 4.3).

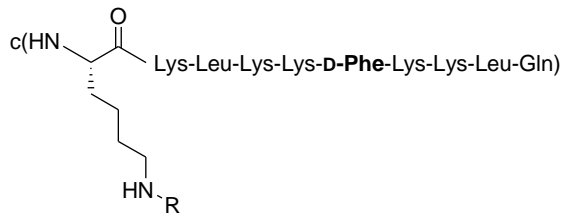
#### 4. Discussió general



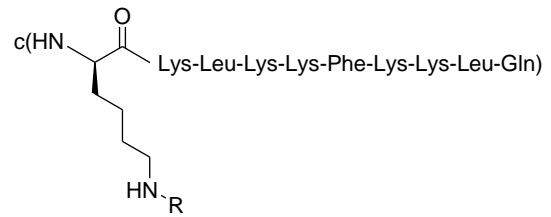
R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>,  
CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, Leu-Lys-CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> o Leu-Lys-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



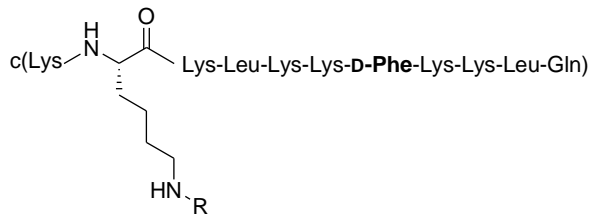
R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>,  
CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, Leu-Lys-CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> o Leu-Lys-CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



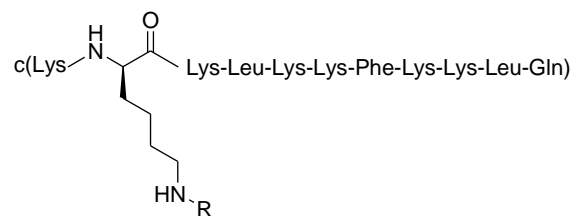
R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



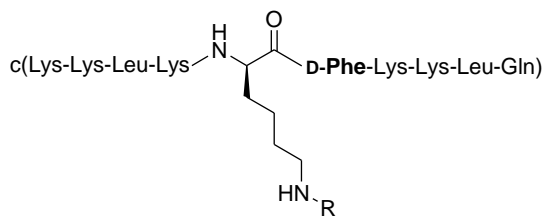
R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



R = CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



R = CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>

Figura 4.3: Ciclolipopèptids incorporant un o dos D-aminoàcids

#### 4. Discussió general

Taula 4.3: Activitat antimicrobiana (CMI) enfront bacteris i fongs fitopatògens, i citotoxicitat dels ciclolipopeptids que contenen un o dos D-aminoàcids

Pèptid	Seqüència <sup>a</sup>	CMI (µM)				Hemòlisi (%) <sup>c</sup>
		<i>Xav</i> <sup>b</sup>	<i>Pss</i> <sup>b</sup>	<i>Ea</i> <sup>b</sup>	<i>Fo</i> <sup>b</sup>	
<b>BPC624</b>	c(KKLKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))fKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	53 ± 5
<b>BPC626</b>	c(KKLKK(CO- <i>iso</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))fKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	51 ± 7
<b>BPC674</b>	c(KKLKK(LK-CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))fKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	3.1-6.2	51 ± 2
<b>BPC668</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ))fKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	79 ± 2
<b>BPC712</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))fKKLQ)	3.1-6.2	12.5-25	25-50	3.1-6.2	30 ± 4
<b>BPC726</b>	c(KKLKK(LK-CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))fKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	0 ± 1
<b>BPC680</b>	c(KK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))LKKfKKLQ)	12.5-25	25-50	25-50	3.1-6.2	77 ± 2
<b>BPC714</b>	c(KK(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))LKKfKKLQ)	12.5-25	25-50	25-50	6.2-12.5	3 ± 1
<b>BPC686</b>	c(K(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))KLKKfKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	12.5-25	10 ± 0.2
<b>BPC716</b>	c(K(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))KLKKfKKLQ)	25-50	12.5-25	25-50	3.1-6.2	2 ± 1
<b>BPC628</b>	c(KKLKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	19 ± 2
<b>BPC630</b>	c(KKLKk(CO- <i>iso</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))FKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	6.2-12.5	22 ± 2
<b>BPC672</b>	c(KKLKk(LK-CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))FKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	3.1-6.2	33 ± 2
<b>BPC666</b>	c(KKLKk(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ))FKKLQ)	12.5-25	12.5-25	25-50	6.2-12.5	61 ± 2
<b>BPC702</b>	c(KKLKk(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))FKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	3.1-6.2	1 ± 0.1
<b>BPC724</b>	c(KKLKk(LK-CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))FKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	<3.1	3 ± 2
<b>BPC678</b>	c(Kk(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))LKKfKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	68 ± 3
<b>BPC704</b>	c(Kk(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))LKKfKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	12.5-25	9 ± 1
<b>BPC684</b>	c(k(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))KLKKfKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	6.2-12.5	8 ± 1
<b>BPC706</b>	c(k(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ))KLKKfKKLQ)	6.2-12.5	6.2-12.5	25-50	3.1-6.2	35 ± 3
<b>BPC632</b>	c(KKLKk(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))fKKLQ)	25-50	12.5-25	25-50	12.5-25	21 ± 13
<b>BPC634</b>	c(KKLKk(CO- <i>iso</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ))fKKLQ)	25-50	12.5-25	>50	6.2-12.5	7 ± 1

<sup>a</sup> CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butanoïl; CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, hexanoïl; CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, 4-metilpentanoïl; CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, octanoïl.

<sup>b</sup> *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*.

<sup>c</sup> Percentatge d'hemòlisi a 150 µM més l'interval de confiança (α = 0.05).

La substitució d'un residu de L-Phe pel seu D-enantiòmer generalment ha produït una disminució en l'activitat antibacteriana. Ara bé, s'han identificat seqüències amb una activitat biològica important enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *F. oxysporum* (CMI entre 3.1 i 6.2  $\mu$ M; **BPC712**, **BPC674** i **BPC680**). Els ciclolipopèptids que contenen un residu de D-Lys han resultat ser més actius que els contenen una D-Phe, especialment enfront *P. syringae* pv. *syringae* i *F. oxysporum*. En particular, els que contenen el dipèptid Leu-Lys acilat (**BPC672**), o bé un grup hexanoil o butanoil a les posicions 1 i 2 (**BPC678**, **BPC684**, **BPC704** i **BPC706**) han resultat ser més actius que el corresponent L-diastereoisòmer enfront un dels patògens. La presència de D-Lys i D-Phe (**BPC632** i **BPC634**) ha proporcionat ciclolipopèptids poc actius. En referència a l'hemòlisi, en general, els ciclolipopèptids que contenen un o dos D-aminoàcids han estat menys hemolítics que els corresponents pèptids que contenen L-enantiòmer. D'entre ells, els que contenen un residu de D-Lys han mostrat un percentatge d'hemòlisi inferior.

### 4.1.2.4. Incorporació d'un residu d'His

S'han sintetitzat 10 ciclolipopèptids derivats de **BPC194** contenint una His (Figura 4.4). Igual que en l'apartat anterior pel seu disseny s'han escollit seqüències acilades a la Lys<sup>1</sup>, Lys<sup>2</sup> o Lys<sup>5</sup> i s'ha substituït la Phe per una His. Les cadenes hidrofòbiques utilitzades han estat les mateixes que les emprades pels ciclolipopèptids que contenen un D-aminoàcid. S'ha avaluat l'activitat hemolítica, l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i l'activitat antifúngica enfront *F. oxysporum* (Taula 4.4).

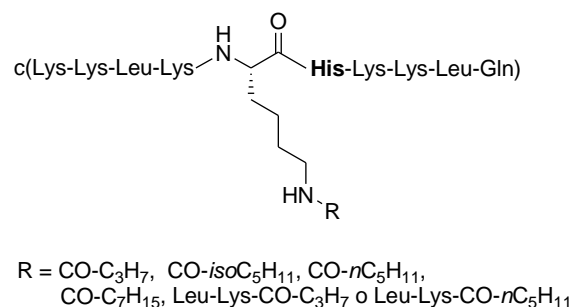


Figura 4.4: Ciclolipopèptids incorporant un residu d'His

#### 4. Discussió general

Taula 4.4: Activitat antimicrobiana (CMI) enfront bacteris i fongs fitopatògens, i citotoxicitat dels ciclolipopèptids que contenen un residu d'His

Pèptid	Seqüència <sup>a</sup>	CMI ( $\mu\text{M}$ )				Hemòlisi (%) <sup>c</sup>
		<i>Xav</i> <sup>b</sup>	<i>Pss</i> <sup>b</sup>	<i>Ea</i> <sup>b</sup>	<i>Fo</i> <sup>b</sup>	
<b>BPC636</b>	c(KKLKK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )HKKLQ)	12.5-25	6.2-12.5	25-50	6.2-12.5	5 $\pm$ 2
<b>BPC638</b>	c(KKLKK(CO- <i>iso</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )HKKLQ)	25-50	6.2-12.5	25-50	6.2-12.5	6 $\pm$ 2
<b>BPC676</b>	c(KKLKK(LK-CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )HKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	3 $\pm$ 0.3
<b>BPC670</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )HKKLQ)	12.5-25	12.5-25	25-50	3.1-6.2	34 $\pm$ 1
<b>BPC718</b>	c(KKLKK(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )HKKLQ)	12.5-25	12.5-25	>50	6.2-12.5	3 $\pm$ 1
<b>BPC728</b>	c(KKLKK(LK-CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )HKKLQ)	6.2-12.5	12.5-25	>50	<3.1	0
<b>BPC682</b>	c(KK(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )LKKHKKLQ)	12.5-25	12.5-25	25-50	3.1-6.2	20 $\pm$ 3
<b>BPC720</b>	c(KK(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )LKKHKKLQ)	12.5-25	12.5-25	>50	<3.1	3 $\pm$ 1
<b>BPC688</b>	c(K(CO- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )KLKKHKKLQ)	25-50	25-50	>50	12.5-25	1 $\pm$ 2
<b>BPC722</b>	c(K(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )KLKKHKKLQ)	25-50	>50	>50	3.1-6.2	3 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butanoïl; CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, hexanoïl; CO-*iso*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, 4-metilpentanoïl; CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, octanoïl.

<sup>d</sup> *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*.

<sup>c</sup> Percentatge d'hemòlisi a 150  $\mu\text{M}$  més interval de confiança ( $\alpha = 0.05$ ).

Quan es substitueix un residu de Phe per una His s'obtenen ciclolipopèptids menys actius enfront els diferents patògens provats. Malgrat això, els pèptids **BPC676**, **BPC682** i **BPC720** han mostrat una millora en l'activitat antifúngica amb valors de CMI <6.2  $\mu\text{M}$ . Pel que fa a l'hemòlisi, la incorporació d'un residu de His ha proporcionat pèptids amb un percentatge d'hemòlisi molt baix (valors entre 0 i 34% a 150  $\mu\text{M}$ ).

##### 4.1.2.5. Estudi de la fitotoxicitat dels ciclolipopèptids sintetitzats

S'ha avaluat en fulles de tabac la fitotoxicitat dels ciclolipopèptids amb L-aminoàcids **BPC500**, **BPC504**, **BPC526**, **BPC528**, **BPC588**, **BPC590**, **BPC596** i **BPC710**, amb un D-aminoàcid **BPC672**, **BPC674**, **BPC702**, **BPC706**, **BPC712** i **BPC714** i amb una His **BPC676** i **BPC728**. S'ha observat que no causen lesions en les fulles a concentracions de 20 a 80 vegades més elevades que les CMI i han estat considerablement menys tòxics que la melitina. Aquests resultats estan d'acord amb la majoria d'articles, els quals especifiquen que els lipopèptids són potents inhibidors dels bacteris fitopatògens però no provoquen danys en la planta quan s'aplica

directament a l'àrea infectada. A més, s'ha observat una relació entre la fitotoxicitat i l'hemòlisi d'aquests ciclolipopeptids. En general, a més fitotoxicitat més hemòlisi.

### 4.1.2.6. Ciclolipopeptids amb millor perfil biològic

Els resultats obtinguts de l'avaluació de l'activitat biològica dels ciclolipopeptids derivats de **BPC194** mostren que els anàlegs contenint L-aminoàcids i una Phe amb una millor activitat antimicrobiana són els que incorporen una cadena hidrofòbica de 4 a 6 carbonis. Ara bé, aquests compostos, en general, presenten una hemòlisi elevada. D'entre aquests, els ciclolipopeptids amb el millor perfil biològic són **BPC500** i **BPC710** que contenen una cadena d'àcid butíric a la Lys<sup>5</sup> o a la Lys<sup>1</sup>, respectivament.

Aquest estudi ha permès demostrar que la introducció de D-aminoàcids o d'una His dona lloc a ciclolipopeptids menys hemolítics. Aquests resultats concorden amb estudis previs descrits a la literatura.<sup>7,8,9</sup> Així, aquesta estratègia ha permès identificar compostos actius i amb baixa hemòlisi. Dintre d'aquests destaquen **BPC672**, **BPC674**, **BPC702**, **BPC706** i **BPC712**.

A més, cal dir que els ciclolipopeptids amb millor activitat biològica són alhora poc fitotòxics.

En conclusió, la derivatització de seqüències peptídiques amb activitat antimicrobiana amb una cadena d'àcid gras és una bona aproximació per al desenvolupament de nous agents antimicrobians.



## 4. Discussió general

### 4.2. Ciclolipopeptidotriazoles derivats de BPC194

En el grup LIPPSO s'han identificat ciclopeptidotriazoles derivats de **BPC194** amb propietats biològiques interessants enfront patògens vegetals. En particular, **BPC548** ha mostrat una elevada activitat antimicrobiana amb valors de CMI entre 3.1 i 25  $\mu\text{M}$  i una baixa citotoxicitat (12% a 150  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4.5).<sup>10,11</sup>

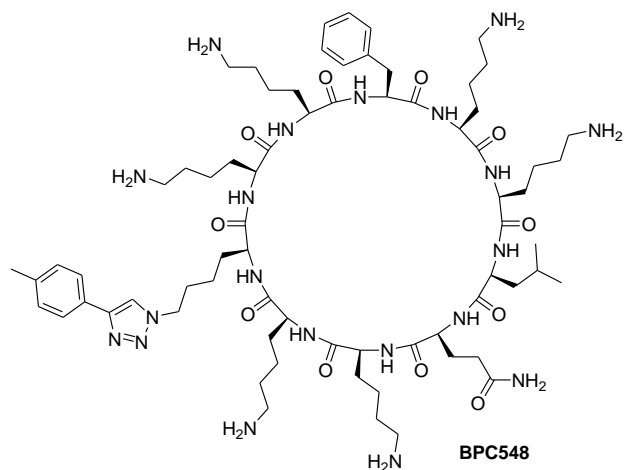


Figura 4.5: Estructura del ciclopeptidotriazole **BPC548**

Tenint en compte aquests resultats s'ha estudiat la síntesi de ciclolipopeptidotriazoles derivats del ciclolipopèptid c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO- $n\text{C}_5\text{H}_{11}$ )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC528**), el qual ha resultat ser un dels ciclolipopèptids més actius (CMI entre 3.1 i 25  $\mu\text{M}$ ) i amb un elevat percentatge d'hemòlisi (98% a 150  $\mu\text{M}$ ). S'han dissenyat ciclolipopeptidotriazoles que contenen la cadena d'hexanoïl a la Lys<sup>5</sup> i un anell d'1,2,3-triazole a la Lys<sup>2</sup> (Figura 4.6). S'ha plantejat la derivatització de la Lys<sup>2</sup> amb un anell d'1,2,3-triazole, perquè, d'una banda, aquest residu no és essencial en l'activitat antibacteriana i, d'altra banda, està localitzat en una posició intermèdia entre la Lys<sup>5</sup> i el residu que està ancorat al suport sòlid durant la síntesi.<sup>2</sup>

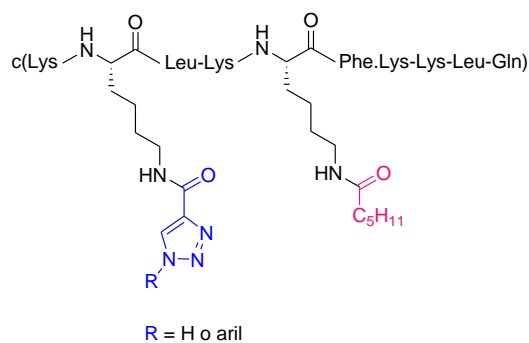
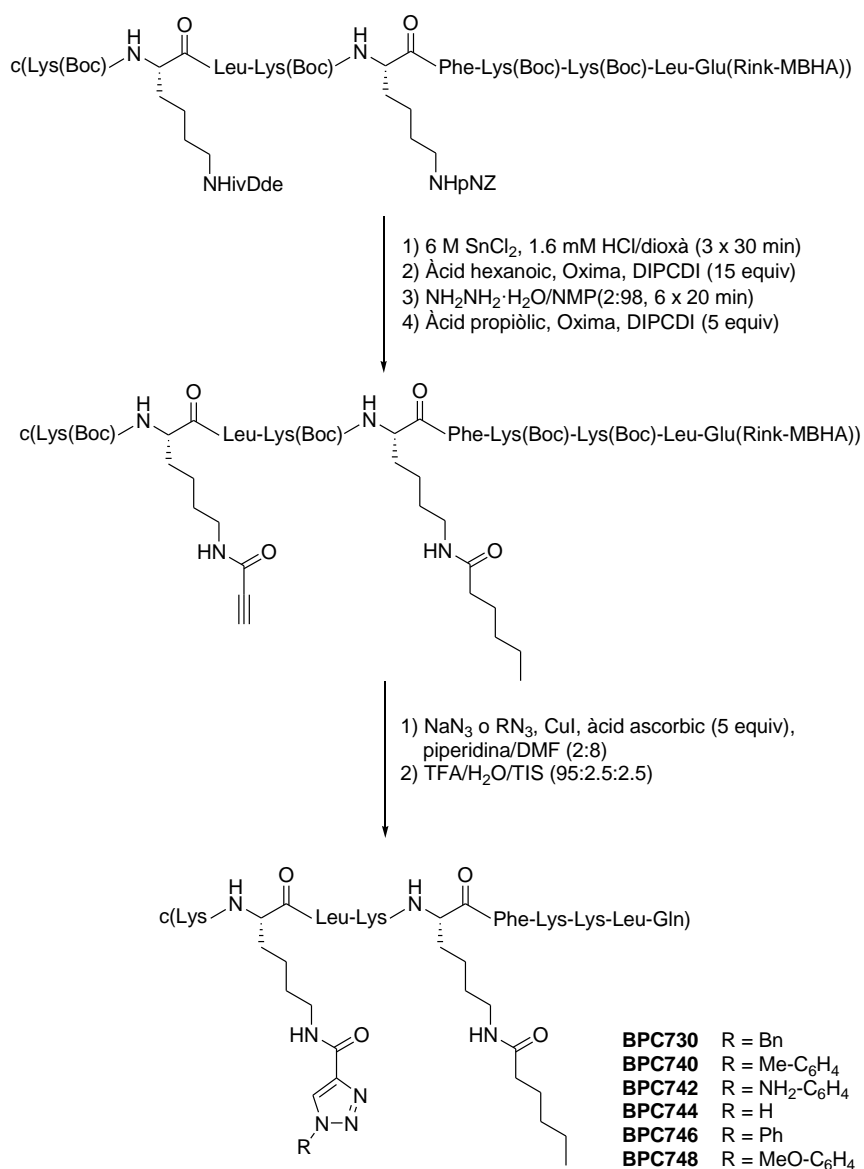


Figura 4.6: Estructura dels ciclolipopeptidotriazoles sintetitzats

Per a la síntesi d'aquest ciclolipopeptidotriazoles s'han avaluat quatre estratègies diferents que requereixen l'ús de cinc grups protectors ortogonals, Fmoc, <sup>t</sup>Bu, All, pNZ i ivDde. Aquests darrers grups s'han utilitzat per la protecció del grup *N*<sup>ε</sup>-amino dels residus Lys<sup>2</sup> i Lys<sup>5</sup>. S'ha estudiat l'ordre d'eliminació dels grups pNZ i ivDde així com de la introducció dels grups hexanoïl i triazolil. Les quatre aproximacions han conduït al lipopeptidotriazole model esperat (**BPC730**). La millor estratègia està representada a l'Esquema 4.4 i ha consistit en: (i) síntesi de la ciclopeptidil resina c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)); (ii) eliminació del grup pNZ; (iii) acoblament de l'àcid hexanoic; (iv) eliminació del grup ivDde; (v) acoblament de l'àcid propiòlic; (vi) formació de l'anell de triazole a través d'una cicloadició 1,3-dipolar en presència de Cu(I) amb una azida;<sup>12</sup> (vii) desancorament del ciclolipopeptidotriazole. Aquest protocol s'ha aplicat a la preparació d'una col·lecció de ciclolipopeptidotriazoles que s'han obtingut amb pureses entre 80 i 99%. Aquests compostos s'han caracteritzat per HRMS i <sup>1</sup>H-RMN.

## 4. Discussió general



Esquema 4.4: Estratègia utilitzada per la síntesi de ciclolipeptidotriazoles

### 4.3. Pèptids conjugats derivats de BPC194 continent un anell d'1,2,3-triazole

En l'última part d'aquesta tesi doctoral s'ha estudiat una estratègia per a la conjugació de c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (**BPC194**) a una cadena peptídica lineal o cíclica a través de la formació d'un anell d'1,2,3-triazole.<sup>12</sup> S'ha descrit que la unió covalent de dues cadenes peptídiques pot conduir a estructures homodimèriques o heterodimèriques amb una major activitat biològica que les cadenes individuals.<sup>13,14</sup>

Concretament, s'ha estudiat la conjugació de **BPC194** al pèptid antimicrobià lineal H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (**BP100**) i a seqüències lineals o cícliques derivades de la part cíclica de la bacteriocina iturina A (Figura 4.7 i 4.8).

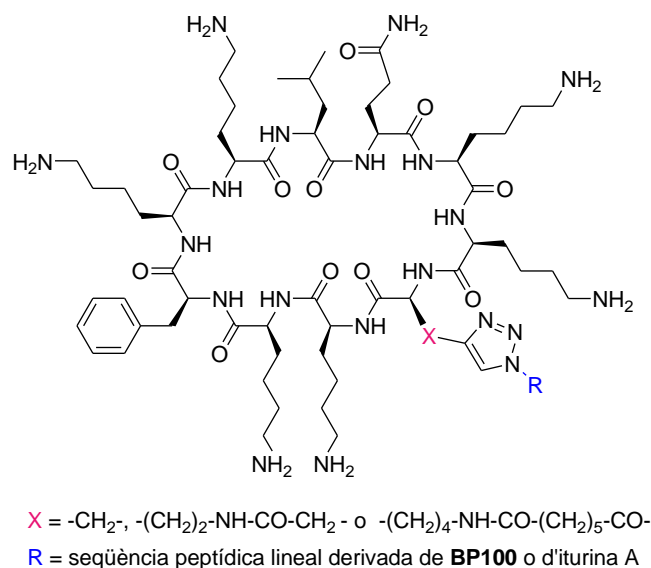


Figura 4.7: Estructura dels pèptids conjugats sintetitzats a partir de **BPC194** i derivats de **BP100** i iturina A lineal

## 4. Discussió general

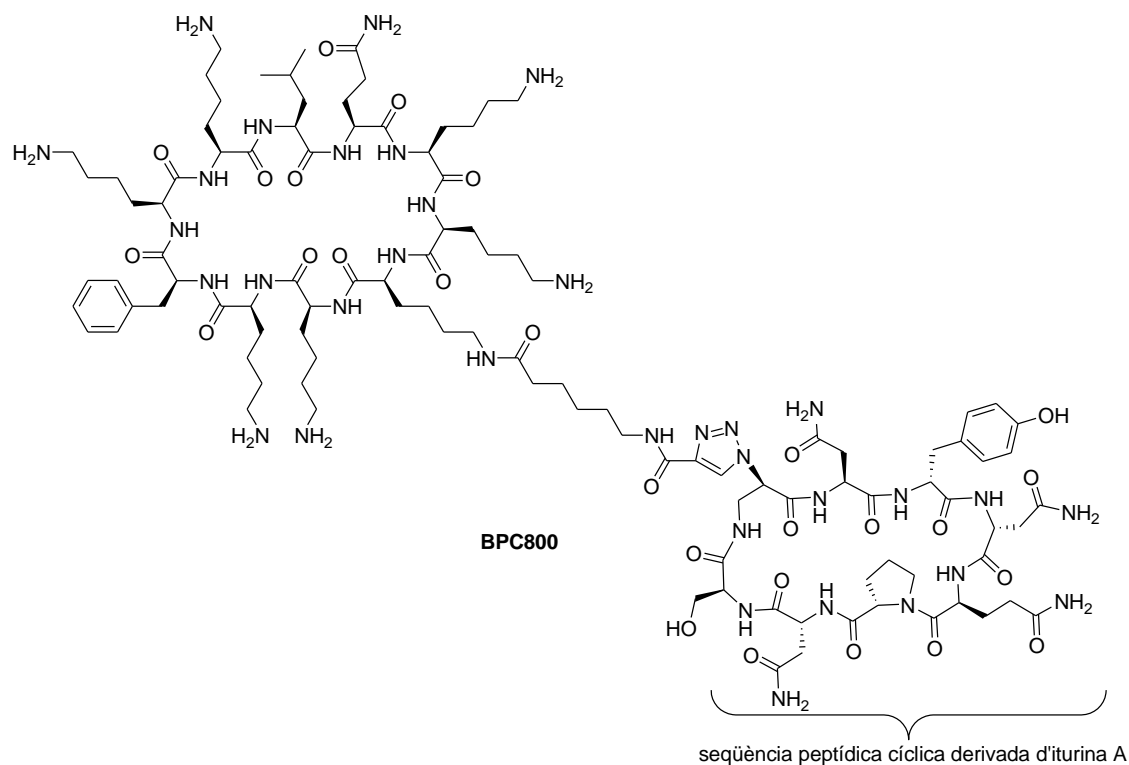


Figura 4.8: Estructura del peptid conjugat sintetitzat a partir del peptid **BPC194** i el derivat cíclic de l'iturina A

Per assolir aquest objectiu s'han sintetitzat alquinil peptidil resines cícliques derivades de **BPC194** per substitució de la Leu<sup>3</sup> per un alquinil aminoàcid (propargilglicina, àcid glutàmic derivatitzat amb propargilamina i lisina contenint un grup propioloil) (Figura 4.9).

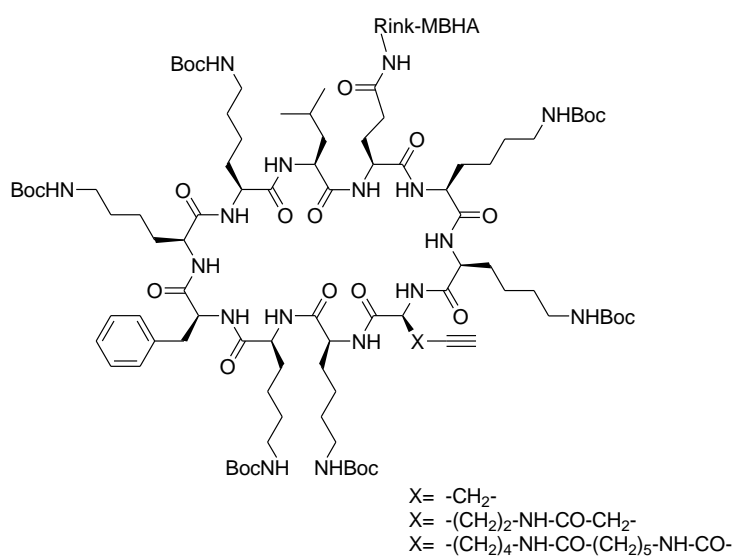


Figura 4.9: Estructura de les alquinil resines

## 4. Discussió general

Així mateix s'han preparat els azidopèptids que es representen a continuació derivats de **BP100** i de la part cíclica de la iturina A (Figura 4.10).

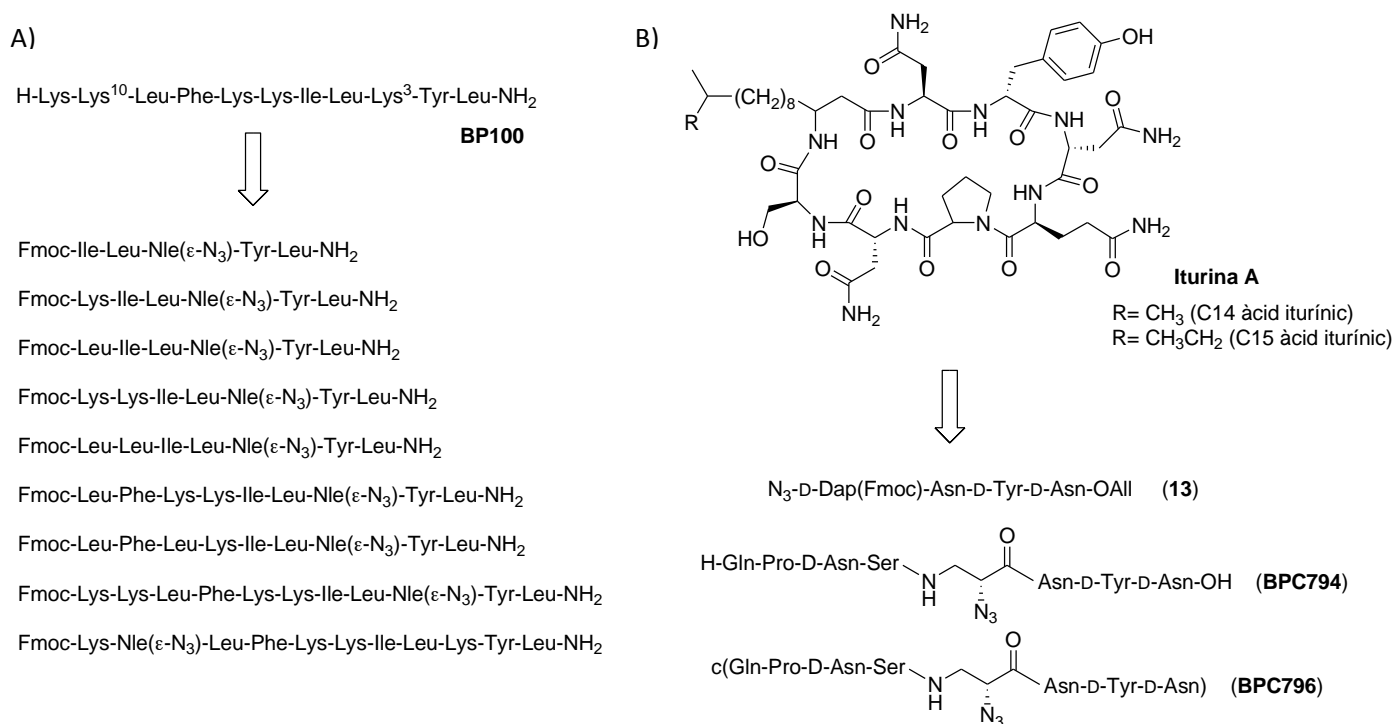


Figura 4.10: Estructura dels diferents azidopèptids: A) derivats de **BP100**; B) derivats d'iturina A

La preparació dels pèptids conjugats s'ha estudiat a través de la formació d'un anell d'1,2,3-triazole mitjançant una reacció de cicloadició entre una azida i un alquí. En primer lloc s'ha assajat aquesta reacció amb l'alquínil resina cíclica que conté el residu d'àcid glutàmic derivatitzat amb propargilamina. S'han avaluat dues condicions de reacció A i B. Les condicions A han consistit en tractar l'alquínil resina cíclica amb el corresponent azidopèptid (5 equiv), CuI (5 equiv), àcid ascòrbic (5 equiv), en presència de piperidina/DMF (2:8). En les condicions B l'alquínil resina cíclica s'ha tractat amb el corresponent azidopèptid (5 equiv), CuI (5 equiv), àcid ascòrbic (5 equiv) i DIEA (10 equiv) en presència de 2,6-lutidina/DMF (3:7). Les condicions B han requerit un tractament addicional amb piperidina/DMF per eliminar el grup Fmoc. S'ha observat que l'efectivitat de la cicloadició depèn de la seqüència i de la seva llargada, malgrat això les reaccions no han seguit una tendència general. Les cicloadicions amb l'azidopèptid de 7 aminoàcids Fmoc-Lys-Lys-Ile-Leu-Nle(ε-N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> i els azidopèptids de 9 i 11 residus no han proporcionat els pèptids conjugats desitjats. Quan l'alquínil resina s'ha tractat amb l'azidopèptid de 7 aminoàcids Fmoc-Leu-Leu-Ile-Leu-Nle(ε-N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub>, o l'azidopèptid de 5 aminoàcids Fmoc-Ile-Leu-Nle(ε-N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub>

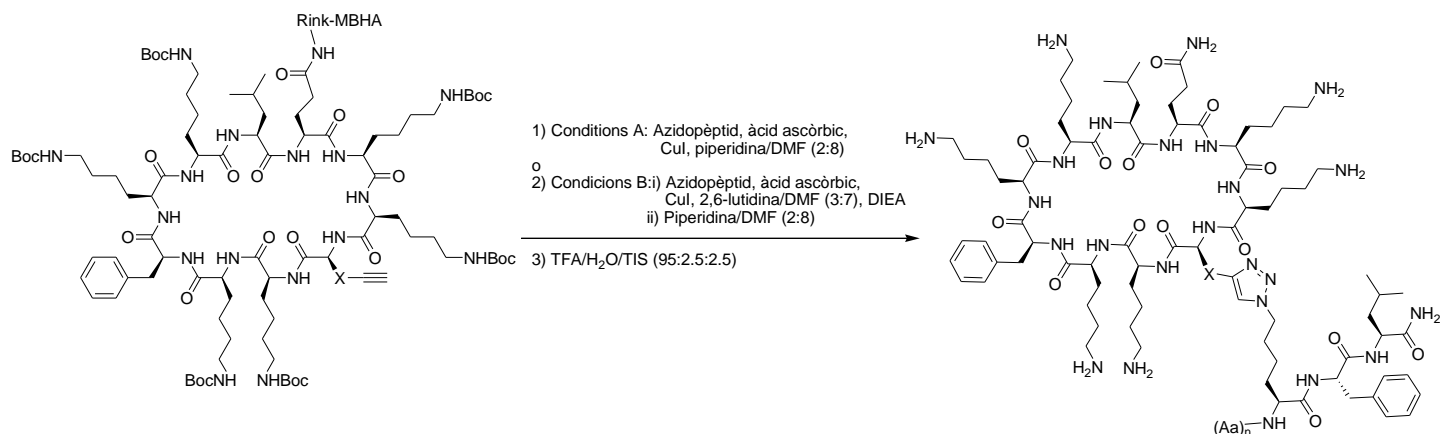
#### 4. Discussió general

---

utilitzant les condicions A s'ha obtingut el pèptid conjugat **BPC804** i **BPC816** respectivament, amb pureses del 96 i 87%. Pel que fa a les cicloadicions amb els azidohexapèptids, la reacció de l'alquiniil resina amb Fmoc-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> ha requerit la utilització de les condicions B, obtenint-se **BPC810** amb un 93% de puresa. En canvi, per Fmoc-Leu-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> tant les condicions A com les B han conduït el pèptid conjugat **22**, essent les A les més efectives donant **22** amb un 95% de puresa. Aquests resultats s'han utilitzat per a la conjugació de les alquiniil peptidil resines cícliques que contenen un residu de propargilglicina i un residu de Lys contenint un grup propioloil amb els azidopèptids Fmoc-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub>, Fmoc-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> i Fmoc-Leu-Leu-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub>. S'han obtingut tots els pèptids conjugats esperats **BPC802**, **BPC808**, **BPC814**, **BPC806**, **BPC818** i **BPC818** amb elevades pureses (86-99%) (Taula 4.5).

Així mateix, l'alquiniil peptidil resina cíclica que conté el residu de Lys<sup>3</sup> derivatitzat amb un grup propioloil s'ha conjugat amb els azidopèptids lineals derivats d'iturina A N<sub>3</sub>-D-Dap(Fmoc)-Asn-D-Tyr-D-Asn-OAll i **BPC794**. Utilitzant les condicions B, s'han obtingut els pèptids conjugats **23** i **BPC798** respectivament, amb pureses de 86 i 93%. Cal destacar que aquestes condicions han permès la conjugació d'aquesta alquiniil resina cíclica amb l'azidopèptid cíclic derivat d'iturina A **BPC796**, proporcionant el pèptid conjugat **BPC800** amb un 95% de puresa (Esquema 4.5).

## 4. Discussió general

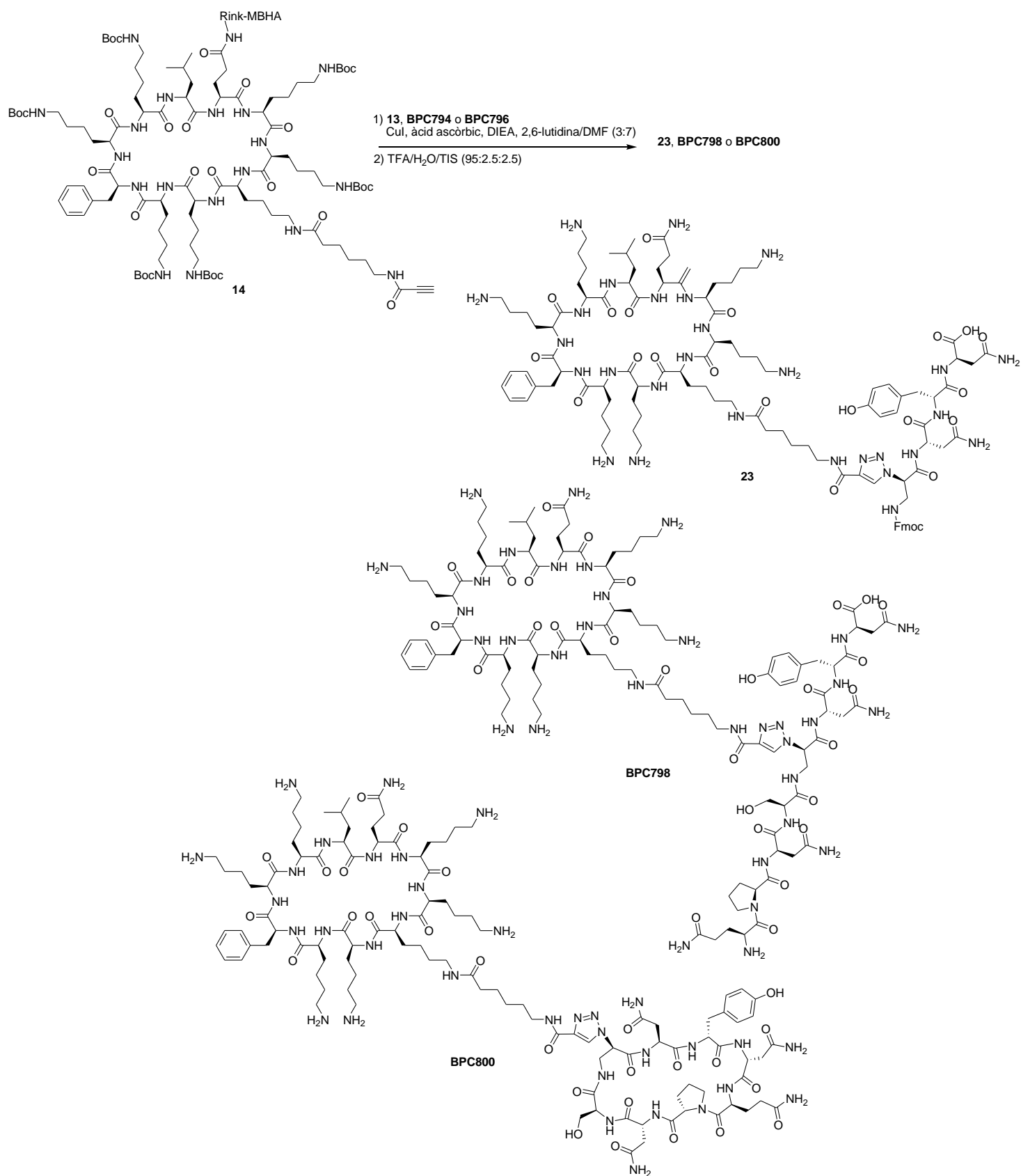


Resina	Azidopèptid	Condicions	Conjugat	X	(Aa) <sub>n</sub>	Puresa(%)
1	4	A	<b>BPC802</b>	-CH <sub>2</sub> -	Ile-Leu-	97
1	5	B	<b>BPC808</b>	-CH <sub>2</sub> -	Lys-Ile-Leu-	99
1	8	A	<b>BPC814</b>	-CH <sub>2</sub> -	Leu-Leu-Ile-Leu-	99
2	4	A	<b>BPC804</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -	Ile-Leu-	96
2	5	B	<b>BPC810</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -	Lys-Ile-Leu-	93
2	6	A	<b>22</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -	Leu-Ile-Leu-	95
2	8	A	<b>BPC816</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -	Leu-Leu-Ile-Leu-	87
3	4	A	<b>BPC806</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-CO-	Ile-Leu-	95
3	5	B	<b>BPC812</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-CO-	Lys-Ile-Leu-	86
3	8	A	<b>BPC818</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-CO-	Leu-Leu-Ile-Leu-	88

Taula 4.5: Síntesi de pèptids conjugats utilitzant azidopèptids derivats de **BP100**



## 4. Discussió general



Esquema 4.5: Síntesis de pèptids conjugats utilitzant azidopèptids derivats d'iturina A

#### 4. Discussió general

S'ha avaluat l'activitat dels pèptids conjugats enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *F. oxysporum* i *P. expansum*. Tots els valors s'han comparat amb els del pèptid **BPC194**. A més, s'ha avaluat la seva citotoxicitat (Taula 4.6). Els resultats han mostrat que excepte **BPC798**, tots els pèptids conjugats són actius almenys enfront un dels patògens amb CMI <25 µM. S'ha observat que conjugació d'un pèptid lineal o cíclic a la posició 3 del pèptid **BPC194** a través d'un anell d'1,2,3-triazole ha proporcionat pèptids amb una activitat antimicrobiana inferior. Tot i això, s'han identificat pèptids conjugats amb una activitat antimicrobiana interessant, essent **BPC806** i **BPC808** els més actius.

Pel que fa a l'hemòlisi, els pèptids conjugats han mostrat una elevada citotoxicitat (64-100% a 150 µM), excepte **BPC798** i **BPC800** que han presentat valors d'hemòlisi inferiors al 2% a 150 µM.

Taula 4.6: Activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs fitopatògens, i hemòlisi

Pèptid	CMI (µM)					Hemòlisi (%) <sup>b</sup>
	<i>Xav</i> <sup>a</sup>	<i>Pss</i> <sup>a</sup>	<i>Ea</i> <sup>a</sup>	<i>Fo</i> <sup>a</sup>	<i>Pe</i> <sup>a</sup>	
<b>BPC194</b>	3.1-6.2	3.1-6.2	6.2-12.5	<3.1	>50	4 ± 1
<b>BPC798</b>	25-50	>50	>50	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	0,8 ± 0,3
<b>BPC800</b>	12.5-25	>50	>50	-	-	1,6 ± 0,5
<b>BPC802</b>	6.2-12.5	12.5-25	>50	3.1-6.2	>50	100 ± 7
<b>BPC804</b>	12.5-25	12.5-25	>50	6.2-12.5	>50	98 ± 4
<b>BPC806</b>	6.2-12.5	12.5-25	25-50	3.1-6.2	>50	100 ± 2
<b>BPC808</b>	3.1-6.2	12.5-25	25-50	3.1-6.2	>50	85 ± 8
<b>BPC810</b>	12.5-25	12.5-25	>50	6.2-12.5	>50	78 ± 6
<b>BPC812</b>	12.5-25	12.5-25	>50	6.2-12.5	>50	64 ± 6
<b>BPC814</b>	6.2-12.5	25-50	>50	6.2-12.5	>50	100 ± 11
<b>BPC816</b>	6.2-12.5	12.5-25	>50	6.2-12.5	25-50	96 ± 6
<b>BPC818</b>	6.2-12.5	12.5-25	>50	6.2-12.5	25-50	89 ± 6

<sup>a</sup> *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Pe*, *Penicillium expansum*.

<sup>b</sup> Percentatge d'hemòlisi a 150 µM més interval de confiança (α = 0.05).

<sup>c</sup> Valors no determinats.

#### 4. Discussió general

---

En conclusió, s'ha aconseguit posar a punt la síntesi en fase sòlida de ciclolipopèptids, de ciclolipopeptidotriazoles i de pèptids conjugats derivats de **BPC194**. S'han obtingut ciclolipopèptids actius i poc hemolítics com són **BPC500**, **BPC672**, **BPC674**, **BPC702** i **BPC712**. A més, s'han obtingut pèptids conjugats amb activitat antimicrobiana, com per exemple **BPC806** i **BPC808**. Aquests resultats són la base per a la identificació de nous agents antimicrobians.

#### 4.4. Bibliografia

1. (a) R. E. W. Hancock, H. G. Sahl, *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**, 1551-1557; (b) E. Montesinos, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **270**, 1-11; (c) E. Montesinos, E. Bardají, *Chem. Biodivers.*, 2008, **5**, 1225-1237; (d) J. F. Marcos, A. Muñoz, E. Pérez-Payá, S. Misra, B. López-García, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2008, **46**, 271-301.
2. S. Monroc, E. Badosa, E. Besalú, M. Planas, E. Bardají, E. Montesinos, L. Feliu, *Peptides*, 2006, **27**, 2575-2584.
3. (a) M. L. Mangoni, Y. Shai, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2011, **68**, 2267-2280; (b) G. Lavery, M. McLaughlin, C. Shaw, S. P. Gorman, B. F. Gilmore, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2010, **75**, 563-569; (c) Y. Shai, A. Makovitzky, D. Avrahami, *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006, **7**, 479-486.
4. J. T. Mika, G. Moiset, A. D. Cirac, L. Feliu, E. Bardají, M. Planas, D. Sengupta, S. J. Marrink, B. Poolman, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1808**, 2197-2205.
5. (a) J. Farrera-Sinfreu, M. Royo, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7813-7815; (b) B. S. Vig, T. F. Murray, J. V. Aldrich, *Biopolymers*, 2003, **71**, 620-637; (c) E. Gorrea, D. Carbajo, R. Gutiérrez-Abad, O. Illa, V. Branchadell, M. Royo, R. M. Ortuño, *Org. Biol. Chem.*, 2012, **10**, 4050-4057.
6. (a) S. M. Mandal, A. E. A. D. Barbosa, O. L. Franco, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, 338; (b) A. Malina, Y. Shai, *Biochem J.*, 2005, **390**, 695-702.
7. (a) I. Güell, J. Cabrefiga, E. Badosa, R. Ferre, M. Talleda, E. Bardají, M. Planas, L. Feliu, E. Montesinos, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 2667; (b) I. Ng-Choi, M. Soler, V. Cerezo, E. Badosa, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, **23**, 4321-4332; (c) I. Ng-Choi, M. Soler, I. Güell, E. Badosa, J. Cabrefiga, E. Bardají, E. Montesinos, M. Planas, L. Feliu, *Prot. Pept. Lett.*, 2014, **21**, 357-367.
8. (a) Z. Oren, Y. Shai, *Biochemistry*, 1997, **36**, 1826-1835; (b) K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 1687-1692; (c) S. Y. Hong, J. E. Oh, K. H. Lee, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, **58**, 1775-1780; (d) Z. Oren, J. Hong, Y. Shai, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 14643-14649.
9. (a) R. Ferre, E. Badosa, L. Feliu, M. Planas, E. Montesinos, E. Bardají, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 3302-3308; (b) S. E. Blondelle and K. Lohner, *Biopolymers*, 2000, **55**, 74-87.
10. (a) I. Güell, S. Vilà, Ll. Micaló, L. Cano, E. Badosa, E. Montesinos, E. Bardají, M. Planas, L. Feliu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, **22**, 4933-4943; (b) I. Güell, Ll. Micaló, L. Cano, E. Badosa, R. Ferre, E. Montesinos, E. Bardají, L. Feliu, M. Planas, *Peptides*, 2012, **33**, 9-17.

#### 4. Discussió general

---

11. (a) W. Q. Fan, A. R. Katritzky, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 4 (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, V. E. F. B. Scriven), Elsevier Science, Oxford, 1996, 1-126; (b) M. Aufort, J. Herscovici, P. Bouhours, N. Moreau, C. Girard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1195-1198; (c) Y. Liu, L. Zhang, J. Wang, Y. Li, Y. Xu, Y. Pan, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 10728-10734; (d) G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.*, 2008, **28**, 278-308; (e) V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 971-975; (f) D. D. Díaz, M. G. Finn, K. B. Sharpless, V. V. Fokin and C. J. Hawker, *An. Quim.*, 2008, **104**, 173-180; (g) H. Li, R. Aneja and I. Chaiken, *Molecules*, 2013, **18**, 9797-9817; (h) J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1325-1337.
12. (a) M. Scrima, A. Chevalier-Isaad, P. Rovero, A. M. Papini, M. Chorev, A. M. D'Ursi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 446-457; (b) C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. J. Meldal, *Comb. Chem.*, 2004, **6**, 312-324; (c) E. A. Sheremet, R. I. Tomanov, E. V. Trukhin, and V. M. Berestovitskaya, *Russian J. Org. Chem.*, 2004, **40**, 594-595; (d) J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302-1315.
13. (a) L. Liu, Z. Y. Hong, C. H. Wong, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 429-432; (b) C. J. Arnusch, H. Branderhorst, B. de Kruijff, R. M. J. Liskamp, E. Breukink, R. J. Pieters, *Biochemistry*, 2007, **46**, 13437-13442; (c) R. J. Pieters, C. J. Arnusch, E. Breukink, *Protein Pept. Lett.*, 2009, **16**, 736-742; (d) V. Martos, P. Castreno, J. Valero, J. Mendoza, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 698-706.
14. (a) S. Richter, T. Ramenda, R. Bergmann, T. Kniess, J. Steinbach, J. Pietzsch, F. Wuest, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 3306-3309; (b) E. N. Lorenzón, G. F. Cespedes, E. F. Vicente, L. G. Nogueira, T. M. Bauab, M. S. Castro and E. M. Cilli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, **56**, 3004-3010; (c) J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao and P. G. Wang, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, **7**, 489-501; (d) J. Xiao, T. Tolbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 6046-6051.



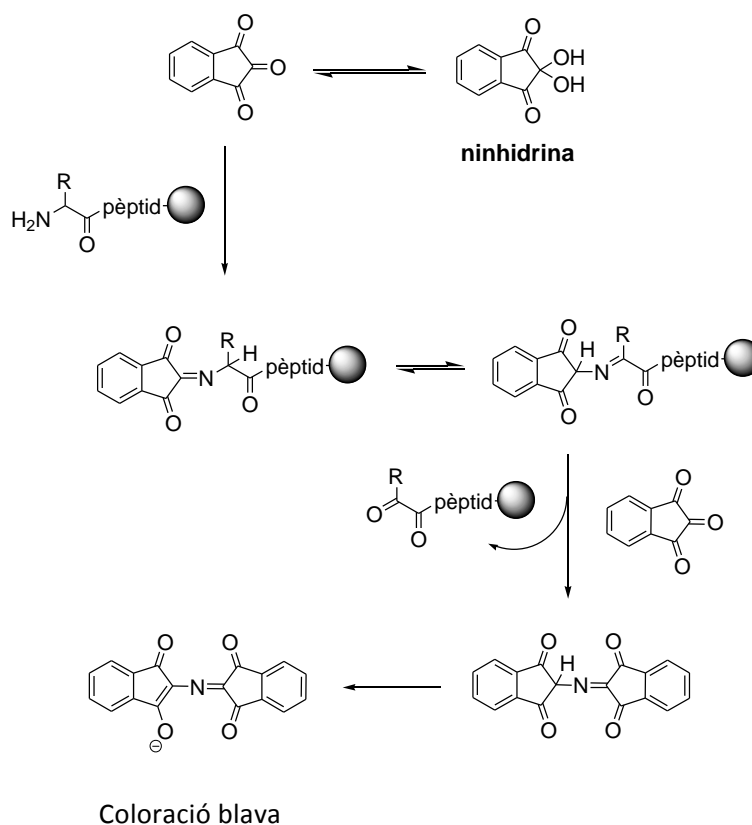
Material i  
Mètodes



## 5.1. Material i Mètodes

5.1.1. Test de ninhidrina o test de Kaiser<sup>1</sup>

El test de Kaiser és un assaig colorimètric qualitatiu que permet detectar la presència d'amines primàries lliures unides a un suport sòlid. Aquest test s'ha utilitzat en aquest treball per comprovar si l'acoblament dels diferents aminoàcids o la ciclació s'han completat. Aquest assaig es basa en una reacció de transiminació-descarboxilació entre el grup amino lliure i la ninhidrina donant una coloració blava per formació del porpra de Ruhemann (Esquema 5.1).



Esquema 5.1 : Test de ninhidrina



## 5. Material i mètodes

---

Per realitzar l'assaig s'han preparat els següents reactius:

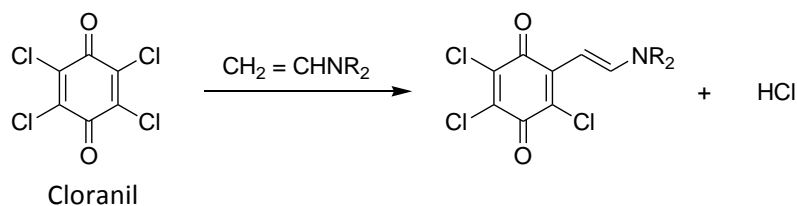
- ❖ **Reactiu A:** dissolució de ninhidrina (500 mg) en etanol absolut (10 mL).
- ❖ **Reactiu B:** dissolució de fenol (100 mg) en etanol absolut (25 mL).
- ❖ **Reactiu C:** dissolució de NaCN 1mM (1 mL) en piridina destil·lada sobre ninhidrina (49 ml).

Una mostra de resina es tracta amb 3 gotes de cada reactiu A, B i C, i s'escalfa a 100 °C durant 3 min. A continuació es comprova el color. Una coloració blavosa indica la presència d'amines lliures per sobre d'1 µmol de grups amino per gram de resina i, per tant, que l'acoblament de l'aminoàcid o la ciclació no ha estat complet (assaig positiu). Per contra, una coloració groguenca és indicativa d'absència d'amines primàries lliures i, per tant, d'un acoblament efectiu (assaig negatiu).

### 5.1.2. Test de cloranil<sup>2</sup>

El test de cloranil és un assaig colorimètric qualitatiu que permet detectar la presència d'amines secundàries lliures unides a un suport sòlid. Com el test de ninhidrina, el test de cloranil ens permet comprovar de manera qualitativa si l'acoblament de l'aminoàcid ha finalitzat. Aquest test s'ha utilitzat en aquest treball per comprovar si l'acoblament de residus de prolina s'ha completat.

El mecanisme de la reacció que produeix la coloració blava és l'addició de l'enamina, formada per reacció entre acetaldehid i l'amina secundària de l'aminoàcid, al cloranil amb pèrdua d'àcid clorhídric (Esquema 5.2).



Esquema 5.2: Test de cloranil

Per realitzar l'assaig es preparen els següents reactius:

- ❖ **Reactiu A:** dissolució al 2% d'acetaldehid en DMF.
- ❖ **Reactiu B:** dissolució al 2% de cloranil en DMF.

Una mostra de resina, entre 0.5 i 2 mg, es tracta amb 5 gotes de cada reactiu A i B i es deixa a temperatura ambient durant 5 min. A continuació es comprova el color. Una coloració blavosa indica la presència d'amines lliures per sobre d'1  $\mu\text{mol}$  de grups amino per gram de resina i, per tant, que l'acoblament de l'aminoàcid no ha estat complet (assaig positiu). Per contra, una coloració groguenca és indicativa d'absència d'amines primàries lliures i, per tant, d'un acoblament efectiu (assaig negatiu).

### 5.1.3. Cromatografia

#### 5.1.3.1. Cromatografia de capa fina (TLC)

La cromatografia de capa fina s'ha realitzat utilitzant cromatofolis de sílica gel 60F<sub>254</sub> de Merck de 20 × 20 cm i amb un gruix de 0.20 mm. Com a revelador s'ha utilitzat llum ultravioleta (UV  $\lambda = 254$  nm) i una dissolució aquosa de permanganat potàssic a l'1.5%.

#### 5.1.3.2. Cromatografia en columna

Les cromatografies en columna en fase normal s'han realitzat emprant sílica gel 60 (0.040-0.063 mm) de Merck. Les cromatografies en fase reversa s'han realitzat utilitzant sílica gel de fase reversa 100 C<sub>18</sub> (> 400 mesh, Fluka).

#### 5.1.3.3. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

L'anàlisi dels pèptids sintetitzats s'ha dut a terme en un equip format per una bomba binària *P680 de Dionex*, un detector espectrofotomètric UV/VIS *Dionex UVD170U* de longitud d'ona variable i un injector automàtic *ASI-100 de Dionex*. El software utilitzat és el programa *Chromeleon™ versió 6.60*. Com a fase mòbil mòbil s'ha emprat 0.1% de TFA en H<sub>2</sub>O (dissolvent A) i 0.1% de TFA en CH<sub>3</sub>CN (dissolvent B) amb un flux d'1 mL·min<sup>-1</sup>. La detecció s'ha realitzat a una longitud d'ona de 220 nm. Per a l'anàlisi de les mostres s'han utilitzat diversos mètodes:

## 5. Material i mètodes

---

- ❖ Mètode A: s'ha emprat una columna Kromasil 100 C<sub>18</sub> (40 mm × 4.6 mm × 3.5 μm) amb un gradient lineal de 2-100% del dissolvent B en 7 min.

Alternativament s'ha utilitzat un equip de cromatografia líquida Agilent Technologies 1200 Series.

- ❖ Mètode B: s'ha emprat una columna Kromasil 100 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm × 3.5 μm) amb un gradient lineal de 2-100% del dissolvent B en 28 min.

### 5.1.4. Espectrometria de masses

#### 5.1.4.1. Espectrometria de masses amb ionització per electrospai (ESI-MS)

Els espectres de masses amb ionització per electrospai (ESI-MS) s'han enregistrat als Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona (STR-UdG). S'ha utilitzat un espectròmetre de masses *Esquire 6000* (Daltonics Bruker) equipat amb una font d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i un electrospai (ESI) amb mode d'ionització positiu ESI (+). Aquest equip permet analitzar fins a  $m/z = 3000$ . Les mostres (5 μl) han estat introduïdes a la font d'ionització de l'espectròmetre de masses a través d'un injector automàtic d'HPLC del model 1100 Series Agilent. El flux de la fase mòbil és de 0.1 mL·min<sup>-1</sup> de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80:20 vol/vol., i s'utilitza el nitrogen com a gas nebulitzant i assecant.

#### 5.1.4.2. Desorció/ionització làser assistida per matriu amb separació segons el temps de vol (MALDI-TOF)

S'ha utilitzat un aparell Bruker Daltonics Ultraflex (STR, UdG) que consisteix en un analitzador lineal d'ions, un làser de nitrogen i un reflector electrostàtic d'ions. Es produeix una ionització de la matriu assistida per làser i la separació dels ions en el temps de vol (TOF), en el qual els ions es separen en funció de la seva relació  $m/z$  després de ser accelerats en un camp elèctric.

#### 5.1.4.3. Espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS)

Els espectres de masses d'alta resolució (HRMS) s'han enregistrat en les mateixes condicions que els d'ESI-MS amb un instrument Bruker micrOTOF-Q IITM utilitzant un analitzador híbrid quadrupol-temps de vol (STR-UdG). Les mostres s'han introduït a la font de ions de

l'espectròmetre de masses per infusió directa i s'han calibrat externament utilitzant formiat de sodi. S'ha treballat en mode d'ionització positiu ESI(+).

Alguns espectres d'HRMS s'han enregistrat a l'Institut de Ciències de los Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza per ionització d'electrosprai (ESI) en un espectròmetre de masses de Bruker MicroTof-Q amb un analitzador híbrid quadrupol-temps de vol. La introducció de mostres s'ha realitzat utilitzant un injector automàtic d'HPLC del model 1100 Series Agilent i s'ha calibrat externament utilitzant formiat de sodi. S'ha treballat en mode d'ionització positiu ESI(+).

### 5.1.5. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

Els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i  $^{13}\text{C}$ -RMN s'han enregistrat en un aparell *Bruker DPX200 Avance* (4.7 T) equipat amb una sonda BBX i una unitat de control de temperatura (BVT2000) [ $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) i  $^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz)], en un aparell *Bruker DPX300 Avance* (7.05 T) equipat amb una sonda QNI i una unitat de control de temperatura (BVT2000) [ $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)], i també en un aparell *Bruker Avance III400* (9.40 T), equipat amb una sonda BBI i una unitat de control de temperatura (BCU Xtreme) [ $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz)].

### 5.1.6. Escalfament per irradiació micrones

S'ha utilitzat un aparell de microones *Discover S-Class* de CEM Corporation, que consisteix en un sistema de distribució de potència de microones continu amb una sortida de potència de 0-300 W. El temps, la temperatura i la potència màxima de l'experiment es controlen amb el software *Synergy*. Aquest aparell de microones incorpora un sistema de control de temperatura que utilitza un sensor, infraroig per a mesurar la temperatura en el fons del recipient.

### 5.1.7. Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Els espectres d'infraroig (IR) s'han enregistrat a la Universitat de Girona en un espectrofotòmetre model Mattson-Galaxy Satellite FT-IR amb transformada de Fourier, utilitzant un sistema de reflexió únic ATR com a accessori de mostreig. Els valors d'absorció s'indiquen en  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5. Material i mètodes

---

### 5.2. Bibliografia

1. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.
2. T. Vojkovsky, *Pept. Res.*, 1995, **8**, 236-237.



Conclusions



### ❖ Ciclolipopèptids derivats de **BPC194**

➤ La millor estratègia per a la preparació de ciclolipopèptids derivats de **BPC194** inclou la síntesi de la corresponent seqüència cíclica unida al suport sòlid c[Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(R)-Phe-Lys-Lys-Leu-Glu(Rink-MBHA)] on R = Mtt o ivDde segons un protocol Fmoc/<sup>t</sup>Bu/All, l'eliminació del grup protector Mtt o ivDde i posterior acilació del grup amino lliure resultant amb el corresponent àcid gras. L'ús del grup protector ivDde condueix al producte final amb una puresa major que quan s'utilitza el grup Mtt. Mitjançant aquesta estratègia s'han preparat ciclolipopèptids derivats de **BPC194** amb pureses elevades.

➤ Les condicions més favorables per a l'eliminació del grup Mtt d'un residu de lisina present en una peptidil resina lineal o cíclica consisteixen en sotmetre la resina a tractaments de 5 min amb una solució de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) sota agitació a temperatura ambient. El número de tractaments amb TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> depèn de la seqüència peptídica. En seqüències cícliques es realitzen 6 tractaments, mentre que en seqüències lineals 4 tractaments.

Les condicions més favorables per l'eliminació del grup ivDde d'un residu de lisina present en una peptidil resina cíclica consisteixen en sotmetre la resina a tractaments de 20 min amb una solució de NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O en NMP (2:8) sota agitació a temperatura ambient.

L'acilació amb un àcid gras de la cadena lateral d'un residu de lisina present en una seqüència derivada de **BPC194** requereix l'ús de DIPCDI i Oxima en NMP durant 1 h. El número d'equivalents dels reactius (10 o 15) depèn de l'àcid gras a acoblar.

➤ La llargada de la cadena d'àcid gras influeix en l'activitat antimicrobiana dels ciclolipopèptids derivats de **BPC194**. Les seqüències que incorporen una cadena hidrofòbica entre 4 i 6 carbonis presenten un millor perfil d'activitat, essent les seqüències més actives les que incorporen un grup butanoil (**BPC500**), 4-metilpentanoil (**BPC504**), pentanoil (**BPC526**) i hexanoil (**BPC528**), juntament amb la seqüència que conté el dipèptid Leu-Lys amb un grup hexanoil (**BPC596**) (CMI entre <3.1 a 25 μM). En canvi, els ciclolipopèptids amb cadenes hidrofòbiques de 12 carbonis (**BPC524** i **BPC530**) presenten una activitat antimicrobiana inferior, i **BPC502** i **BPC622**, que contenen una cadena de palmitoil i oleoil, respectivament, no són actius.



## 6. Conclusions

---

- La posició de la cadena d'àcid gras influeix en l'activitat biològica dels ciclolipopèptids derivats de **BPC194**. Les seqüències amb una cadena hidrofòbica als residus de Lys de les posicions 1, 2 o 5 són més actives que aquelles que contenen aquesta cadena a les posicions 4, 7 i 8.
- La introducció d'un o més D-aminoàcids en la seqüència de ciclolipopèptids derivats de **BPC194**, en general, proporciona seqüències amb una bona activitat antimicrobiana. Els ciclolipopèptids amb una D-Lys són, en general, més actius que els que contenen una D-Phe. En canvi, la presència simultània d'una D-Phe i una D-Lys dóna lloc a seqüències poc actives.

La substitució del residu de Phe dels ciclolipopèptids derivats de **BPC194** per una His redueix l'activitat antibacteriana.

- L'acilació de **BPC194** amb una cadena d'àcid gras proporciona ciclolipopèptids més hemolítics que el pèptid cíclic de partida. Una estratègia per disminuir l'hemòlisi d'aquests compostos consisteix en la substitució d'un residu de Lys o Phe pel seu enantiòmer o de la Phe per una His. Els ciclolipopèptids amb una D-Lys són menys hemolítics que els que presenten una D-Phe, mentre que els que mostren els percentatges d'hemòlisi més baixos són els que contenen una His.
- Els ciclolipopèptids amb un millor perfil d'activitat antimicrobiana i hemòlisi són **BPC672, BPC674, BPC710, BPC702, BPC706** i **BPC712**. A més, aquests compostos no són fitotòxics.

### ❖ Ciclolipopèptidotriazoles derivats de **BPC194**

- La síntesi de ciclolipopèptidotriazoles derivats de **BPC194** incorporant un anell de triazole a la cadena lateral de la Lys<sup>2</sup> i una cadena d'àcid gras a la Lys<sup>5</sup> inclou la síntesi de la peptidil resina c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)), que se sotmet de forma seqüencial a les etapes següents: eliminació del grup pNZ i acoblament de l'àcid gras al grup amino lliure resultant de la Lys<sup>5</sup>, eliminació del grup ivDde, acoblament d'àcid propiòdic a la Lys<sup>2</sup> i, finalment, reacció del grup propioloil amb un azidoderivat per a formar l'anell d'1,2,3-triazole. Seguint aquesta metodologia s'han preparat 6 ciclolipopèptidotriazoles derivats de **BPC194** amb pureses elevades (80-99%).

### ❖ Pèptids conjugats derivats de **BPC194**

- Una estratègia per a la síntesi de pèptids conjugats derivats de **BPC194** i una seqüència lineal o cíclica implica la conjugació d'una alquil peptidil resina derivada de **BPC194** amb un azidopèptid a través de la formació d'un anell d'1,2,3-triazole. Mitjançant aquesta estratègia, s'ha conjugat **BPC194** a seqüències lineals derivades de **BP100** i d'iturina A, així com a una seqüència cíclica derivada de la iturina A. La conjugació de **BPC194** a un pèptid lineal o cíclic disminueix l'activitat antimicrobiana del pèptid de partida **BPC194** i n'augmenta l'hemòlisi. Tot i això, els pèptids conjugats resultants són actius enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *F. oxysporum*. **BPC806** i **BPC808** han resultat ser els pèptids conjugats amb un millor perfil d'activitat antimicrobiana amb valors de CMI compresos entre 3.1 i 50 µM.



# DISSENY I SÍNTESI DE LIPOPÈPTIDS CÍCLICS I DE PÈPTIDS CONJUGATS DERIVATS DE BPC194 AMB ACTIVITAT ANTIMICROBIANA

Sílvia Vilà Roura

2014

## ANNEX

A1. A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides .....	2
A2. Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides .....	23
A3. Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles.....	200
A4. Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide <b>BPC194</b> .....	257

## A1. A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides

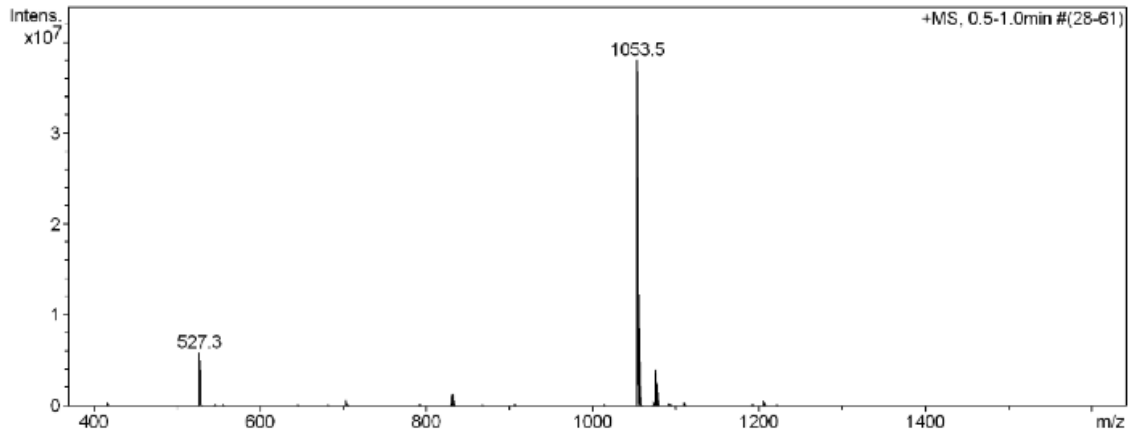
Sílvia Vilà, Esther Badosa, Emilio Montesinos, Lidia Feliu,\* and Marta Planas\*

### Table of contents

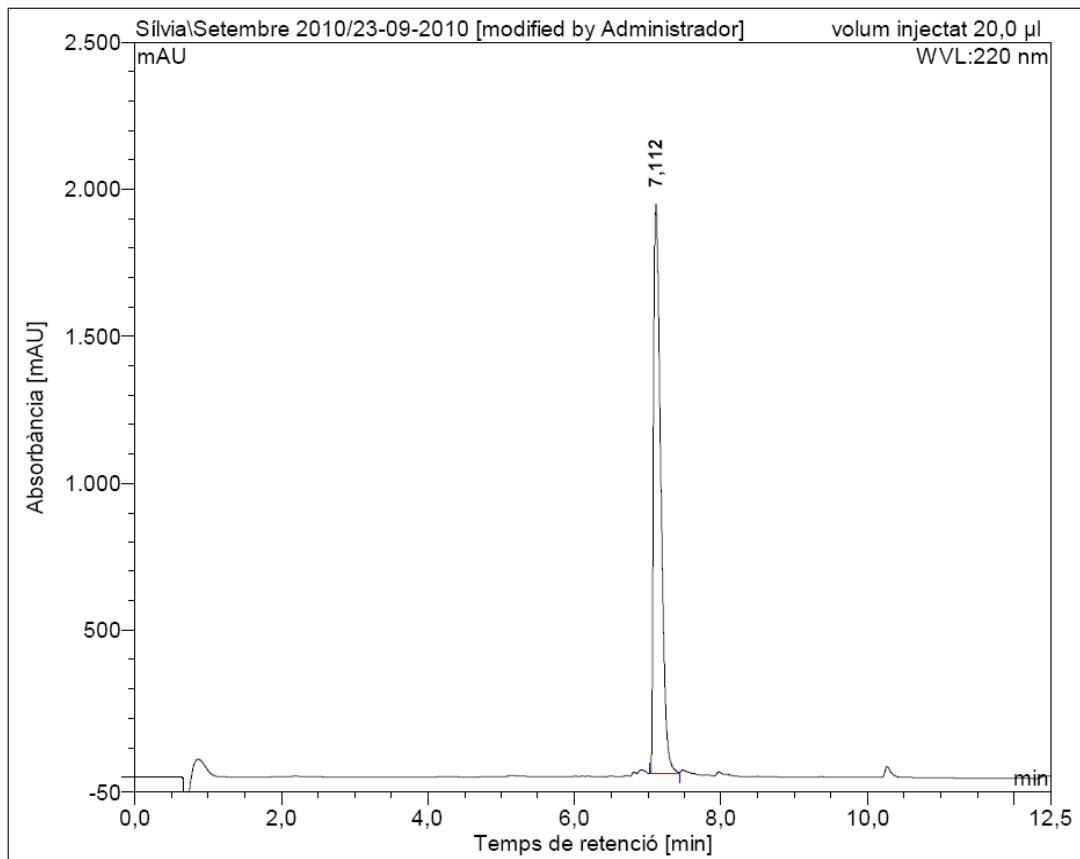
Fmoc-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll .....	3
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll.....	4
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll .....	5
Fmoc-Lys(COCH <sub>3</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>7a</b> ) .....	6
Fmoc-Lys(COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>7b</b> ).....	7
Fmoc-Lys(COC <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>7c</b> ).....	8
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH <sub>3</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>11a</b> ) .....	9
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>11b</b> ).....	10
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll ( <b>11c</b> ) .....	11
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC194</b> ).....	12
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) .....	12
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH <sub>3</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>5</b> ) .....	12
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC498</b> ) .....	13
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>4</sub> H <sub>7</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC500</b> ) .....	15
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>15</sub> H <sub>31</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC502</b> ) .....	17
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>11</sub> H <sub>22</sub> OH)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC524</b> ).....	19
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC <sub>11</sub> H <sub>23</sub> )-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) ( <b>BPC530</b> ) .....	21

Fmoc-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

ESI-MS (m/z)



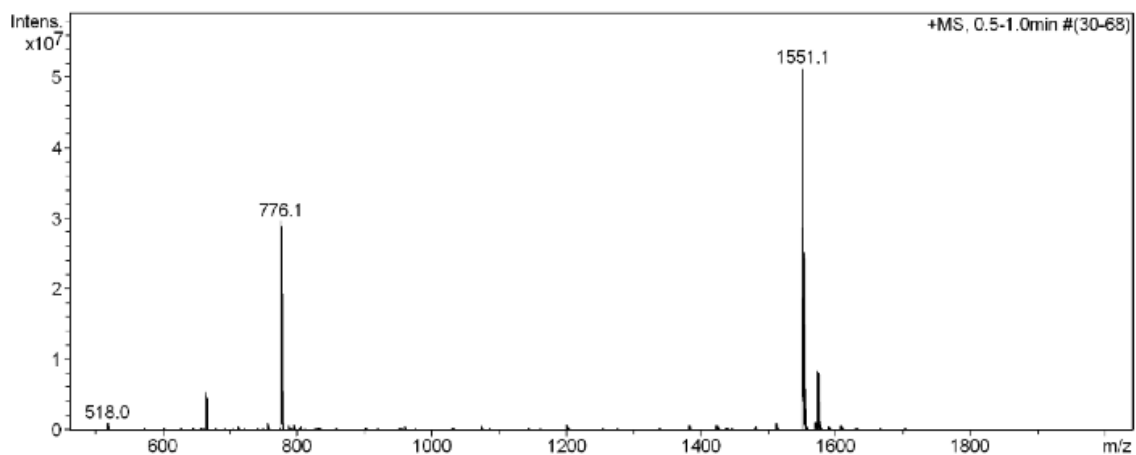
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



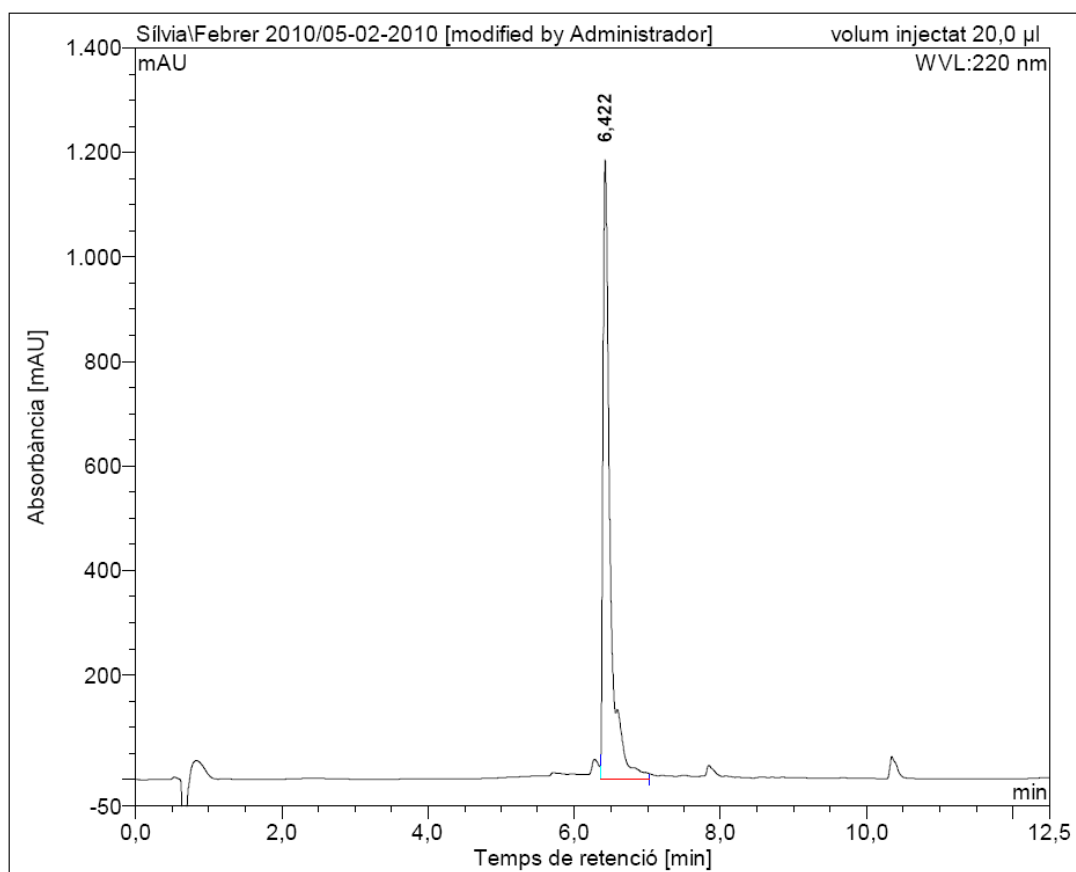
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,11	1937,784	223,207	100,00
Total:		1937,784	223,207	100,00

Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

ESI-MS (m/z)



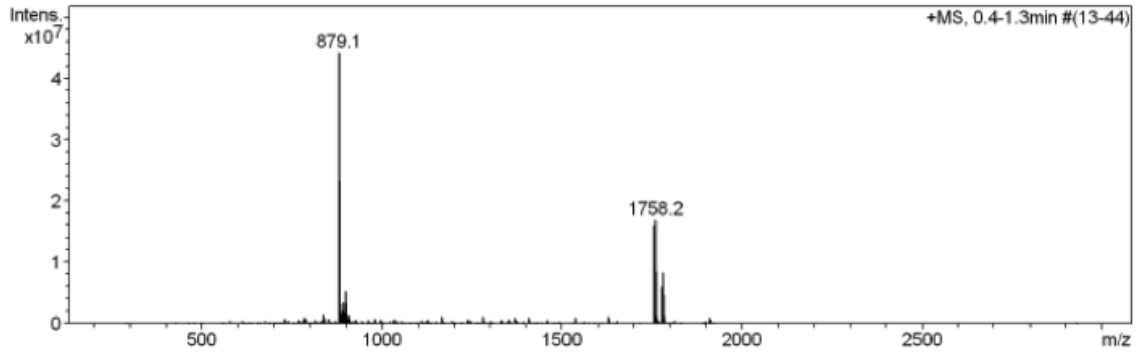
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



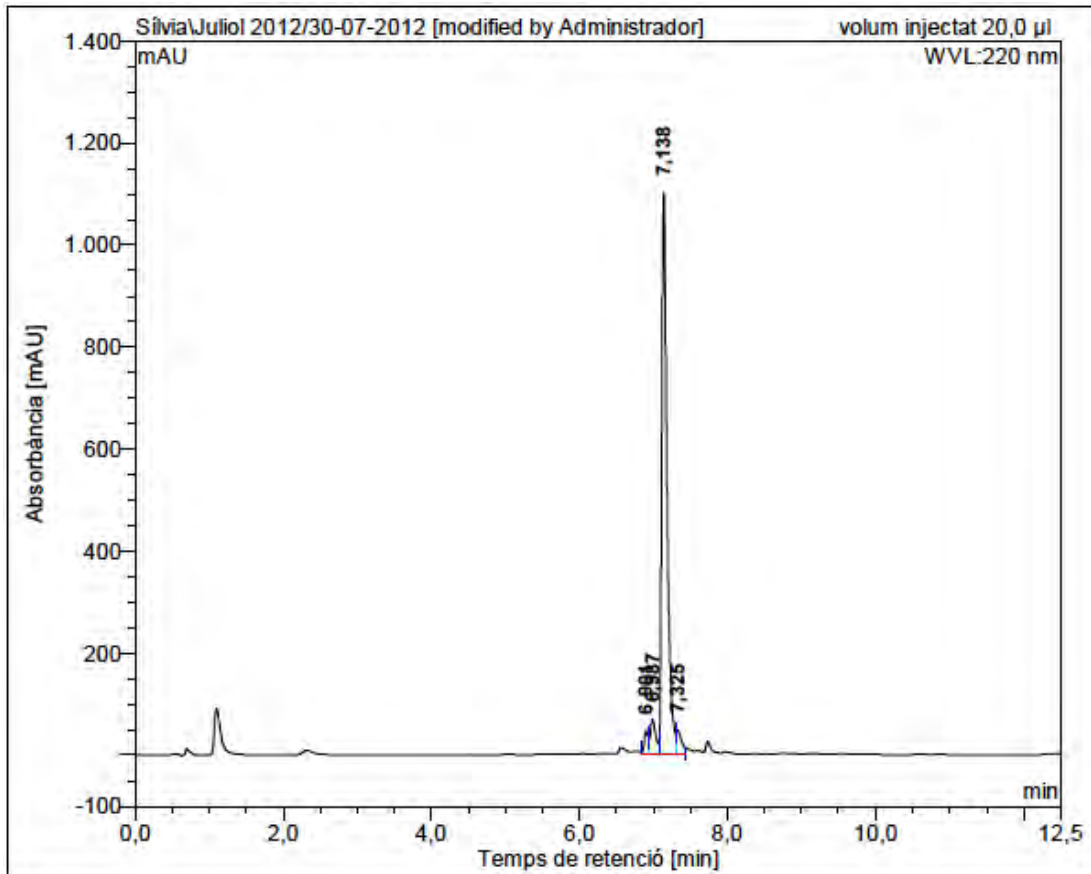
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,42	1186,004	134,786	100,00
Total:		1186,004	134,786	100,00

Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

ESI-MS (m/z)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

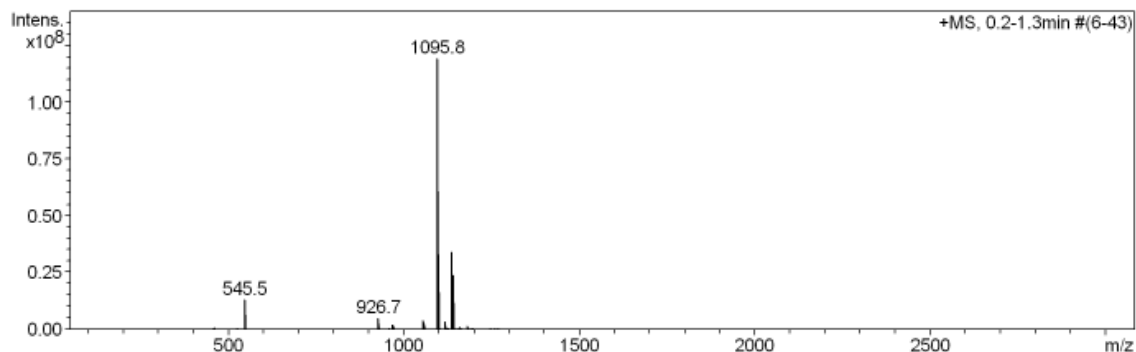


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,90	44,489	2,715	2,67
2	6,99	66,646	5,448	5,36
3	7,14	1098,328	89,672	88,22
4	7,33	45,526	3,814	3,75
Total:		1254,990	101,650	100,00

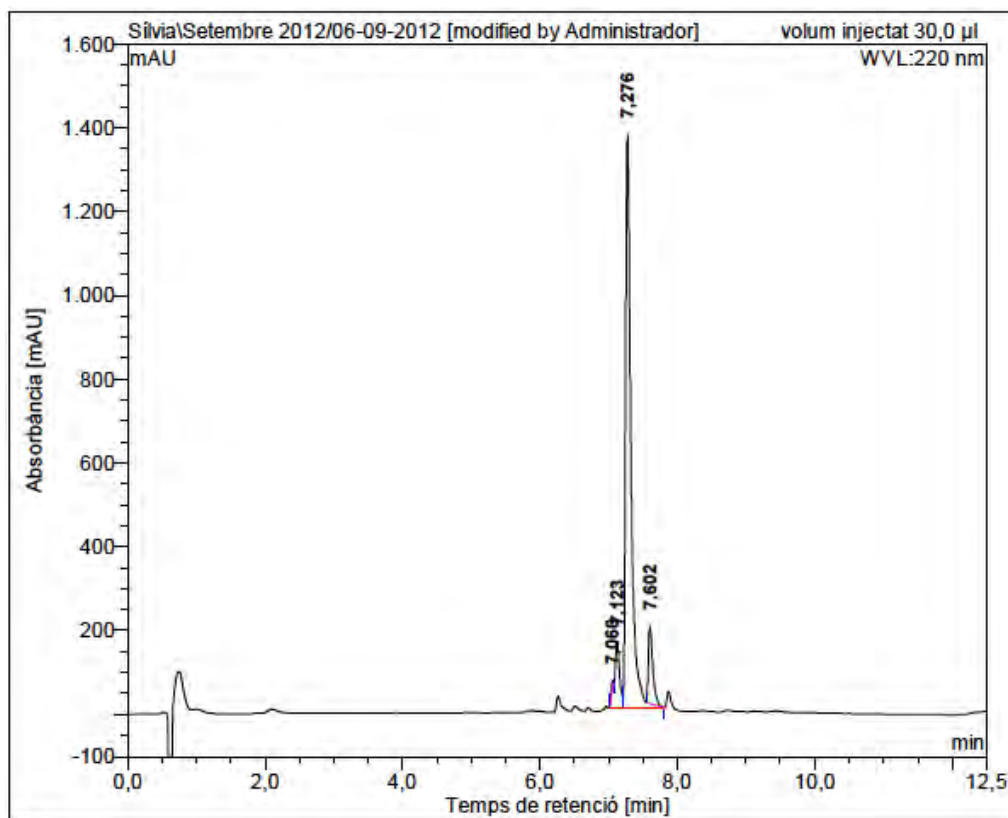


Fmoc-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (7a)

ESI/MS (m/z)



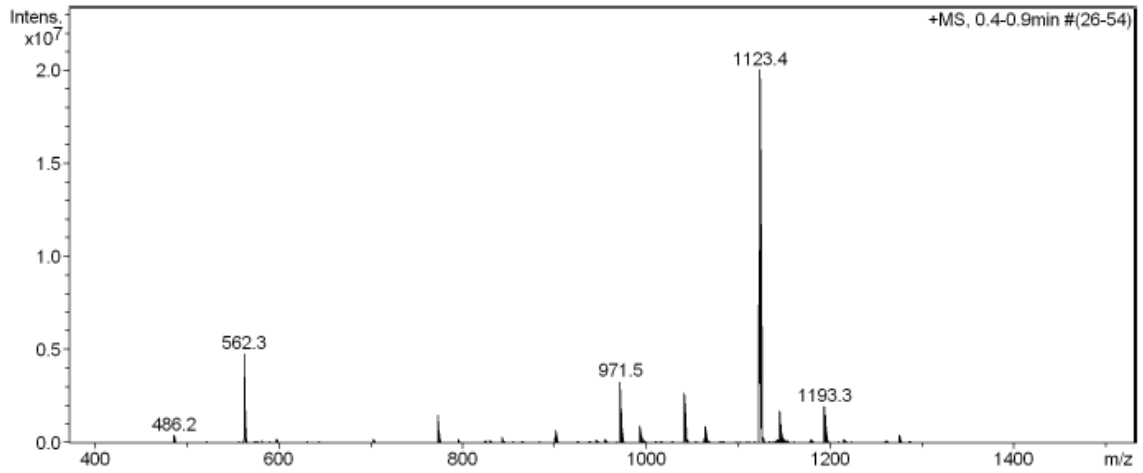
HPLC (220 nm)



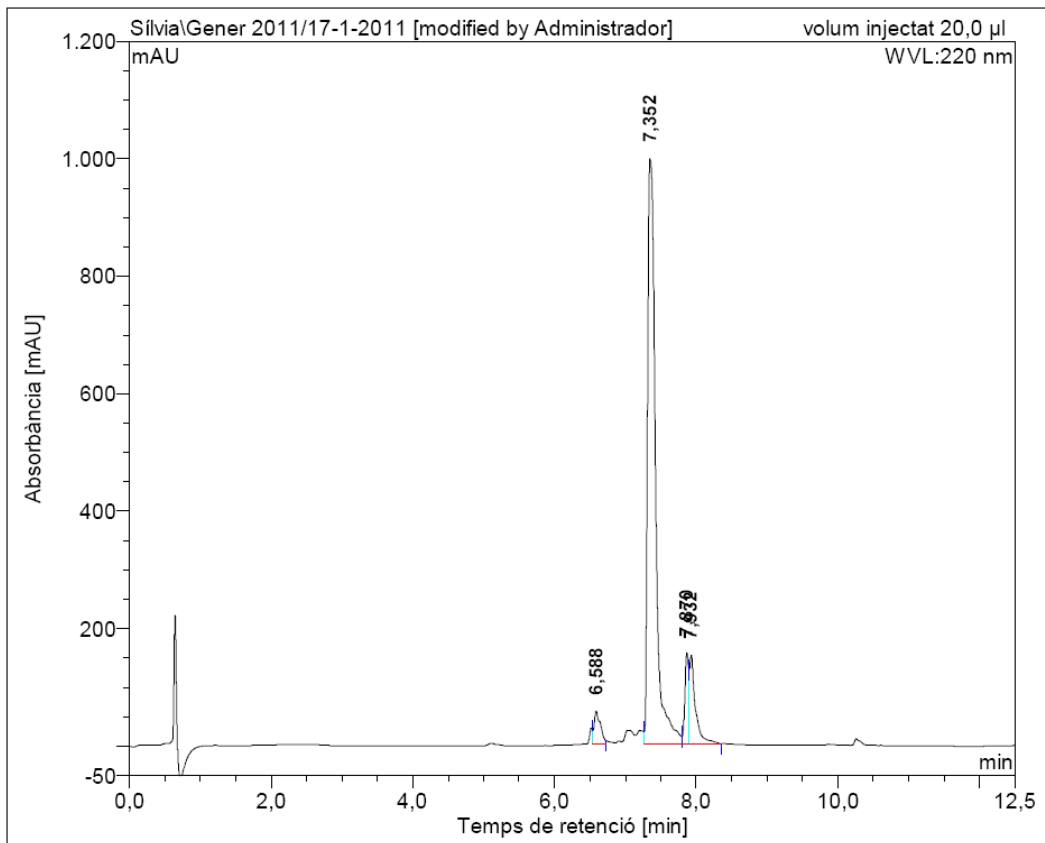
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,06	18,357	0,710	0,46
2	7,12	158,498	13,821	8,98
3	7,28	1370,242	125,530	81,53
4	7,60	183,745	13,901	9,03
Total:		1730,842	153,963	100,00

Fmoc-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (7b)

ESI-MS (m/z)



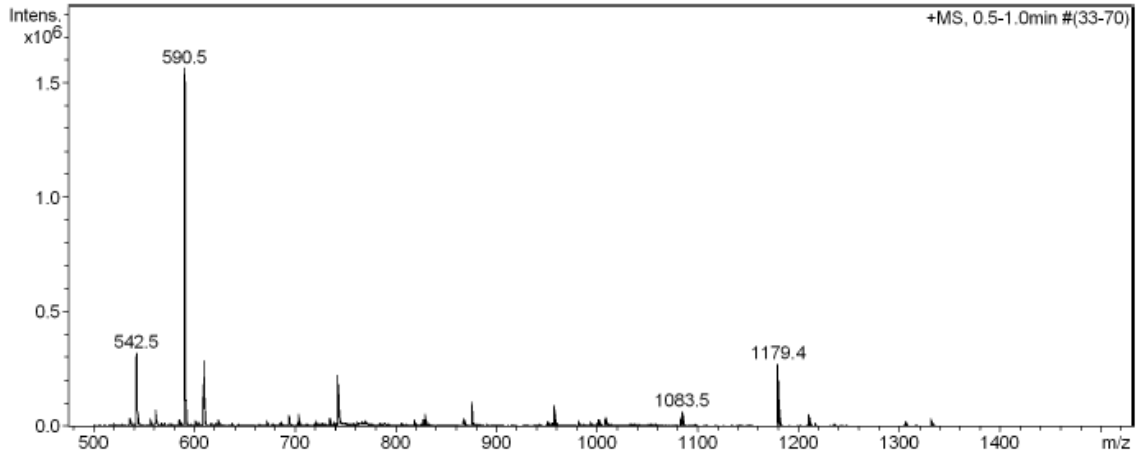
HPLC (220 nm)



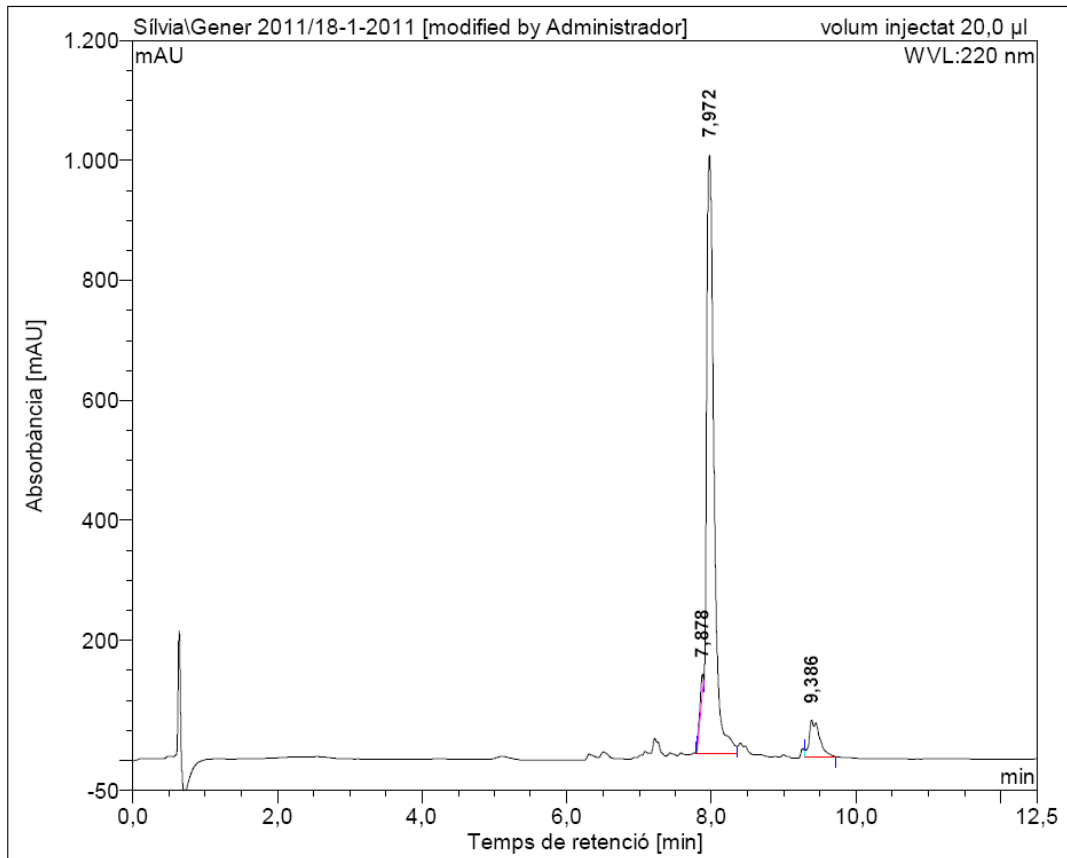
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,59	55,359	5,548	3,49
2	7,35	995,032	129,227	81,27
3	7,87	154,356	9,479	5,96
4	7,93	151,154	14,759	9,28
Total:		1355,902	159,013	100,00

Fmoc-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (7c)

ESI-MS (m/z)



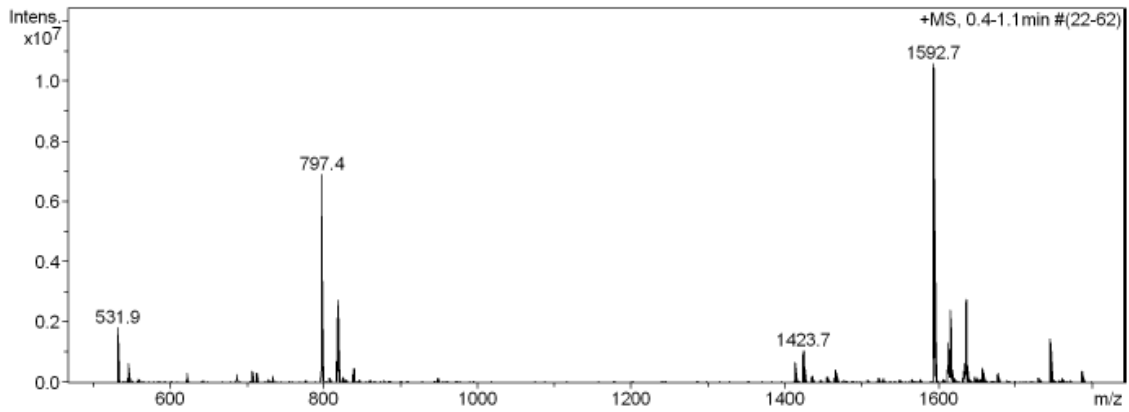
HPLC (220 nm)



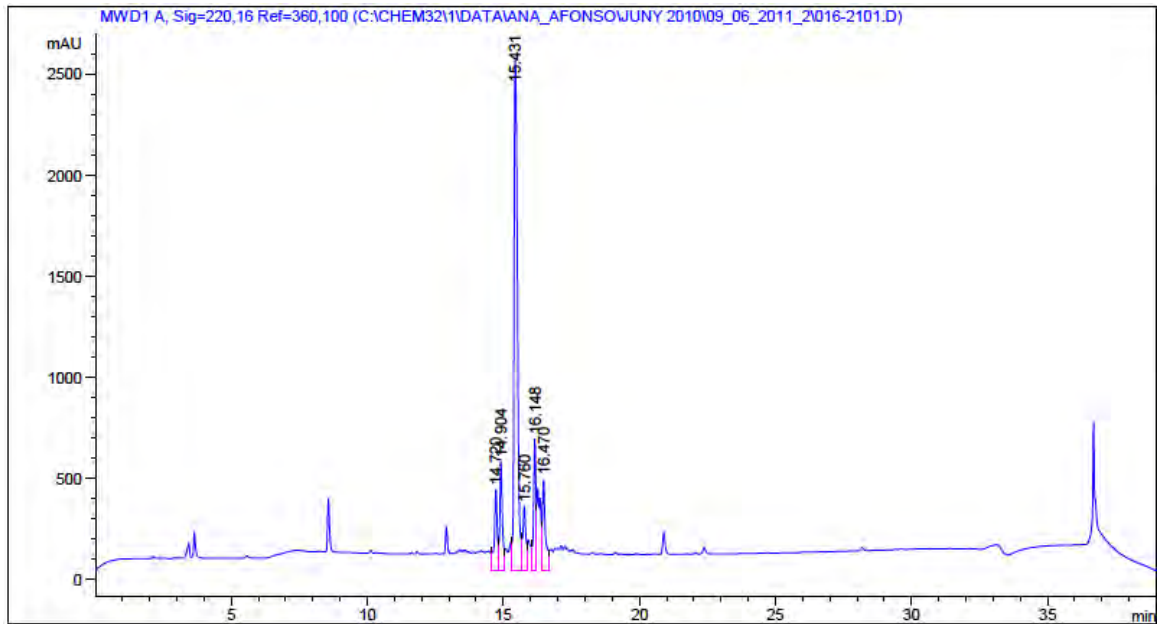
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,88	32,686	1,856	1,35
2	7,97	997,695	125,644	91,39
3	9,39	60,975	9,975	7,26
<b>Total:</b>		<b>1091,356</b>	<b>137,476</b>	<b>100,00</b>

Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (11a)

ESI/MS (m/z)



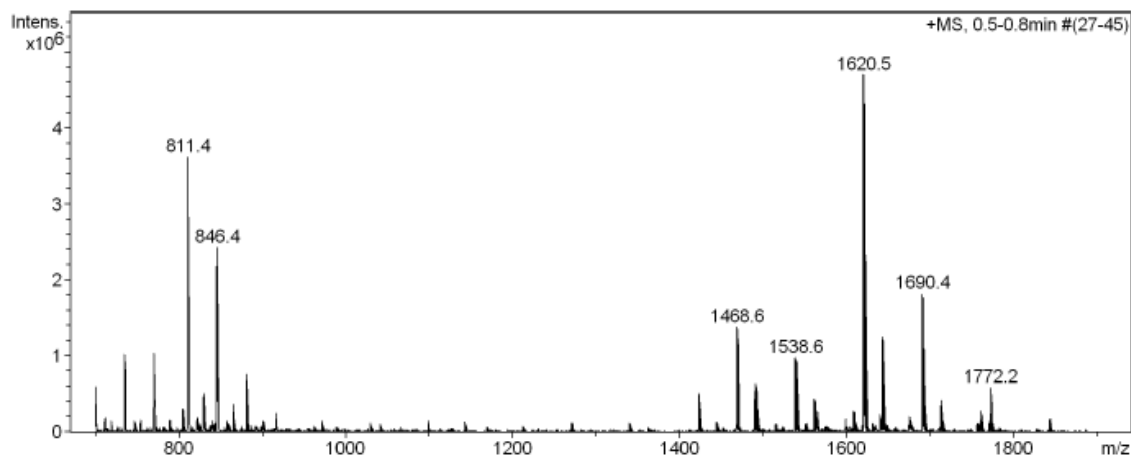
HPLC (220 nm)



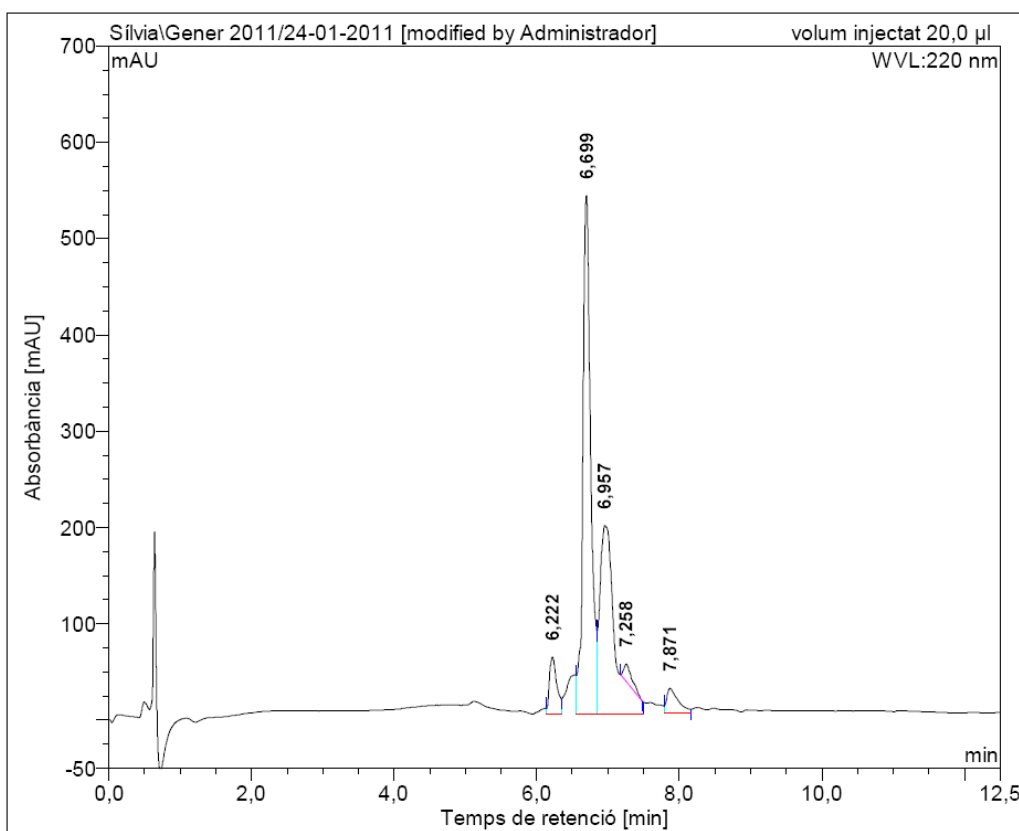
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	14.720	VV	0.1102	3174.79932	401.88586	8.1241
2	14.904	VV	0.0970	3654.04932	539.89490	9.3505
3	15.431	VV	0.1436	2.24210e4	2524.24414	57.3740
4	15.760	VV	0.1052	2374.83667	317.90781	6.0771
5	16.148	VV	0.0859	3801.68872	653.09937	9.7283
6	16.470	VV	0.1129	3652.27295	448.86636	9.3460

Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll (11b)

ESI-MS (m/z)



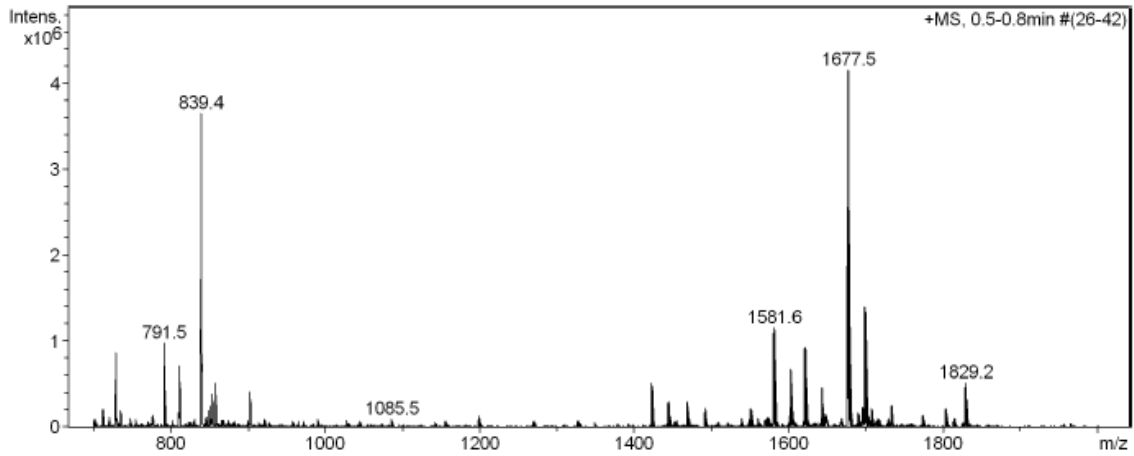
HPLC (220 nm)



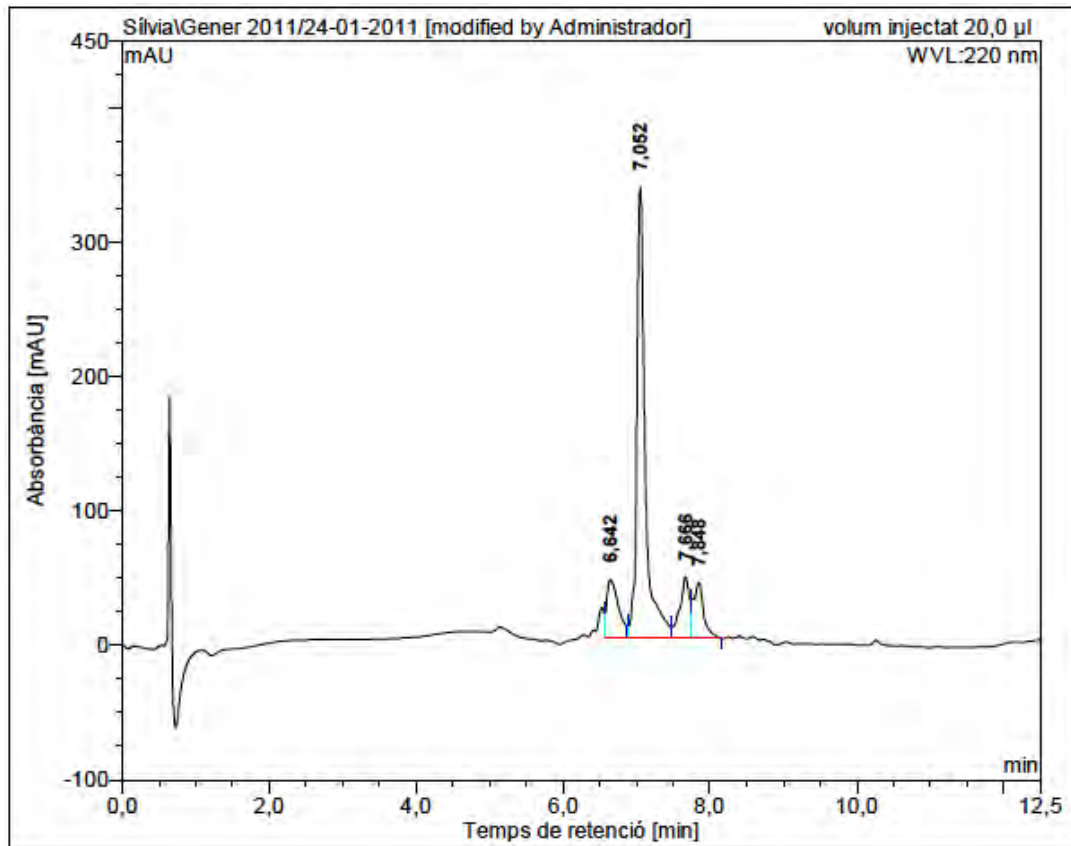
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,22	58,358	7,085	5,35
2	6,70	537,527	69,007	52,12
3	6,96	195,224	49,002	37,01
4	7,26	18,335	2,539	1,92
5	7,87	25,249	4,762	3,60
<b>Total:</b>		<b>834,692</b>	<b>132,395</b>	<b>100,00</b>

Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAlI (11c)

ESI-MS (m/z)



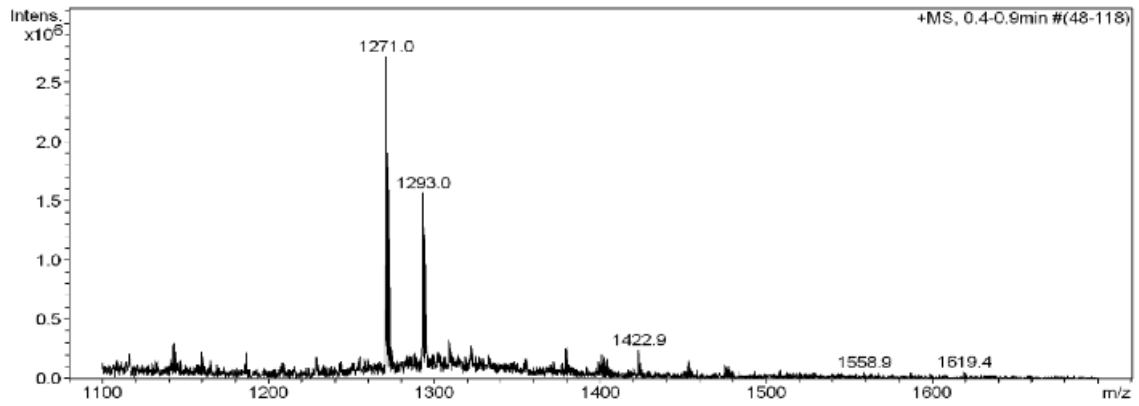
HPLC (220 nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,64	43,326	7,995	12,01
2	7,05	335,685	44,668	67,09
3	7,67	46,050	6,733	10,11
4	7,85	41,628	7,189	10,80
Total:		466,689	66,584	100,00

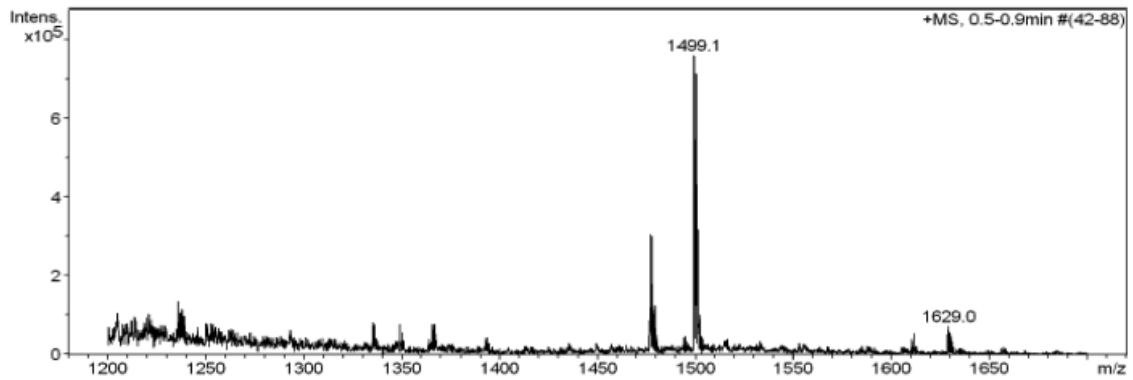
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

ESI-MS (m/z)



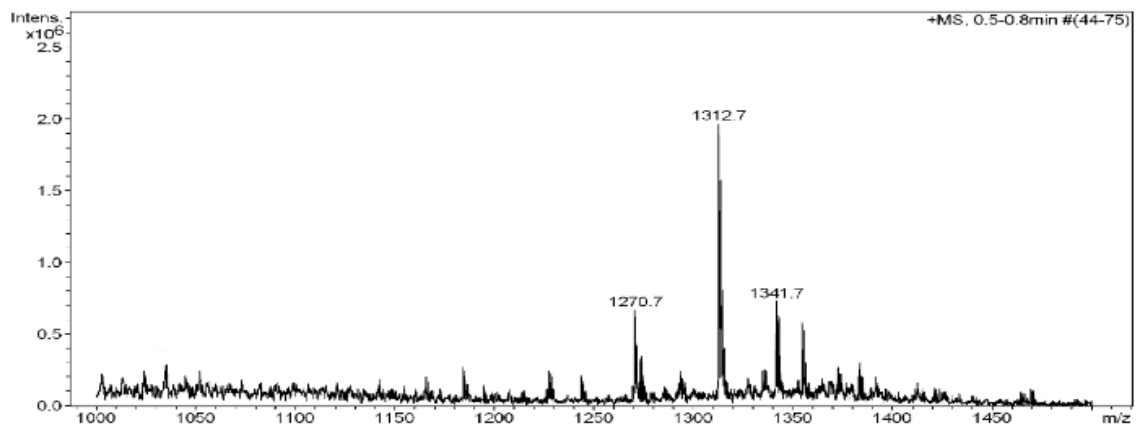
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

ESI-MS (m/z)



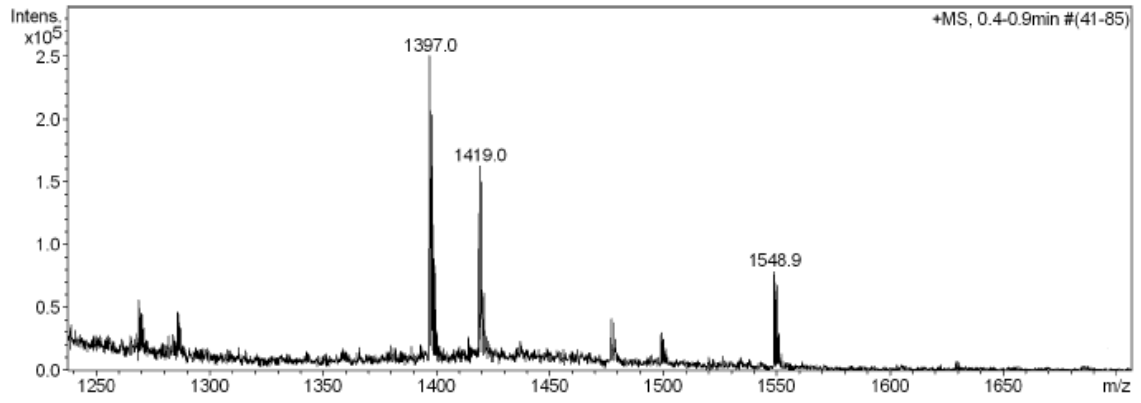
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COCH<sub>3</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (5)**

ESI/MS (m/z)

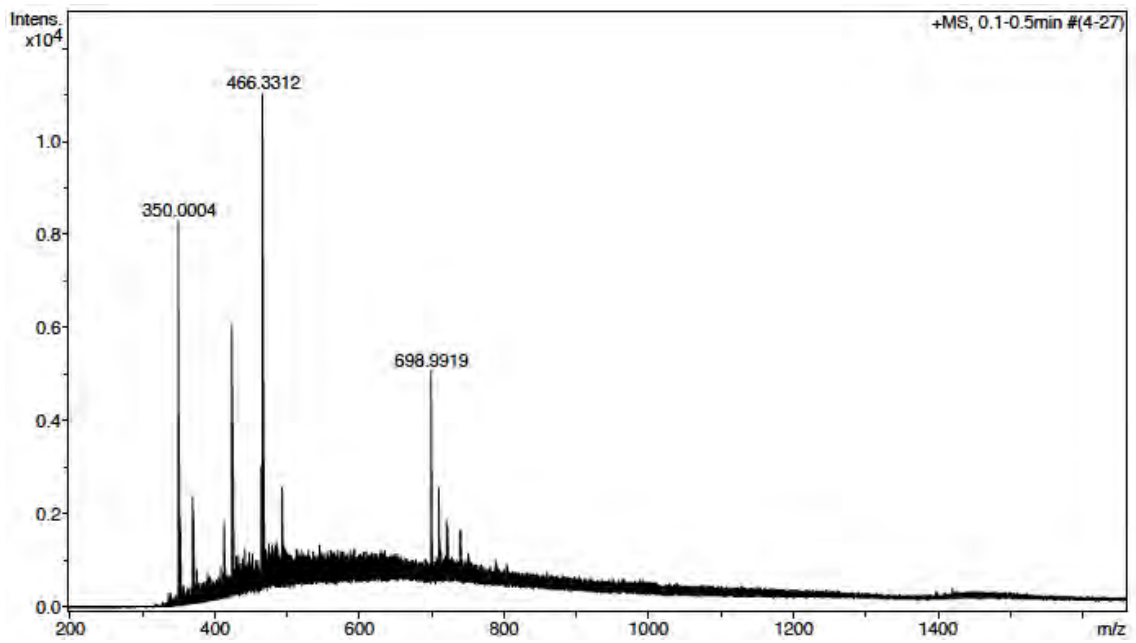


c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC498)

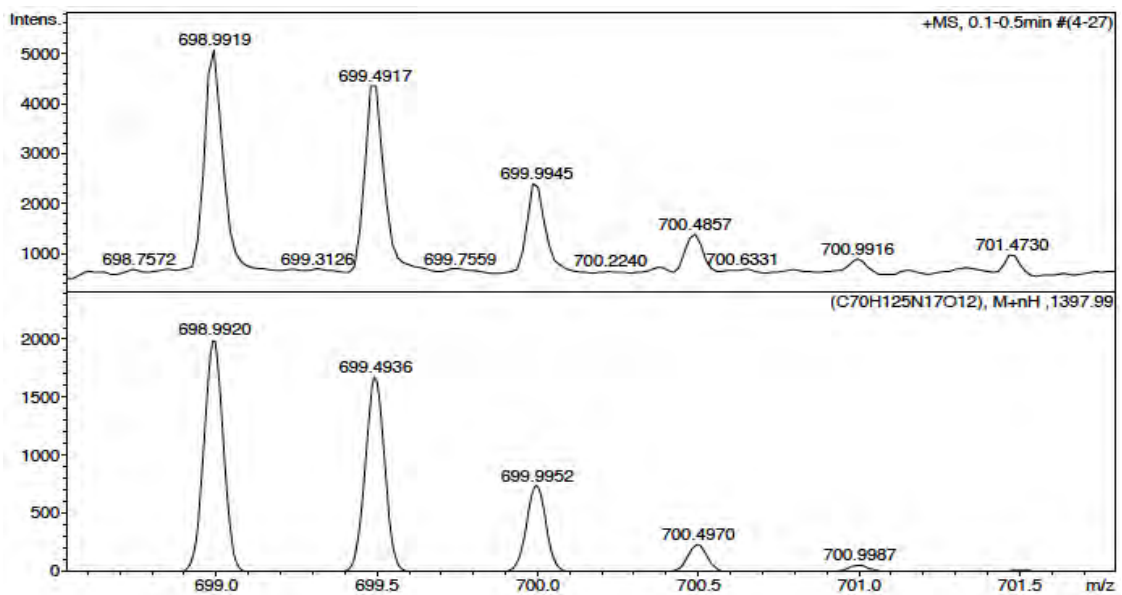
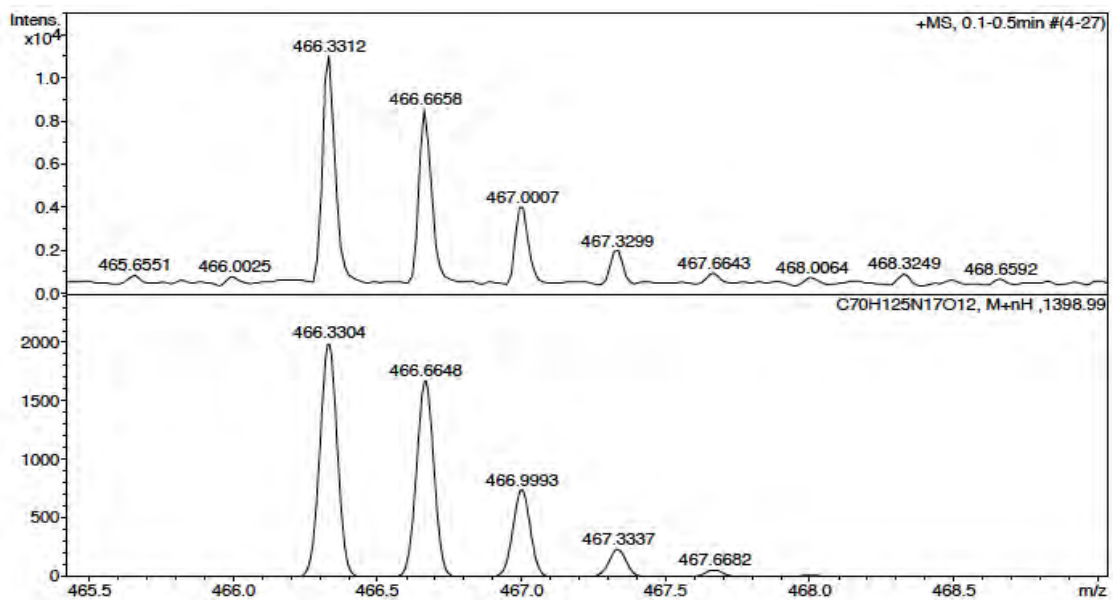
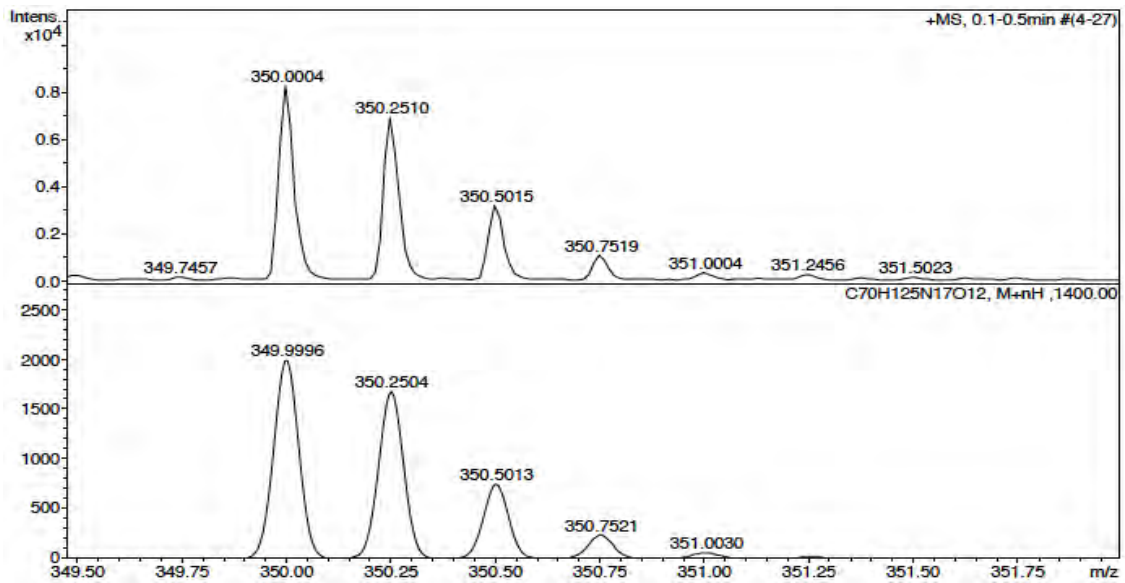
ESI-MS (m/z)



HRMS (ESI) m/z

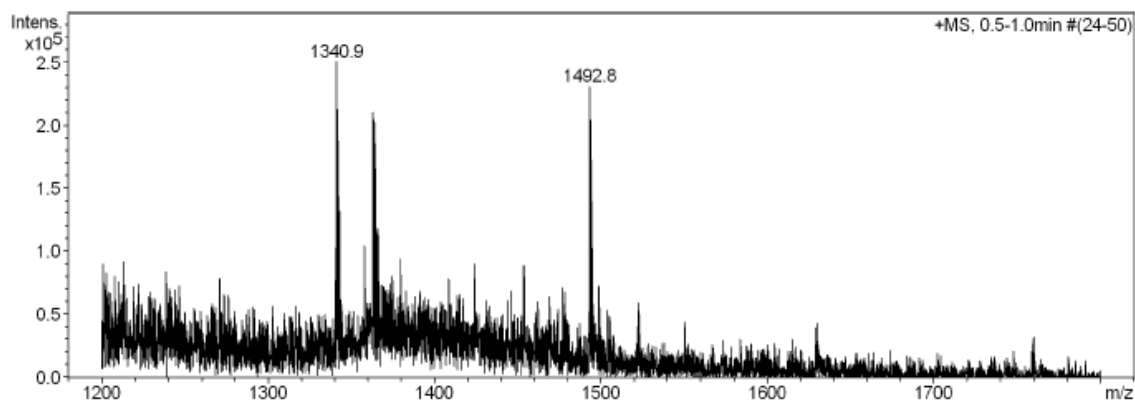




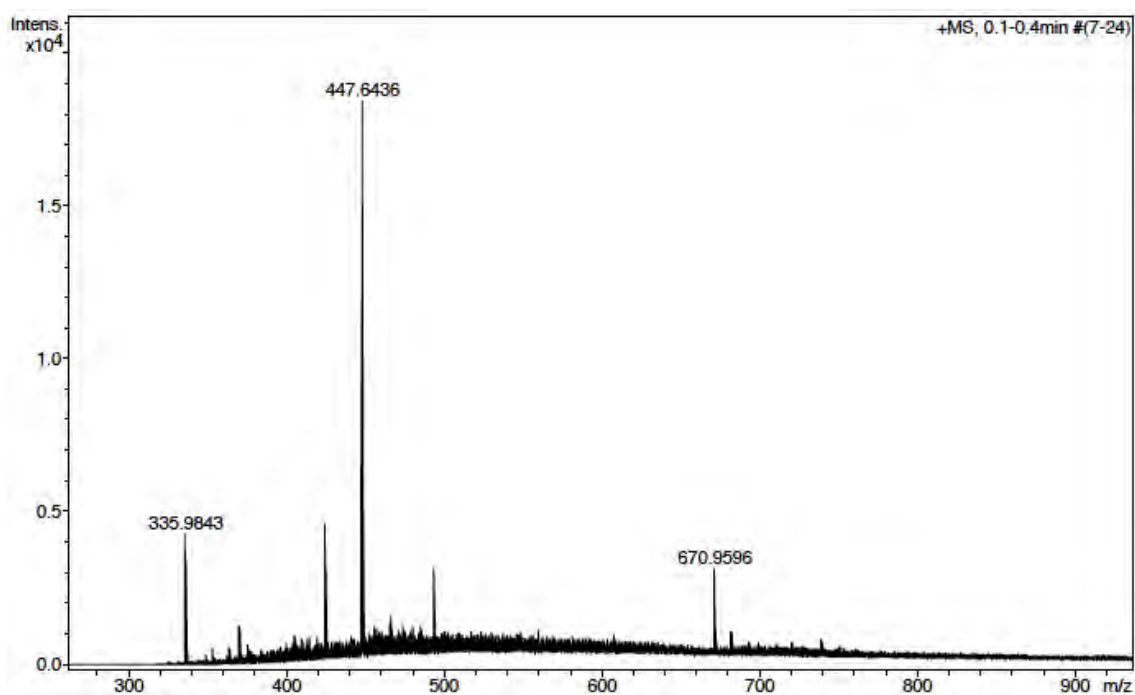


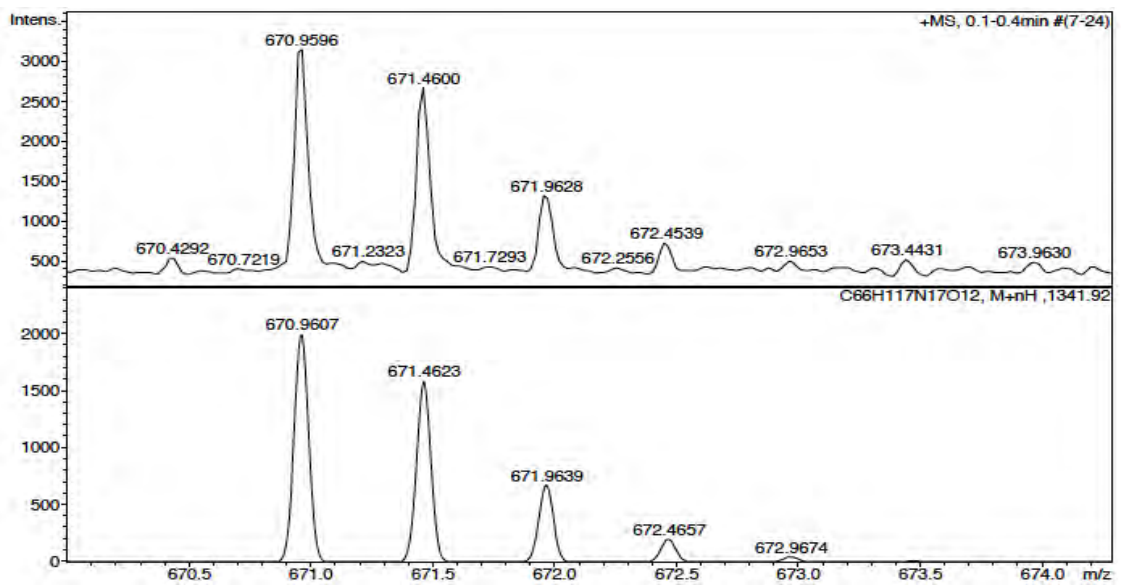
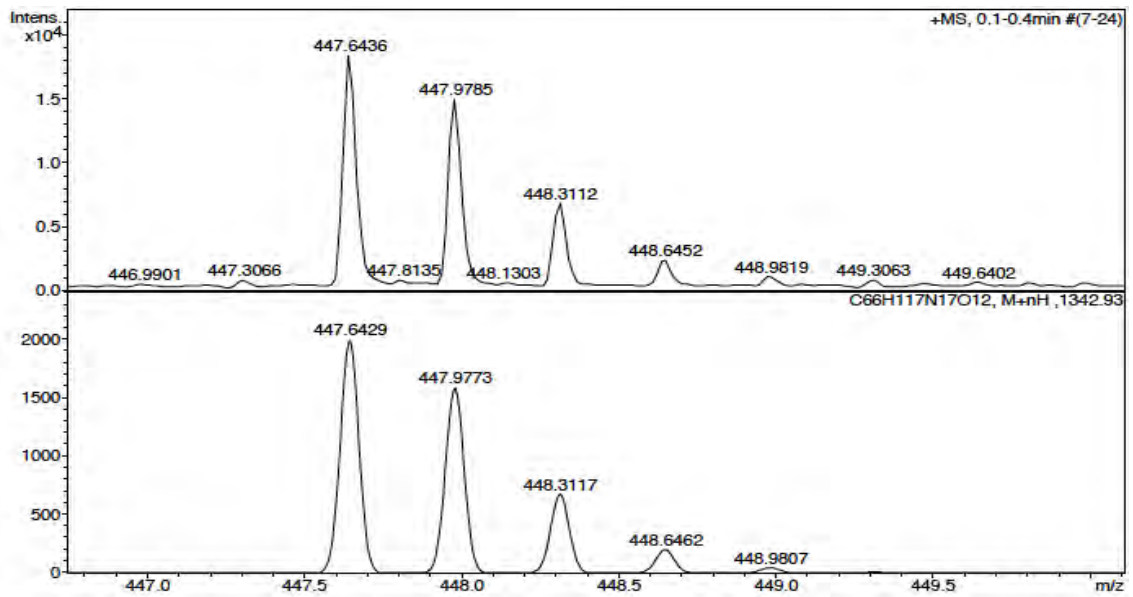
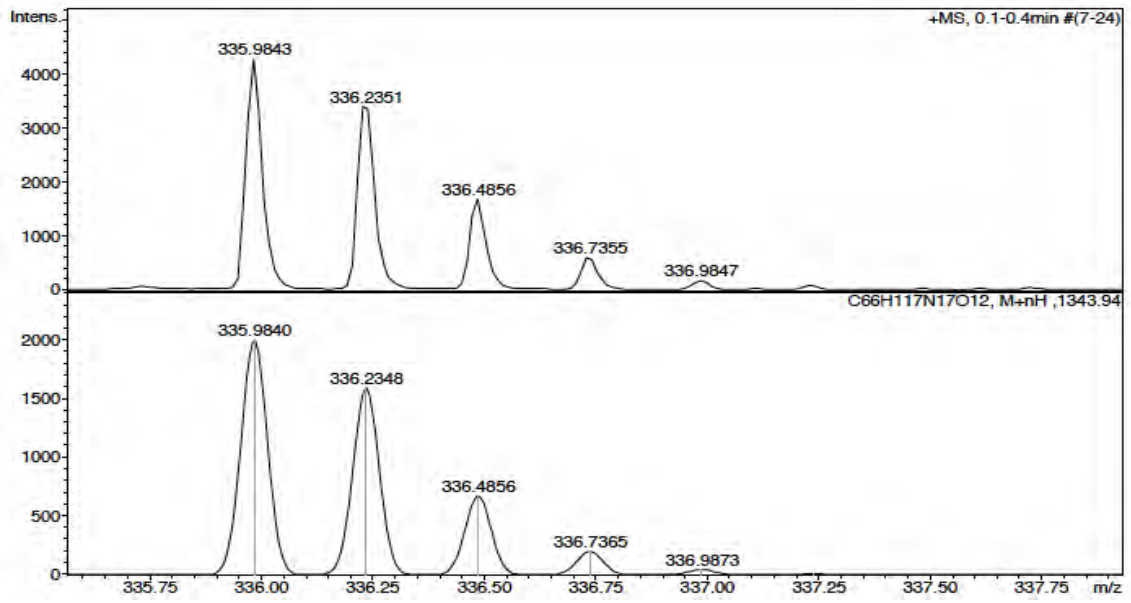
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>4</sub>H<sub>7</sub>))-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC500)**

ESI-MS (m/z)



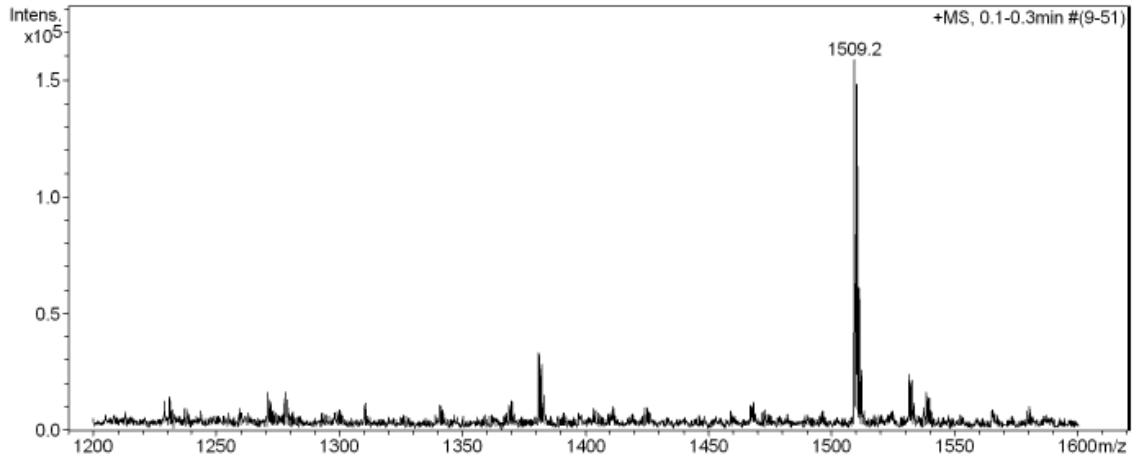
HRMS (ESI) m/z



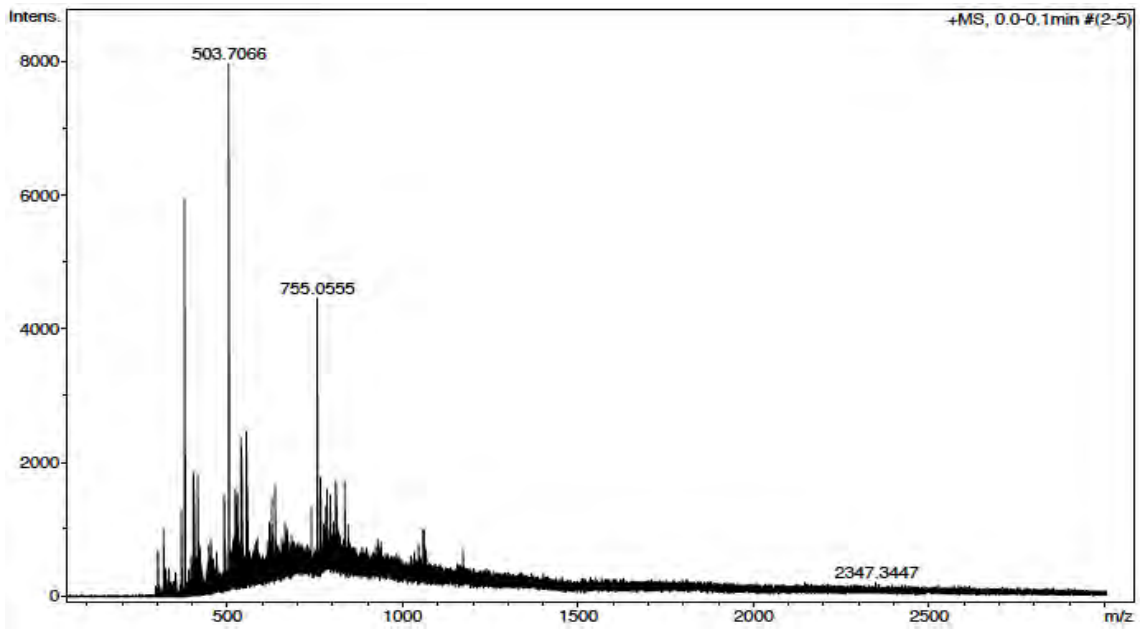


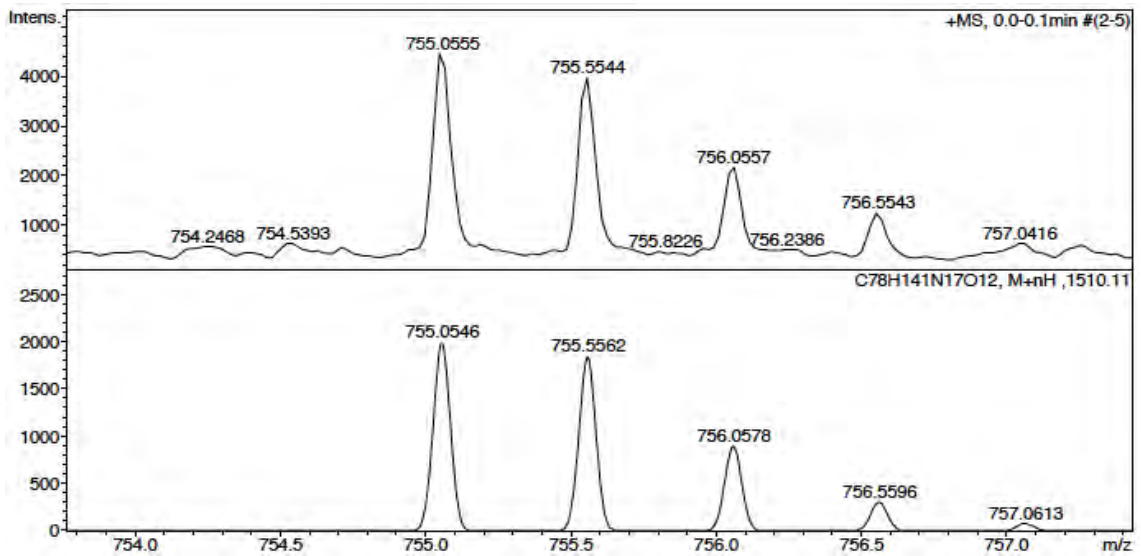
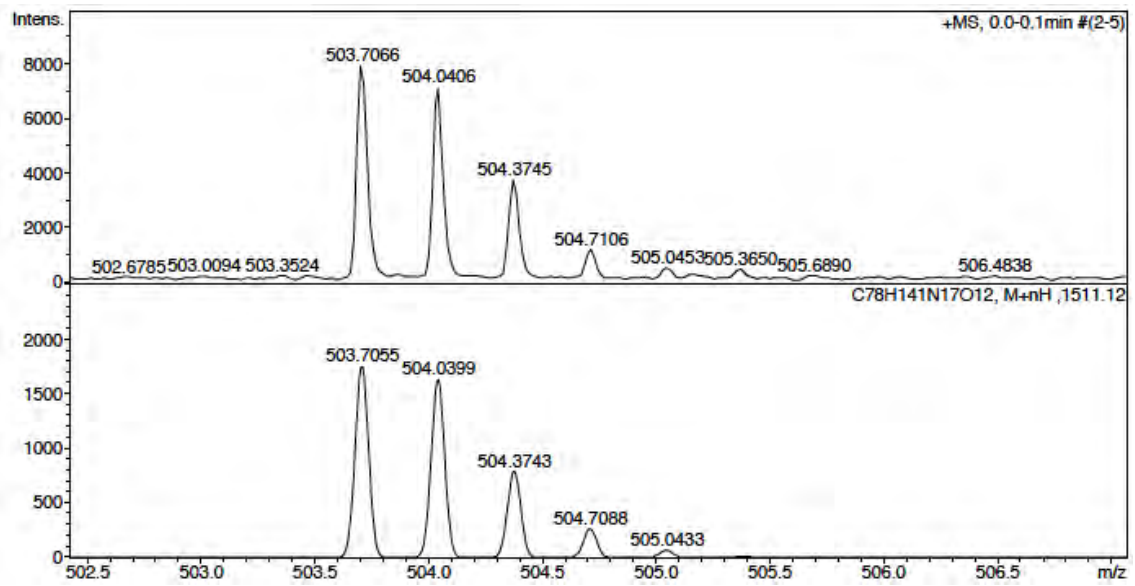
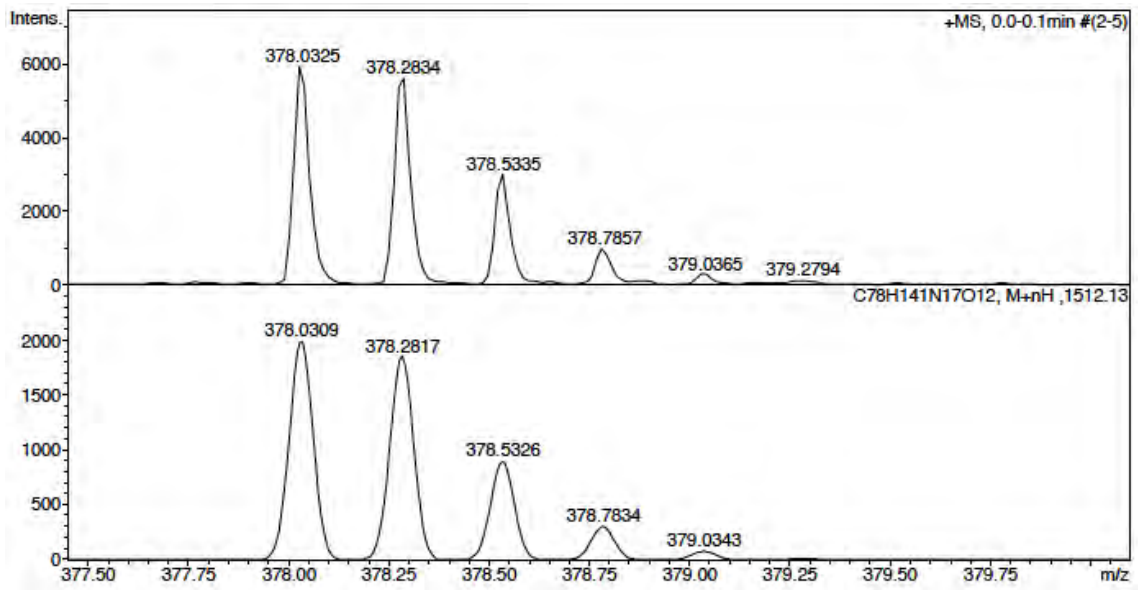
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>15</sub>H<sub>31</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC502)

ESI-MS (m/z)



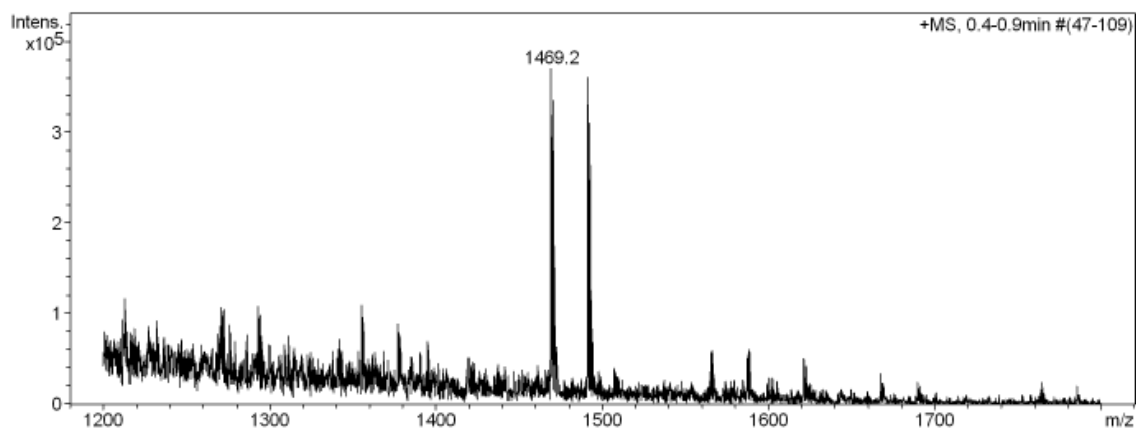
HRMS (ESI) m/z



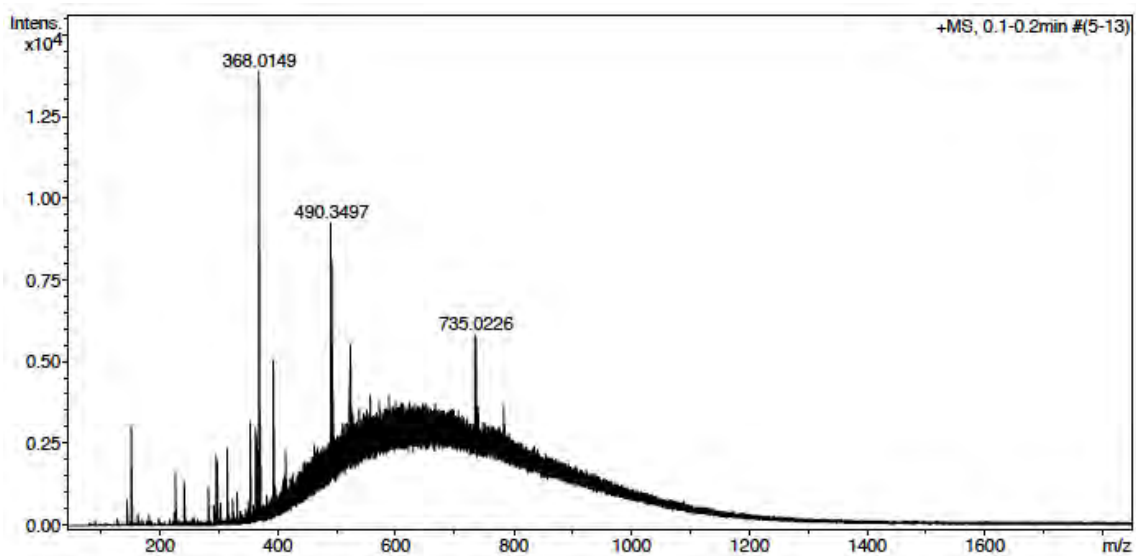


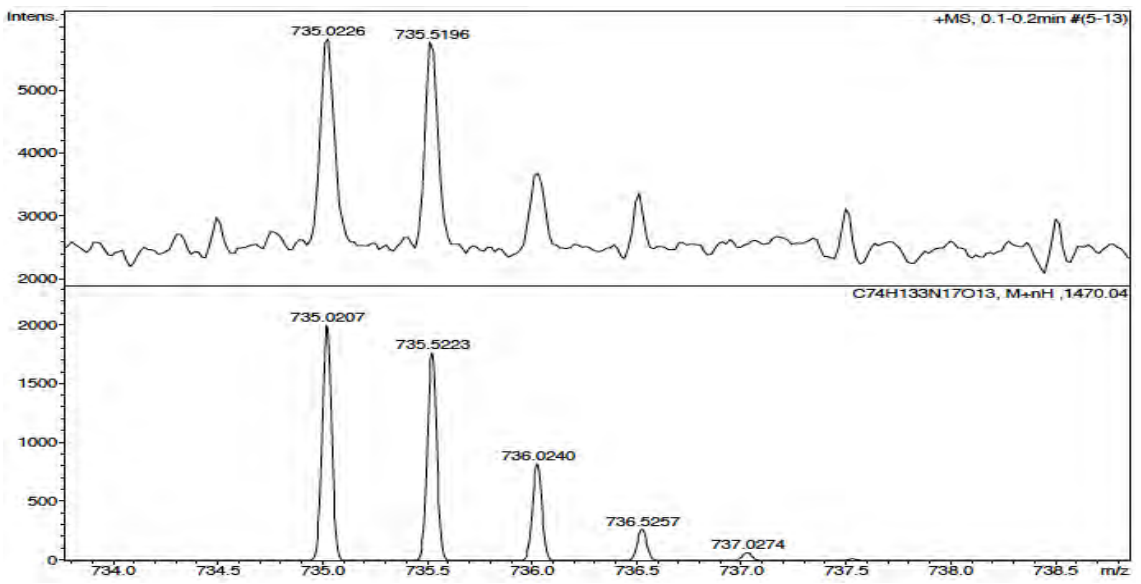
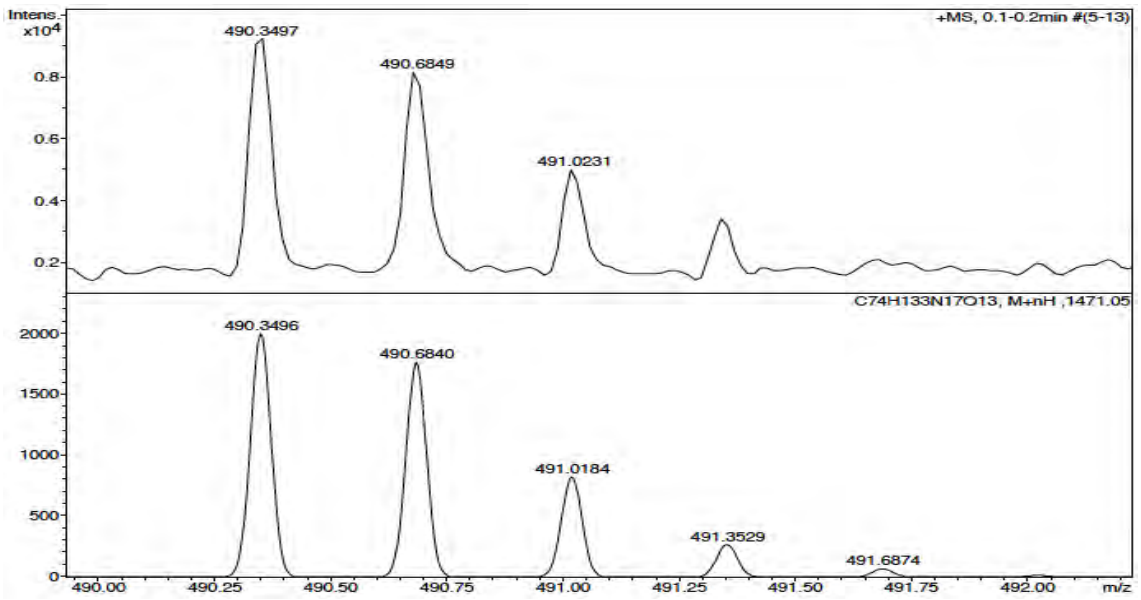
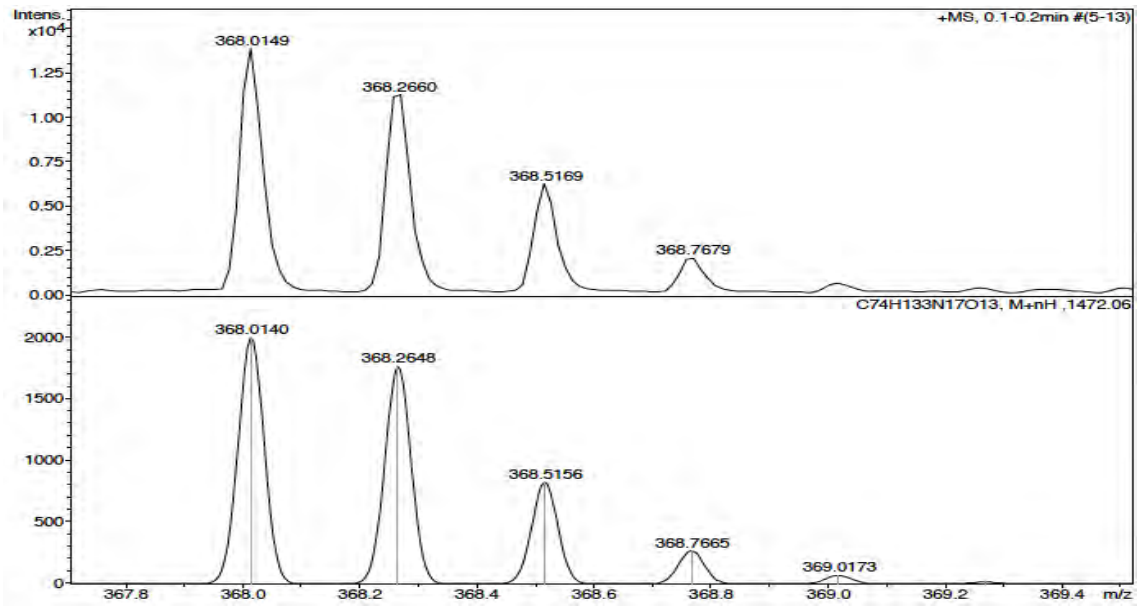
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>OH)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC524)

ESI-MS (m/z)



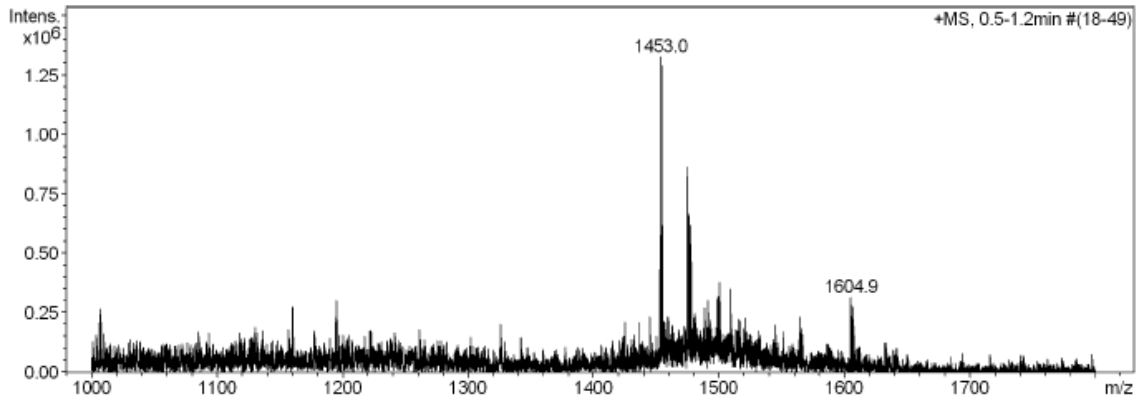
HRMS (ESI) m/z



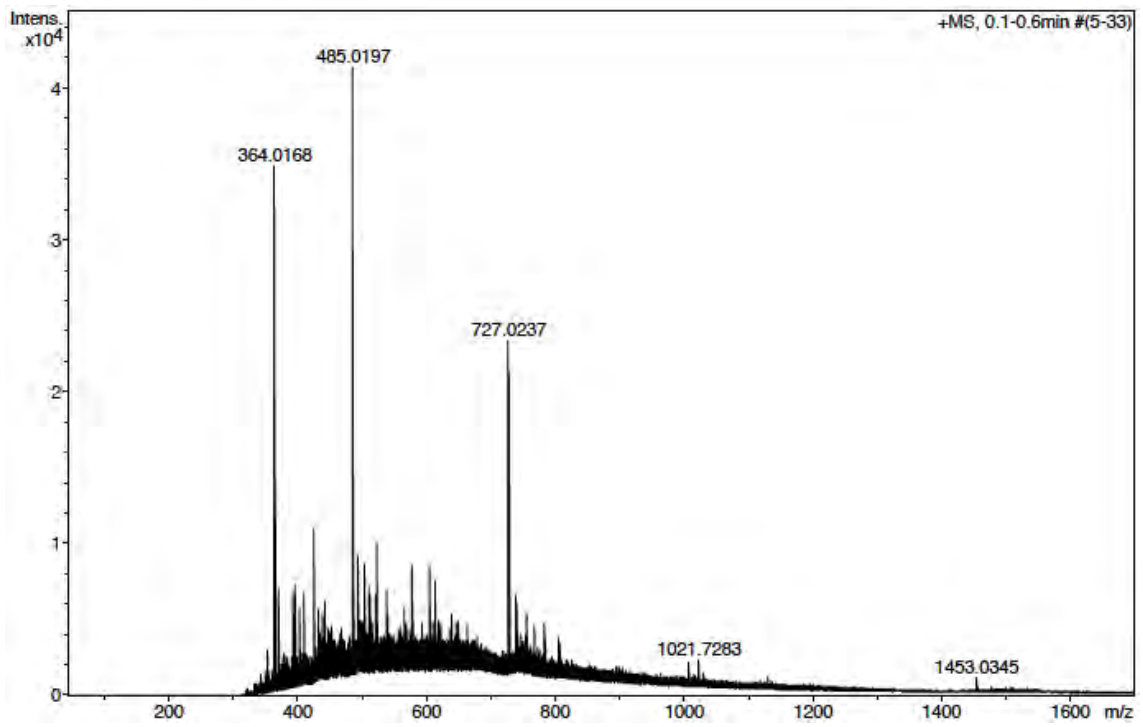


c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(COC<sub>11</sub>H<sub>23</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC530)

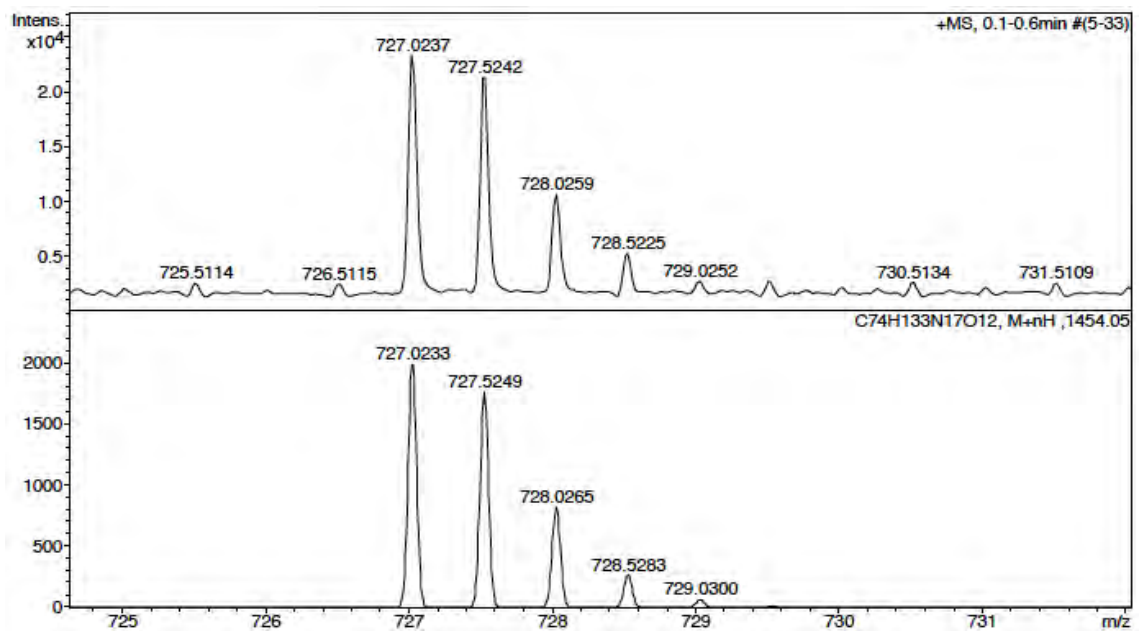
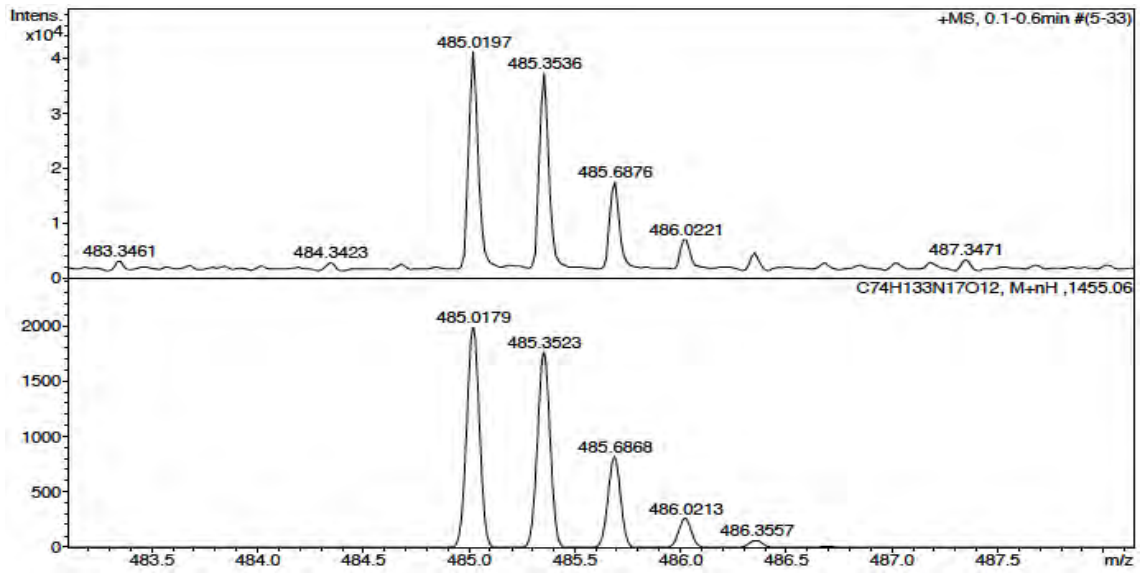
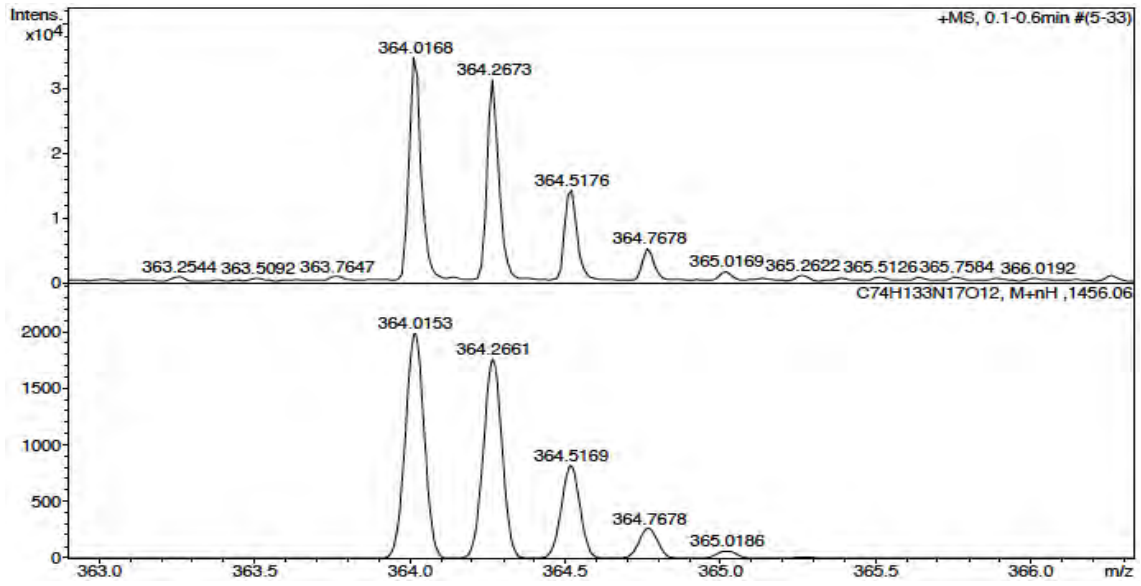
ESI-MS (m/z)



HRMS (ESI) m/z







## **A2. Incorporation of D-amino acids or of a His reduces the hemolytic activity of antimicrobial cyclolipopeptides**

Sílvia Vilà, Esther Badosa, Emilio Montesinos, Marta Planas\*, and Lidia Feliu\*

### **Table of contents**

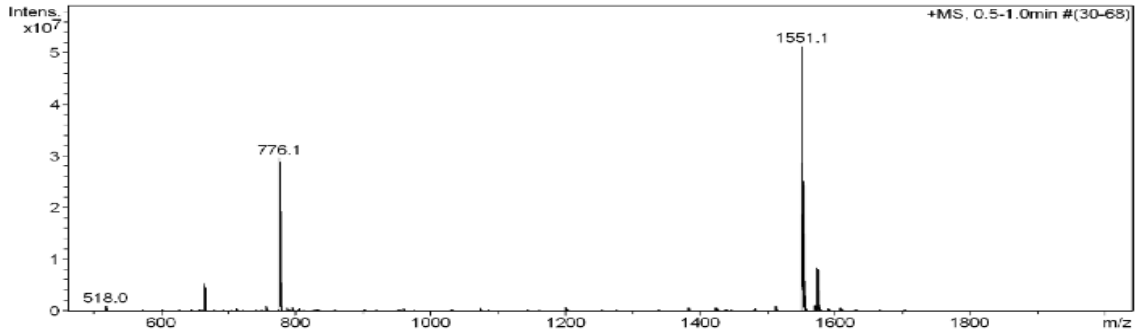
1. Linear peptidyl resins.....	24
2. Cyclic peptidyl resins.....	43
3. Cyclolipopeptides .....	63

## 1. Linear peptidyl resins

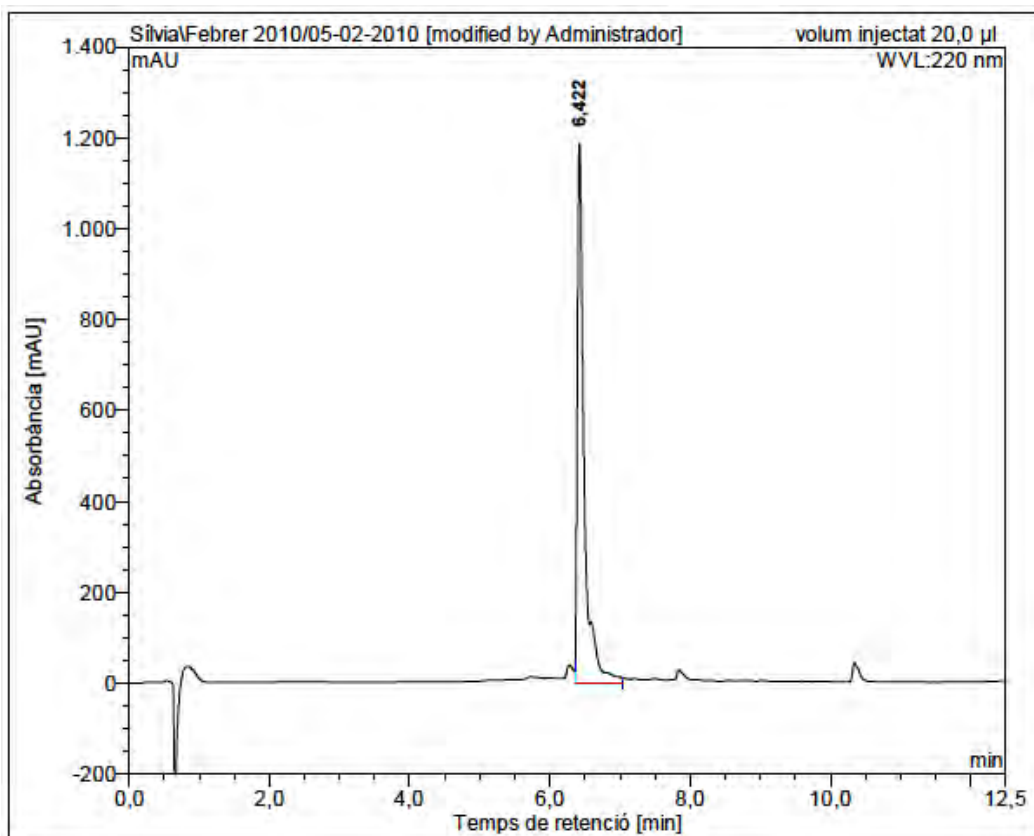
### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

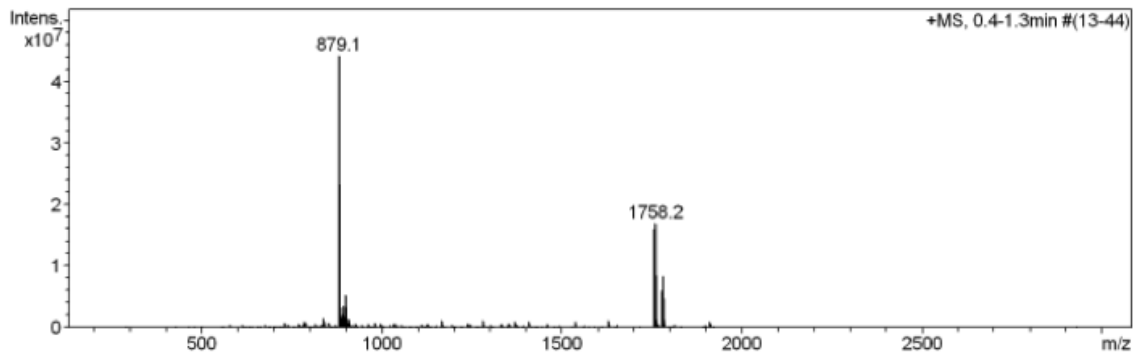


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,42	1186,004	134,786	100,00
Total:		1186,004	134,786	100,00

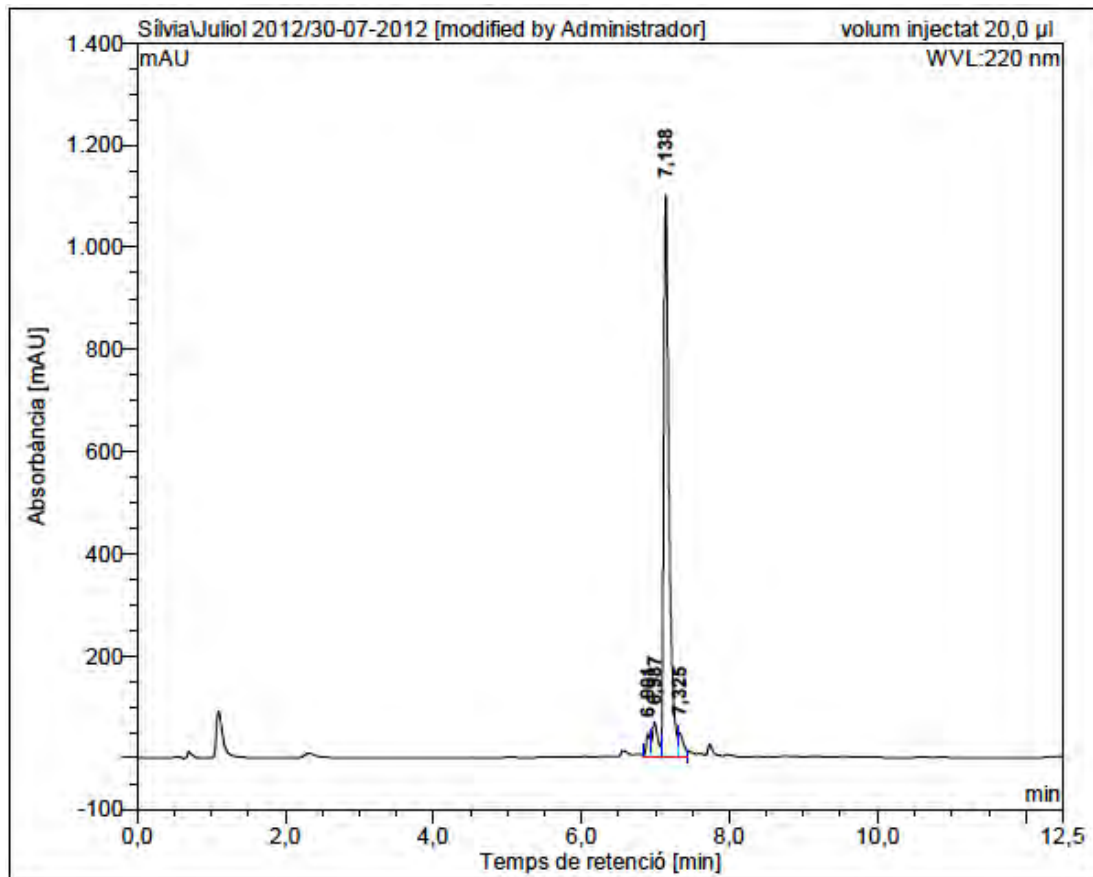
**Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

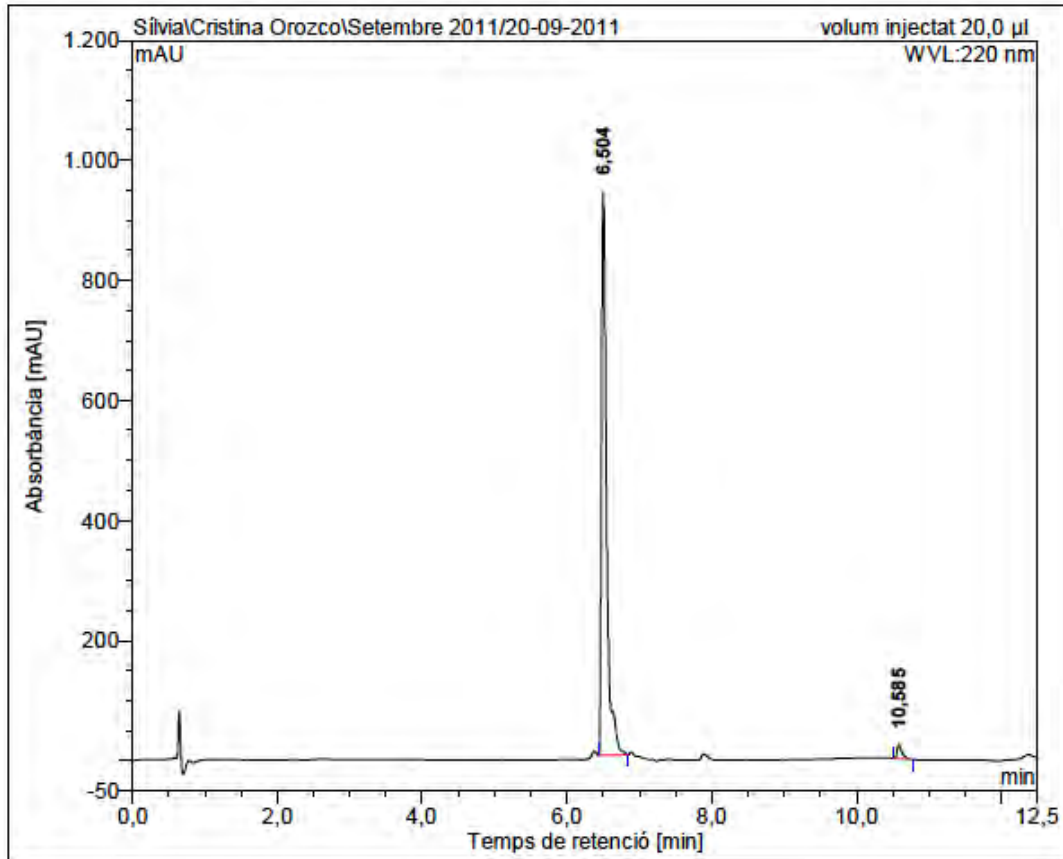


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,90	44,489	2,715	2,67
2	6,99	66,646	5,448	5,36
3	7,14	1098,328	89,672	88,22
4	7,33	45,526	3,814	3,75
Total:		1254,990	101,650	100,00

**Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

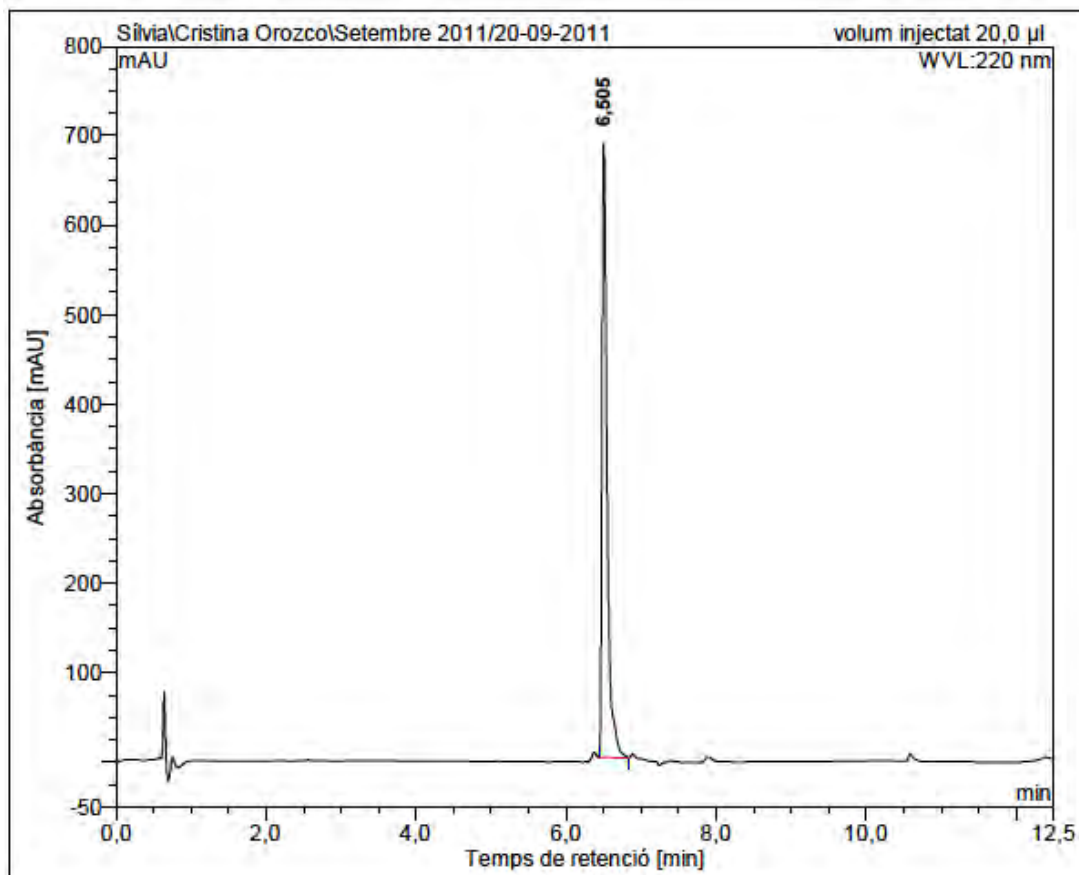


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,50	938,433	76,827	97,69
2	10,59	23,715	1,820	2,31
Total:		962,149	78,648	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

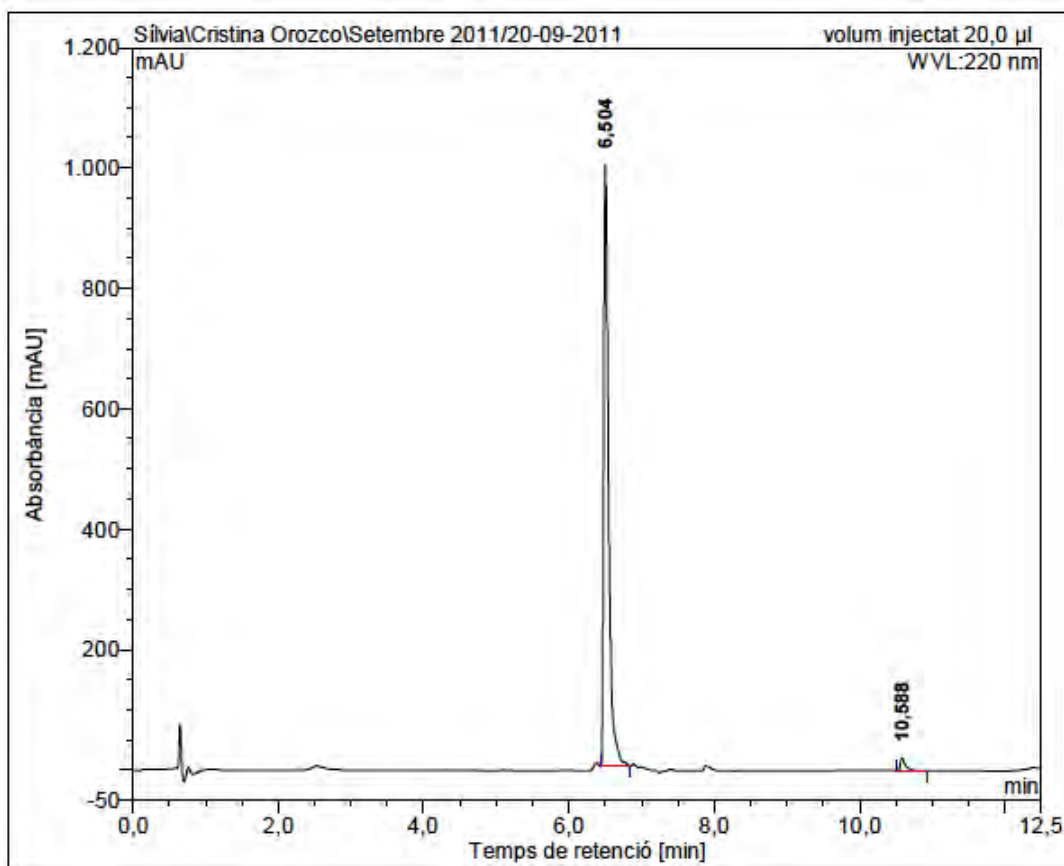


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,50	685,663	54,438	100,00
Total:		685,663	54,438	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

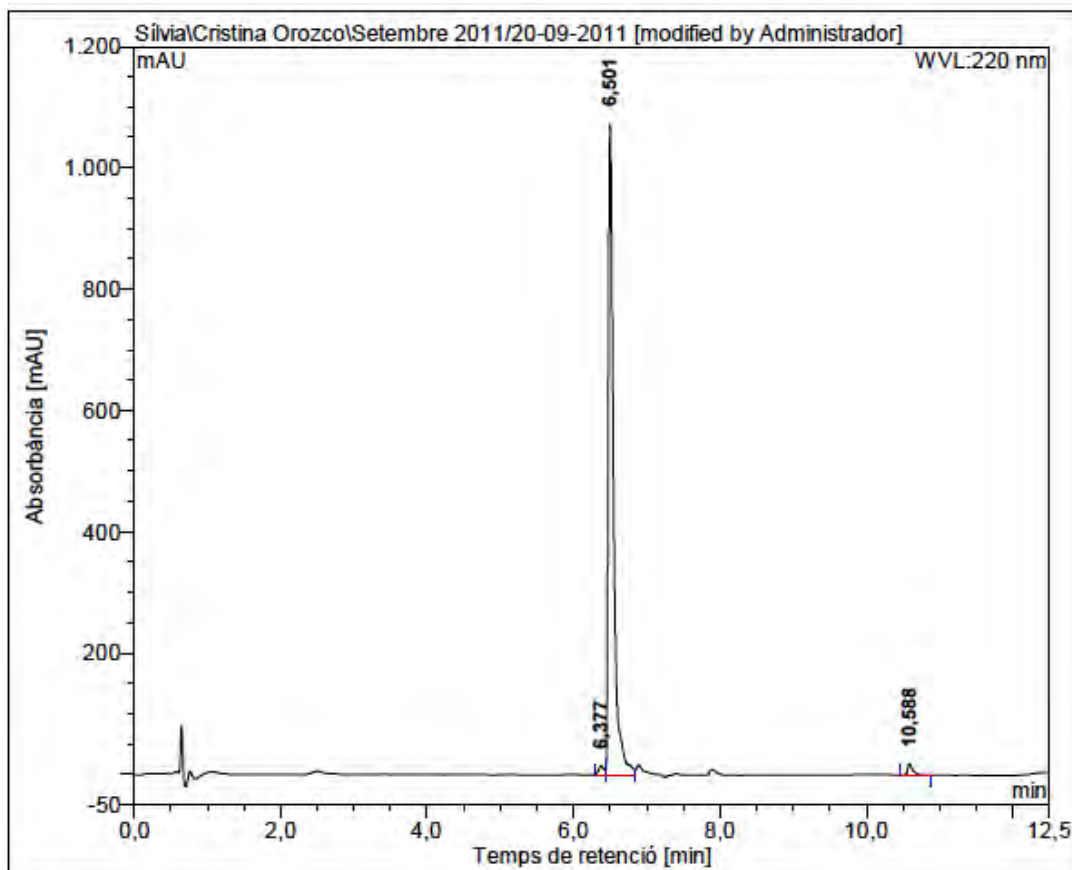


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,50	999,753	78,391	97,92
2	10,59	20,989	1,665	2,08
Total:		1020,741	80,057	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



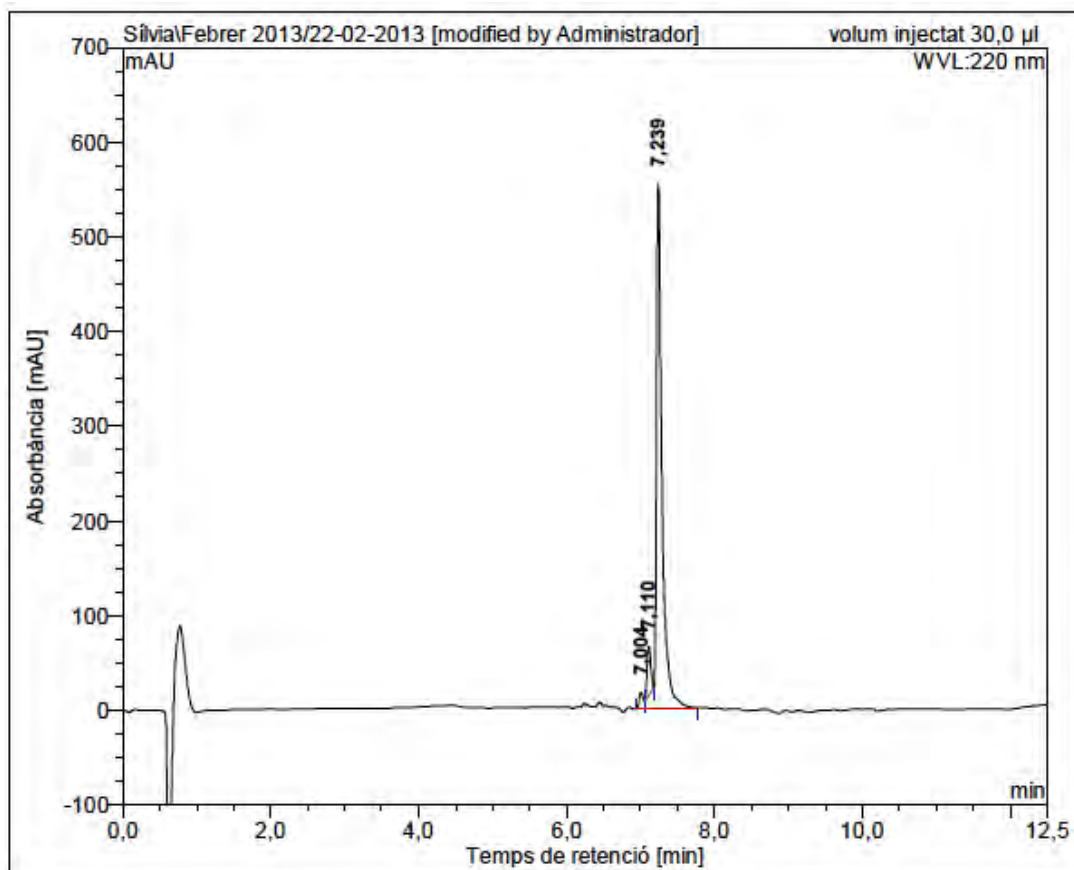
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,38	14,774	1,215	1,33
2	6,50	1072,166	88,854	97,04
3	10,59	19,104	1,499	1,64
Total:		1106,044	91,567	100,00



### Fmoc-Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

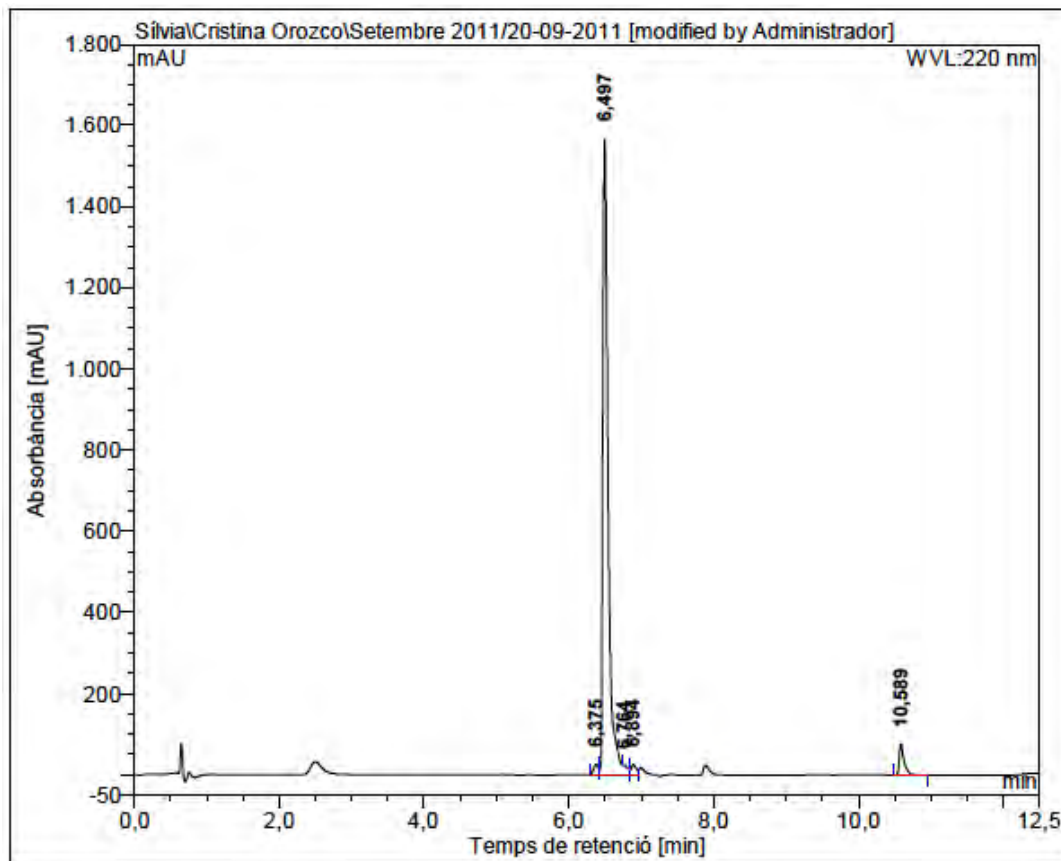


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,00	17,434	1,128	2,05
2	7,11	51,683	2,983	5,43
3	7,24	555,106	50,795	92,51
Total:		624,223	54,906	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

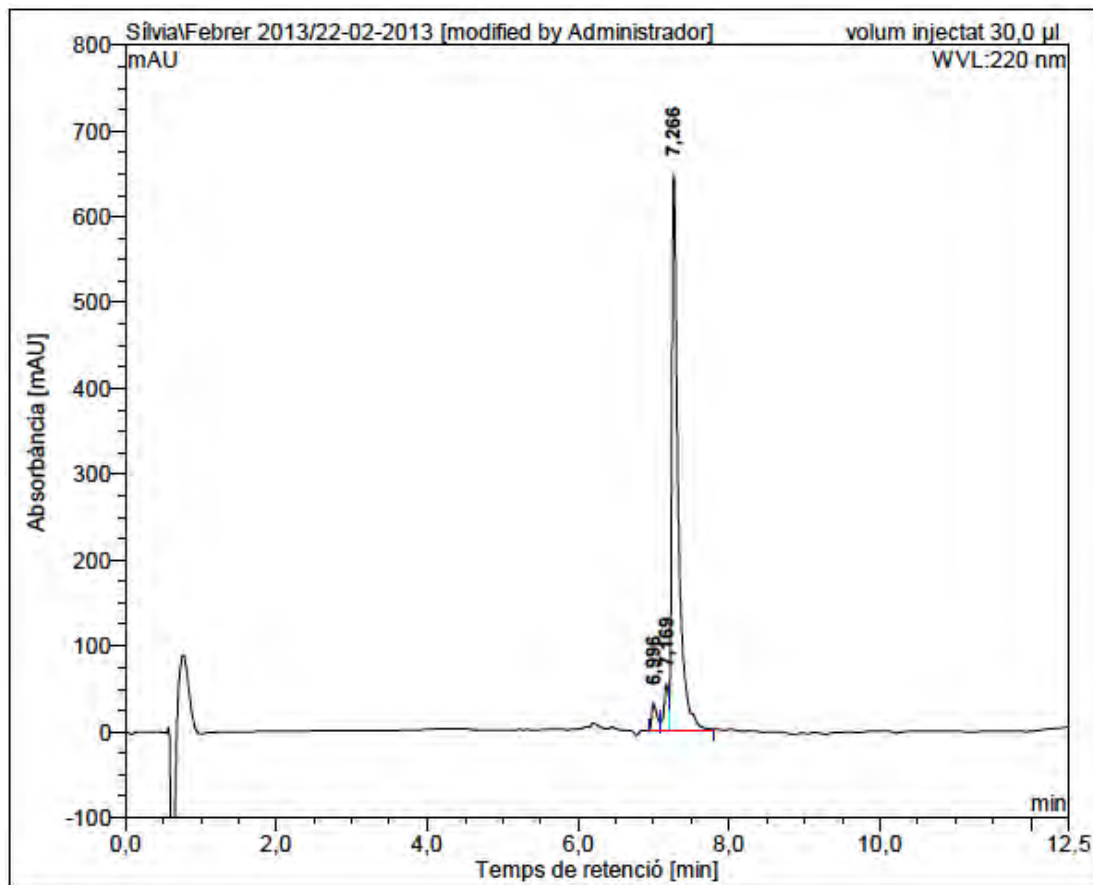


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,38	24,818	1,984	1,38
2	6,50	1565,471	133,839	92,98
3	6,76	3,071	0,162	0,11
4	6,89	24,556	1,948	1,35
5	10,59	76,614	6,015	4,18
Total:		1694,530	143,947	100,00

### Fmoc-Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

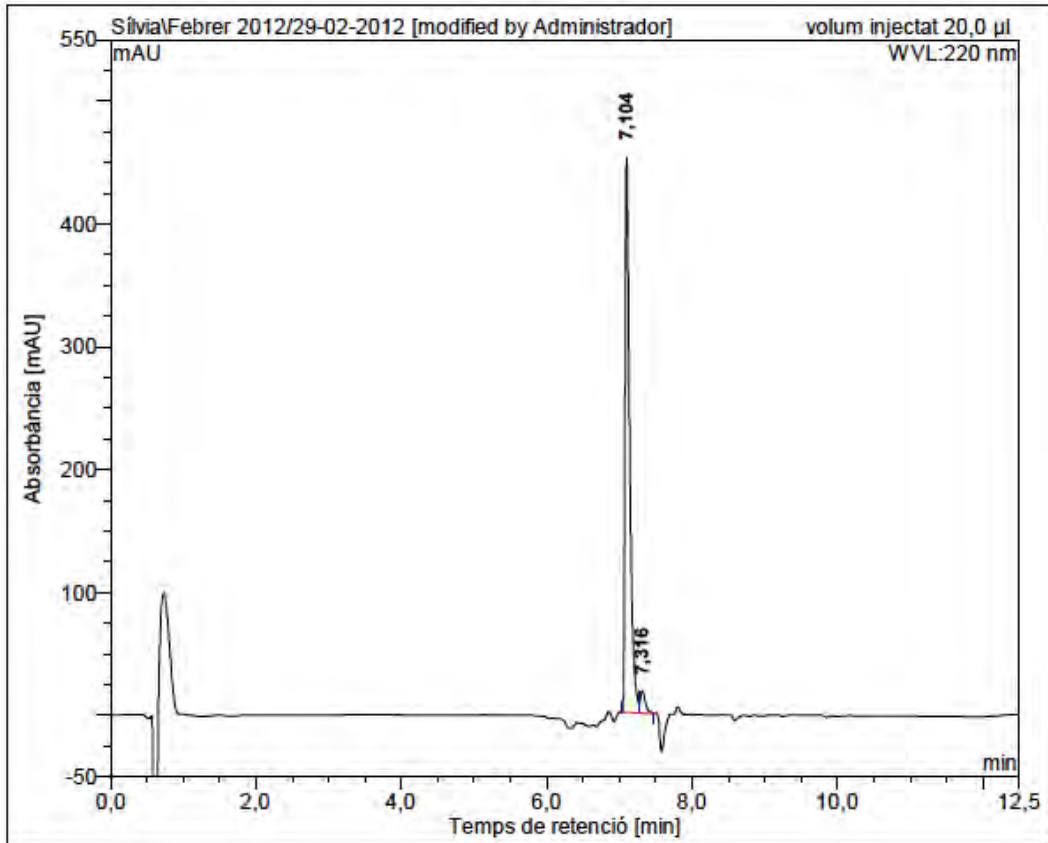


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,00	32,291	2,600	3,66
2	7,17	54,628	4,033	5,68
3	7,27	648,827	64,327	90,65
Total:		735,746	70,960	100,00

**Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

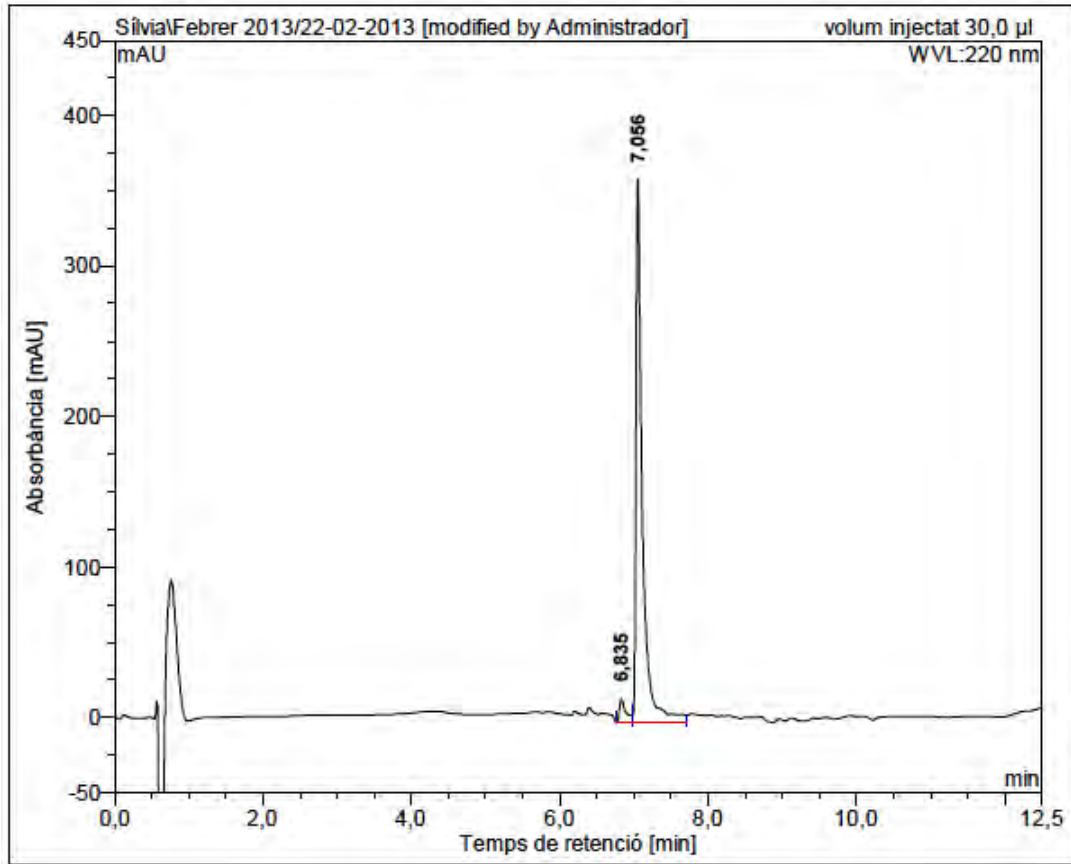


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,10	452,357	33,258	95,73
2	7,32	18,129	1,482	4,27
Total:		470,486	34,740	100,00

**Fmoc-Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

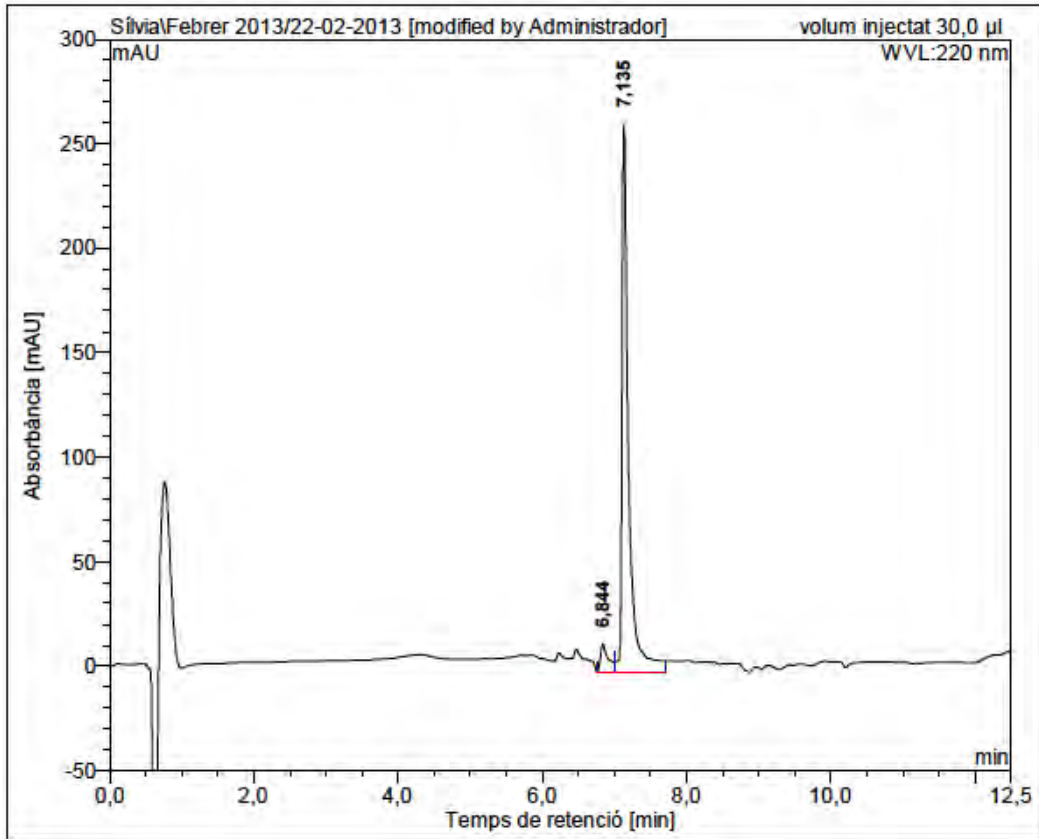


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,84	15,549	1,601	4,19
2	7,06	361,506	36,578	95,81
Total:		377,055	38,178	100,00

**Fmoc-Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

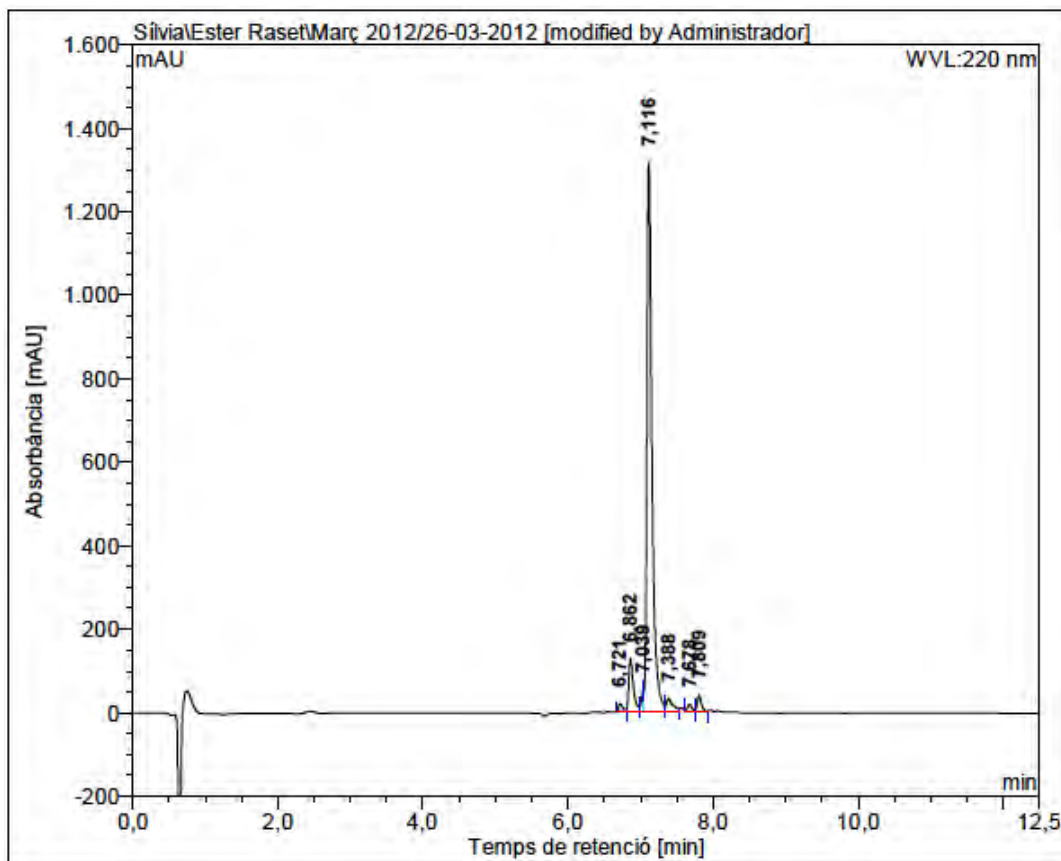


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,84	13,008	1,583	5,49
2	7,14	261,531	27,269	94,51
Total:		274,539	28,852	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

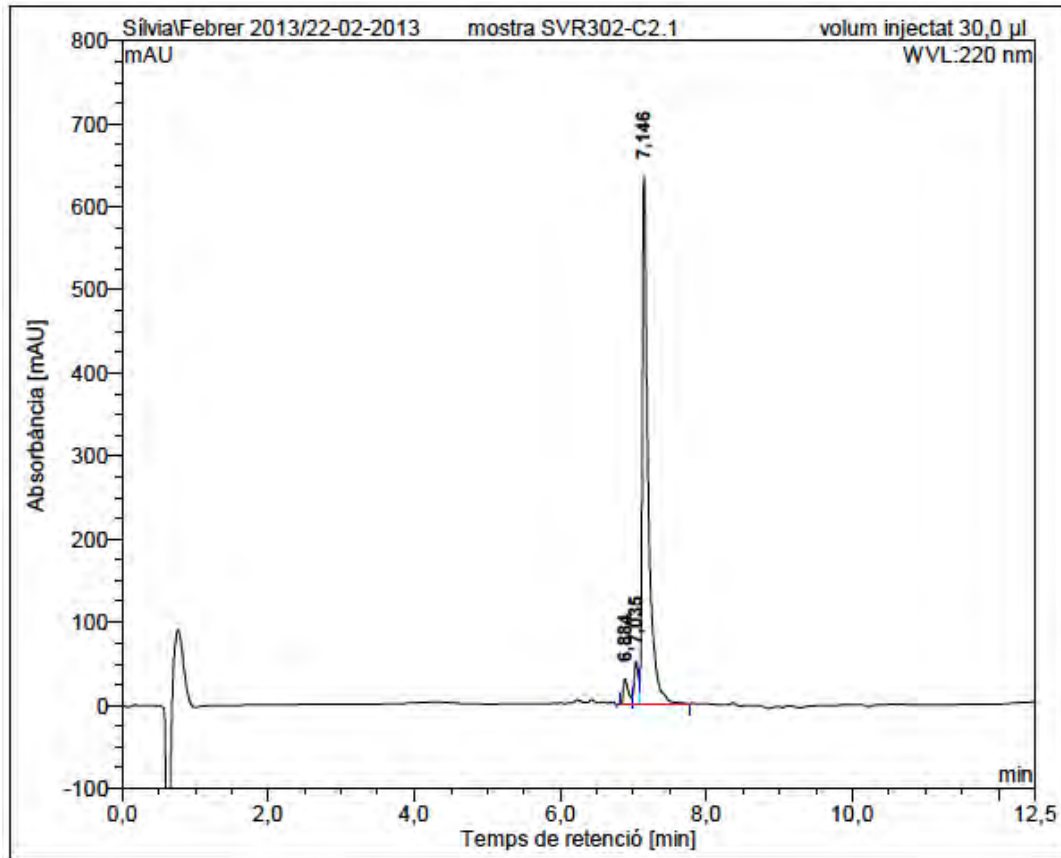


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,72	17,410	1,167	0,91
2	6,86	128,929	10,003	7,79
3	7,04	52,410	2,269	1,77
4	7,12	1317,373	106,947	83,30
5	7,39	33,146	3,667	2,86
6	7,68	18,483	1,475	1,15
7	7,81	39,392	2,856	2,22
Total:		1607,143	128,384	100,00

**Fmoc-Lys-D-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



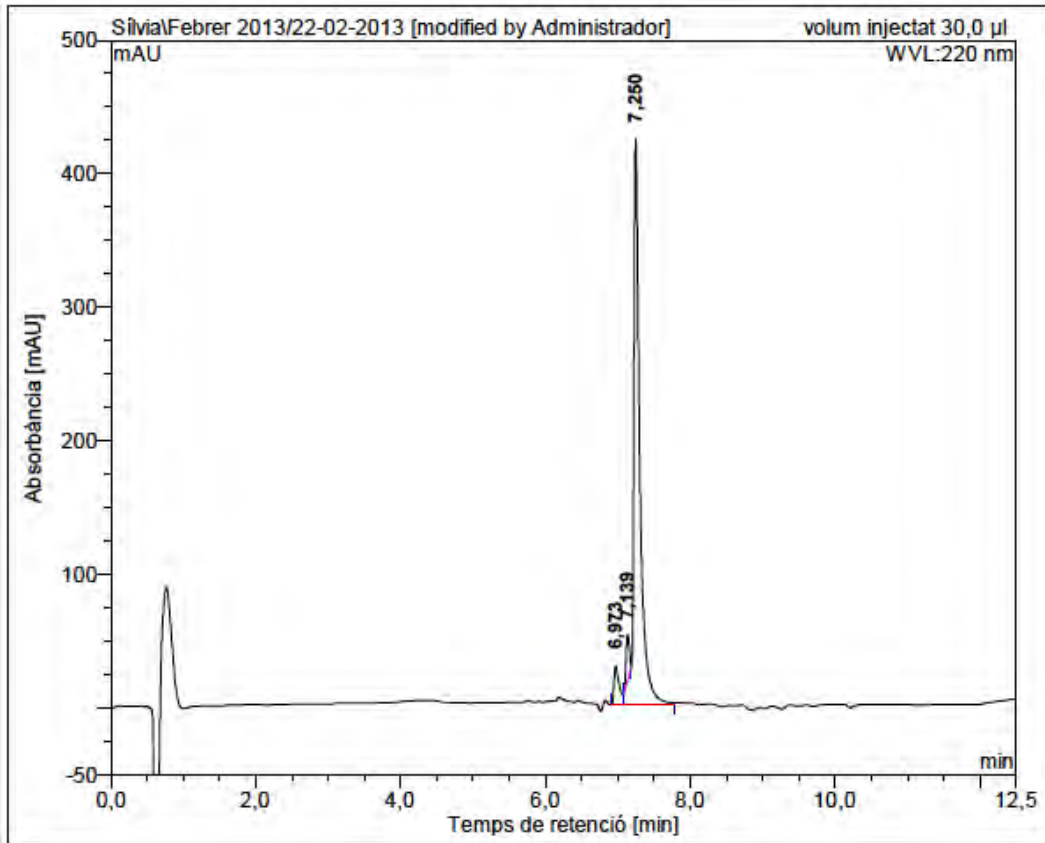
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,88	29,762	2,286	3,51
2	7,04	50,372	3,439	5,28
3	7,15	636,272	59,401	91,21
Total:		716,406	65,126	100,00



**Fmoc-D-Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-D-Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

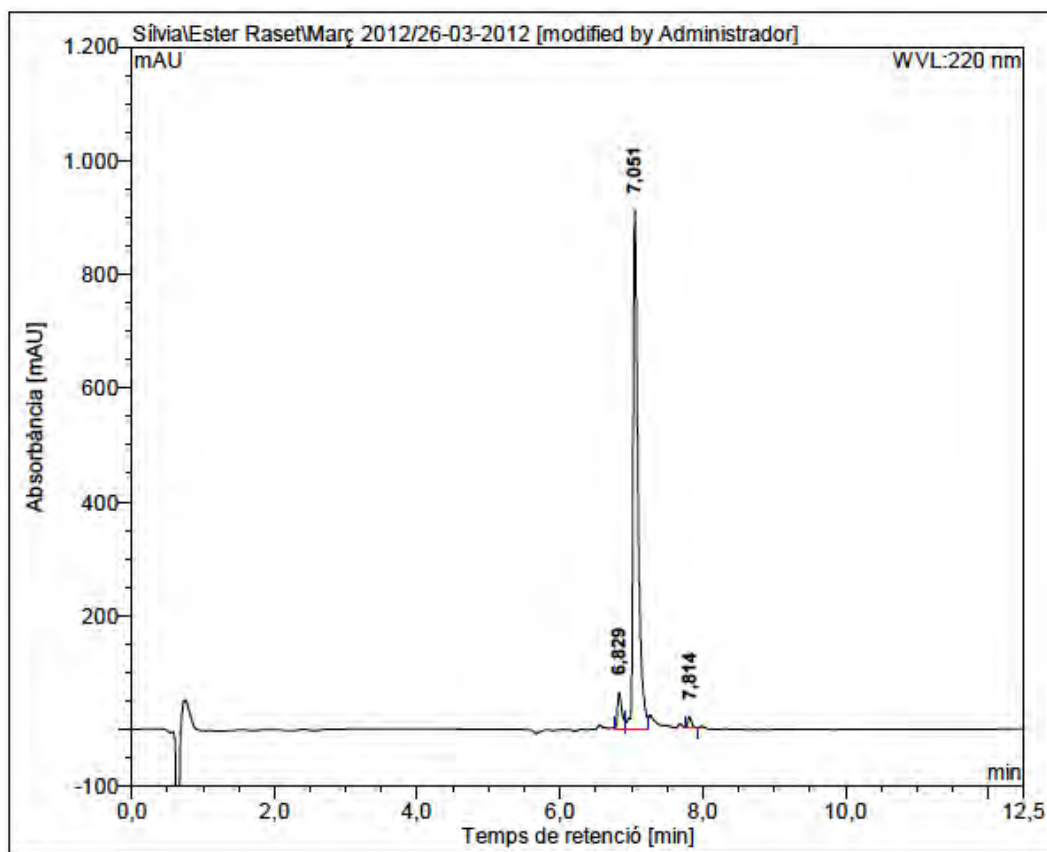


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,97	28,816	2,346	5,03
2	7,14	33,435	1,765	3,79
3	7,25	423,723	42,514	91,18
Total:		485,975	46,625	100,00

**Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

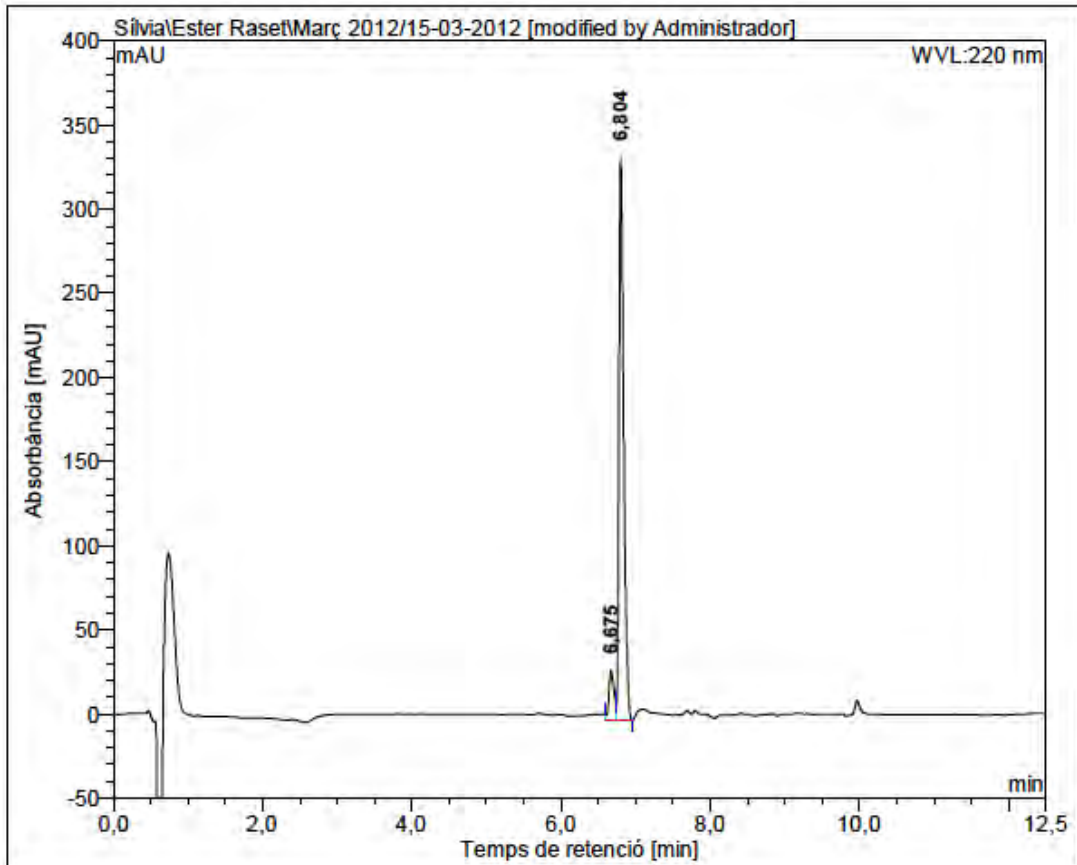


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,83	63,946	4,749	6,06
2	7,05	912,158	72,380	92,39
3	7,81	19,101	1,216	1,55
Total:		995,205	78,345	100,00

### Fmoc-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-His-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

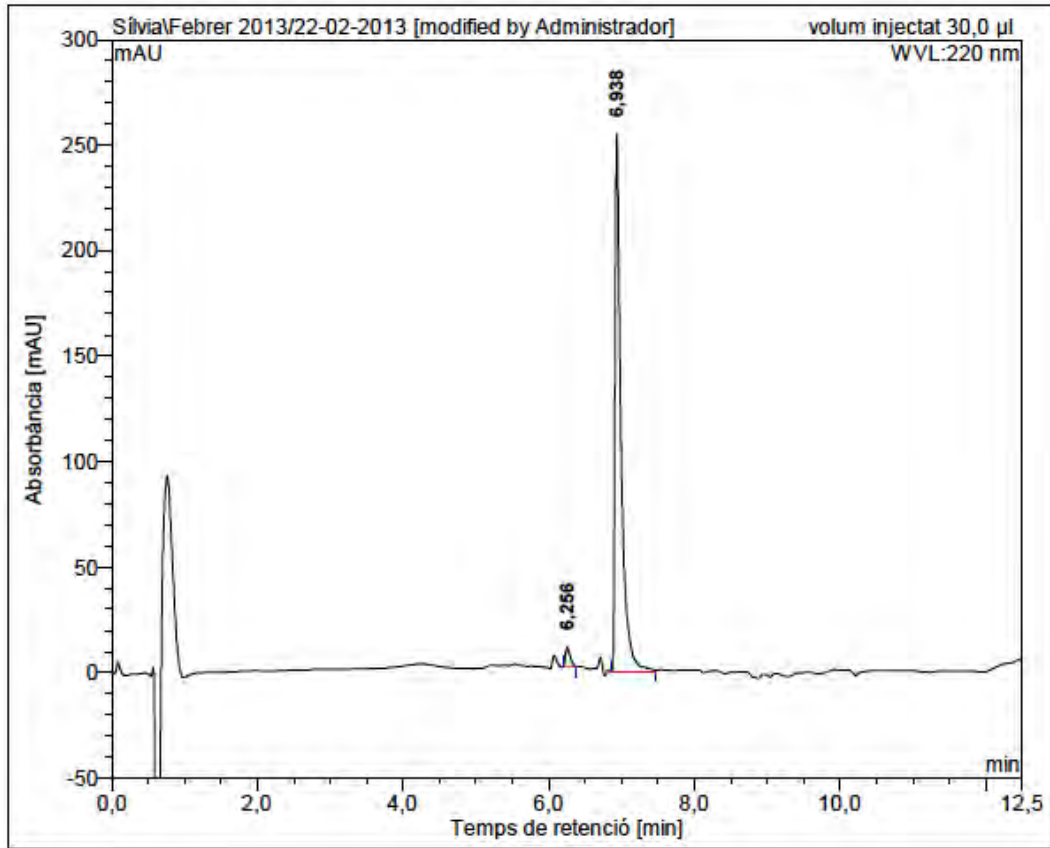


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,67	29,416	2,337	8,85
2	6,80	334,489	24,080	91,15
Total:		363,905	26,417	100,00

**Fmoc-Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

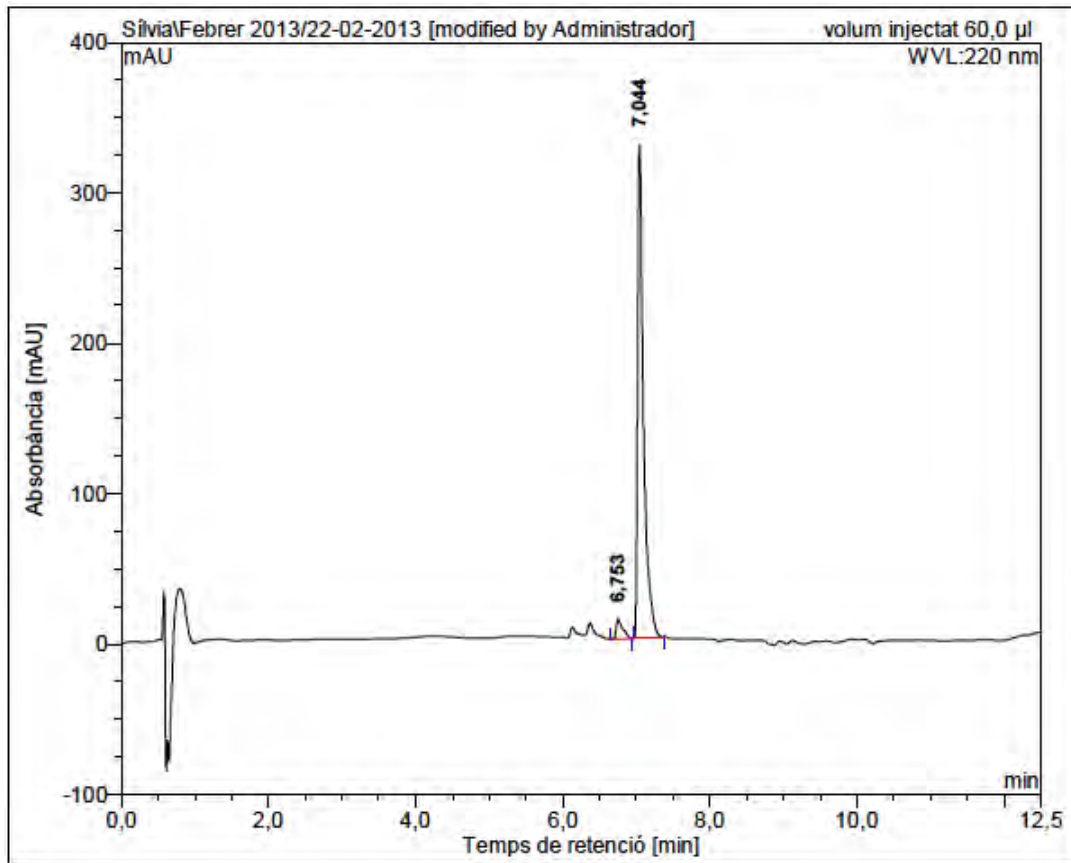


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,26	8,940	0,646	2,55
2	6,94	255,032	24,695	97,45
Total:		263,972	25,341	100,00

**Fmoc-Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

(obtained from Fmoc-Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



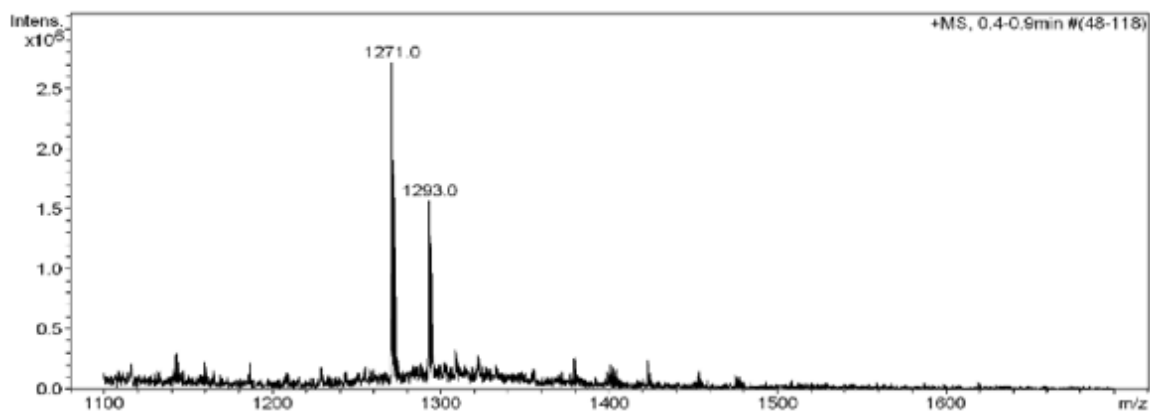
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,75	13,366	1,337	4,16
2	7,04	328,754	30,771	95,84
Total:		342,120	32,108	100,00

## 2. Cyclic peptidyl resins

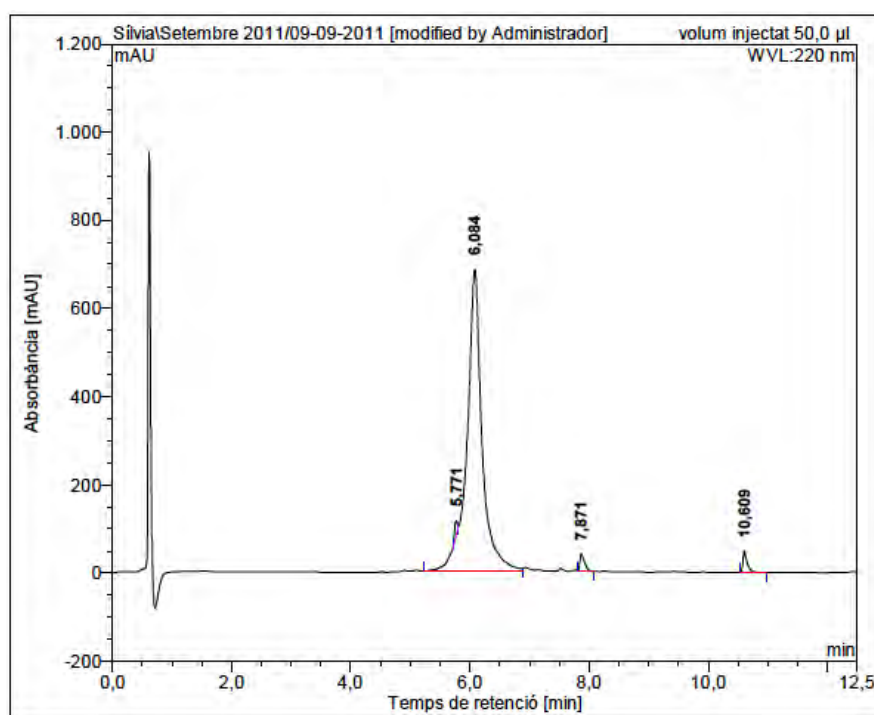
### c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

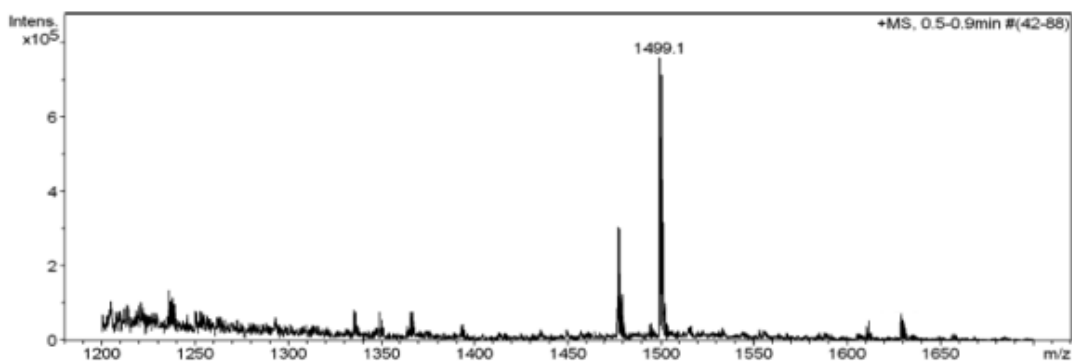


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,77	32,759	1,882	0,90
2	6,08	683,242	200,104	95,54
3	7,87	38,835	3,478	1,66
4	10,61	48,300	3,984	1,90
Total:		803,136	209,449	100,00

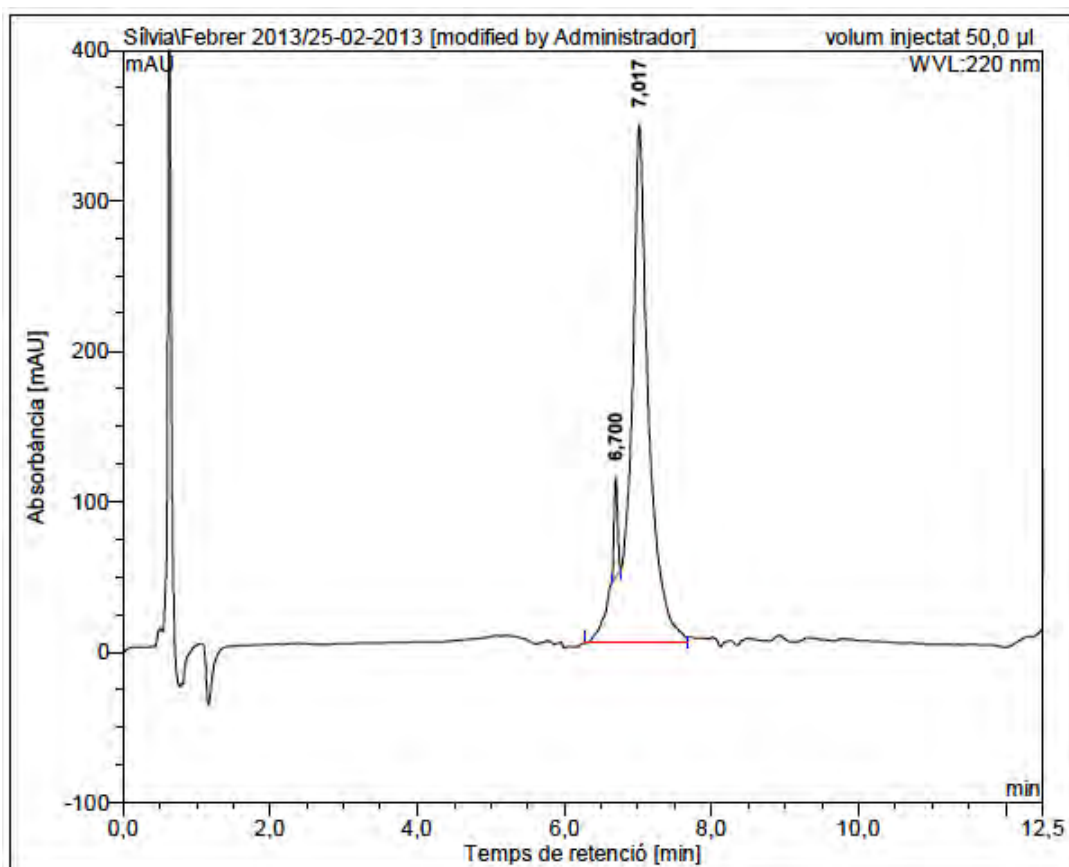
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

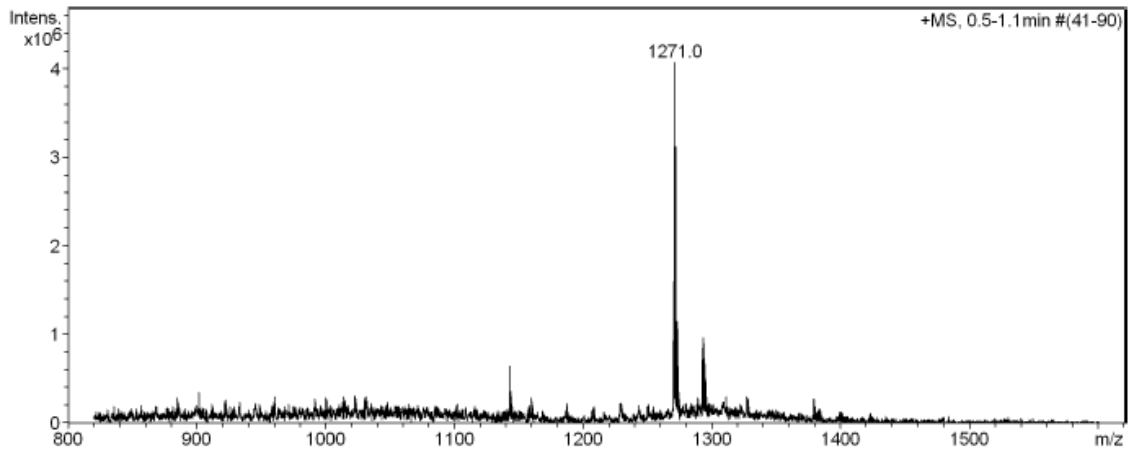


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,70	66,269	3,662	3,49
2	7,02	344,642	101,351	96,51
Total:		410,911	105,013	100,00

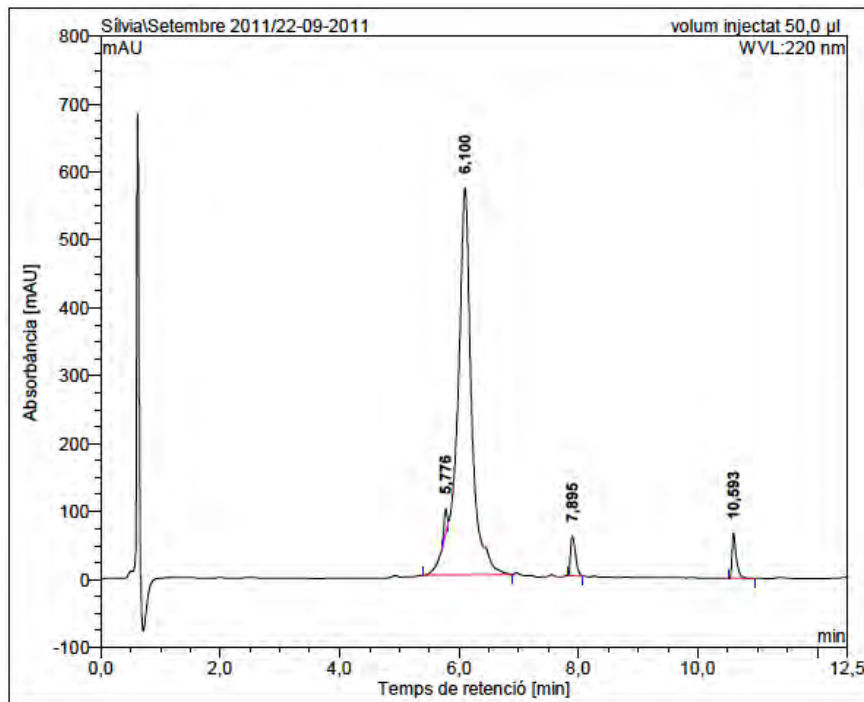
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS (*m/z*)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)



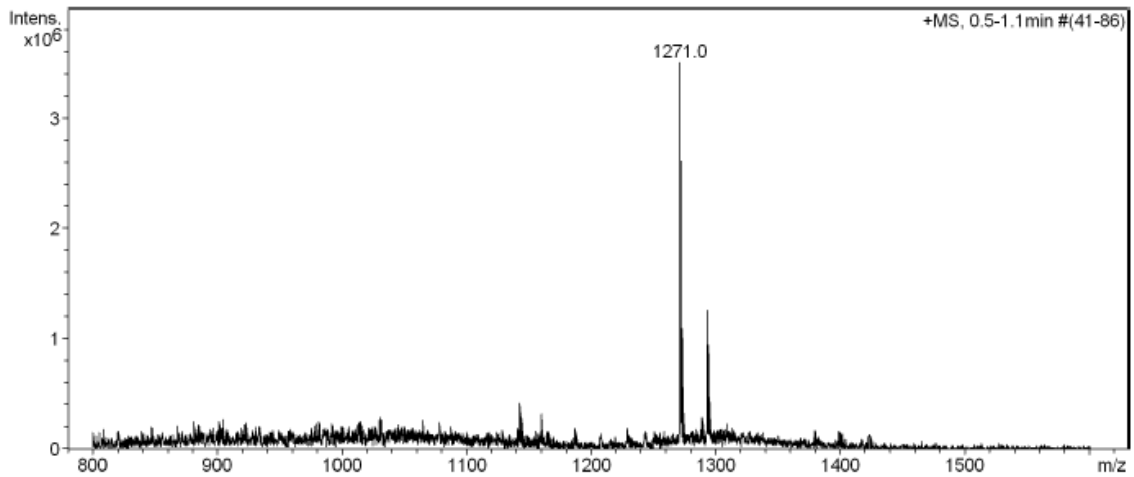
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,78	36,785	2,069	1,21
2	6,10	570,641	157,577	92,35
3	7,90	57,685	5,570	3,26
4	10,59	66,841	5,422	3,18
Total:		731,952	170,638	100,00



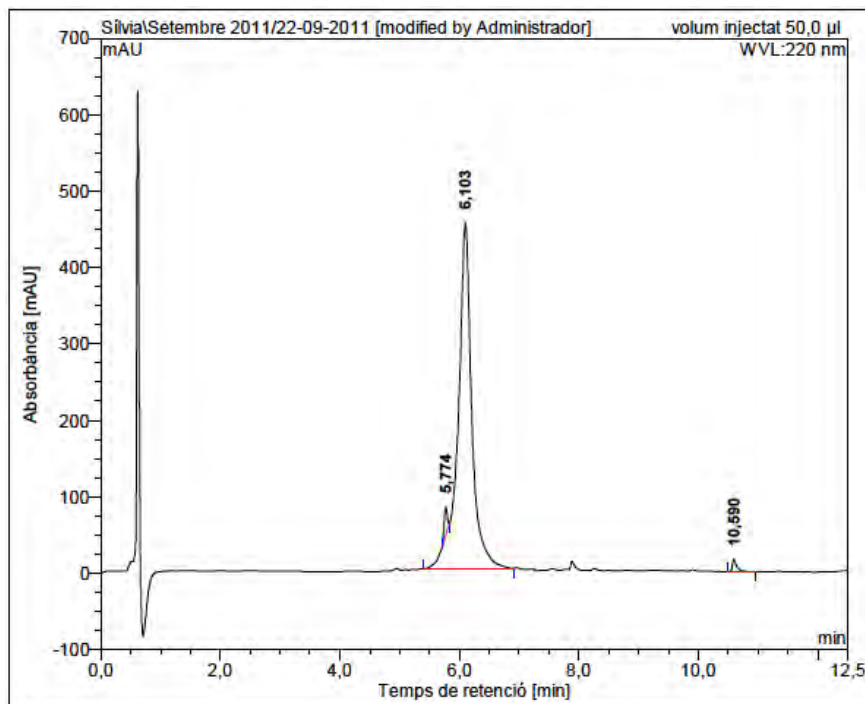
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS (*m/z*)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

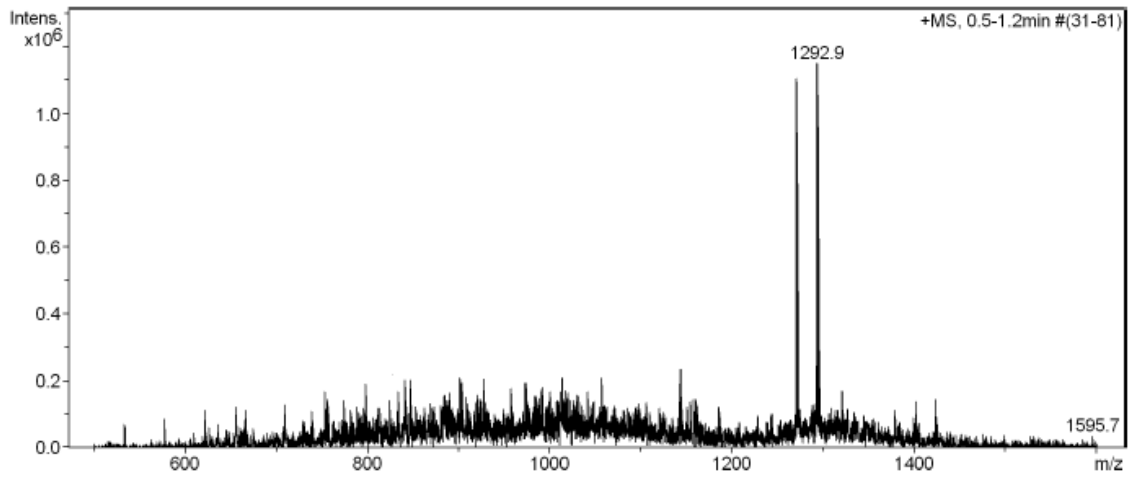


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,77	36,552	2,162	1,72
2	6,10	452,913	121,874	97,22
3	10,59	15,939	1,322	1,05
Total:		505,403	125,357	100,00

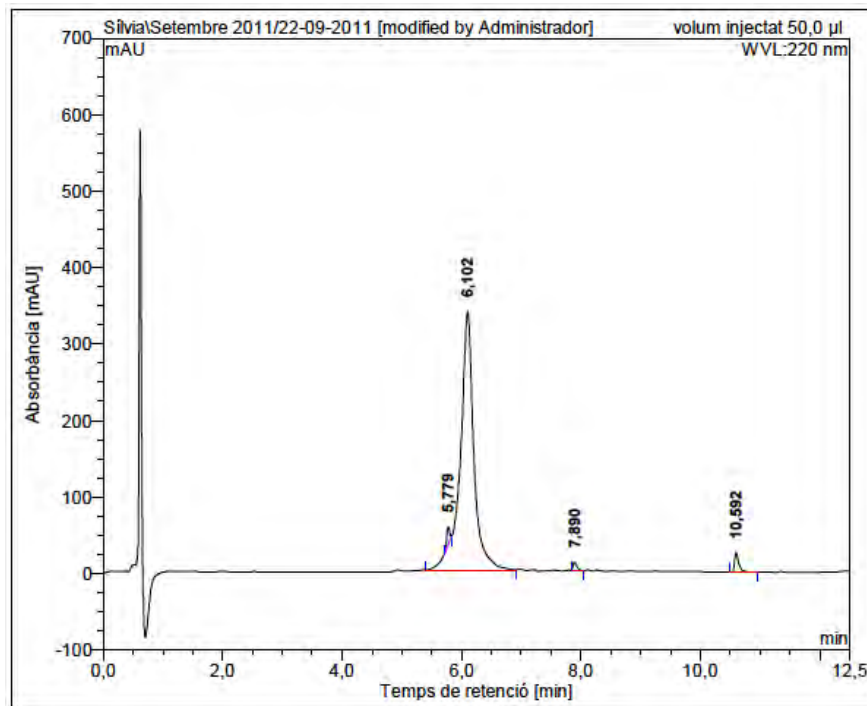
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

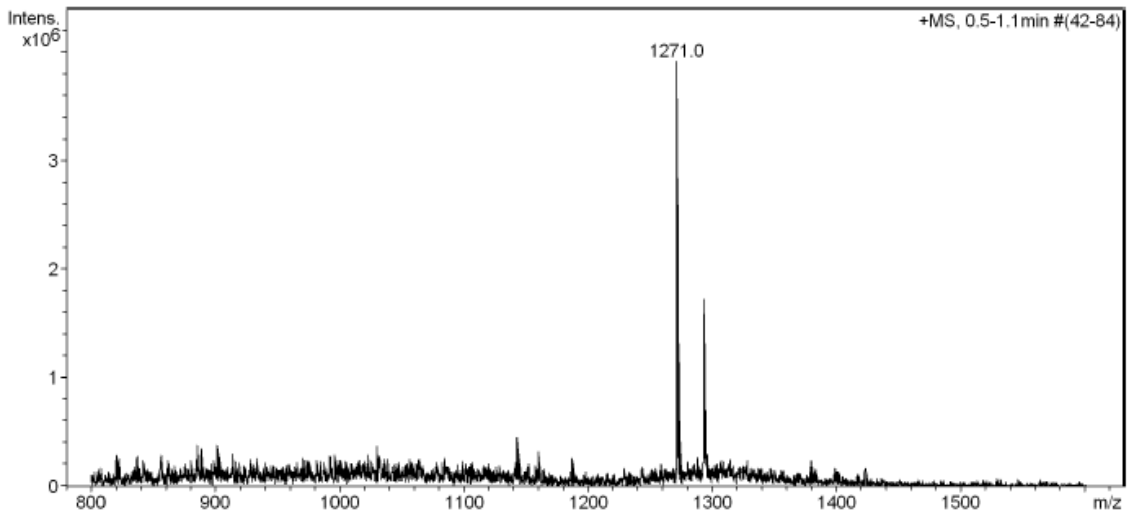


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,78	22,627	1,318	1,40
2	6,10	337,502	89,875	95,38
3	7,89	11,384	0,918	0,97
4	10,59	25,697	2,121	2,25
Total:		397,210	94,232	100,00

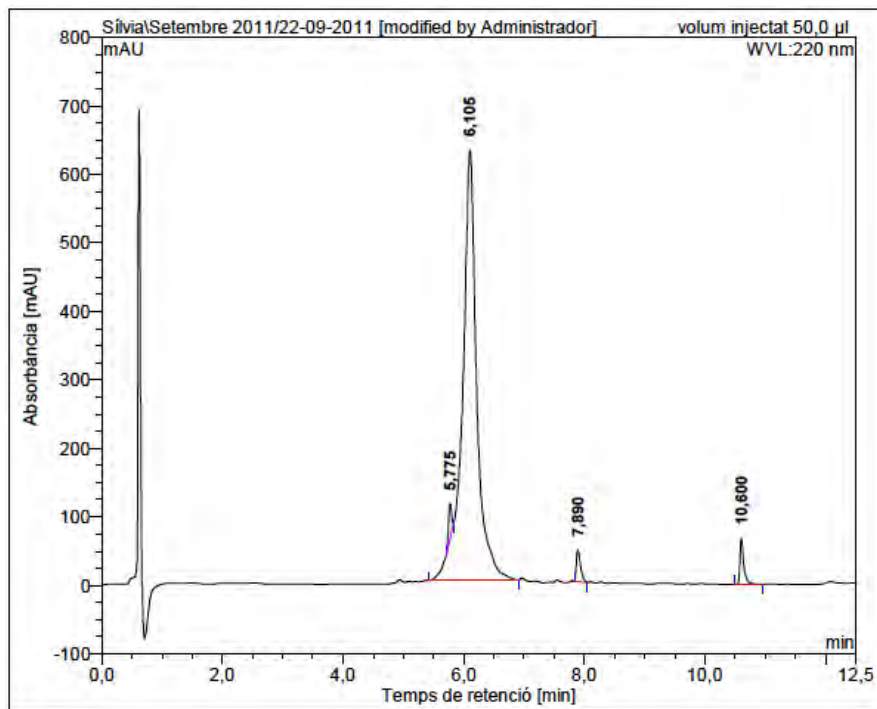
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Mtt)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS (*m/z*)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

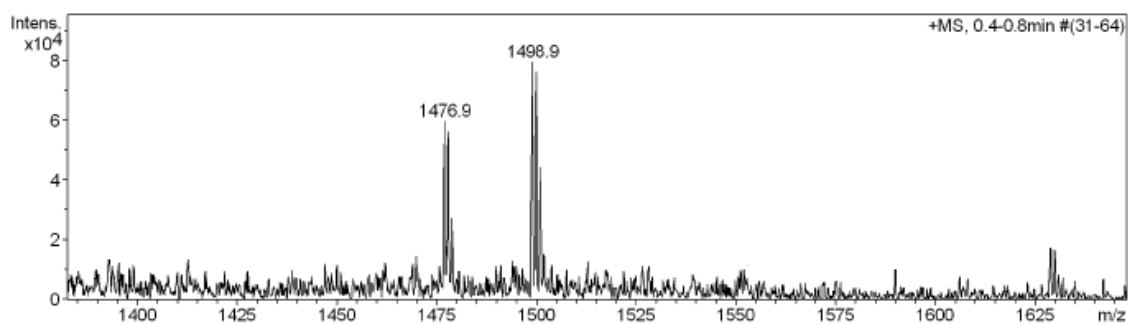


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,78	50,588	2,917	1,57
2	6,11	628,743	173,846	93,78
3	7,89	46,481	3,736	2,02
4	10,60	66,493	4,885	2,64
Total:		792,306	185,385	100,00

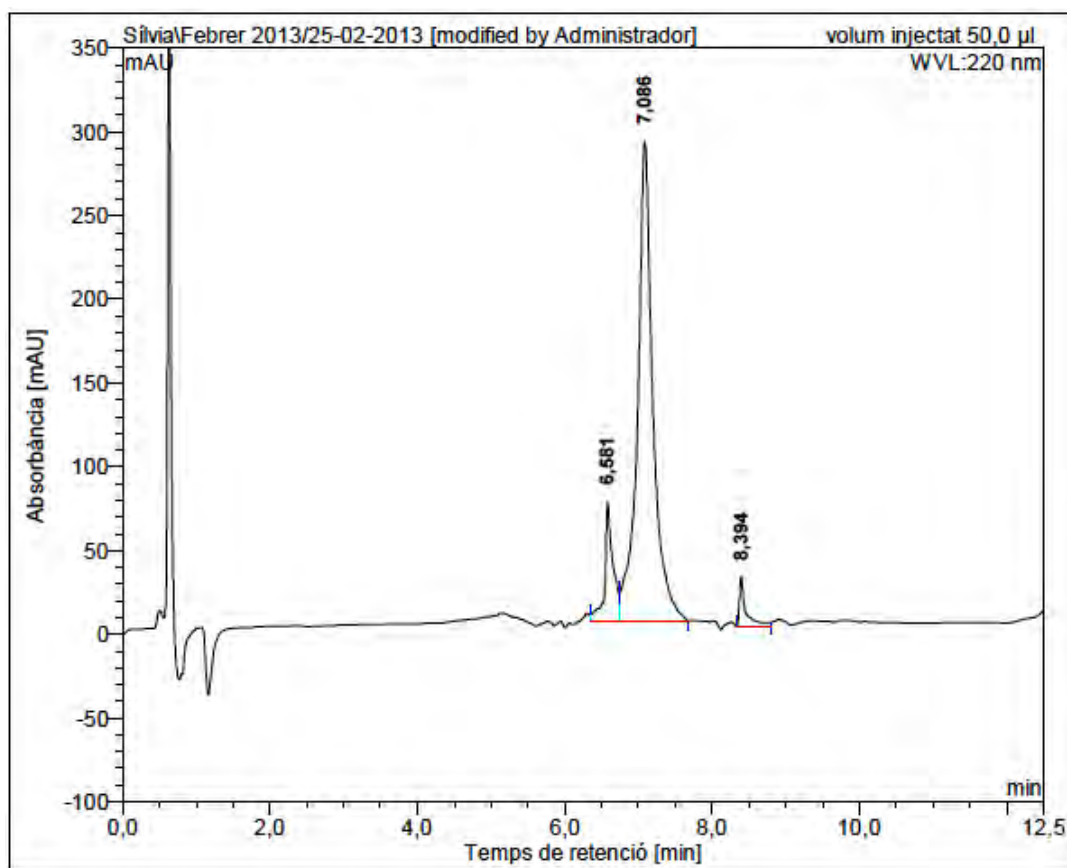
**c(Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

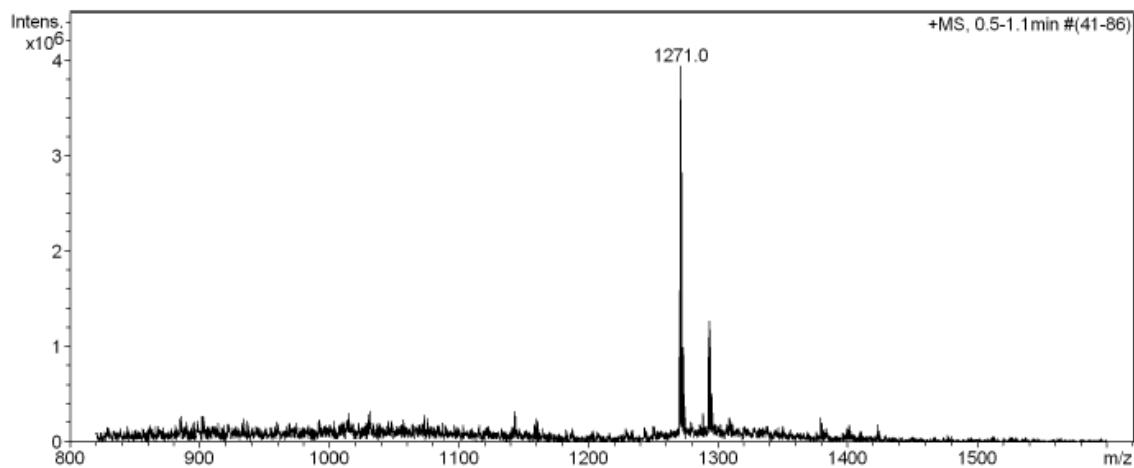


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,58	70,779	8,972	11,05
2	7,09	286,293	69,084	85,09
3	8,39	30,015	3,133	3,86
Total:		387,087	81,190	100,00

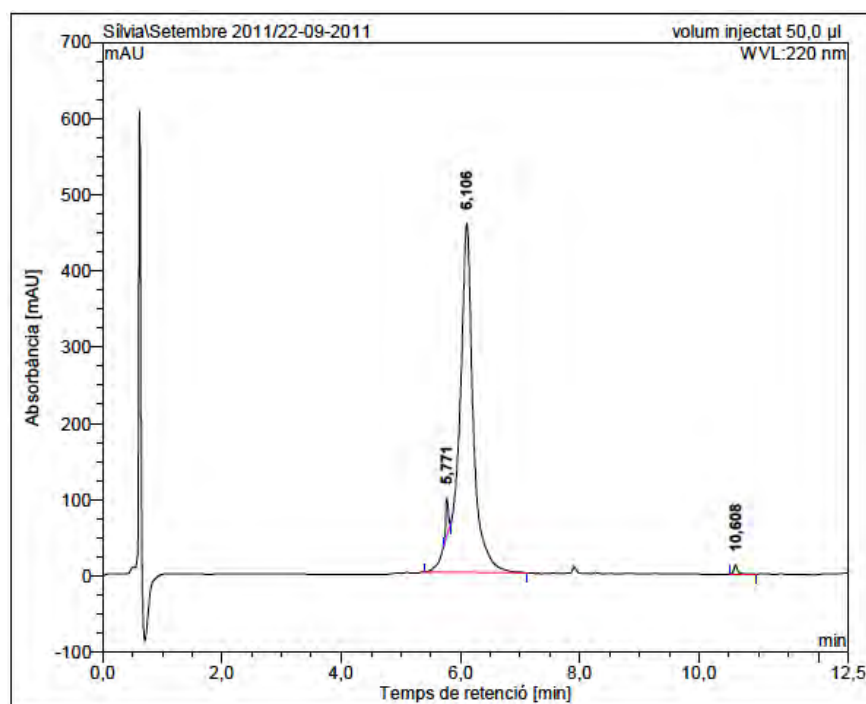
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC194)**

(obtained from c(Lys(Mtt)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

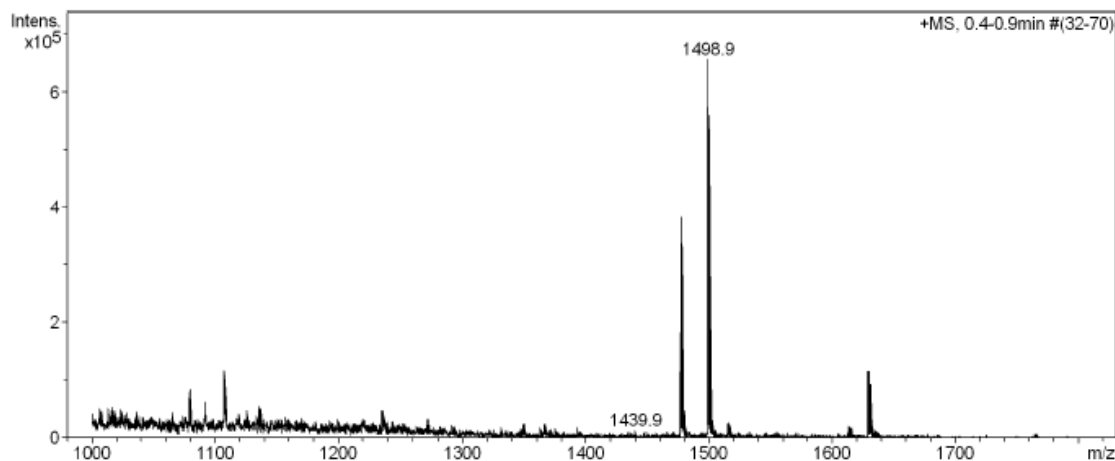


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,77	49,845	2,319	1,79
2	6,11	457,730	126,095	97,49
3	10,61	12,014	0,929	0,72
Total:		519,589	129,342	100,00

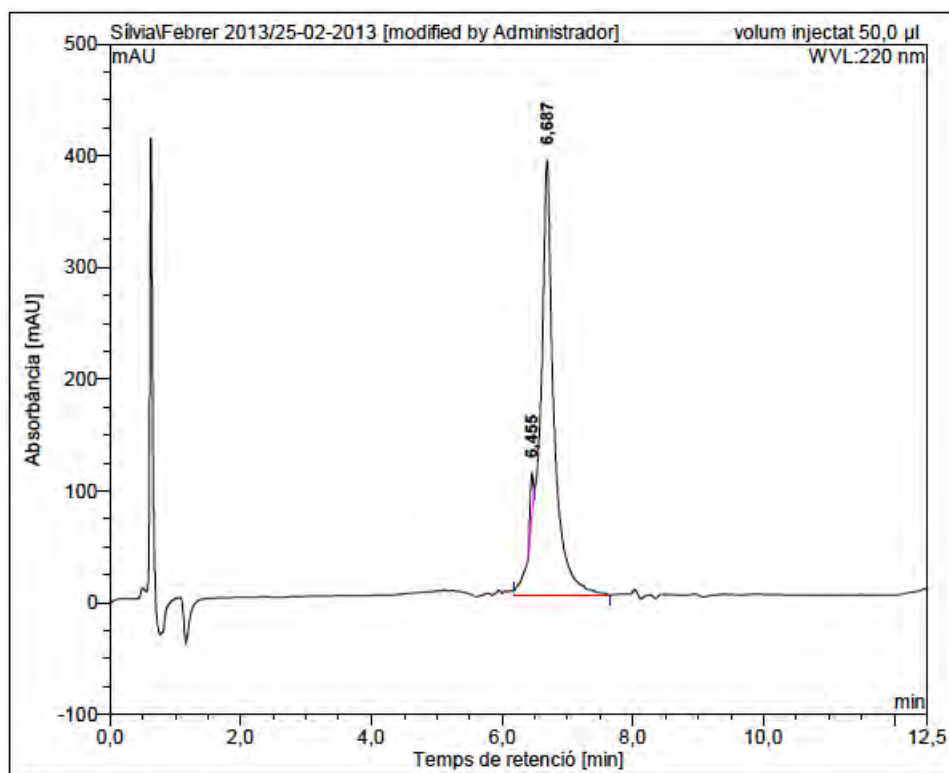
**c(Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

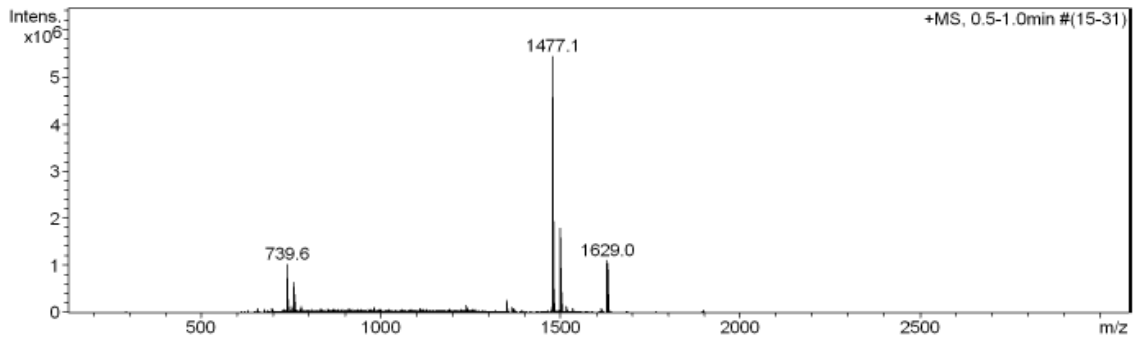


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,45	39,494	2,143	2,14
2	6,69	389,487	98,139	97,86
Total:		428,982	100,283	100,00

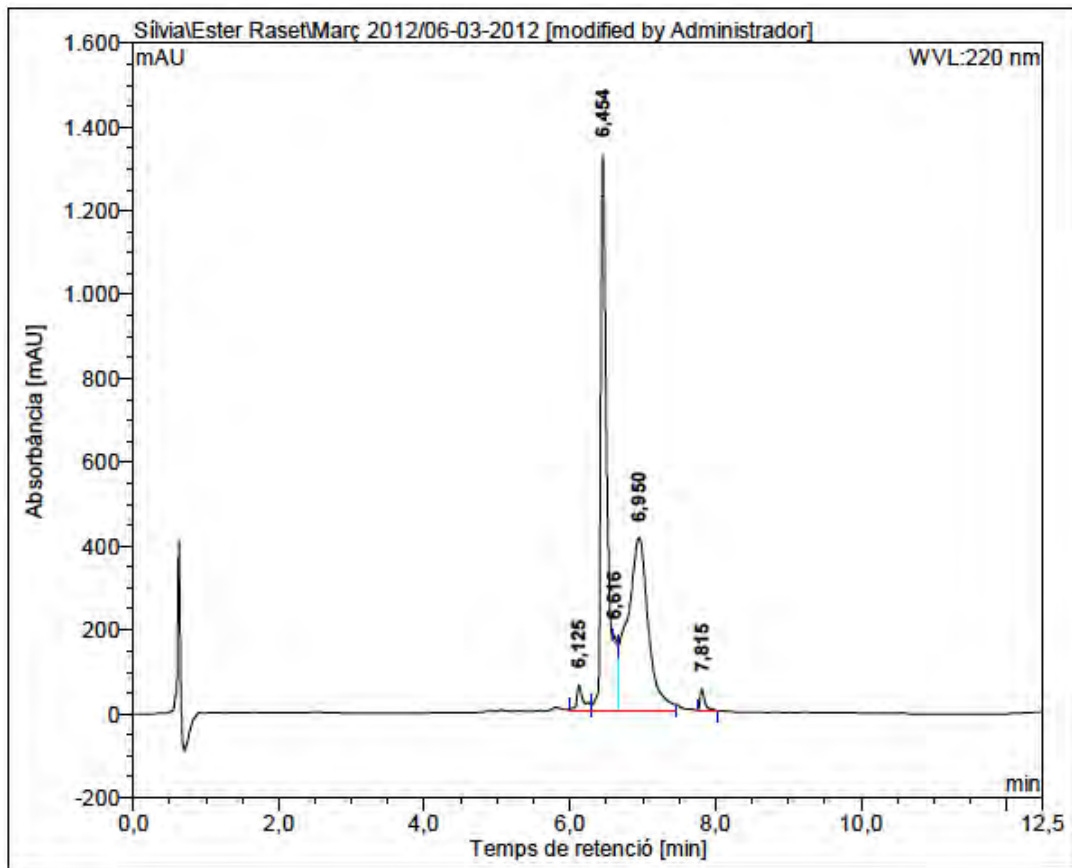
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

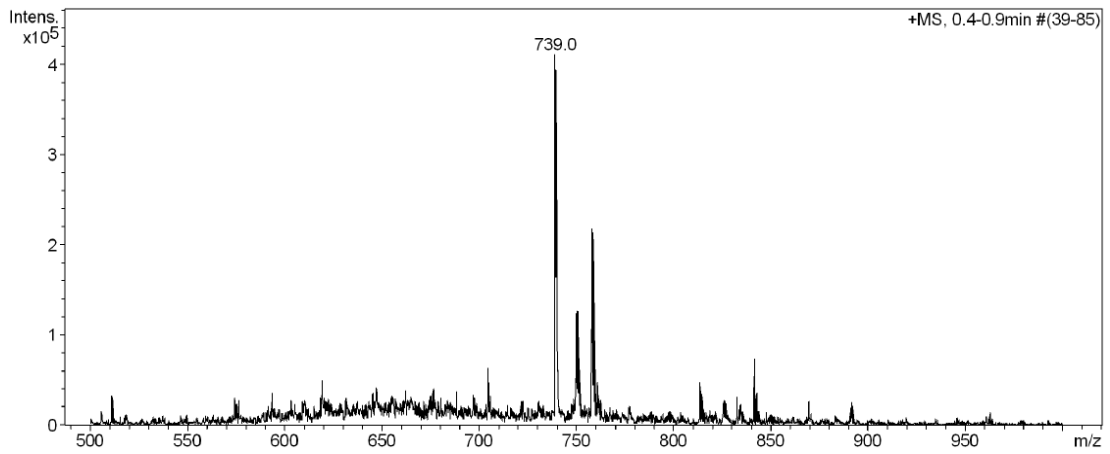
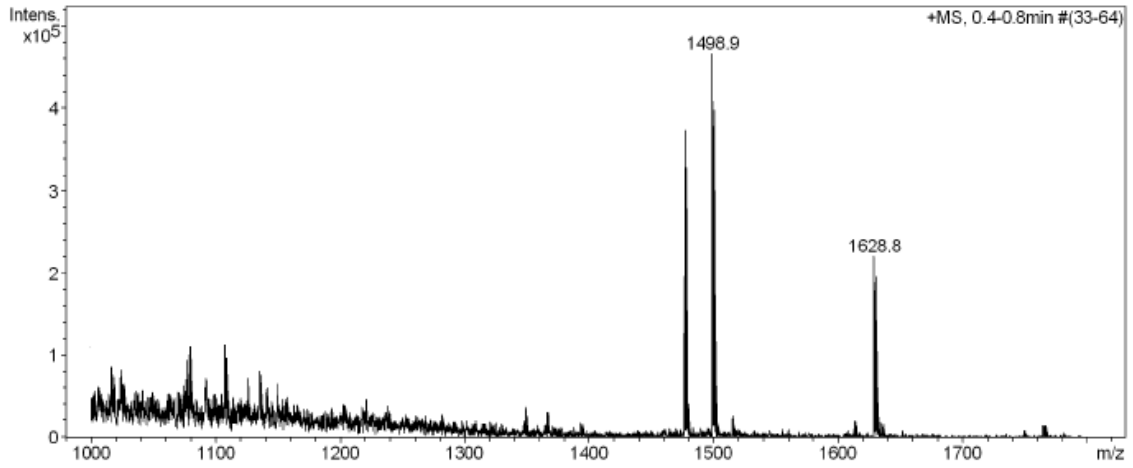


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,13	62,181	7,339	2,54
2	6,45	1328,189	137,342	47,49
3	6,62	15,250	0,594	0,21
4	6,95	414,133	140,030	48,42
5	7,82	50,719	3,882	1,34
Total:		1870,472	289,187	100,00

**c(Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

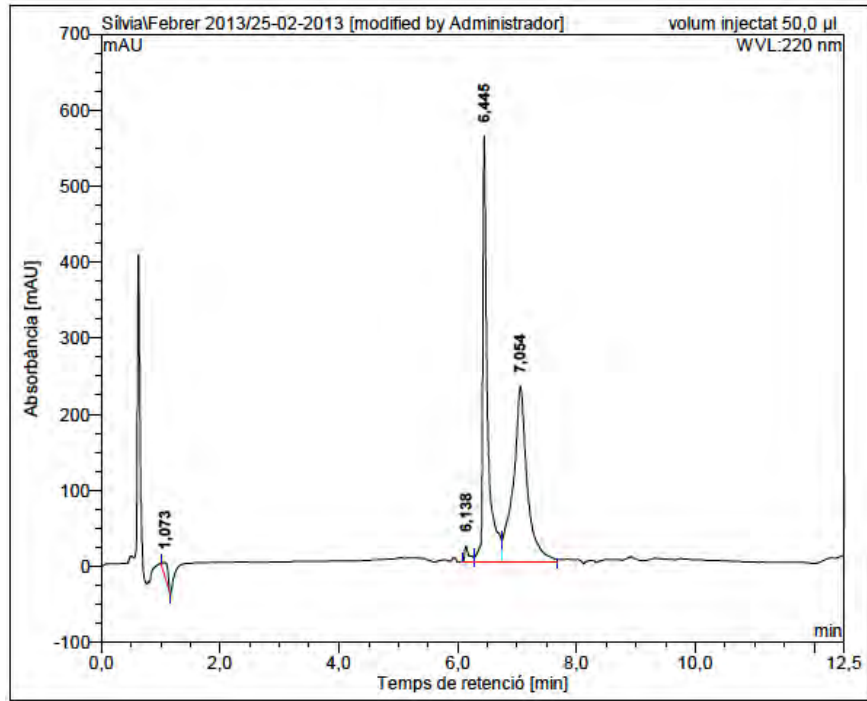
(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )





HPLC ( $\lambda=220$  nm)

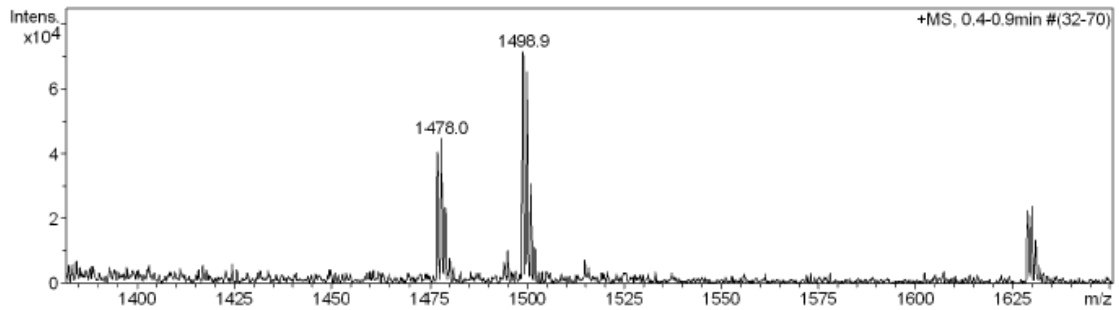


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	1,07	19,106	2,047	1,73
2	6,14	19,709	1,666	1,41
3	6,44	559,000	52,330	44,18
4	7,05	229,955	62,402	52,68
Total:		827,770	118,445	100,00

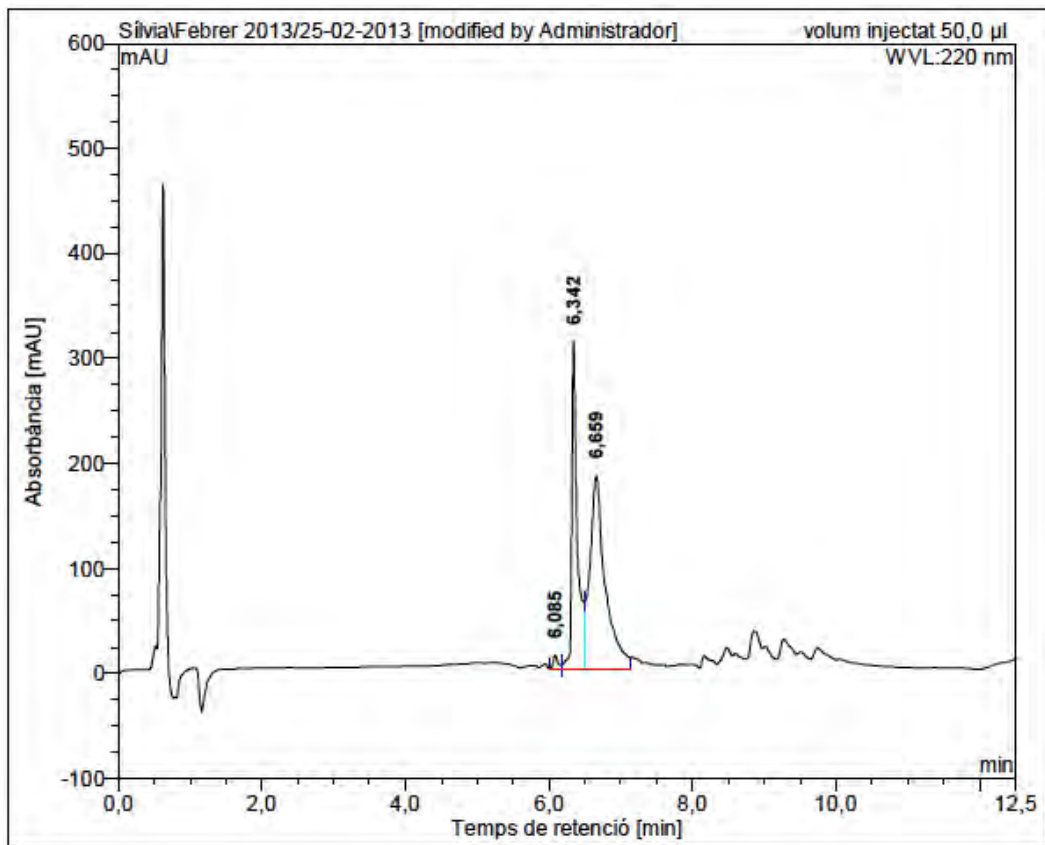
**c(Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS (*m/z*)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

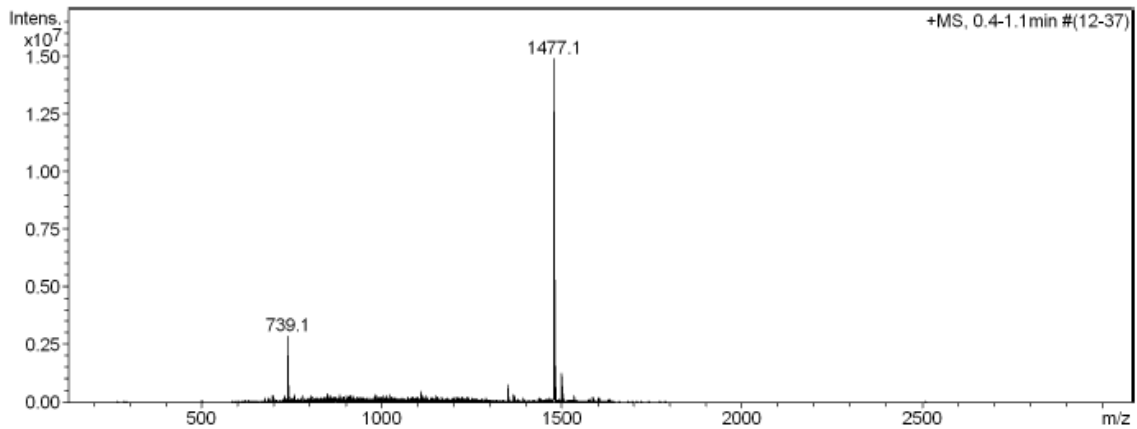


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,09	12,910	0,930	1,25
2	6,34	312,285	27,235	36,63
3	6,66	183,818	46,189	62,12
Total:		509,014	74,355	100,00

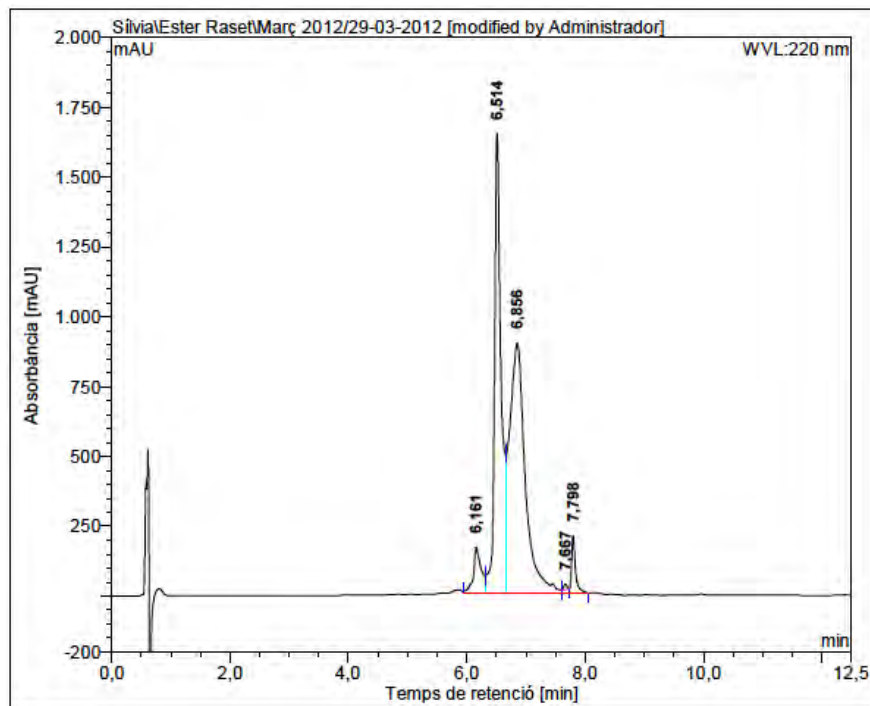
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

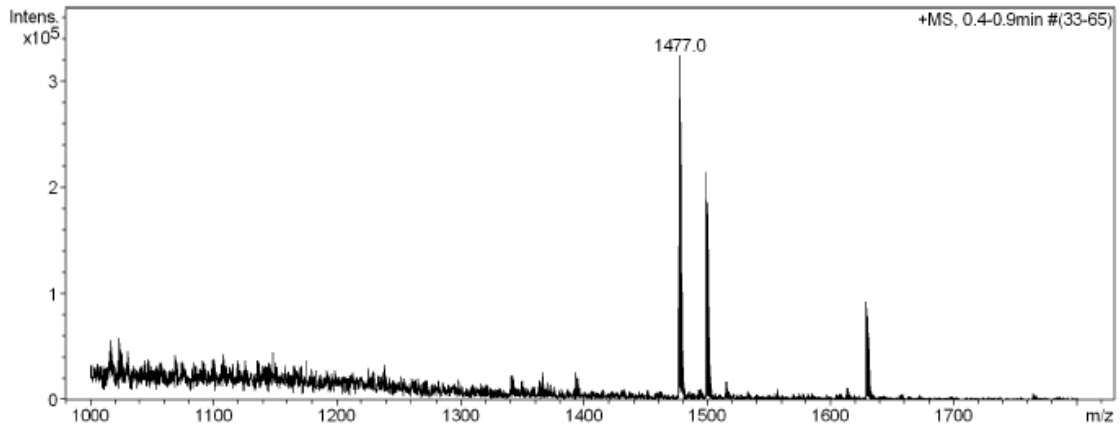


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,16	164,596	25,132	4,68
2	6,51	1644,657	215,486	40,15
3	6,86	895,626	277,380	51,69
4	7,67	20,687	1,262	0,24
5	7,80	206,858	17,414	3,24
Total:		2932,424	536,673	100,00

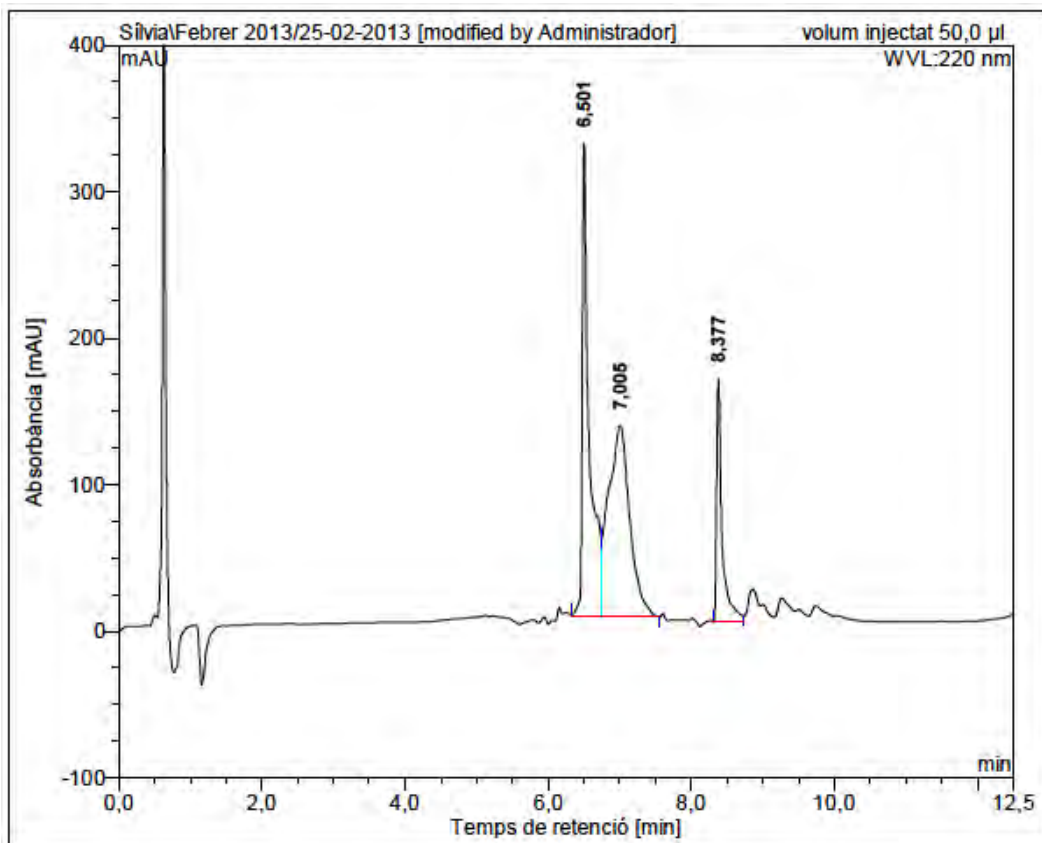
**c(Lys-D-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

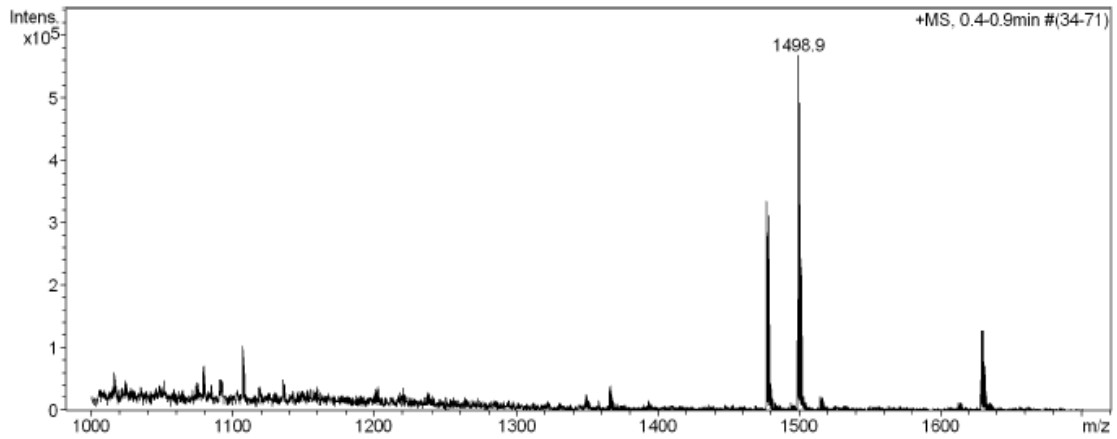


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,50	323,091	37,009	38,06
2	7,01	130,898	45,467	46,76
3	8,38	165,738	14,764	15,18
Total:		619,727	97,240	100,00

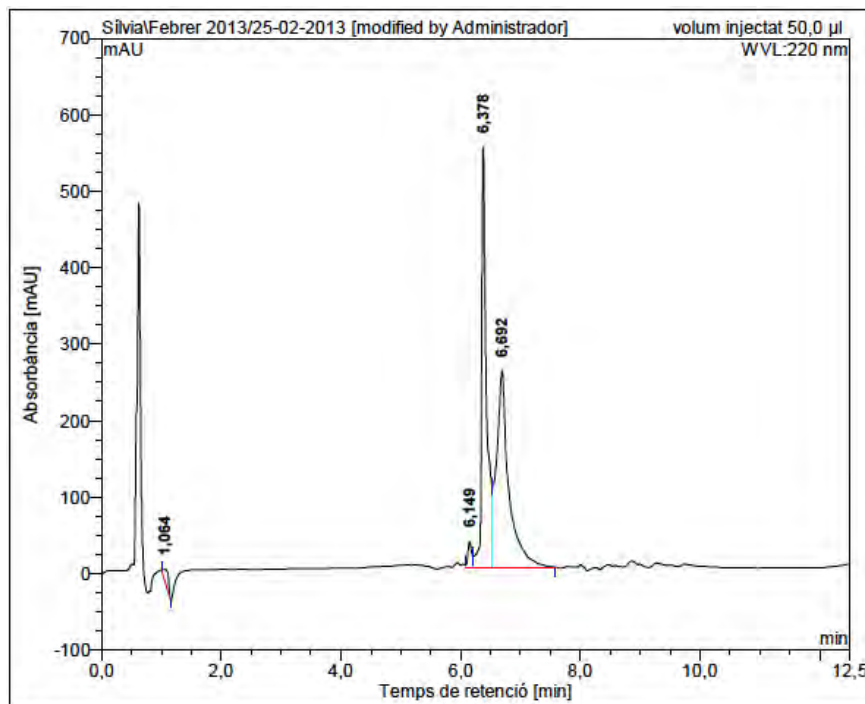
**c(D-Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(D-Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS (*m/z*)



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

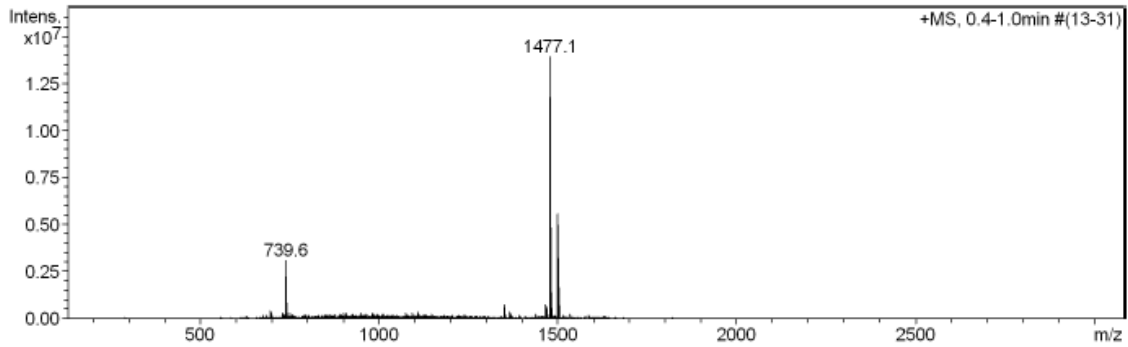


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	1,06	16,433	1,959	1,67
2	6,15	33,155	2,463	2,09
3	6,38	549,417	52,079	44,28
4	6,69	257,021	61,102	51,96
Total:		856,025	117,603	100,00

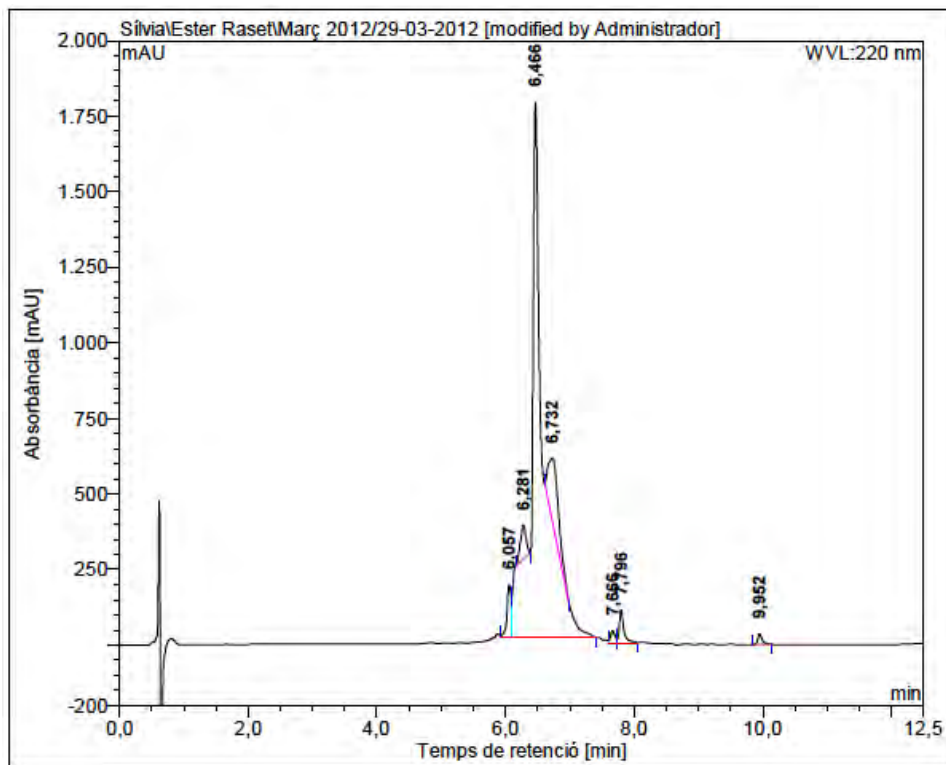
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-D-Lys(ivDde)-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

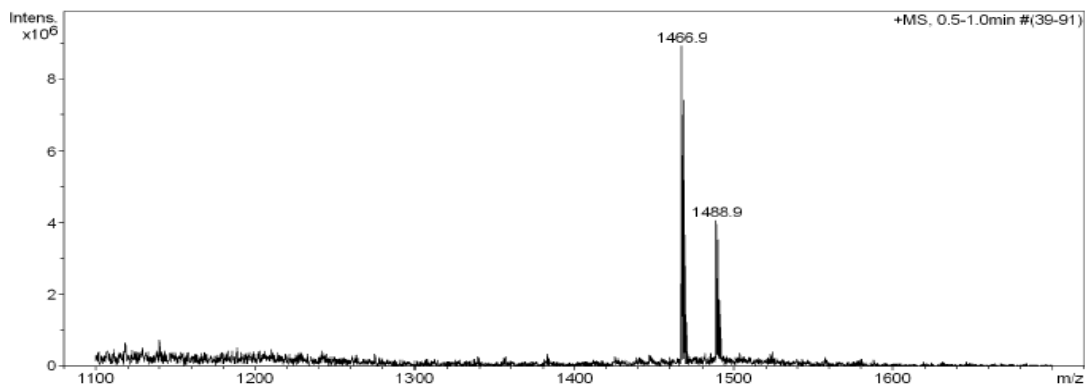


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,06	173,818	12,517	2,54
2	6,28	112,865	11,739	2,38
3	6,47	1769,451	415,075	84,14
4	6,73	211,258	39,070	7,92
5	7,67	39,950	3,189	0,65
6	7,80	109,261	8,952	1,81
7	9,95	35,378	2,774	0,56
<b>Total:</b>		<b>2451,981</b>	<b>493,317</b>	<b>100,00</b>

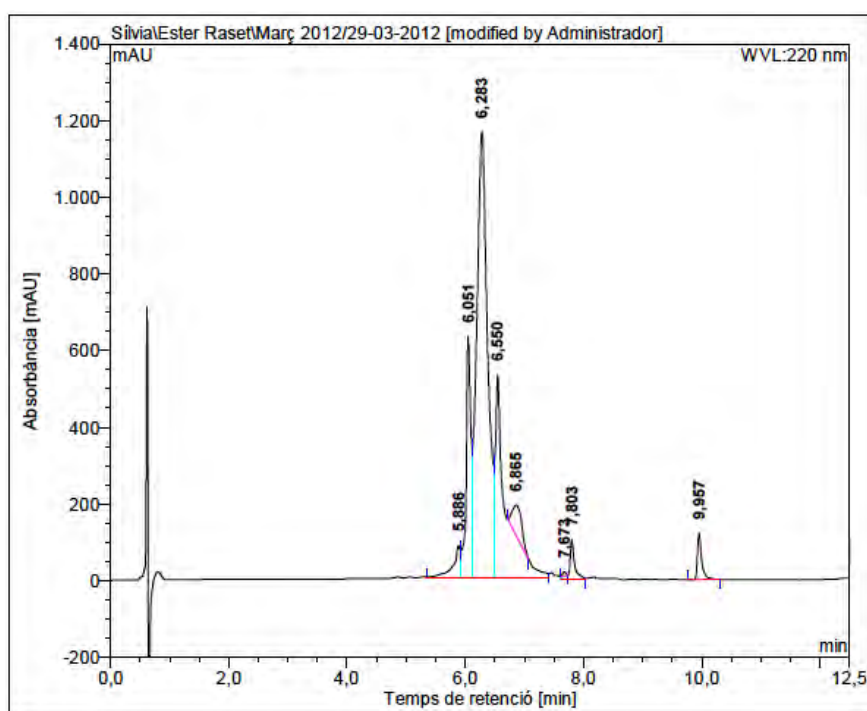
**c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(ivDde)-His-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

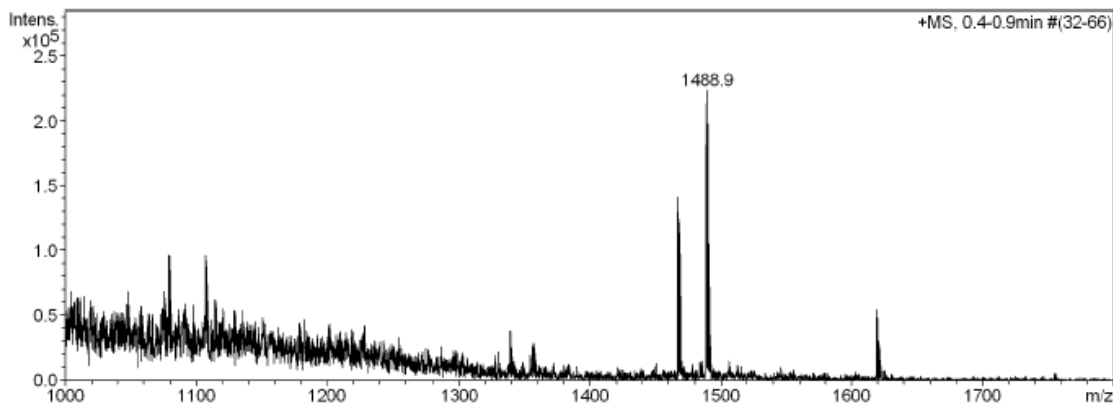


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,89	81,903	11,545	2,49
2	6,05	627,212	56,859	12,27
3	6,28	1160,764	246,592	53,21
4	6,55	526,080	113,451	24,48
5	6,86	79,780	15,039	3,24
6	7,67	11,641	0,695	0,15
7	7,80	101,282	9,294	2,01
8	9,96	121,854	9,982	2,15
Total:		2710,516	463,457	100,00

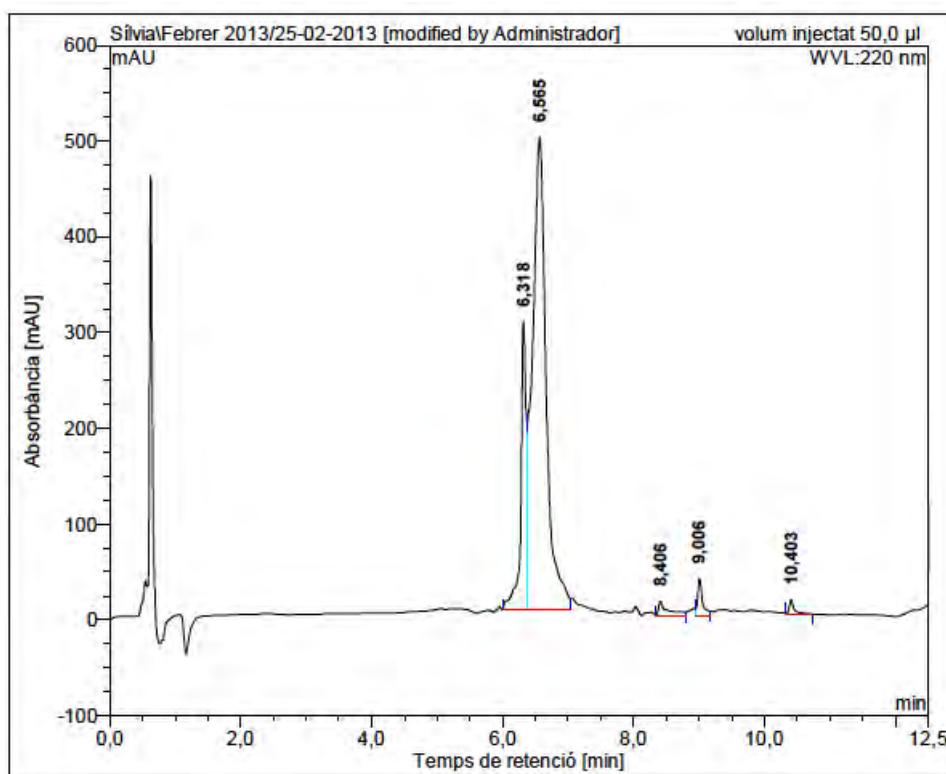
**c(Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)



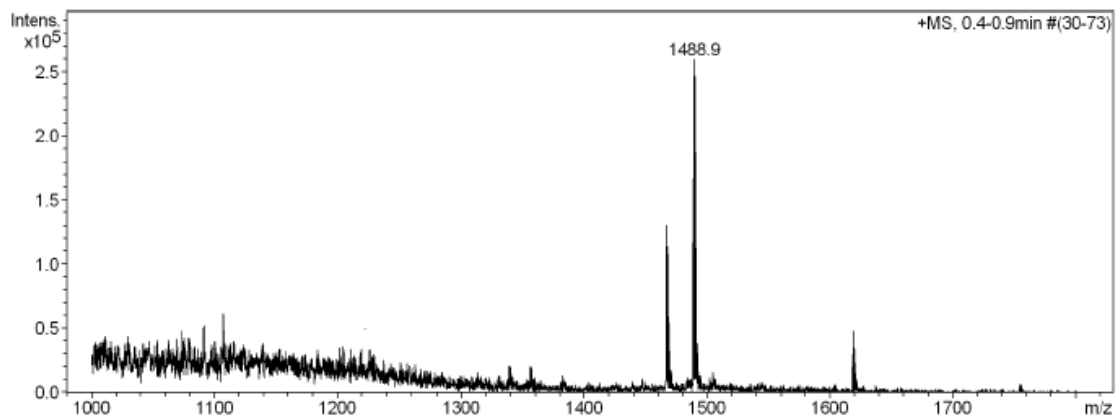
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,32	300,749	27,964	17,93
2	6,56	492,703	121,157	77,69
3	8,41	14,454	2,347	1,50
4	9,01	38,331	3,196	2,05
5	10,40	15,181	1,288	0,83
Total:		861,419	155,951	100,00



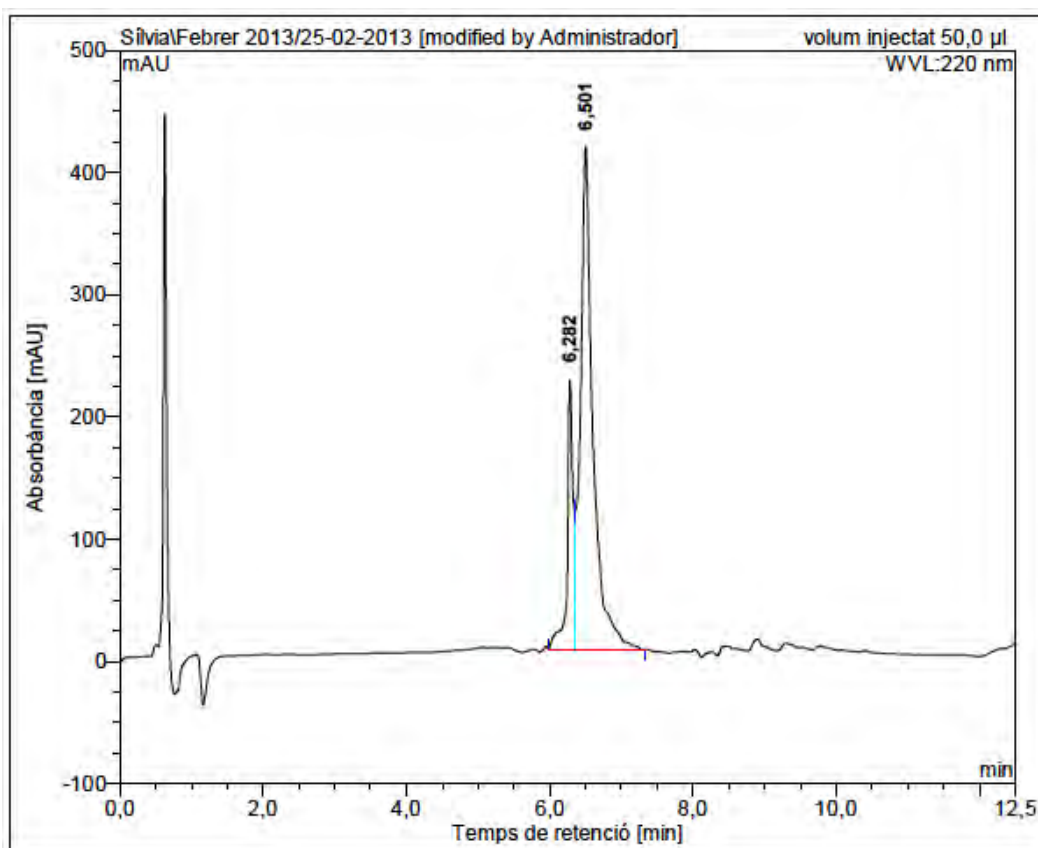
**c(Lys(ivDde)-Lys-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(obtained from c(Lys(ivDde)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-His(Tr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)))

ESI-MS ( $m/z$ )



HPLC ( $\lambda=220$  nm)

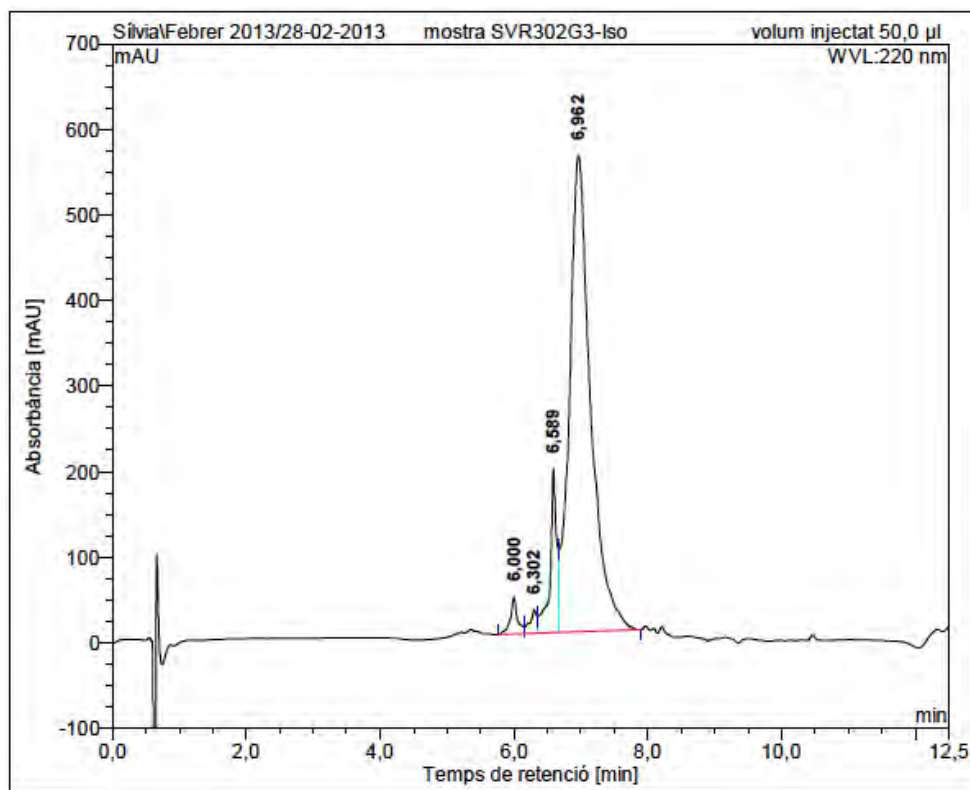


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,28	220,755	20,583	19,63
2	6,50	411,844	84,262	80,37
Total:		632,599	104,846	100,00

### 3. Cyclolipopeptides

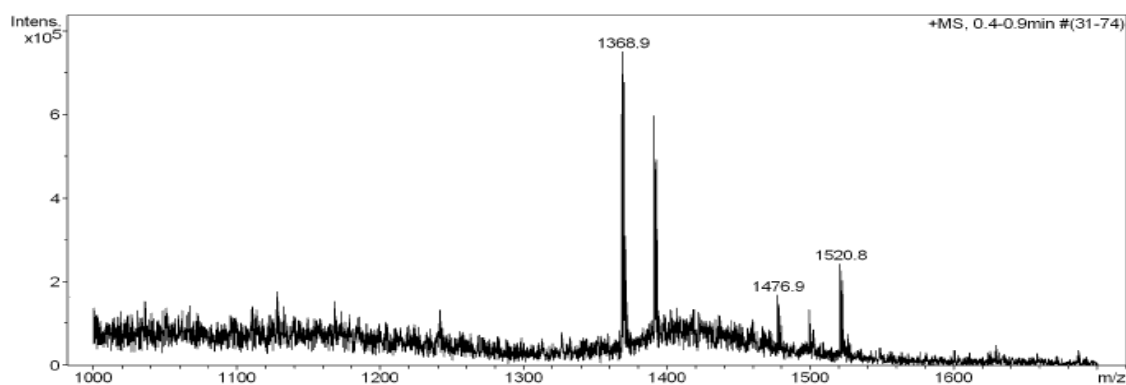
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-isoC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC504)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

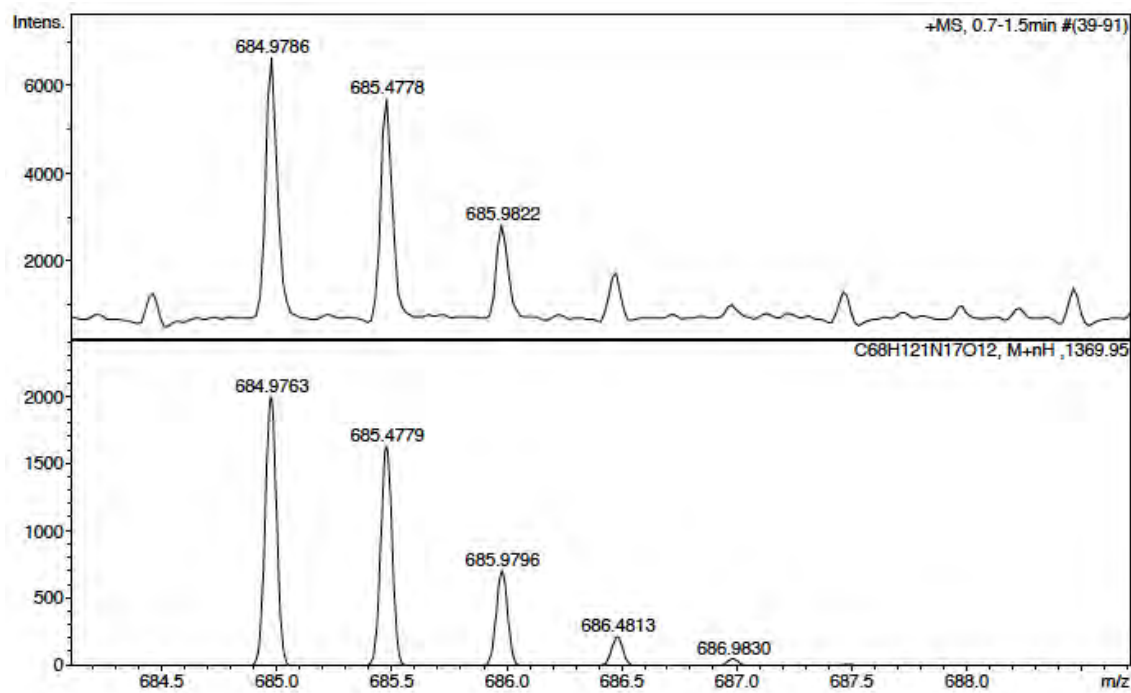
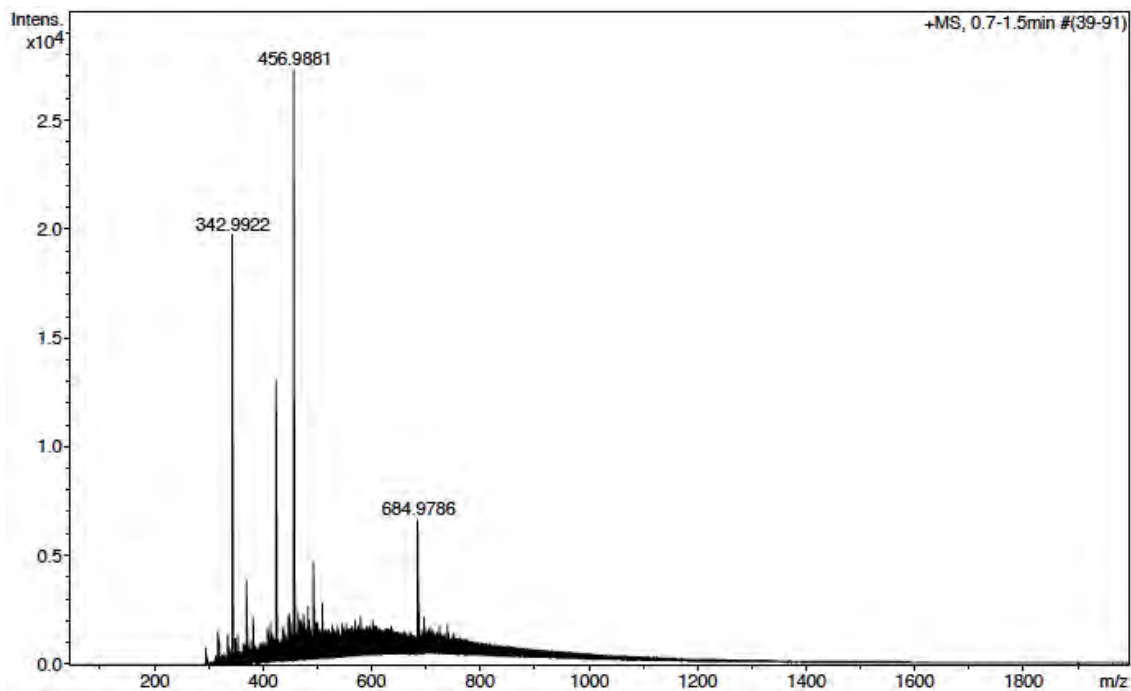


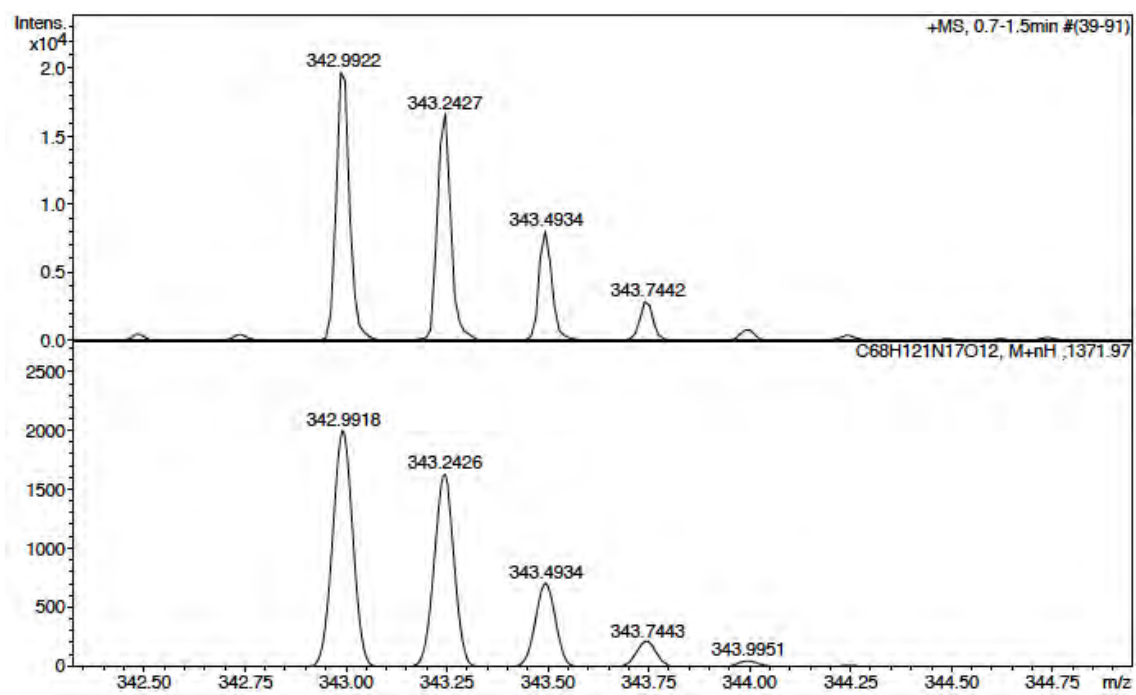
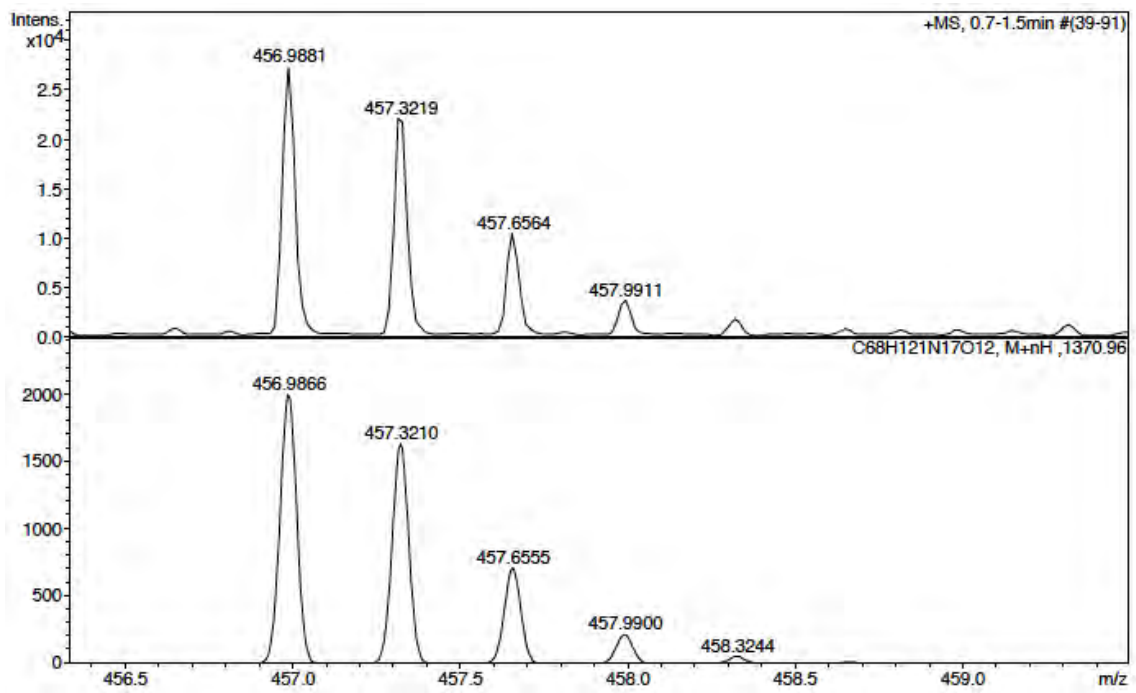
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,00	43,109	5,348	2,28
2	6,30	27,257	3,232	1,38
3	6,59	191,526	22,194	9,45
4	6,96	556,886	204,193	86,90
Total:		818,778	234,967	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



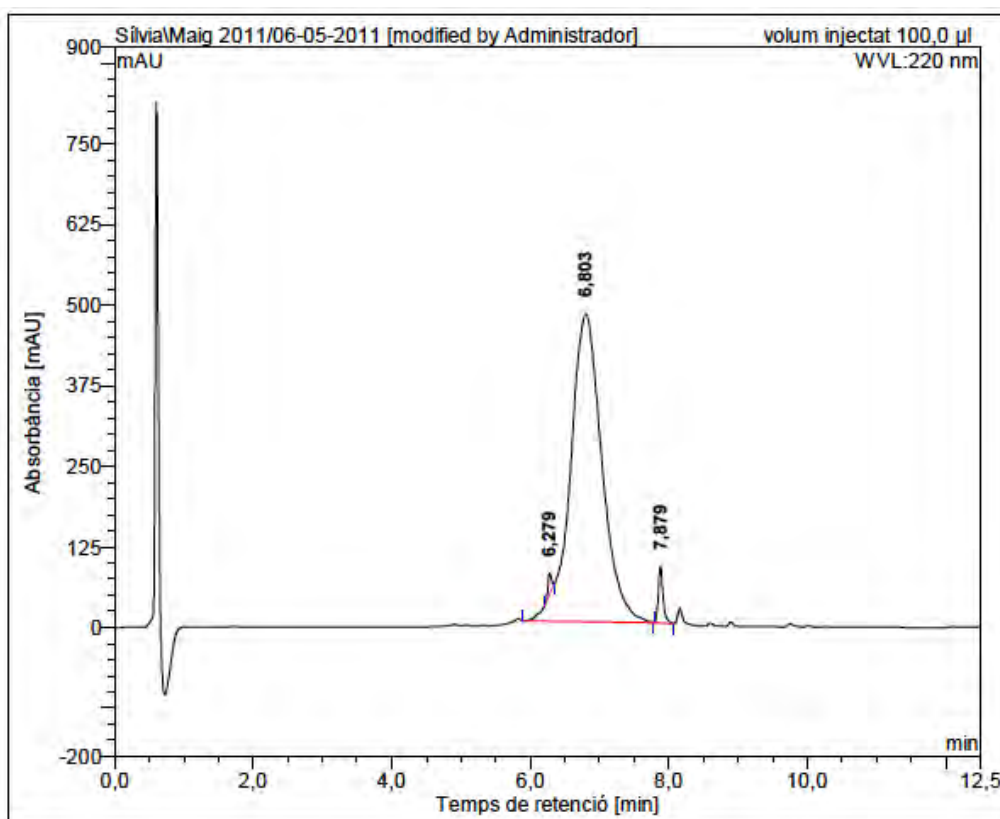
HRMS (ESI)  $m/z$





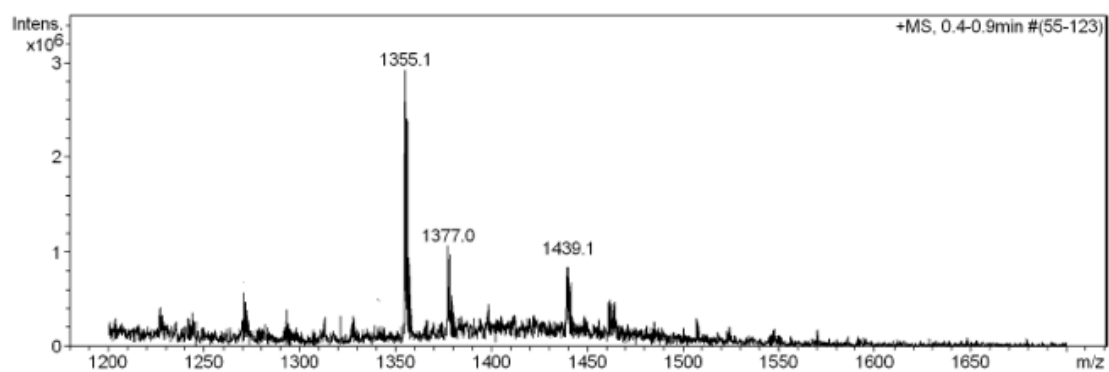
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC526)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

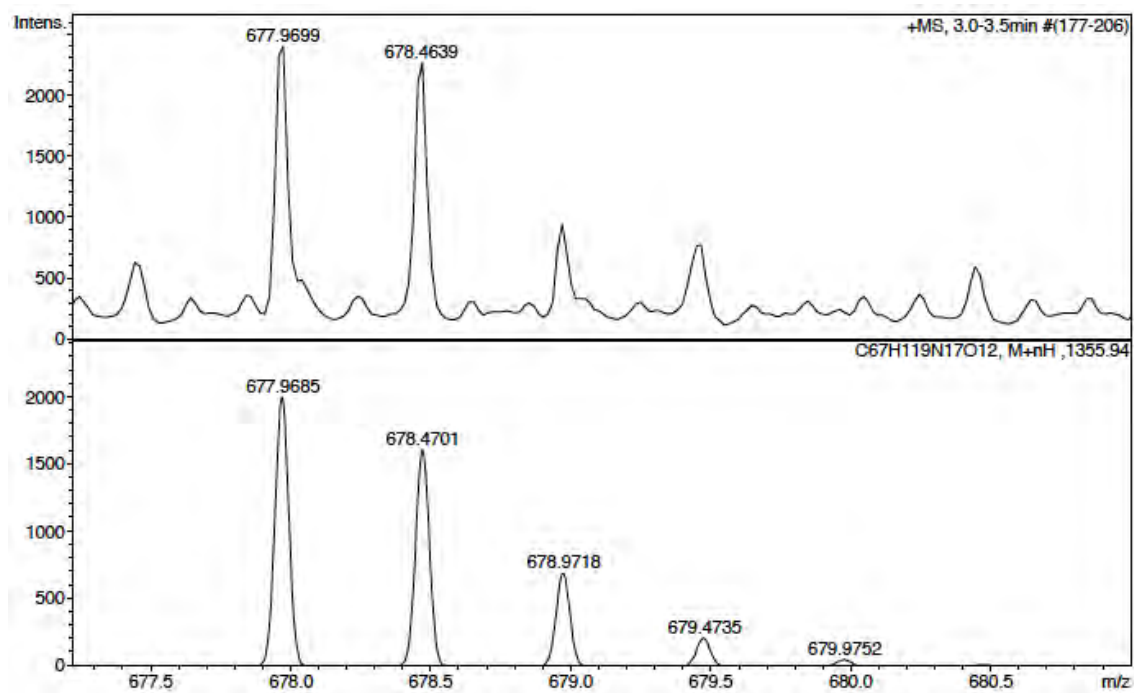
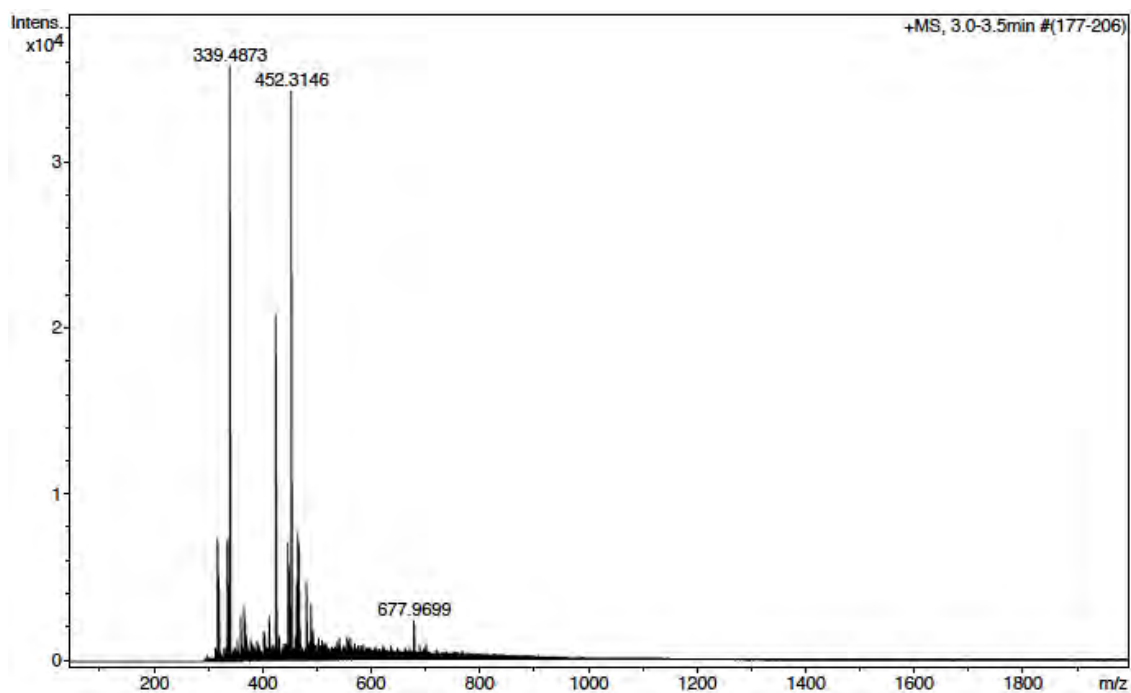


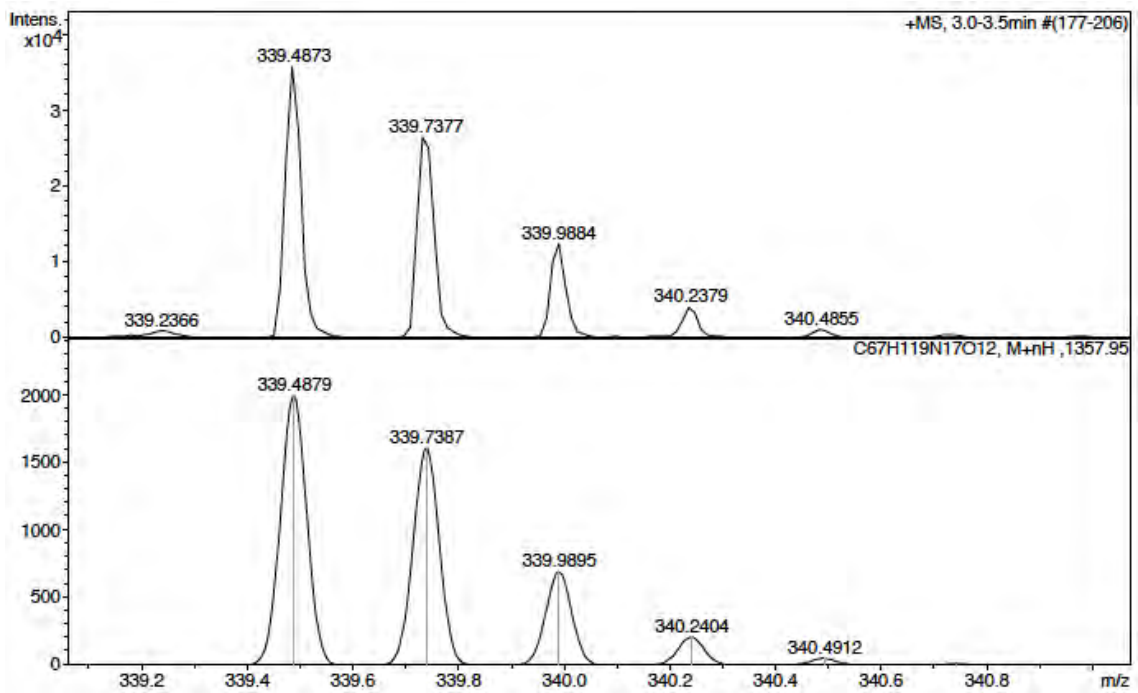
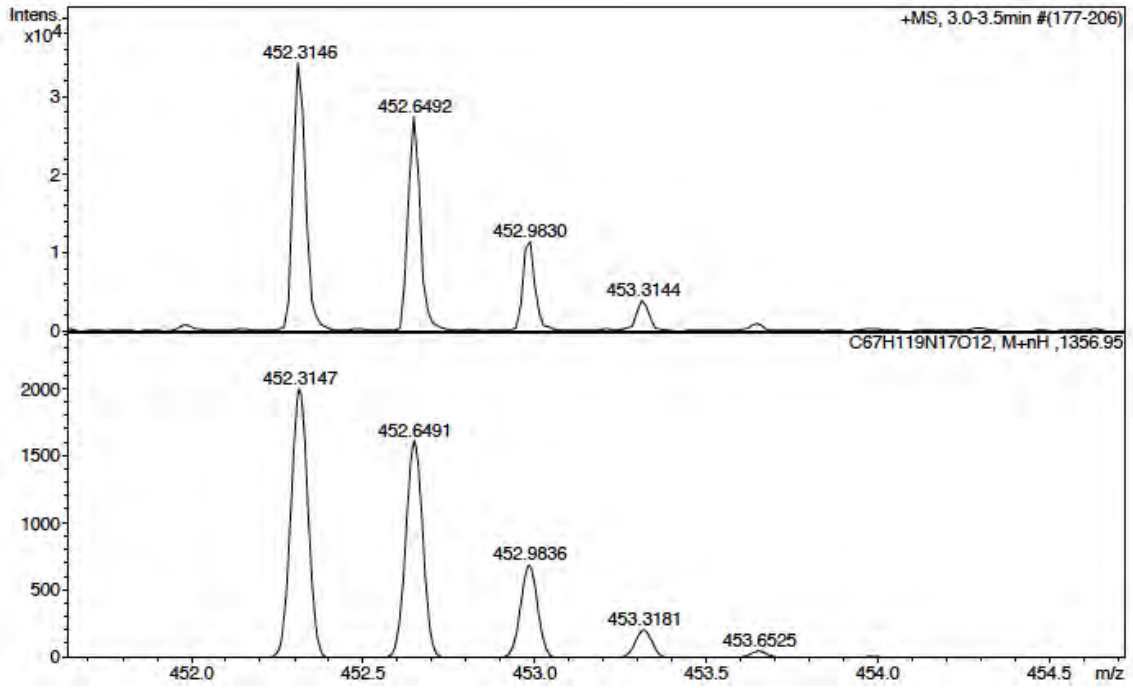
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,28	31,917	1,774	0,68
2	6,80	477,519	252,275	96,67
3	7,88	88,062	6,920	2,65
Total:		597,498	260,969	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



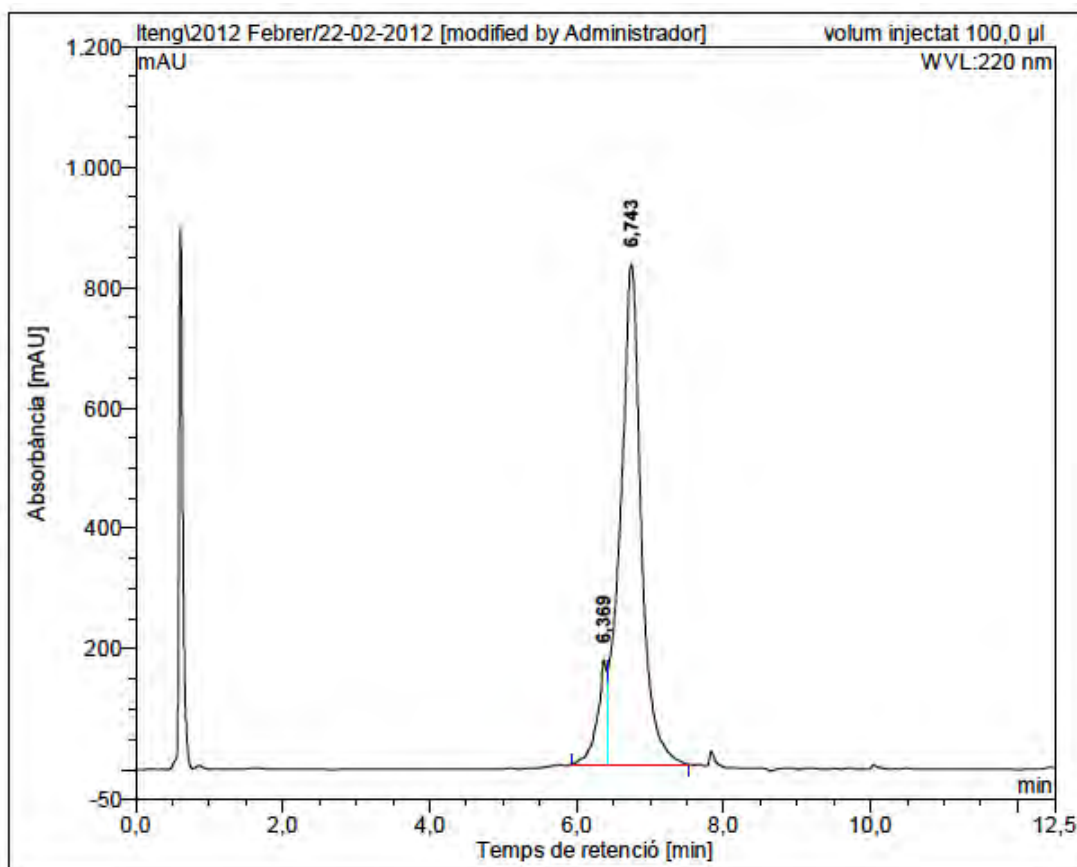
HRMS (ESI)  $m/z$





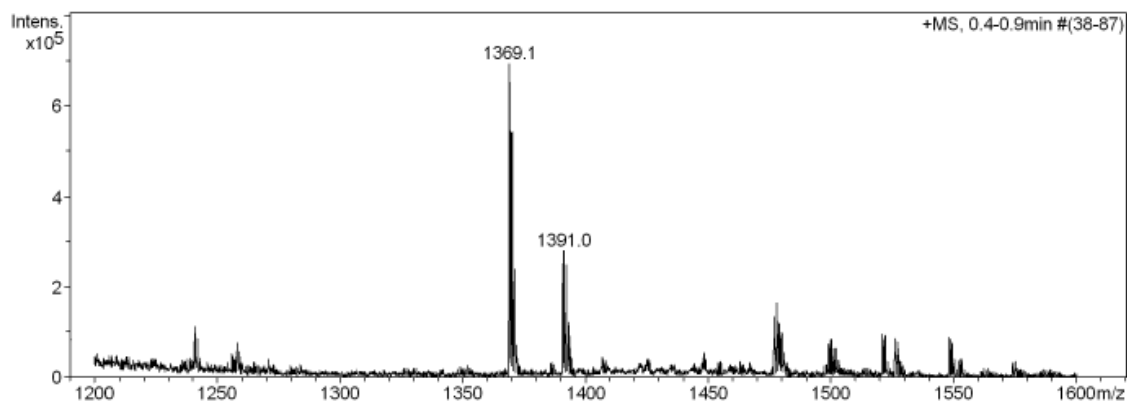
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC528)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



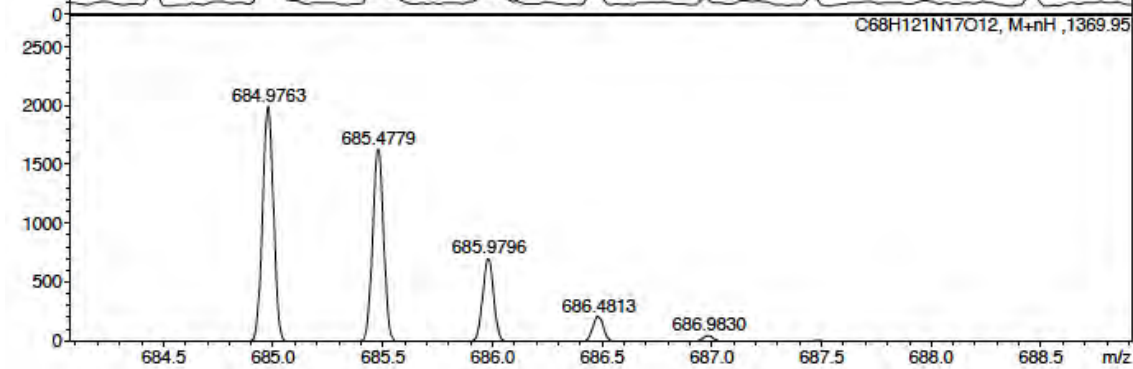
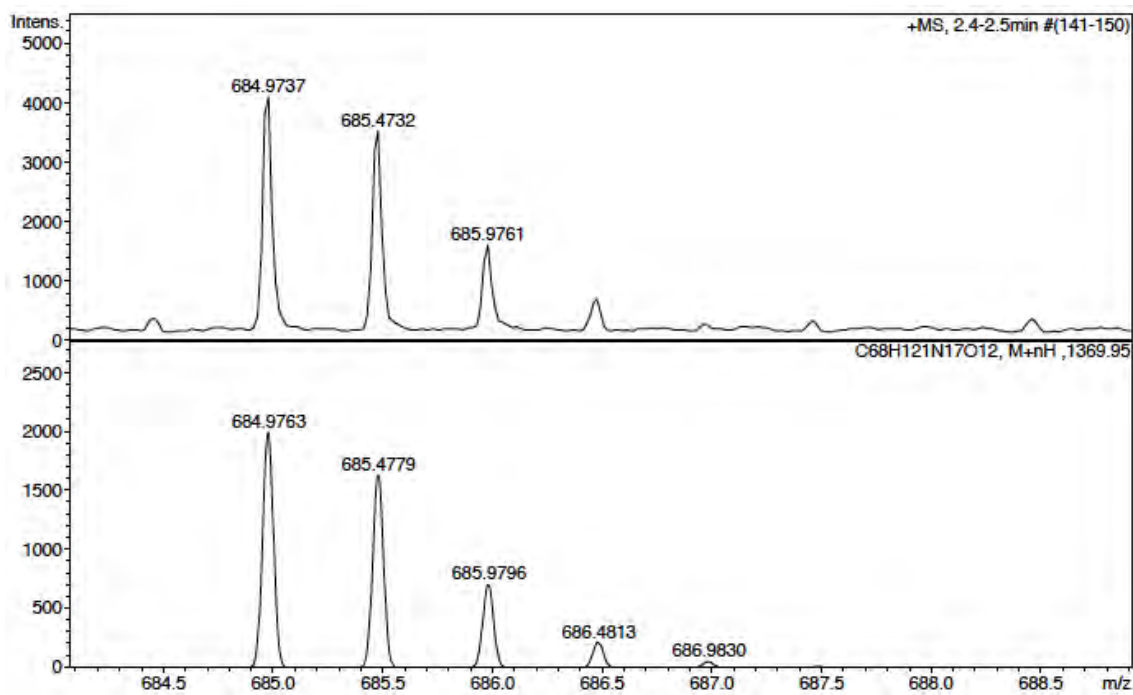
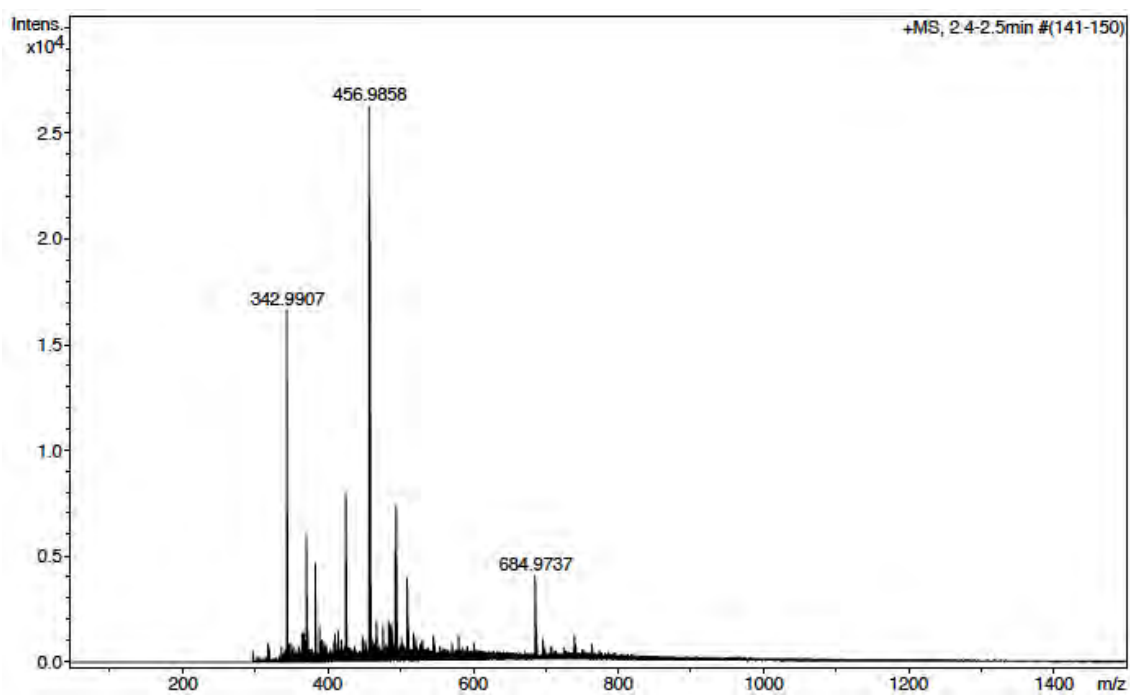
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,37	174,230	25,641	8,55
2	6,74	831,983	274,367	91,45
Total:		1006,213	300,008	100,00

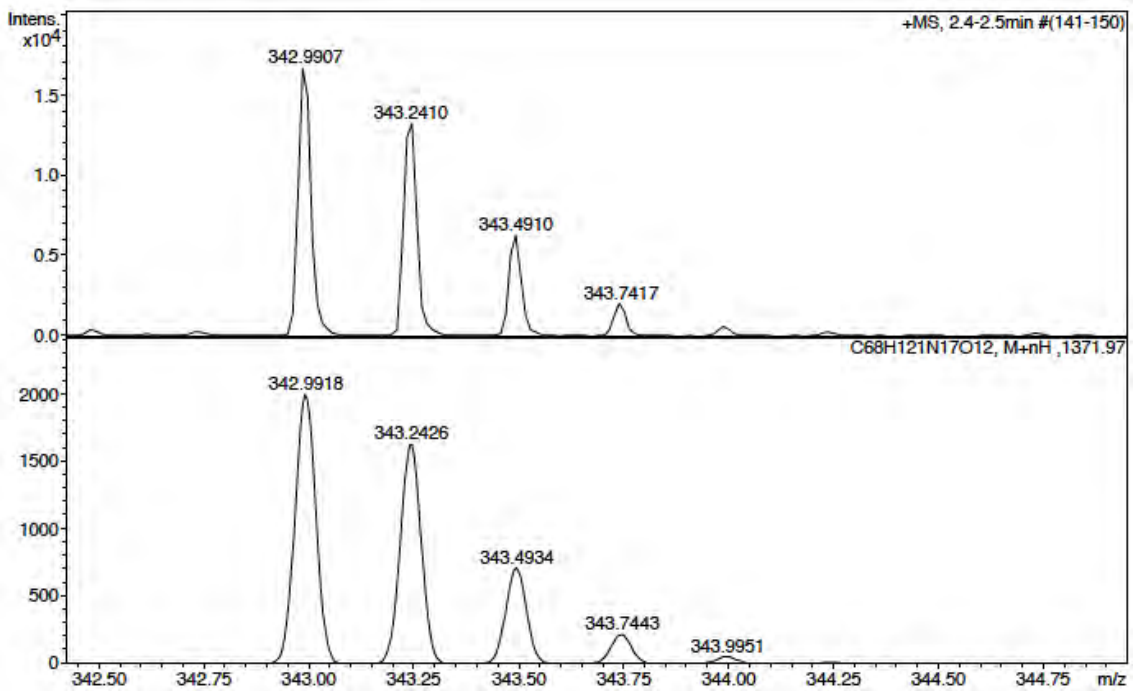
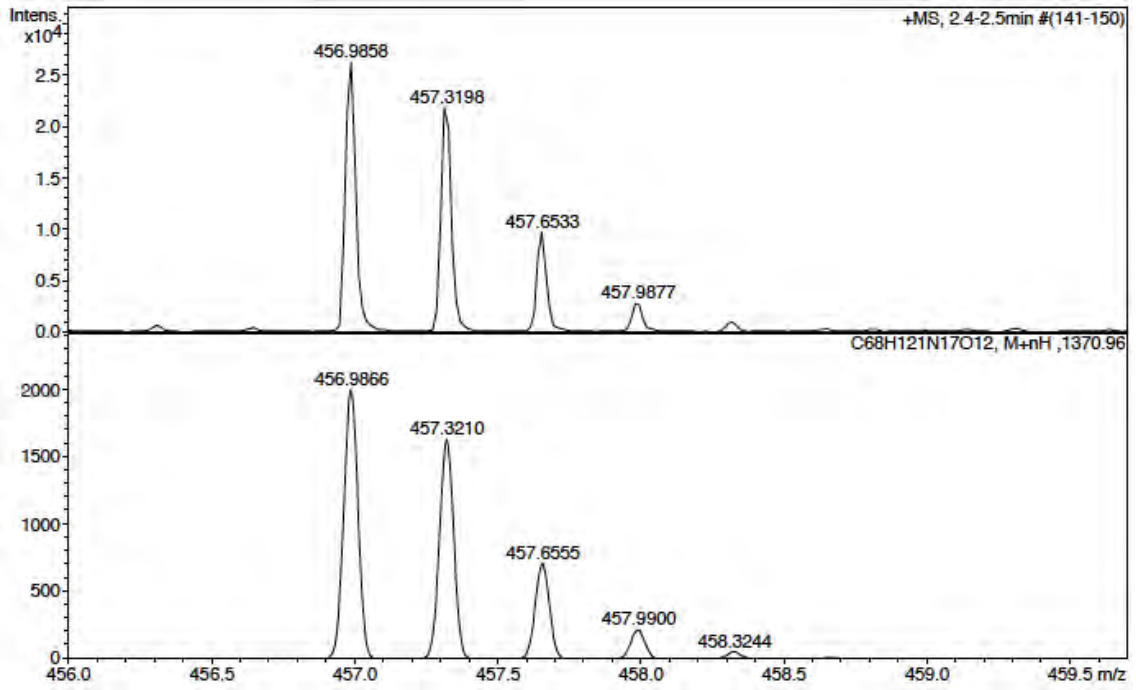
ESI-MS (*m/z*)





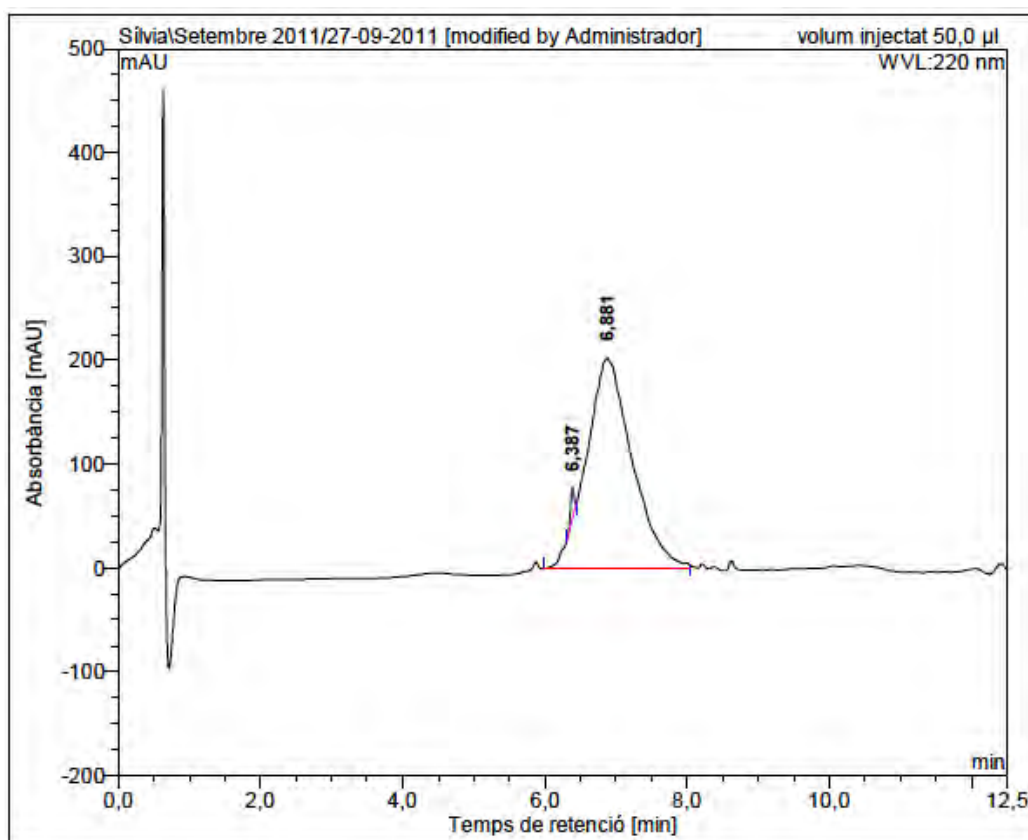
HRMS (ESI)  $m/z$





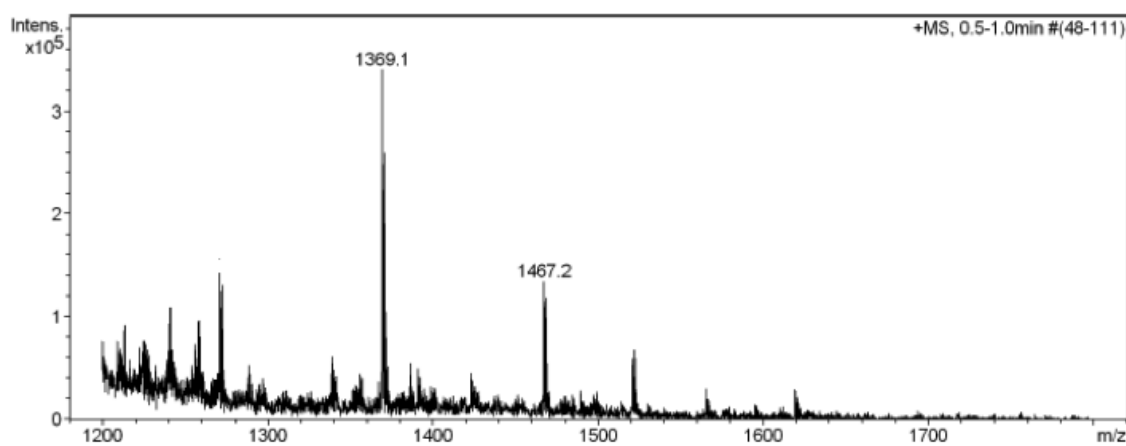
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Leu-Gln) (BPC582)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

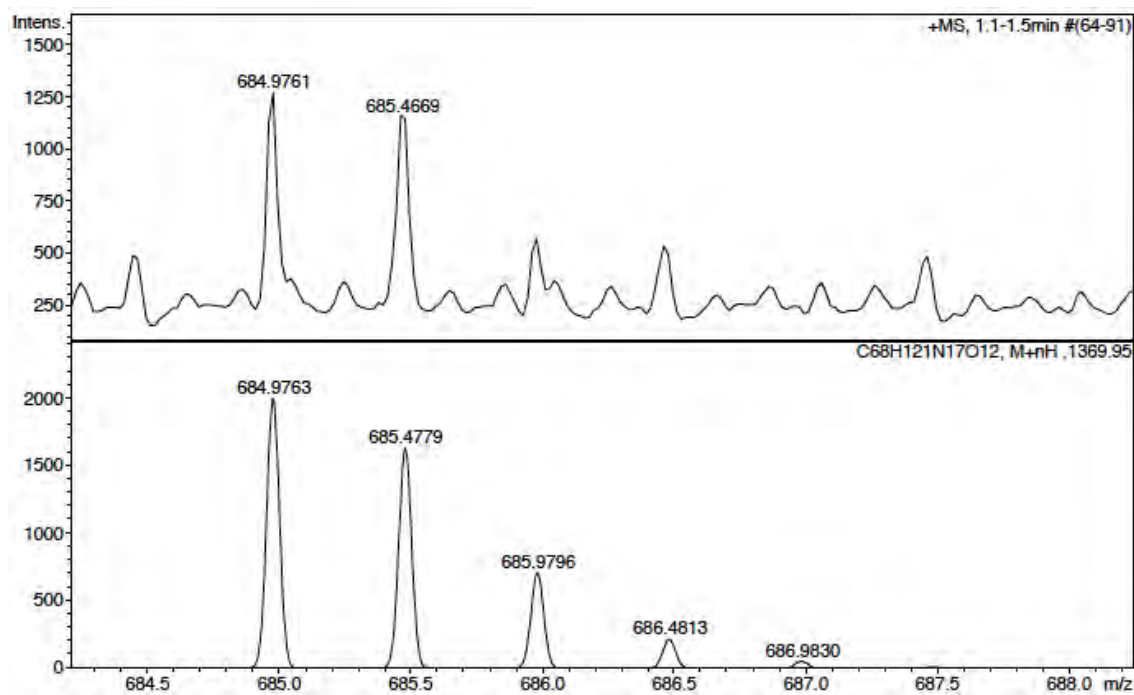
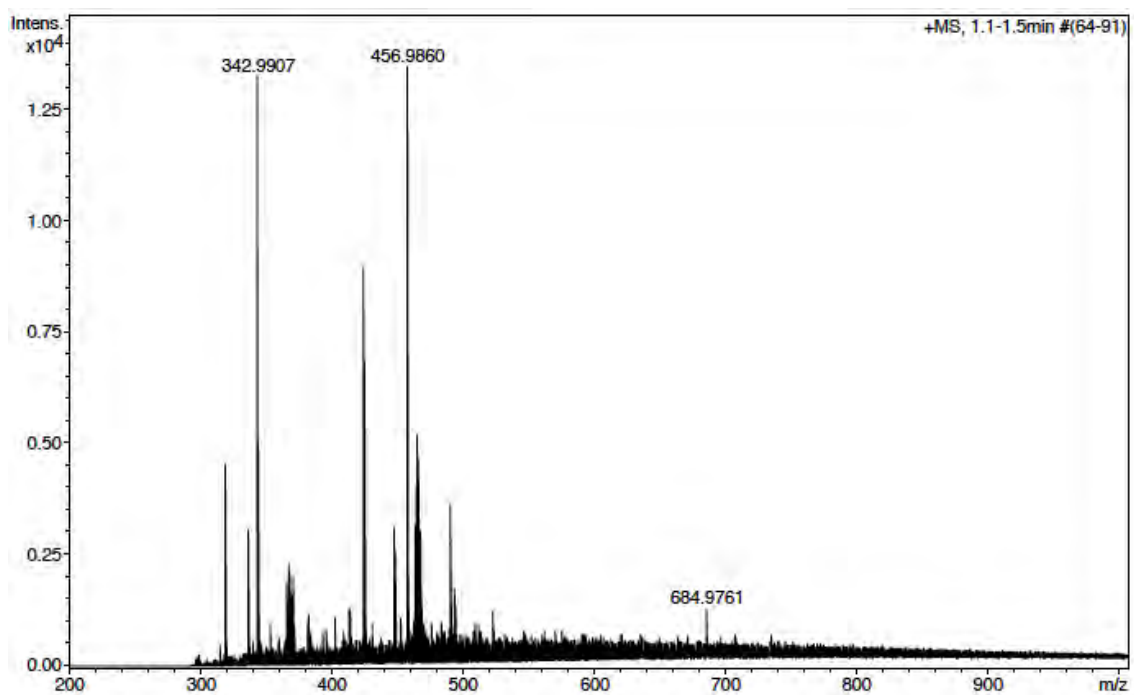


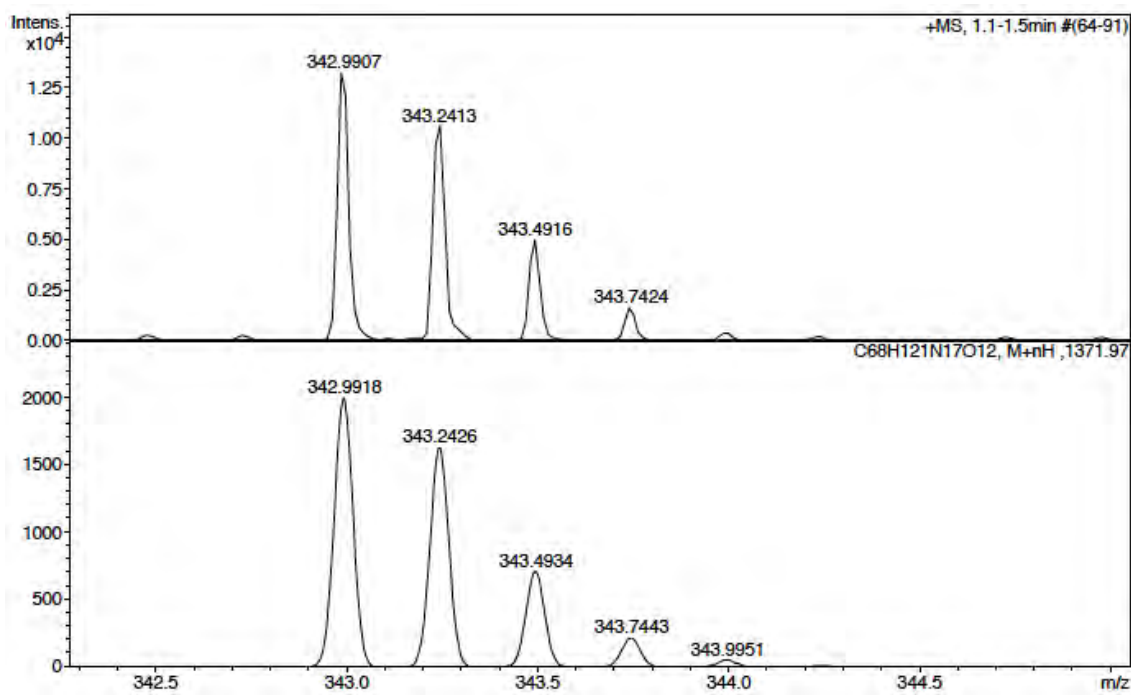
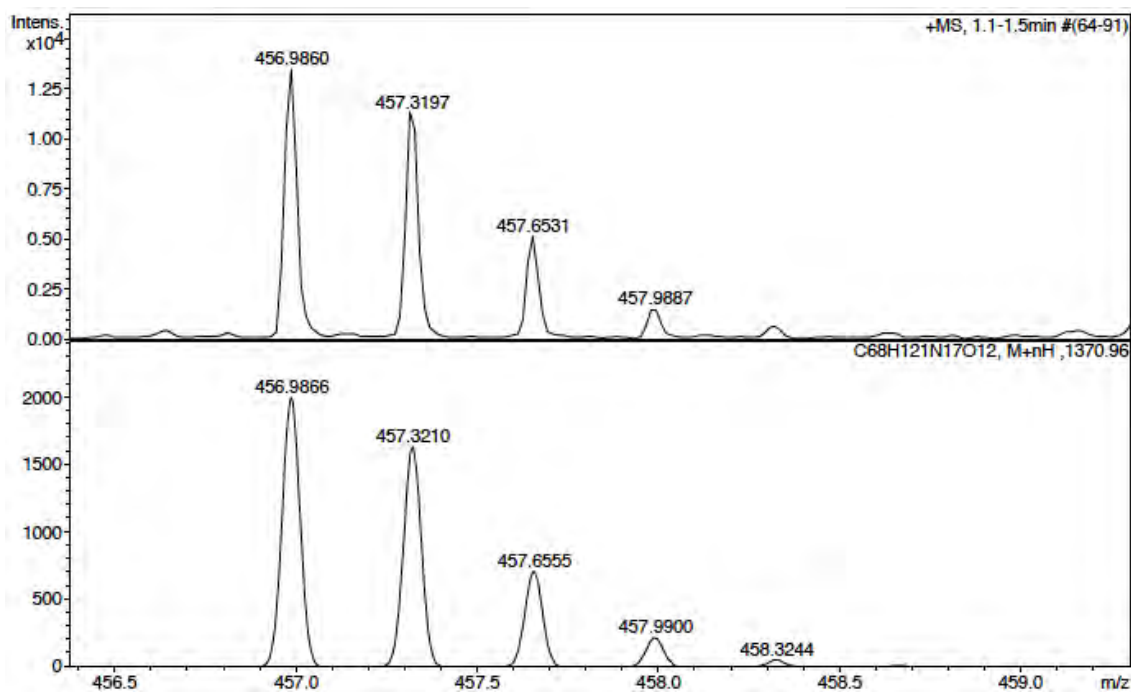
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,39	28,336	1,554	1,01
2	6,88	202,852	151,983	98,99
Total:		231,189	153,537	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



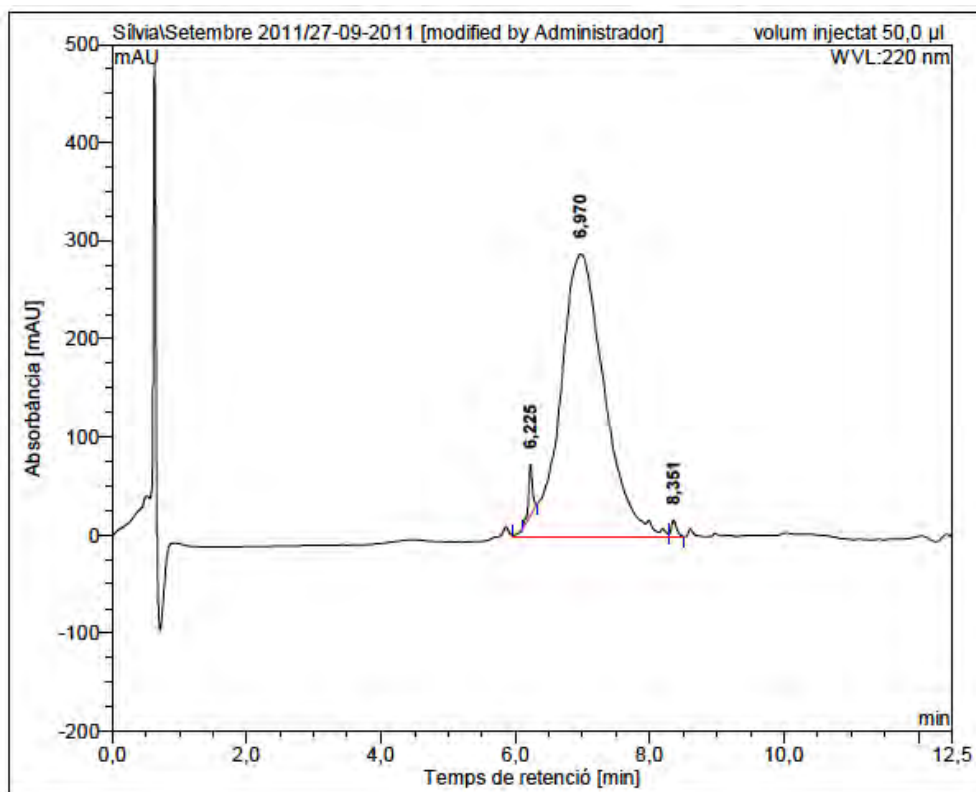
HRMS (ESI)  $m/z$





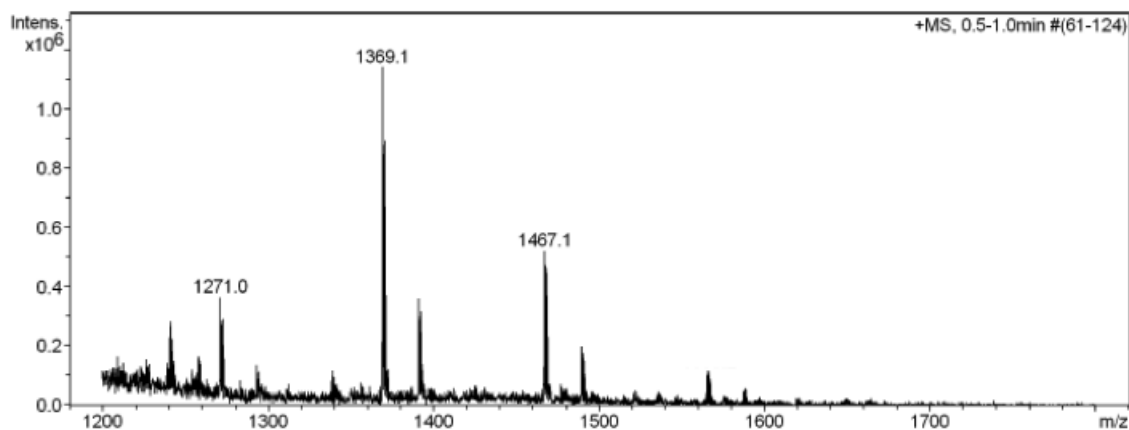
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Lys-Leu-Gln) (BPC584)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

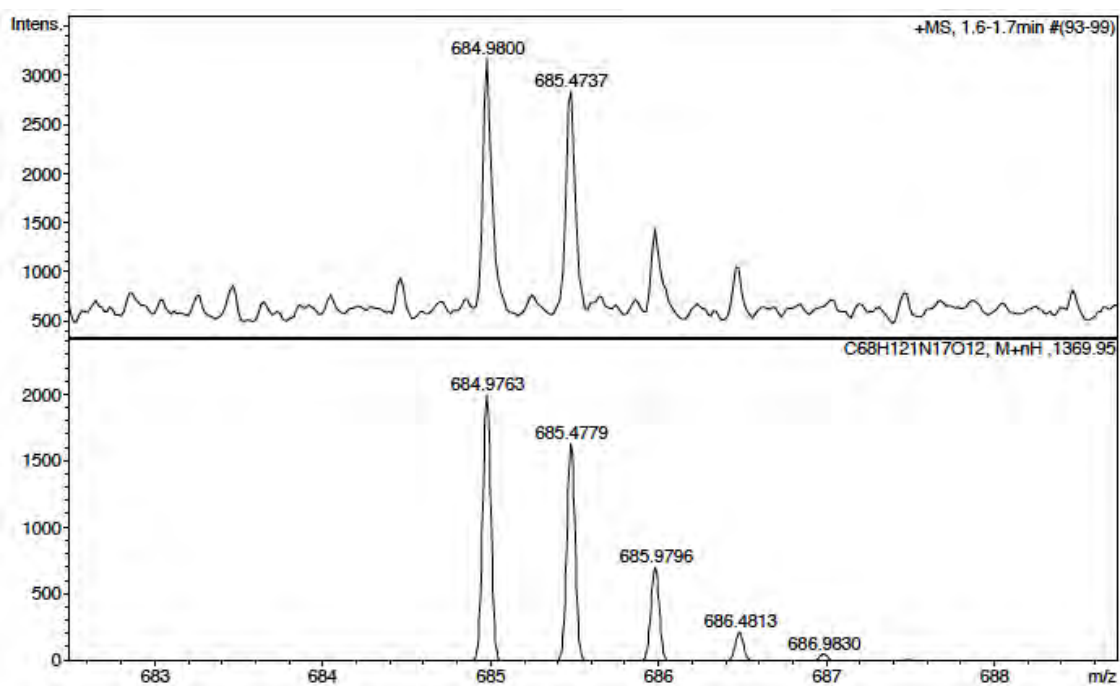
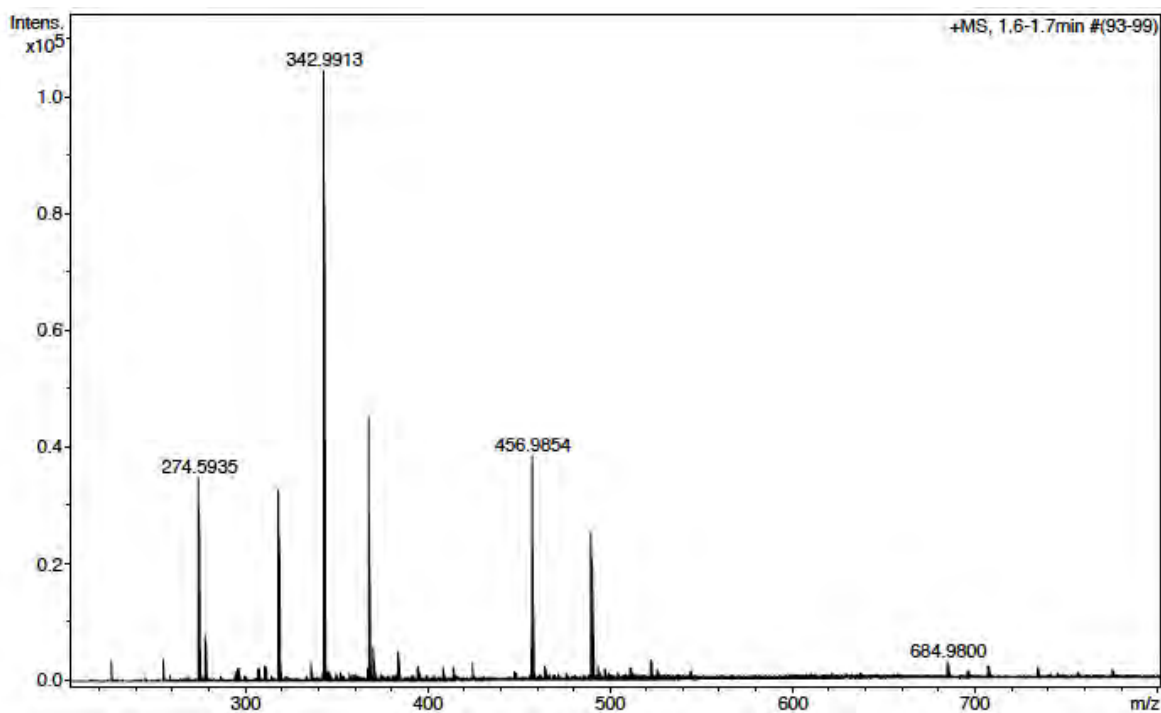


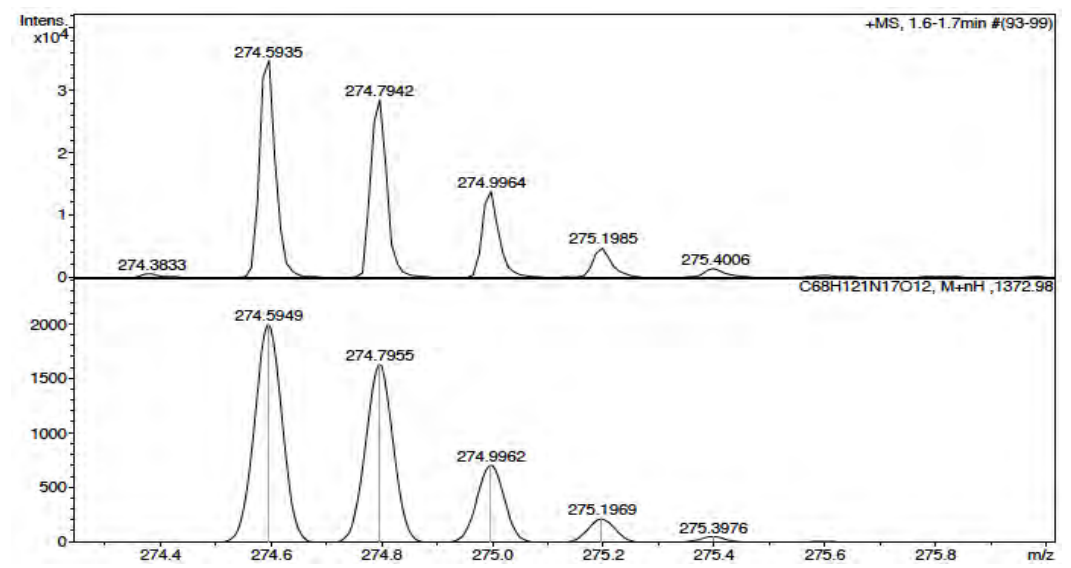
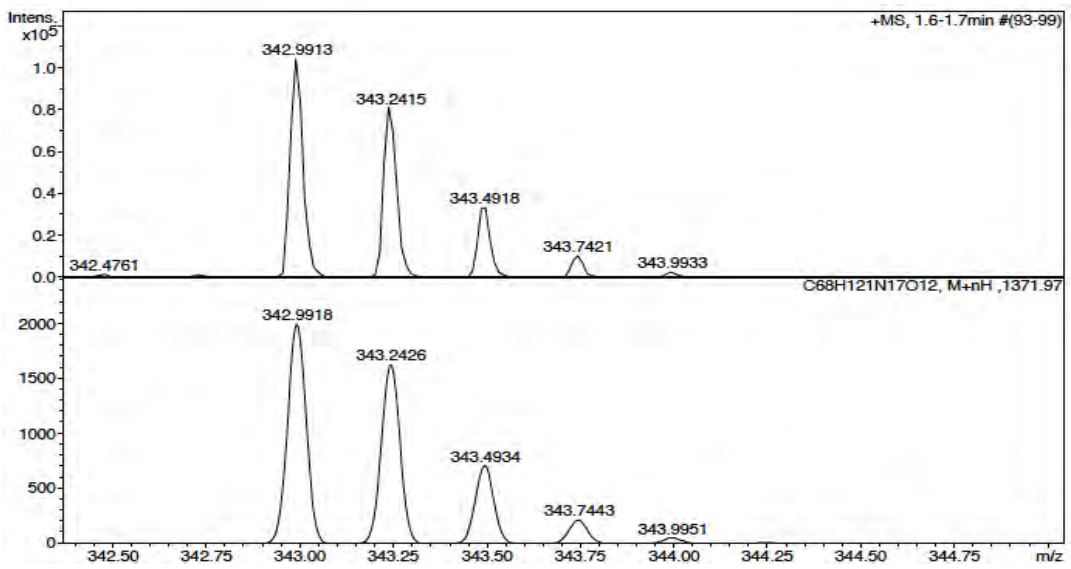
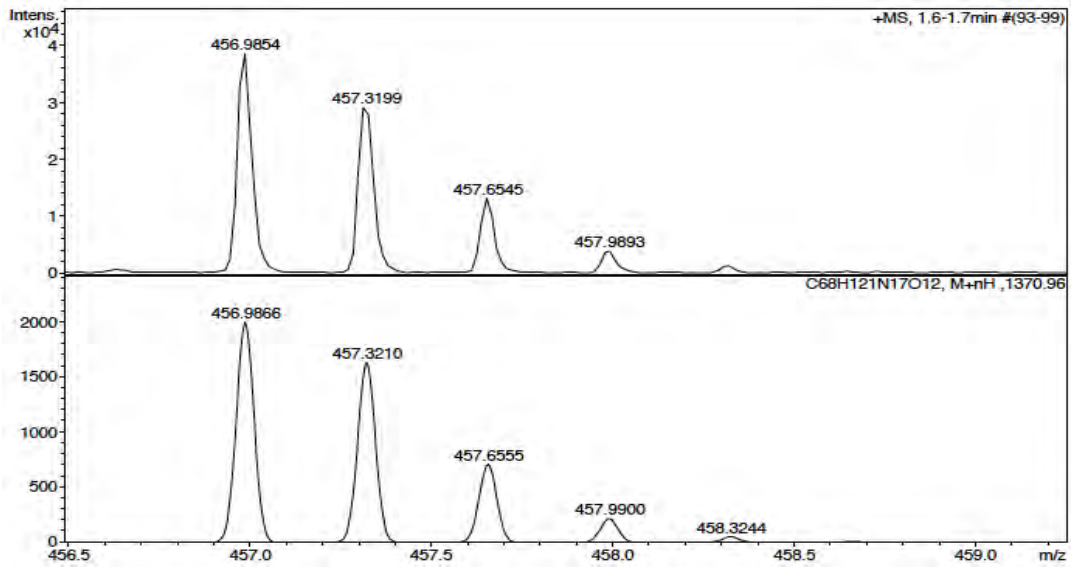
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,23	51,343	3,552	1,58
2	6,97	287,676	220,048	97,73
3	8,35	17,231	1,550	0,69
Total:		356,250	225,150	100,00

ESI-MS (*m/z*)



HRMS (ESI)  $m/z$

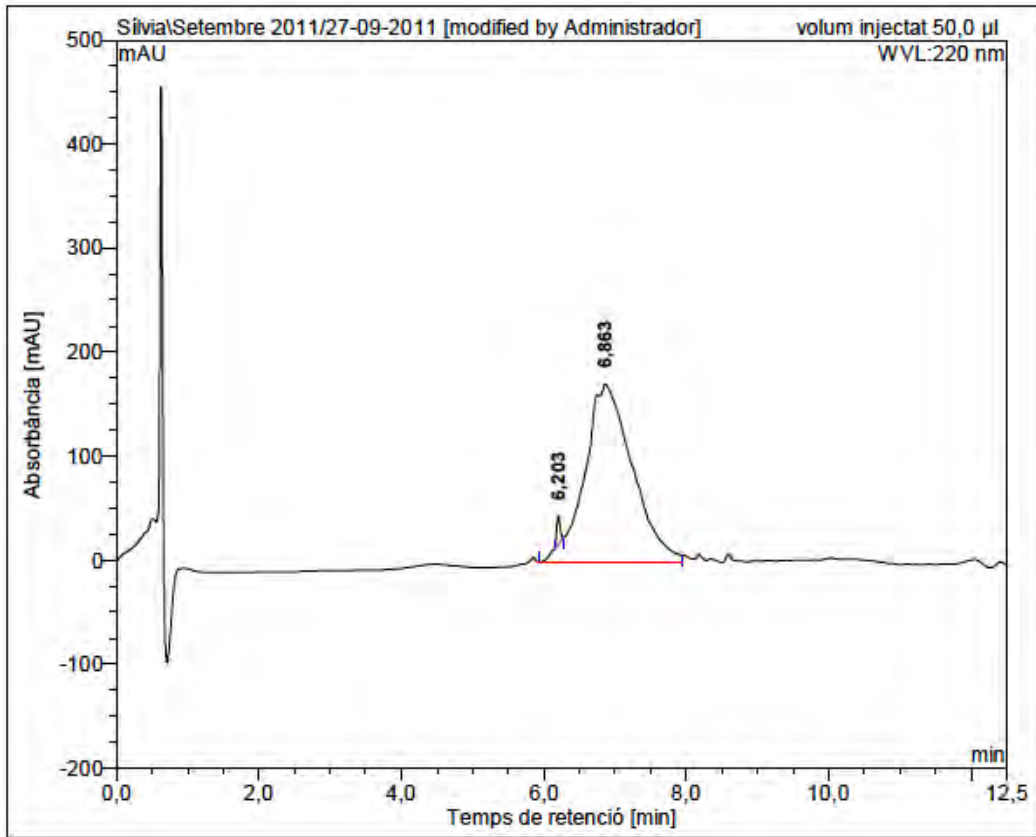






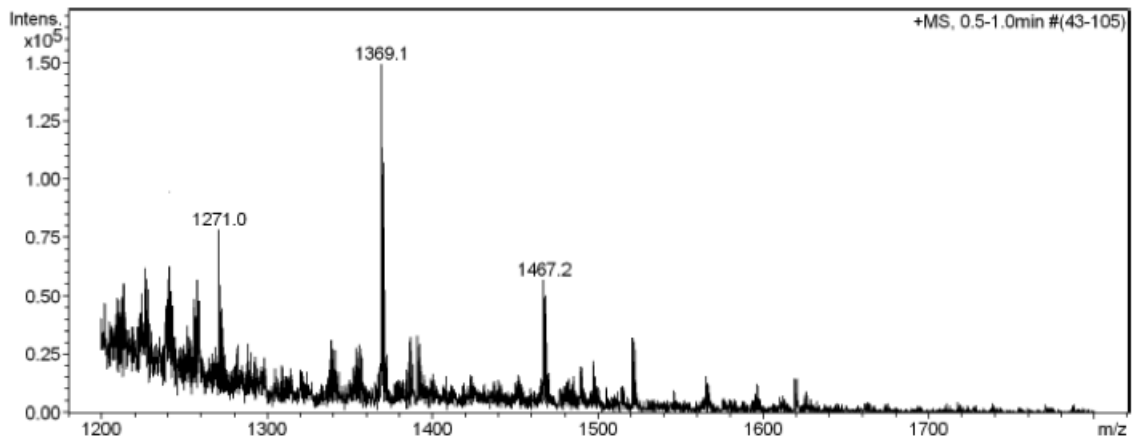
c(Lys-Lys-Leu-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC586)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

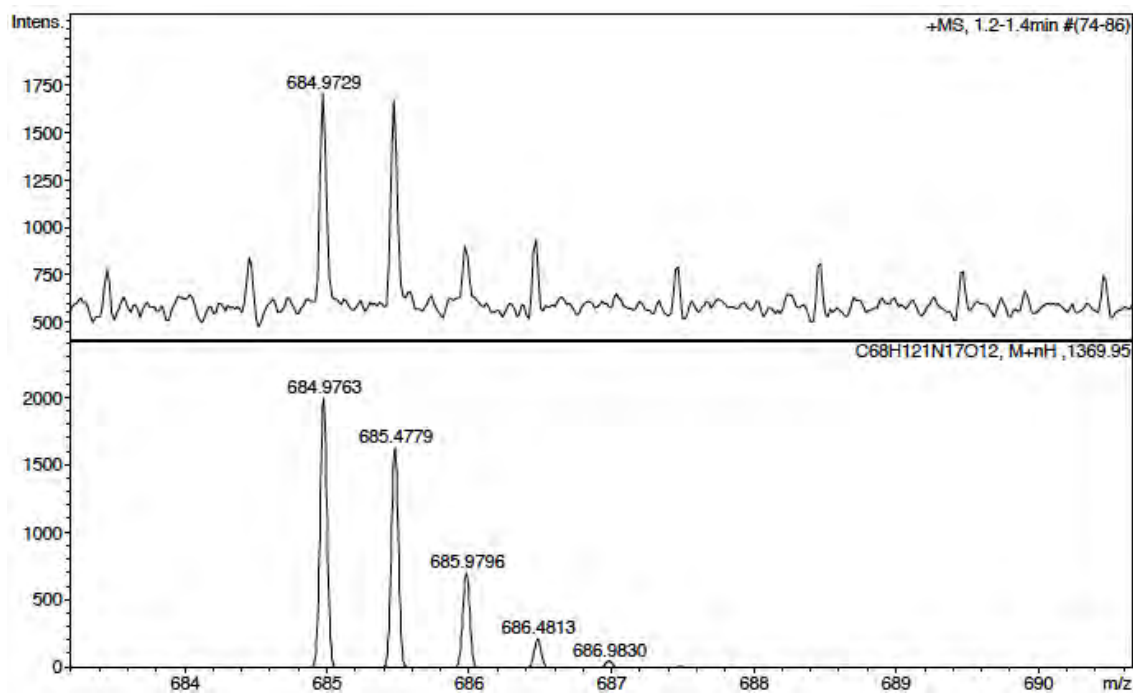
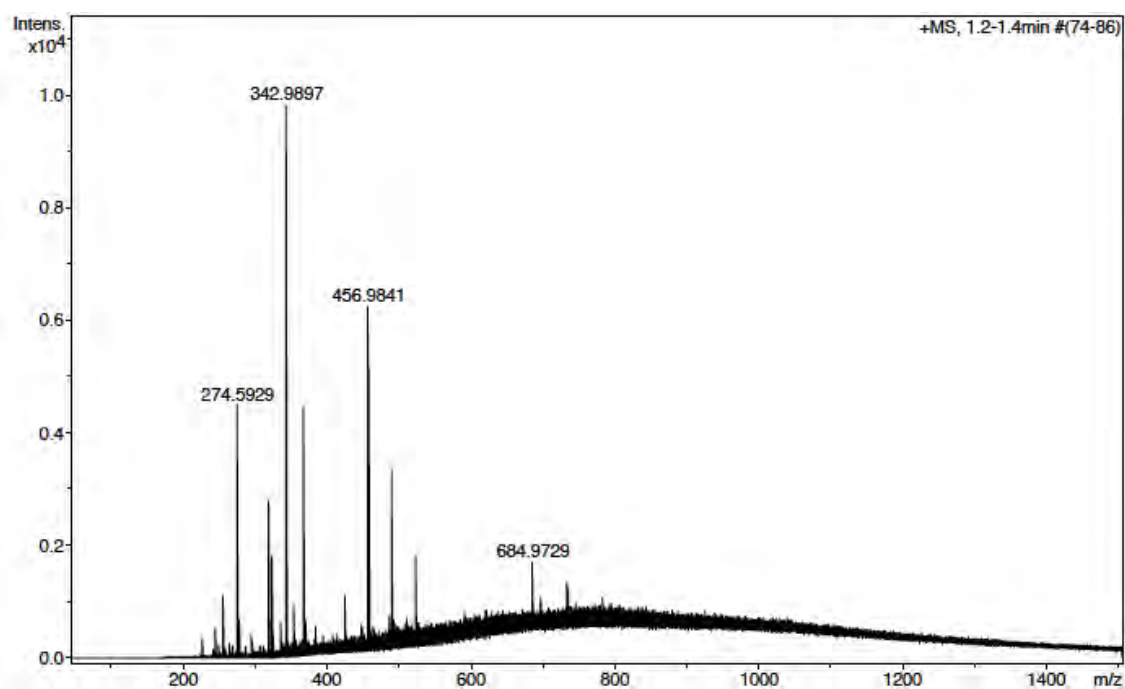


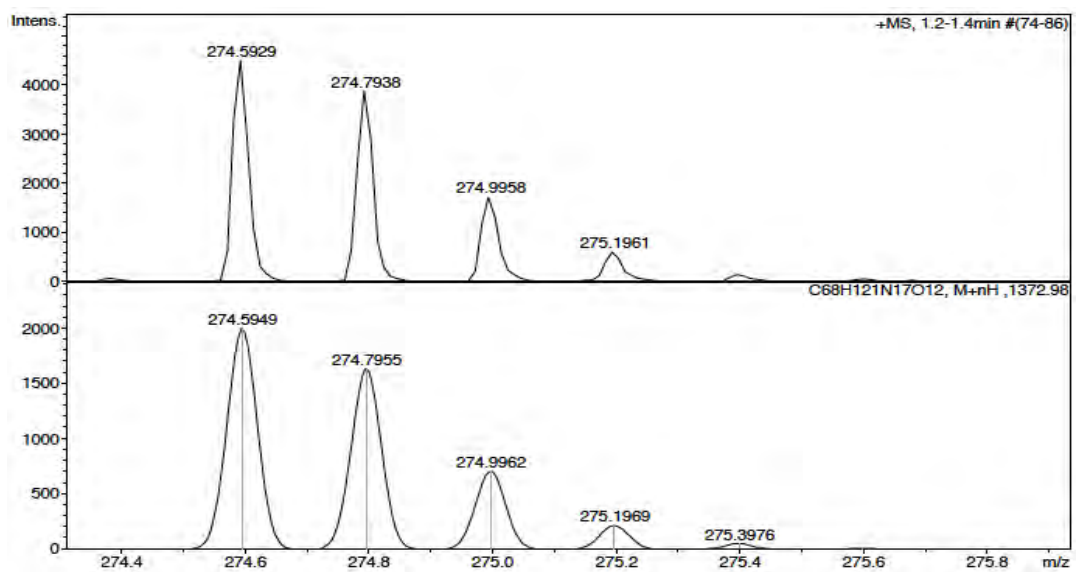
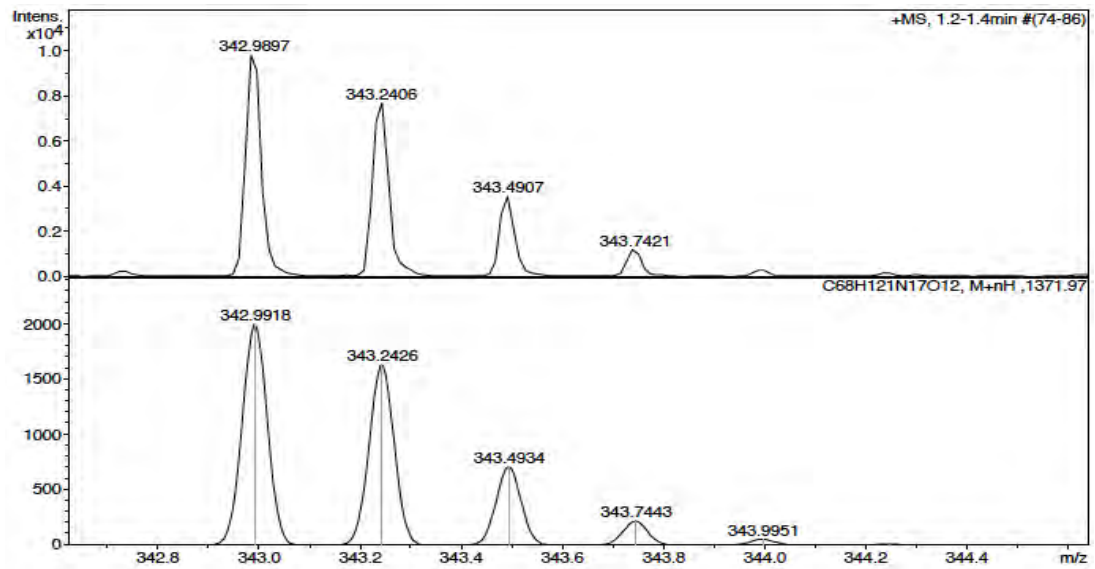
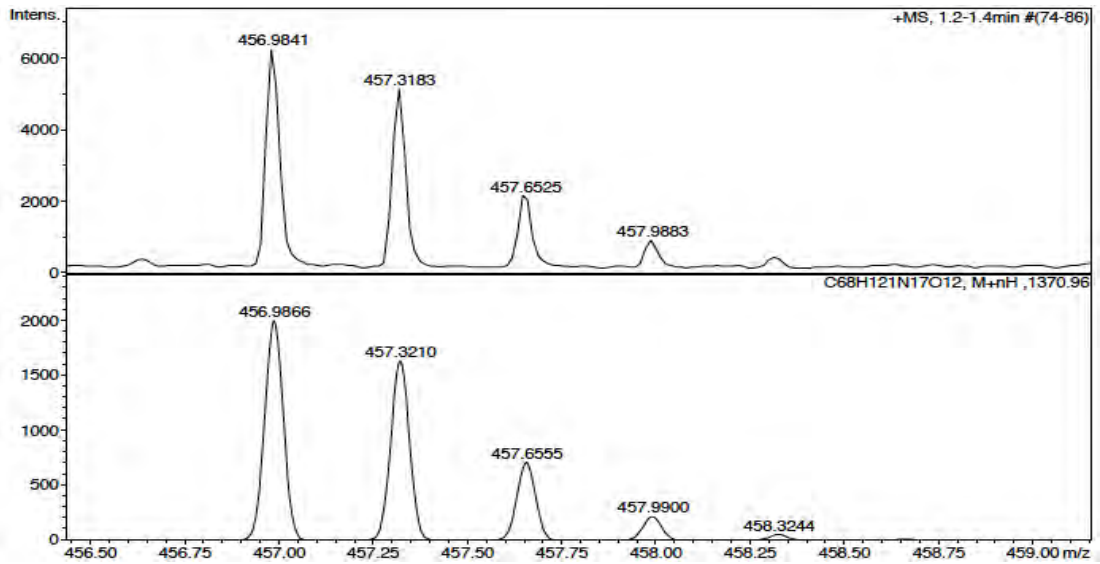
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,20	27,444	1,541	1,15
2	6,86	171,359	132,556	98,85
Total:		198,802	134,097	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



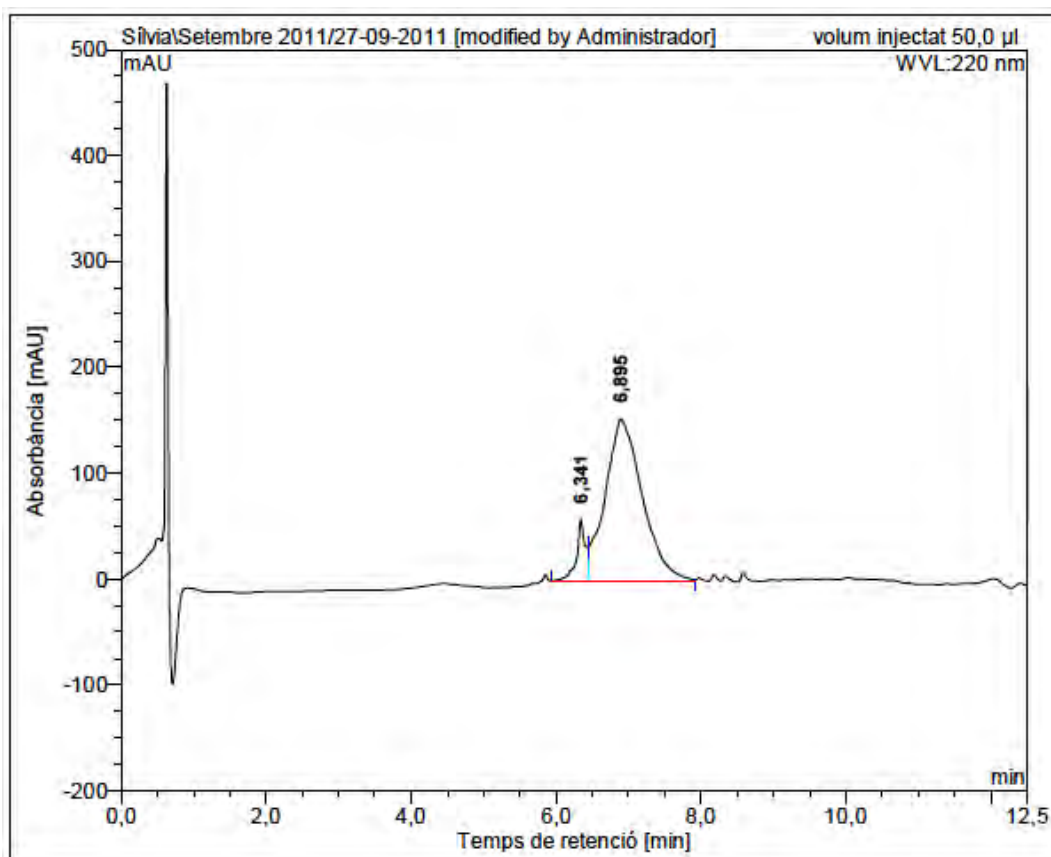
HRMS (ESI)  $m/z$





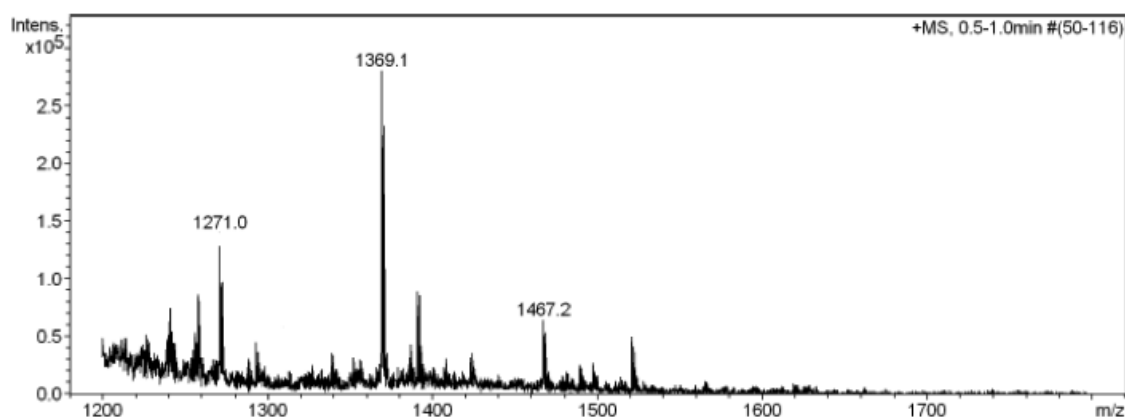
c(Lys-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC588)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

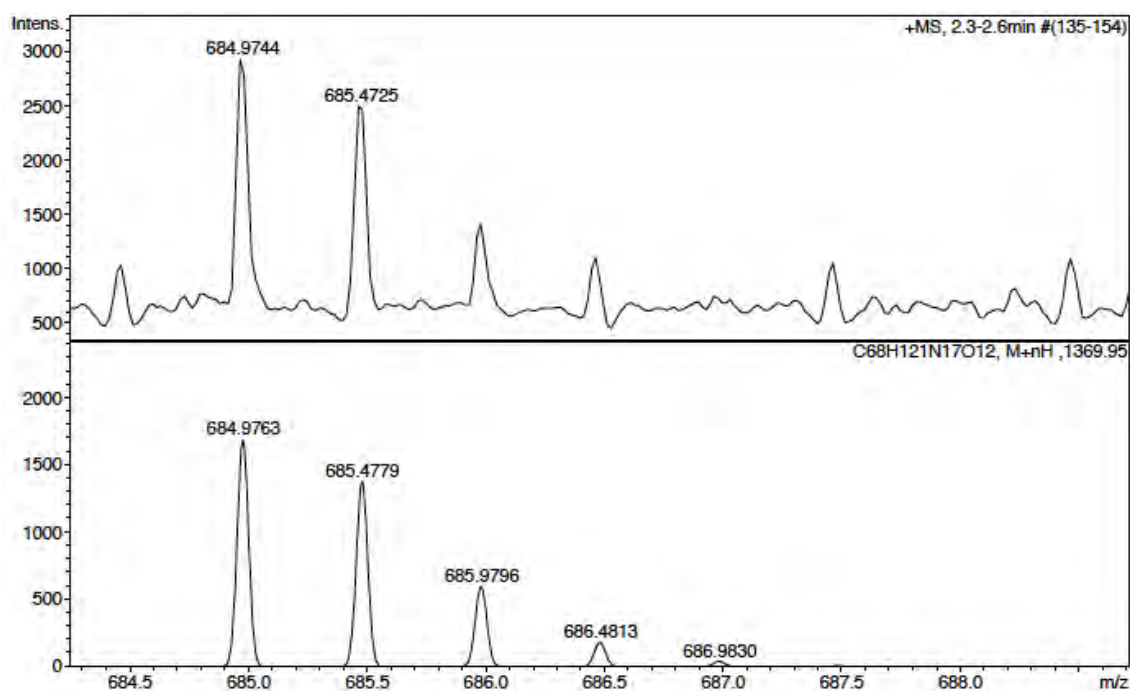
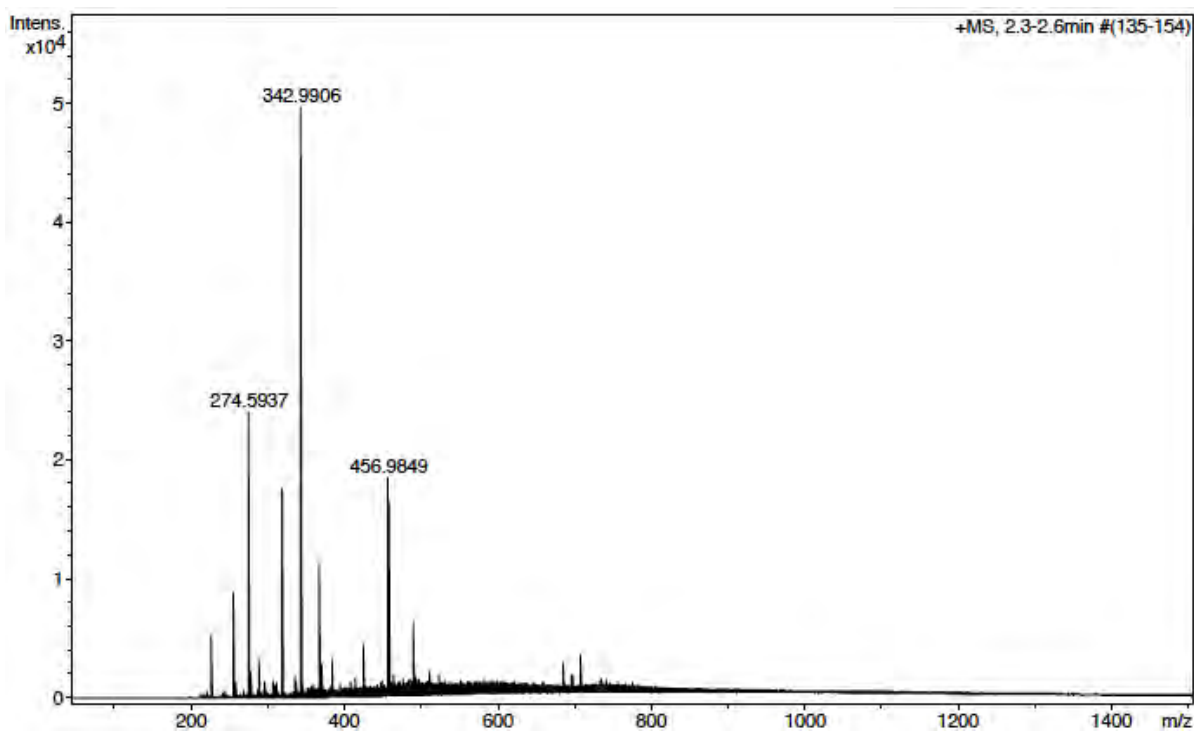


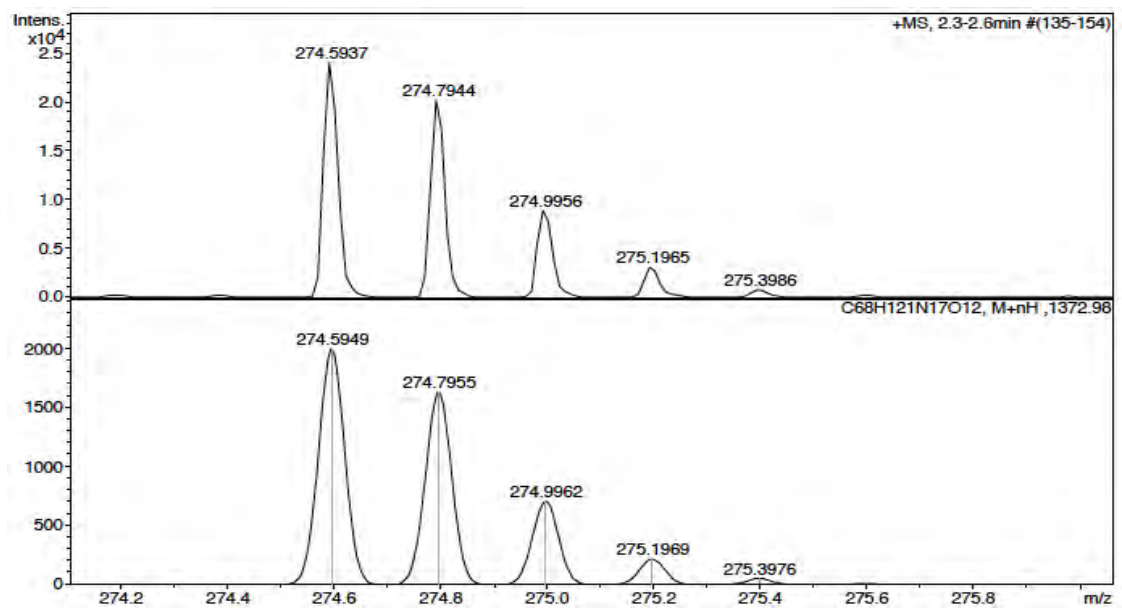
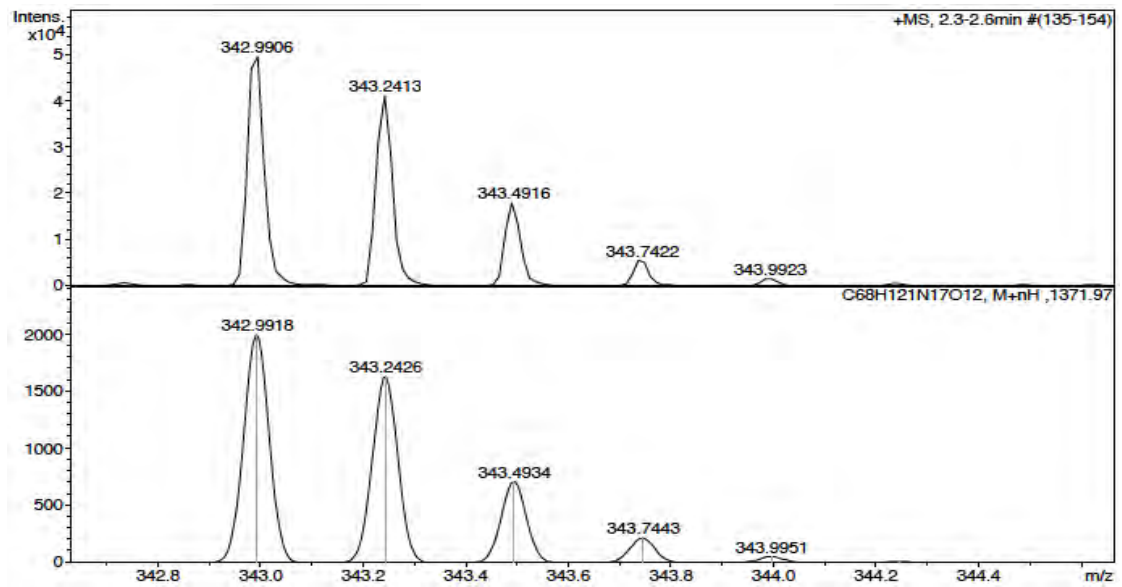
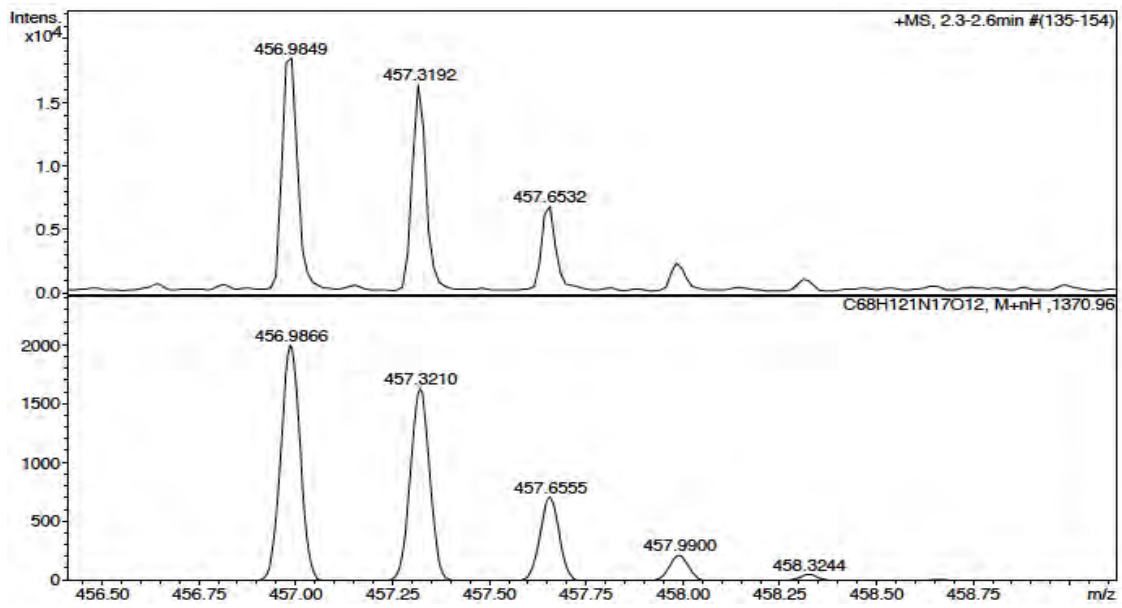
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,34	57,893	7,946	8,03
2	6,89	152,955	91,011	91,97
Total:		210,847	98,958	100,00

ESI-MS (*m/z*)



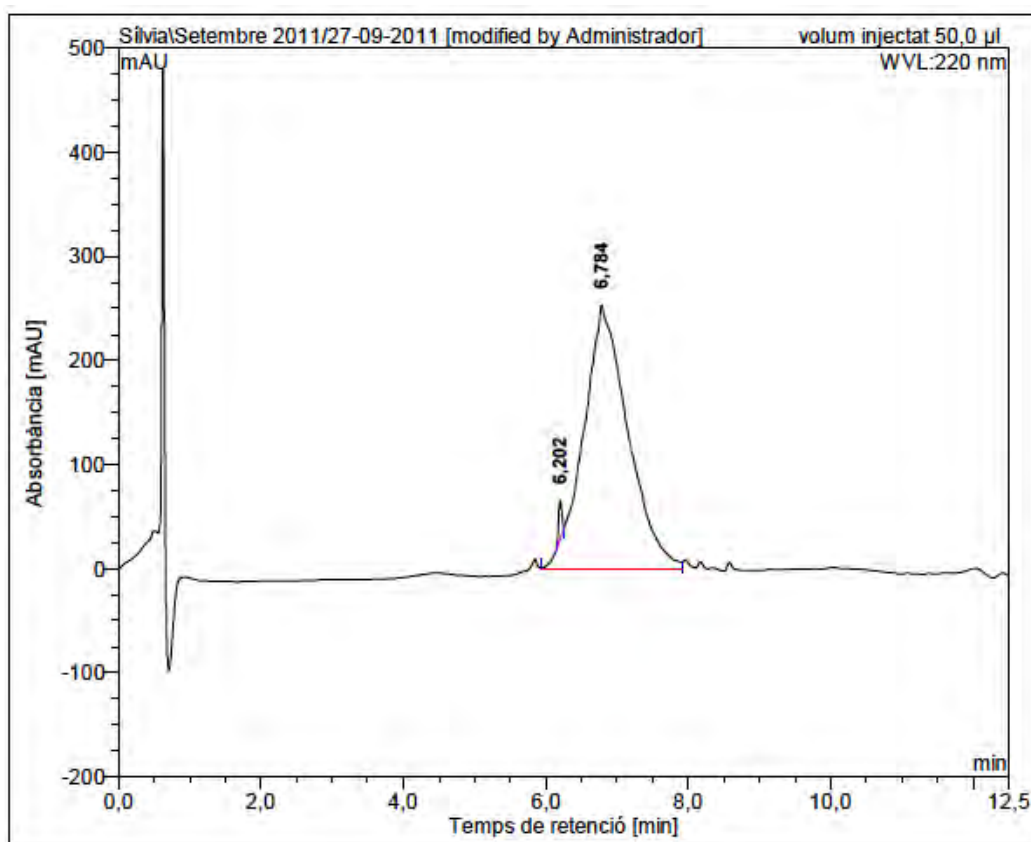
HRMS (ESI)  $m/z$





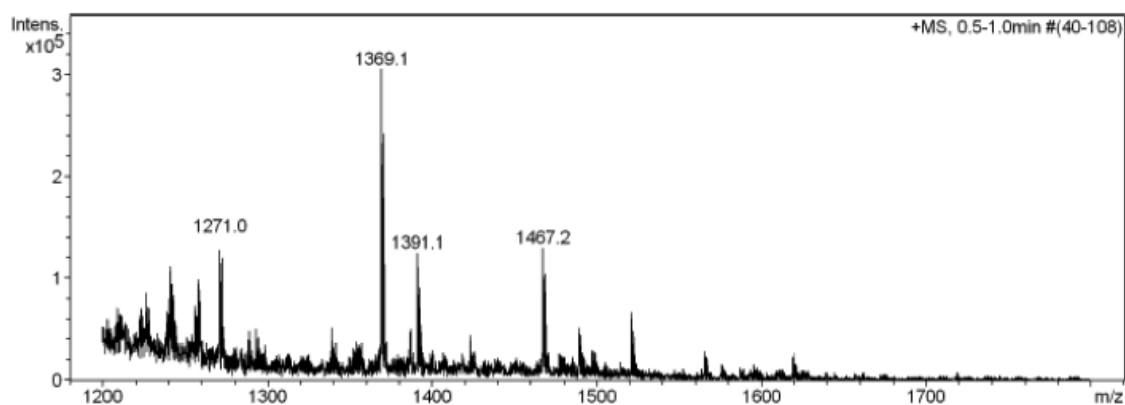
c(Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC590)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

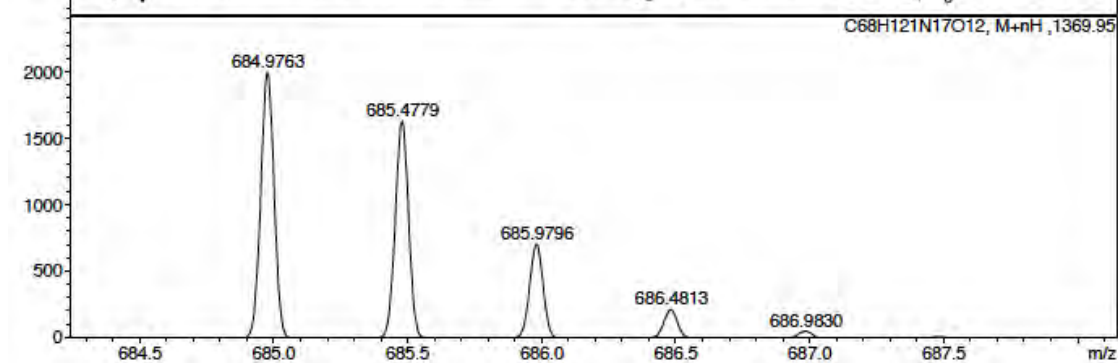
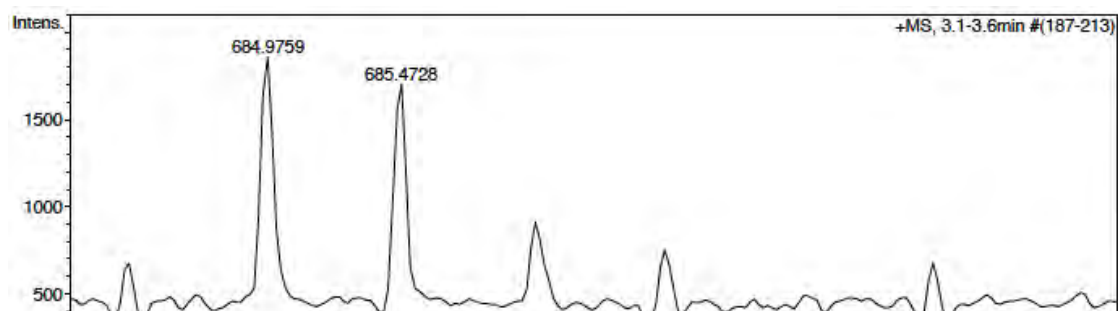
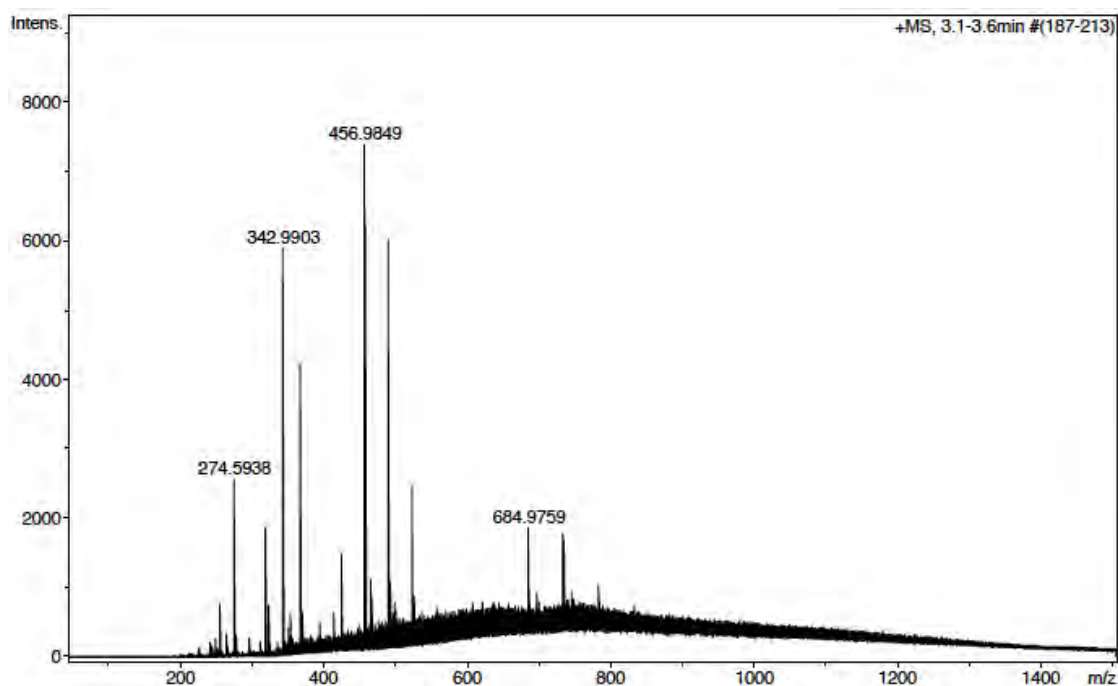


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,20	36,737	1,997	1,09
2	6,78	252,510	181,604	98,91
Total:		289,248	183,601	100,00

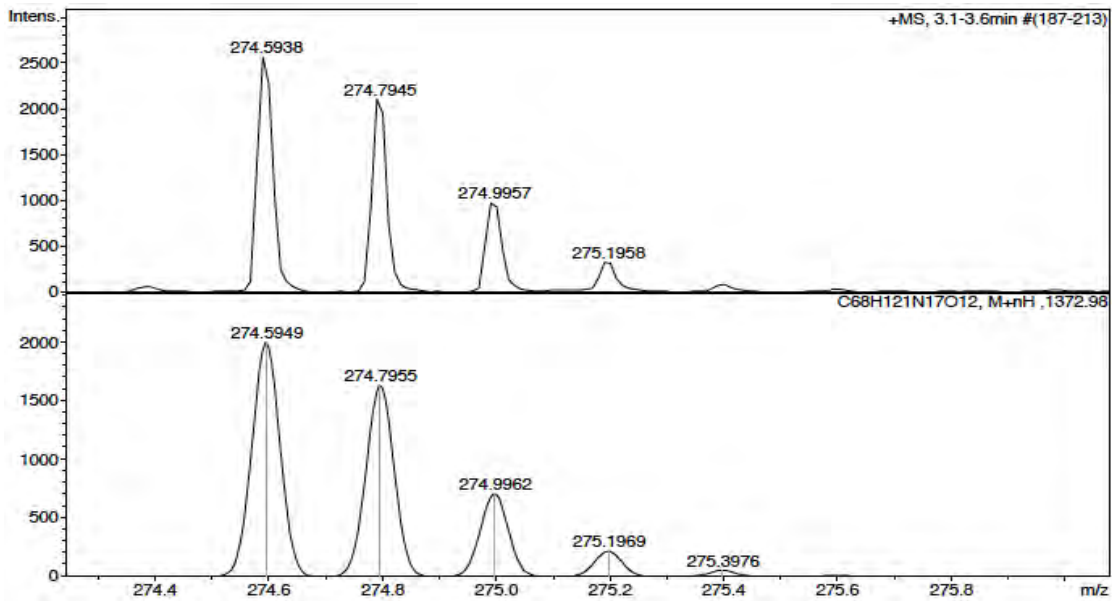
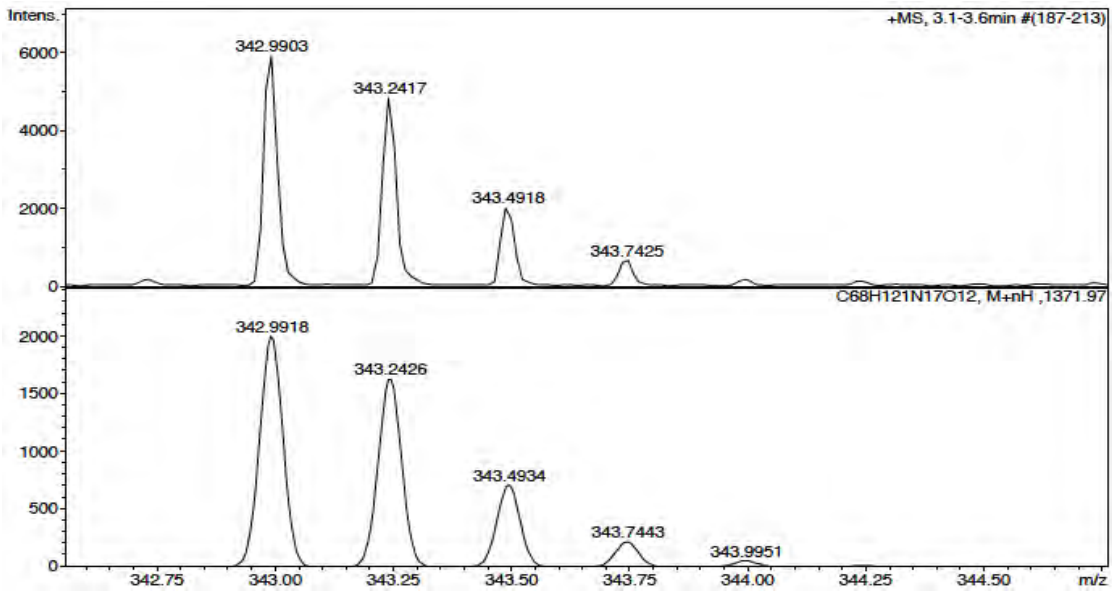
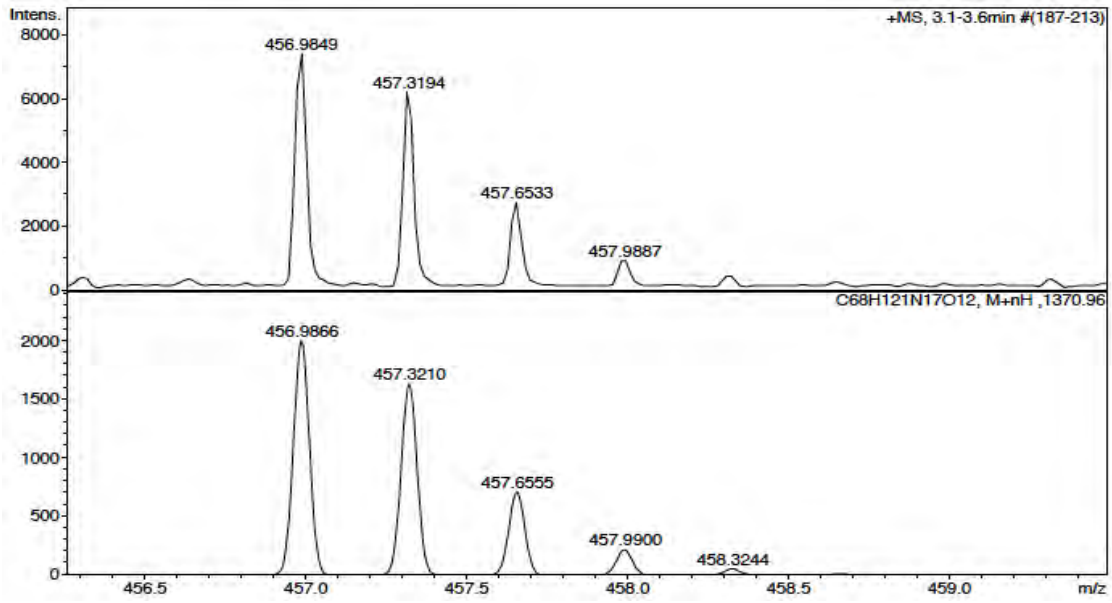
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

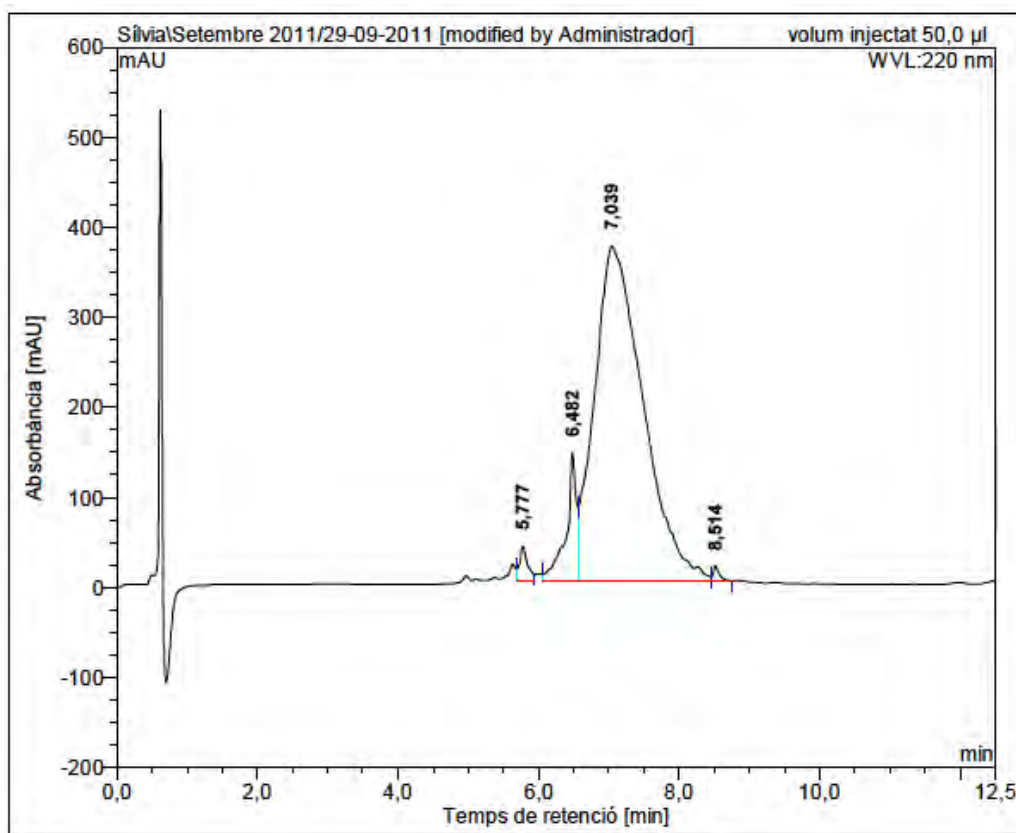






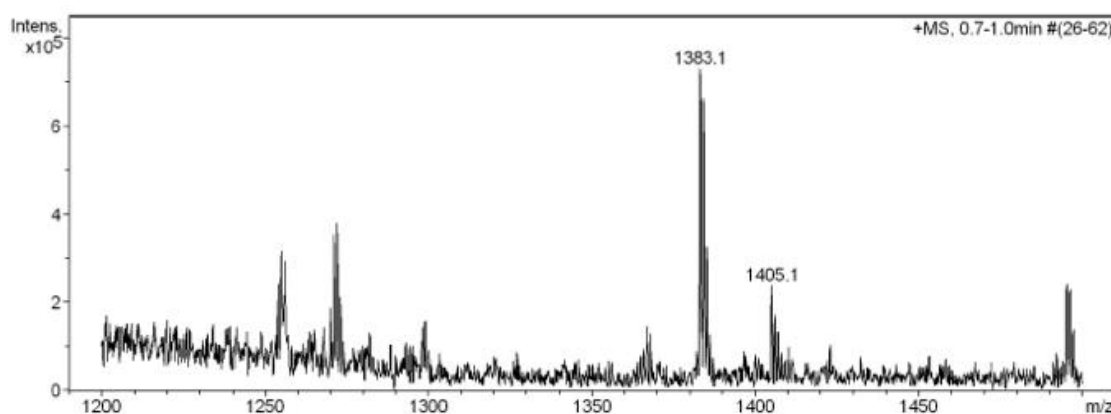
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC592)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

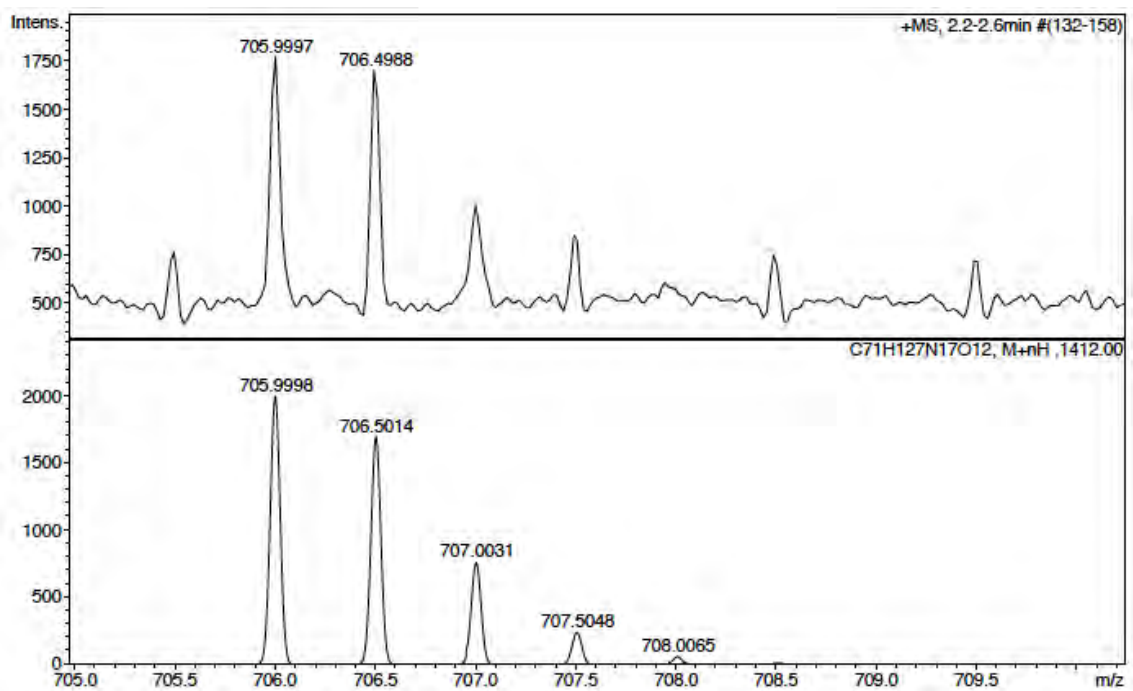
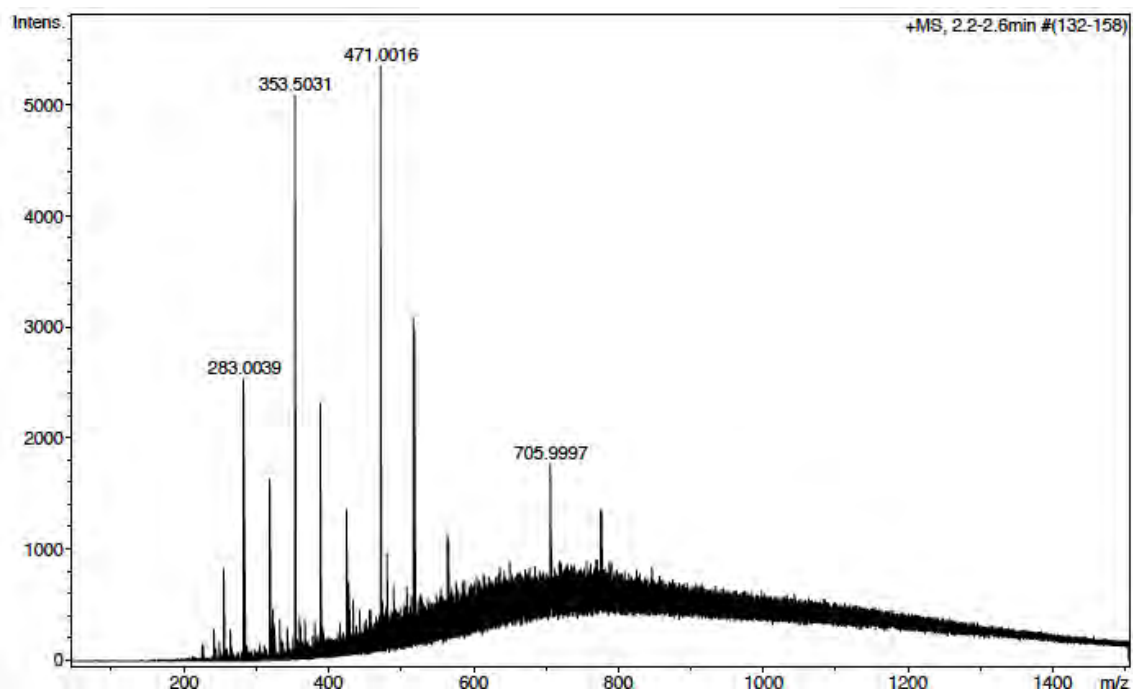


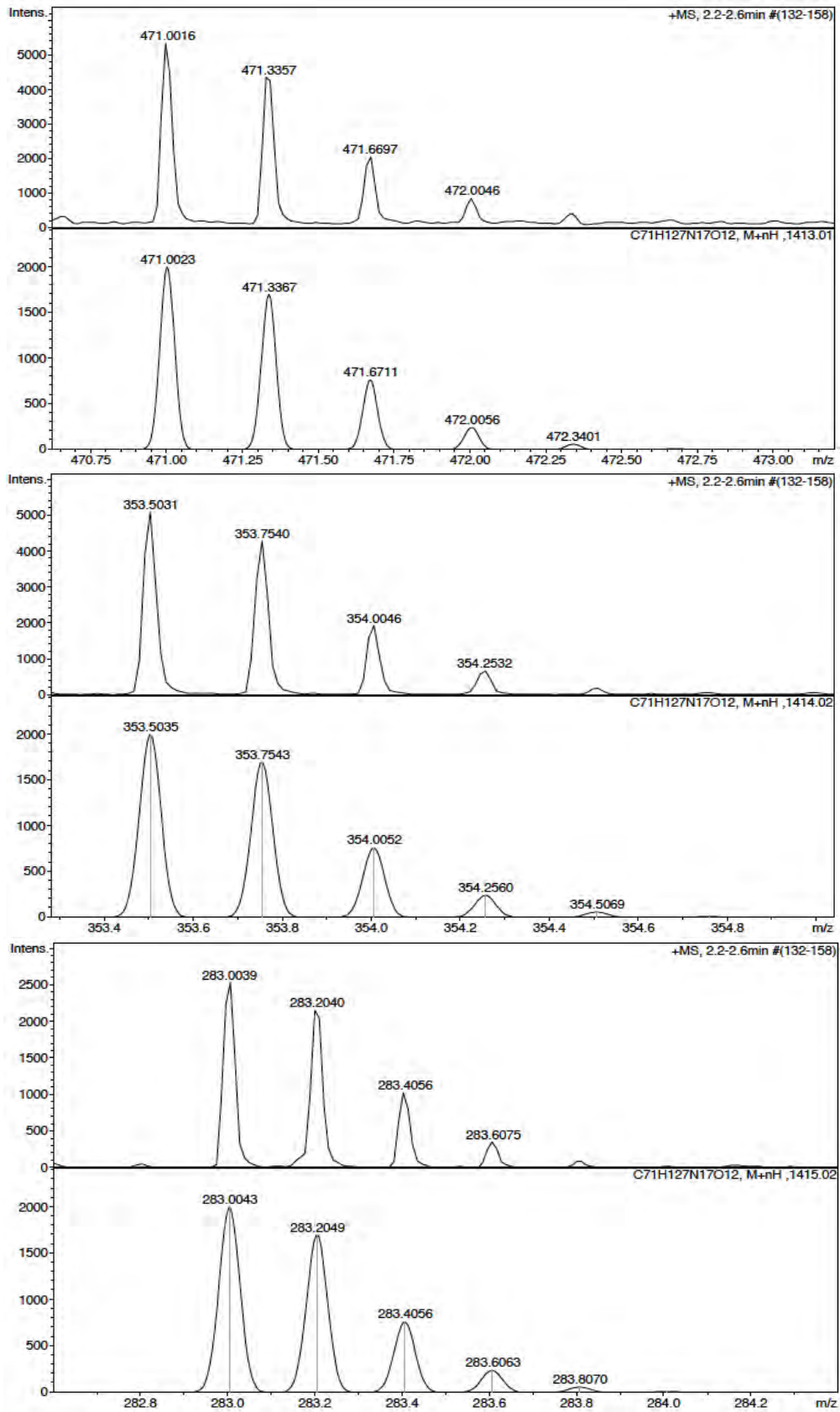
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,78	38,280	5,233	1,60
2	6,48	142,230	24,015	7,32
3	7,04	372,146	296,912	90,56
4	8,51	16,726	1,704	0,52
Total:		569,382	327,864	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



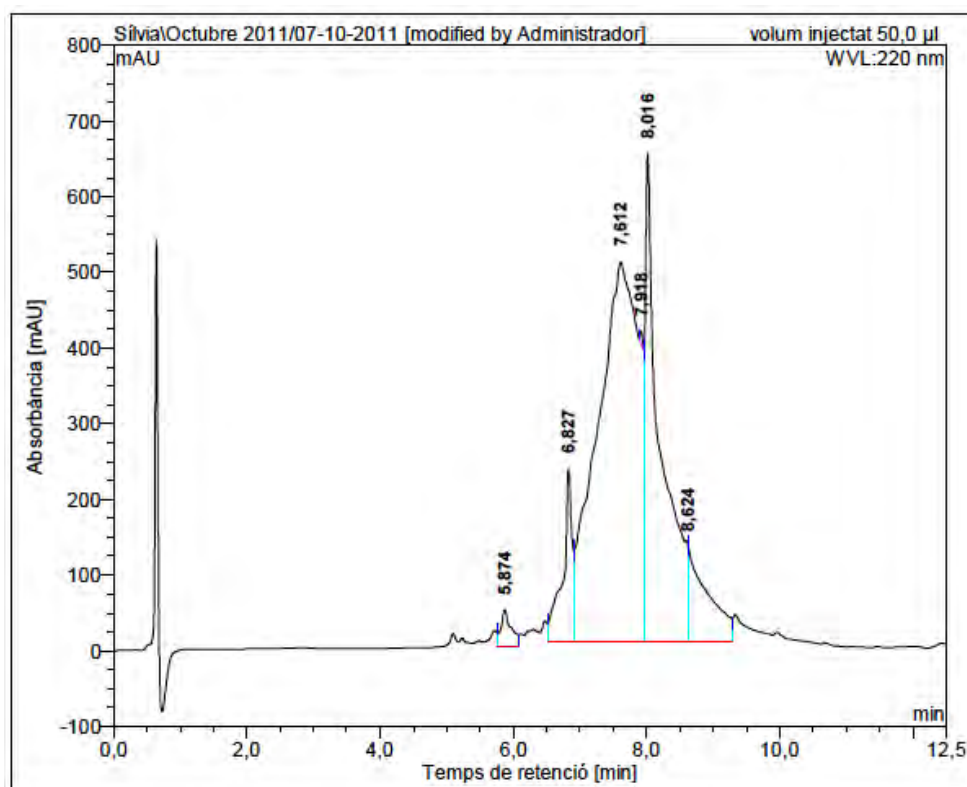
HRMS (ESI)  $m/z$





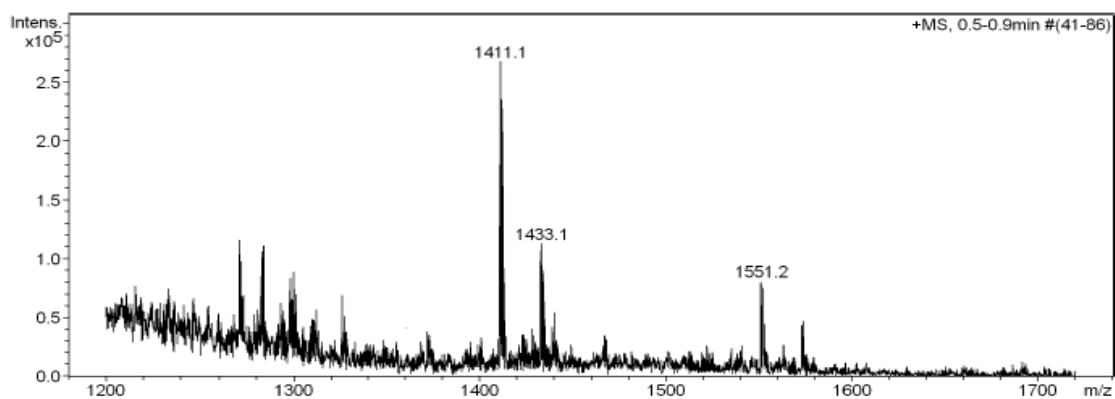
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC594)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



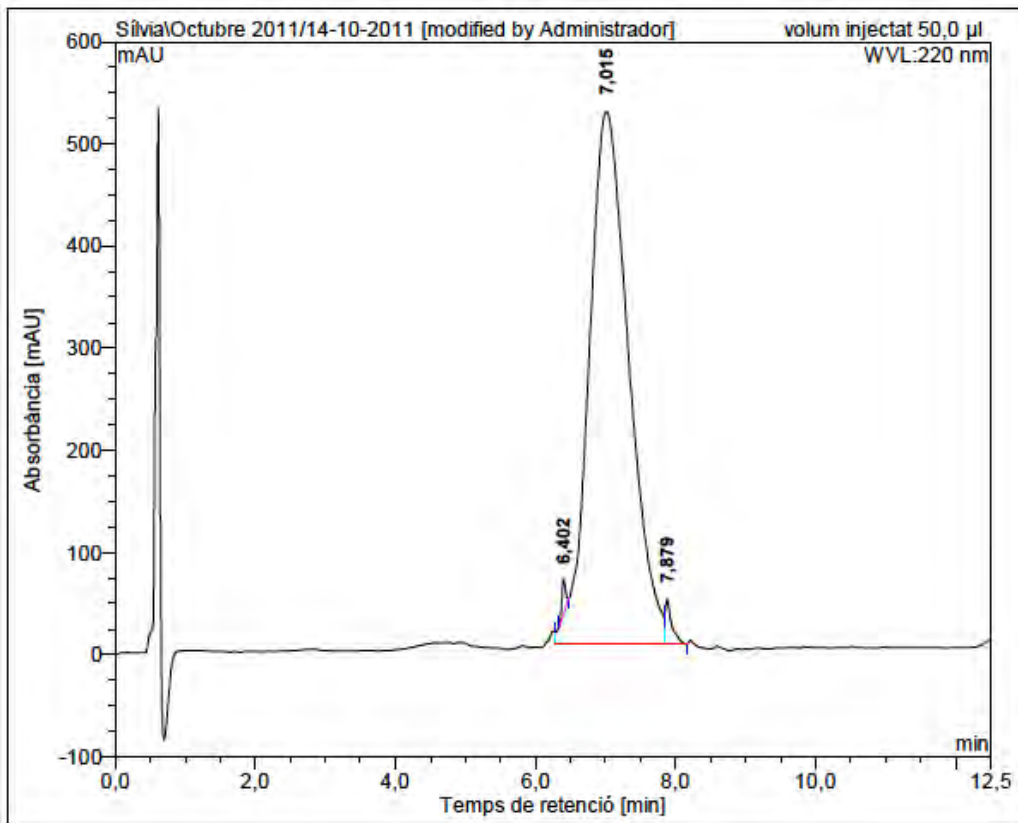
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,87	47,311	8,098	1,30
2	6,83	228,410	36,950	5,93
3	7,61	501,645	359,519	57,71
4	7,92	16,056	0,650	0,10
5	8,02	645,596	175,173	28,12
6	8,62	126,417	42,563	6,83
Total:		1565,435	622,952	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



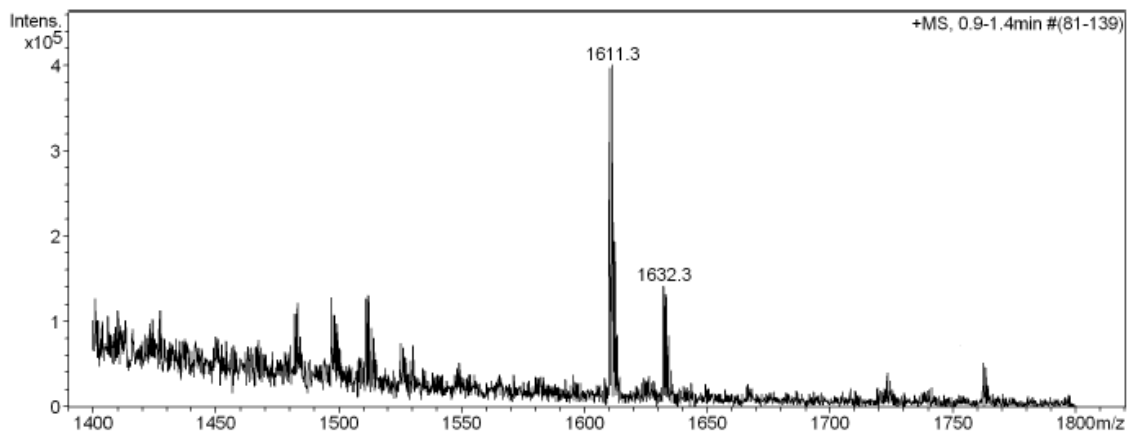
*c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(Leu-Lys-CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>))-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln* (BPC596)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

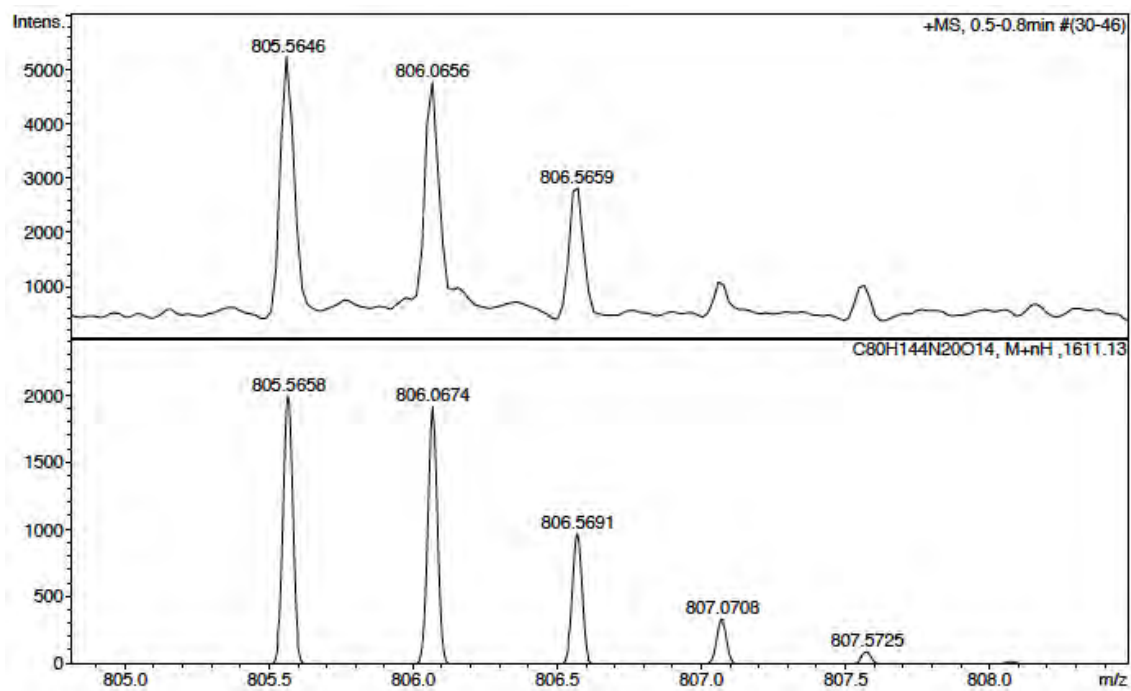
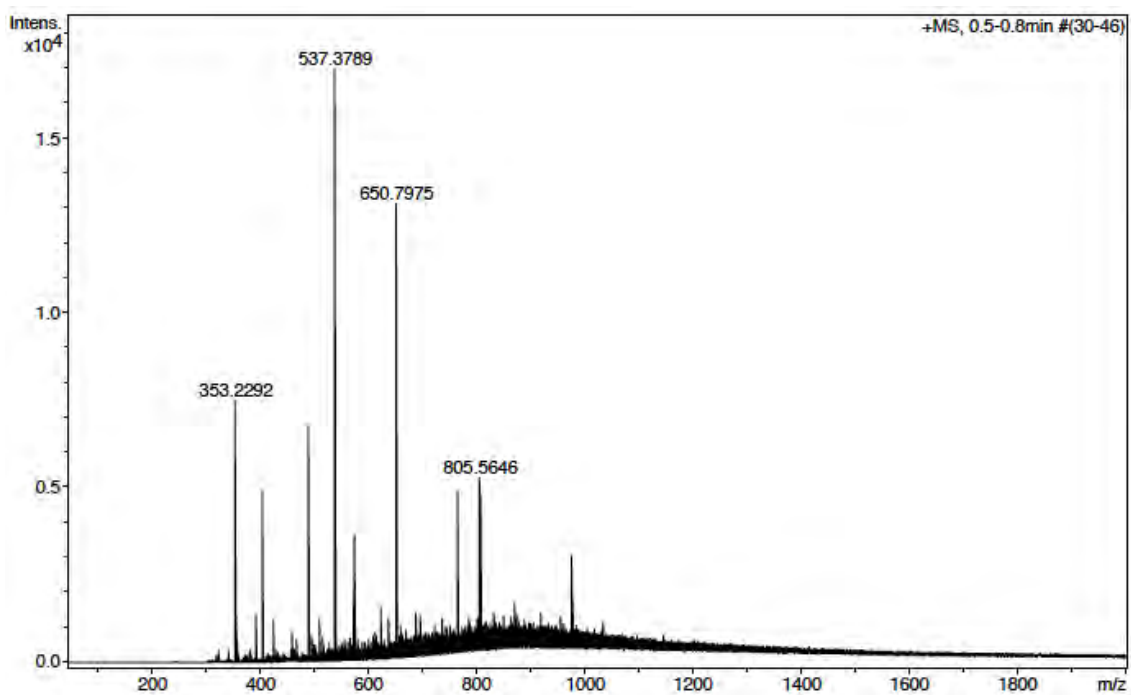


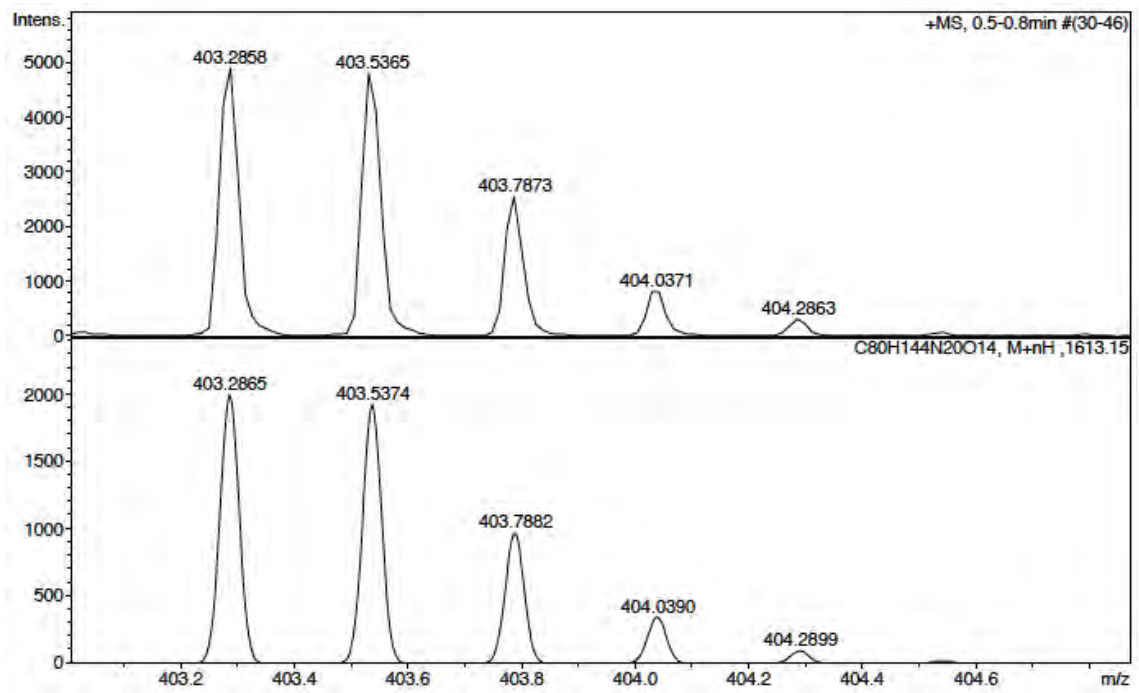
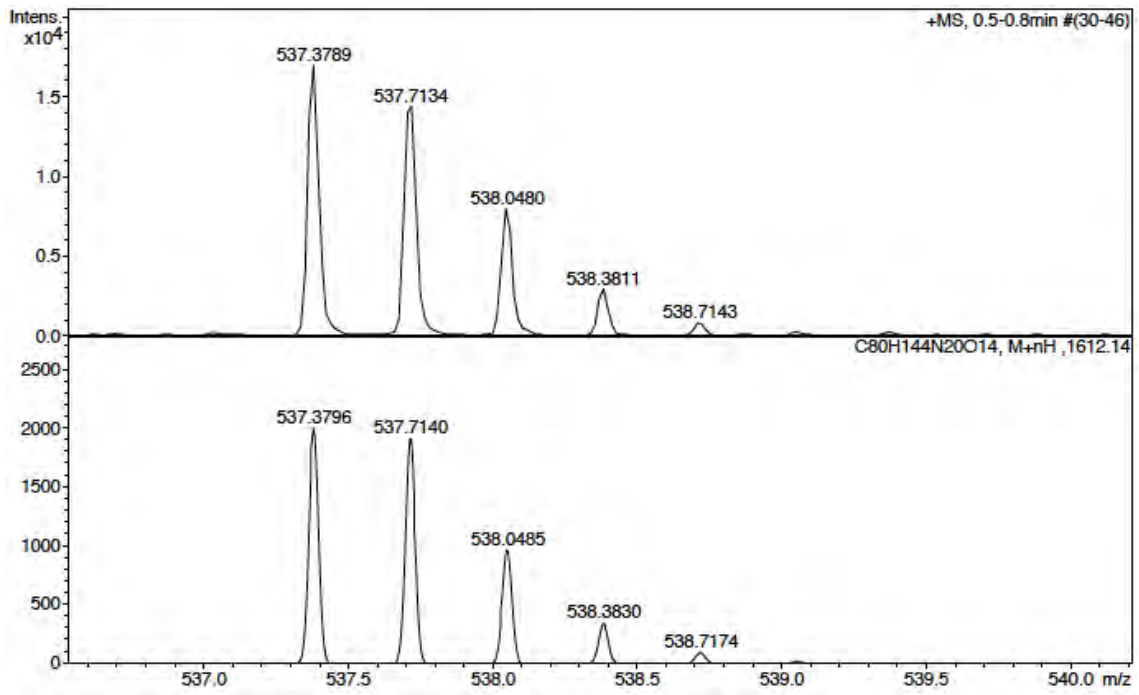
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,40	33,242	1,998	0,57
2	7,02	521,302	341,397	98,00
3	7,88	43,752	4,963	1,42
Total:		598,296	348,358	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

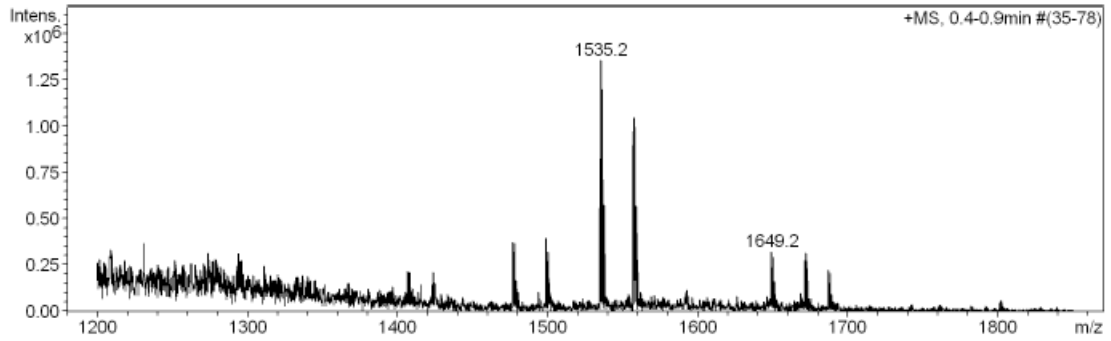




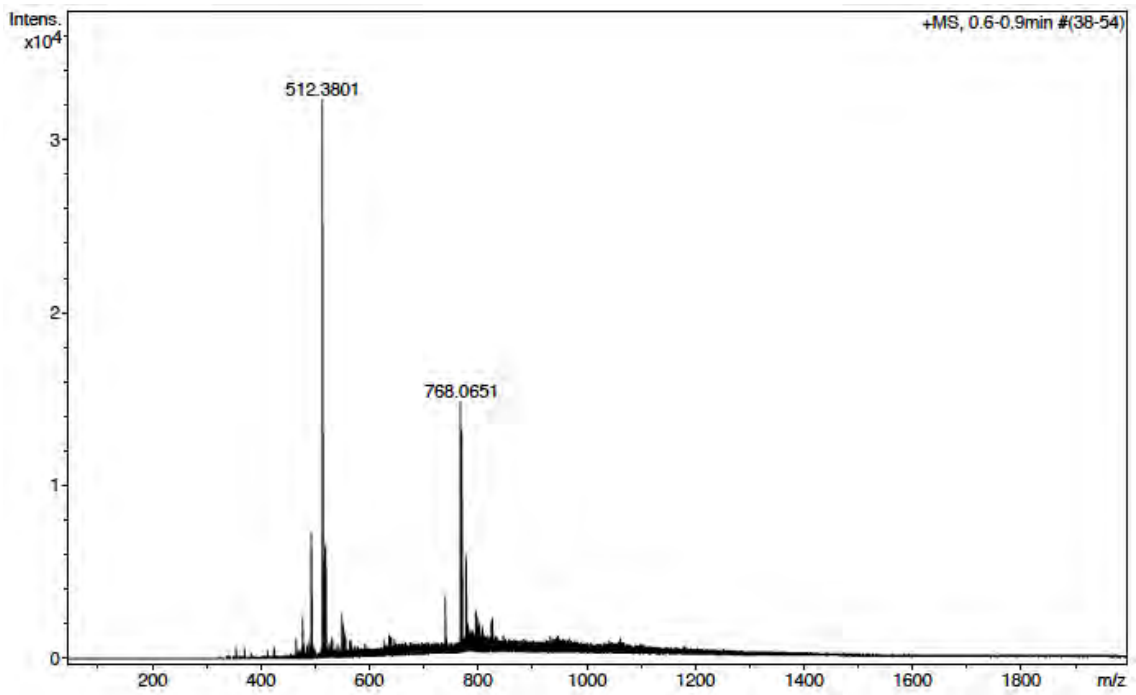


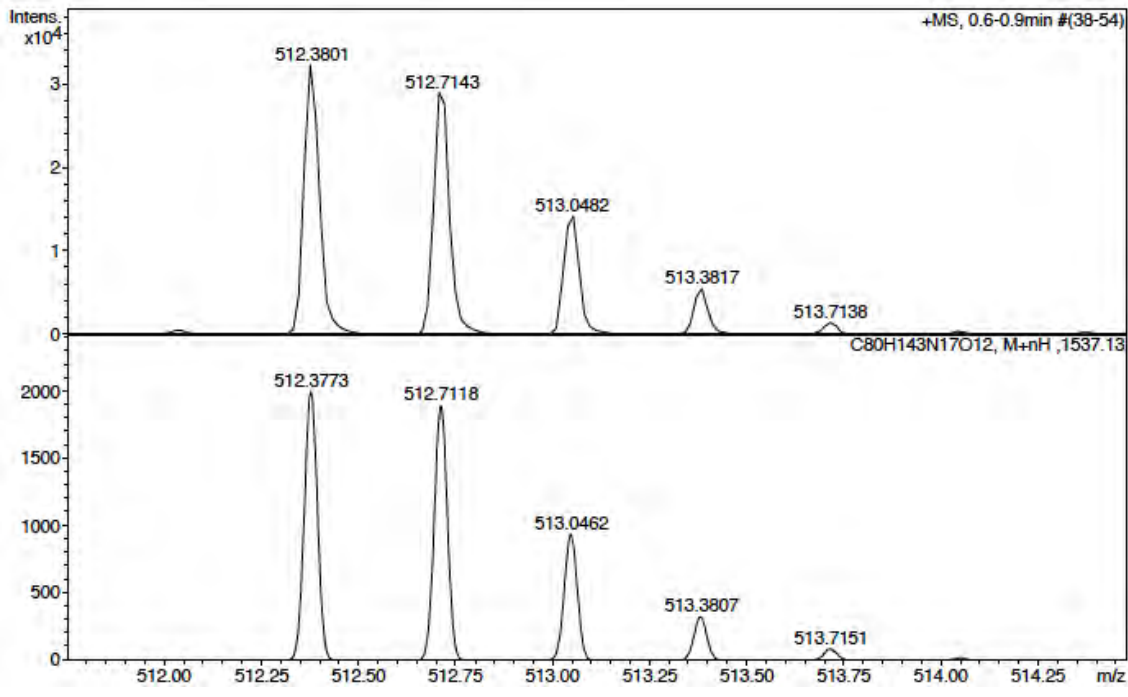
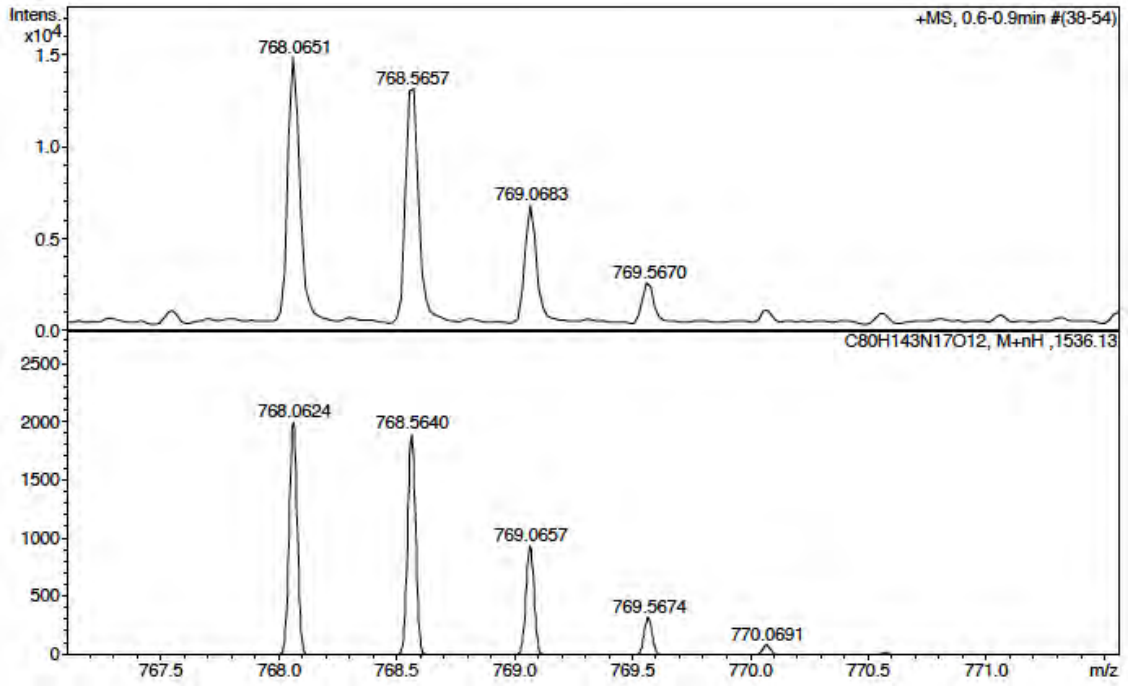
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC622)

ESI-MS(m/z)



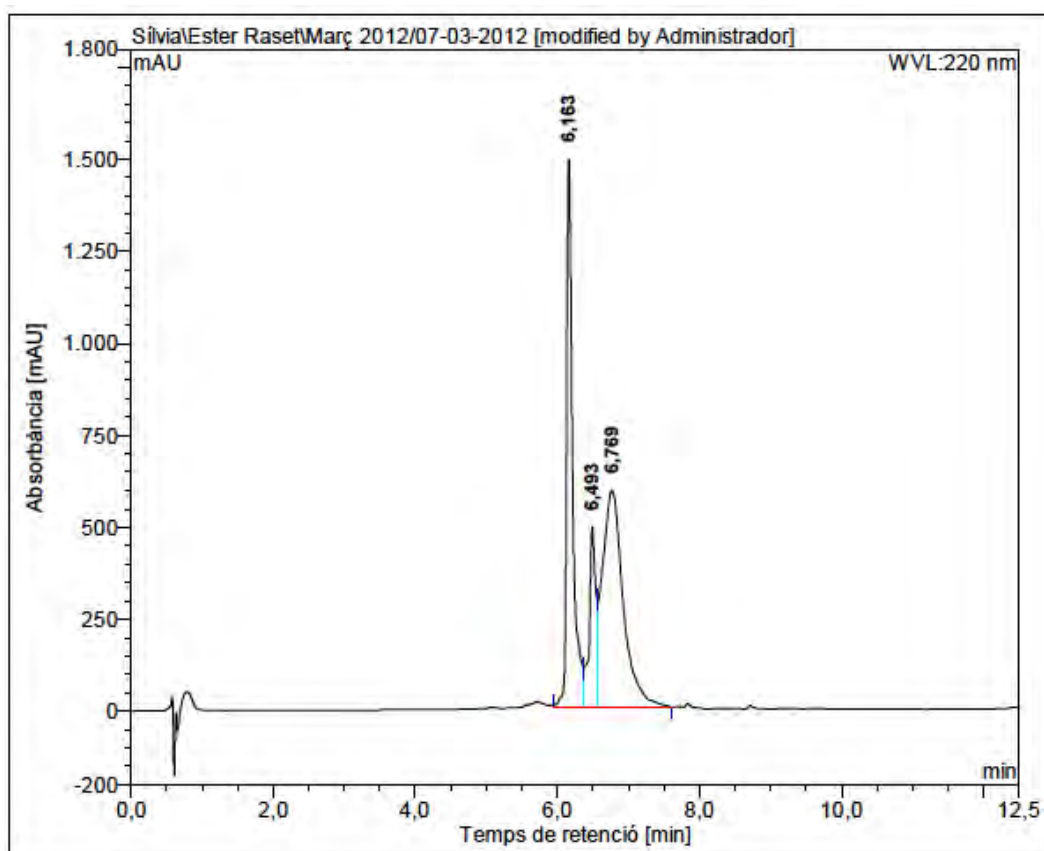
HRMS (ESI) m/z





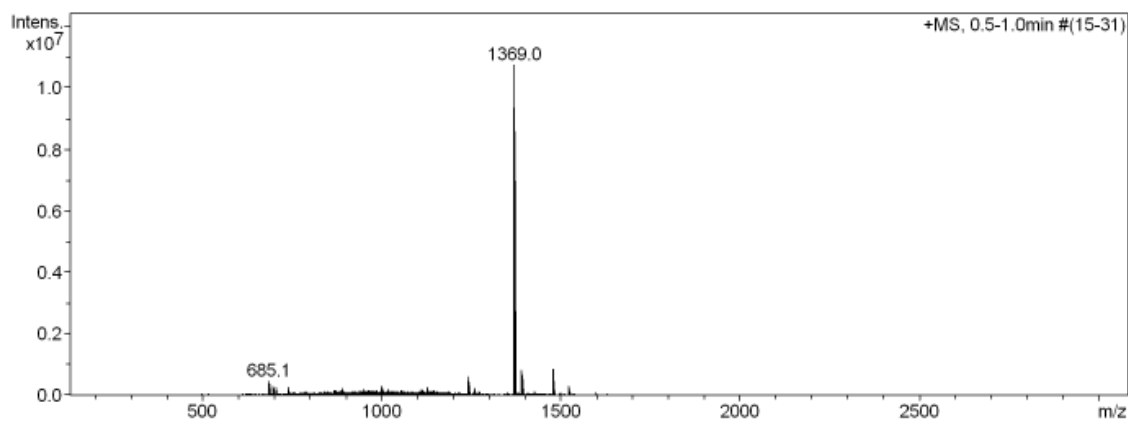
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC624)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

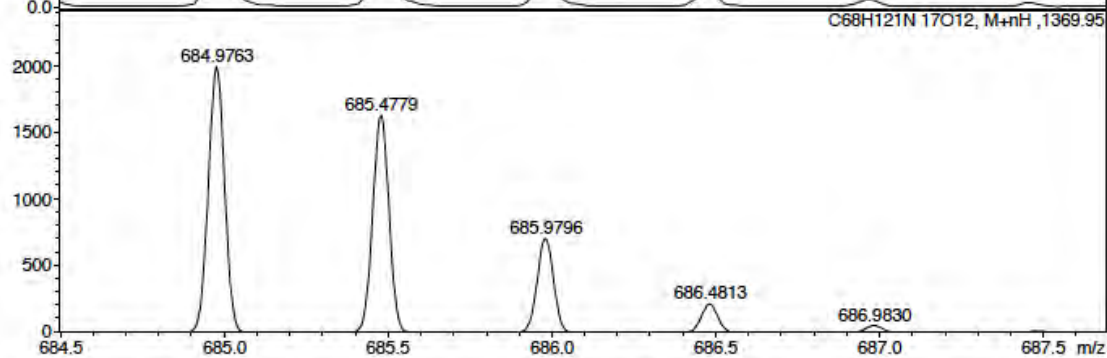
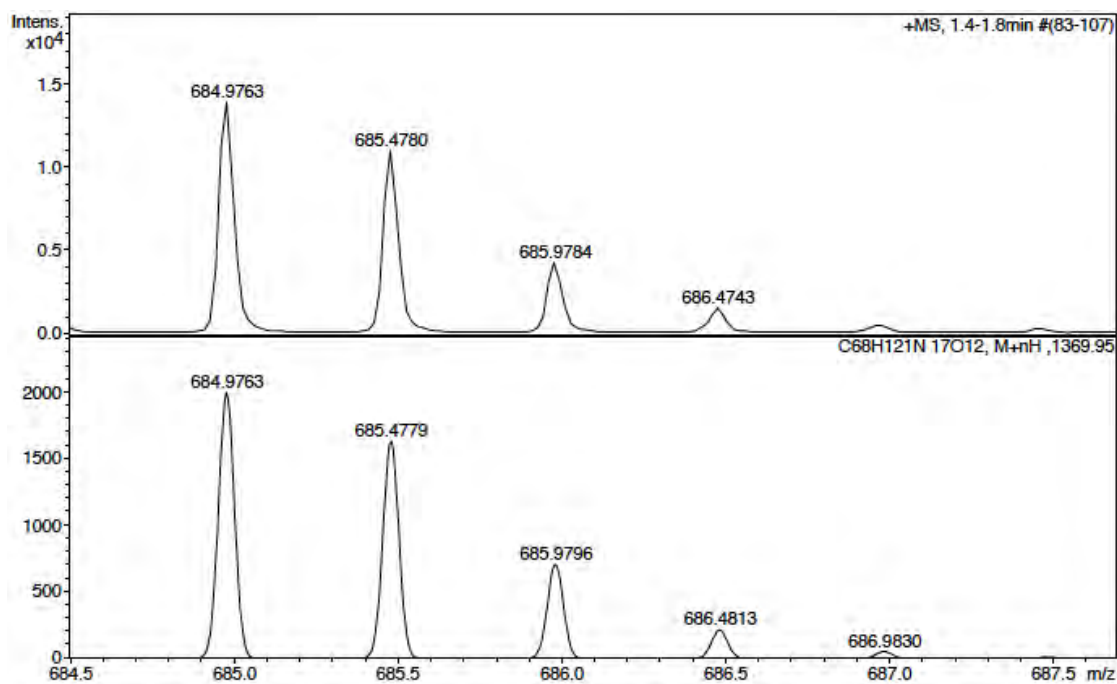
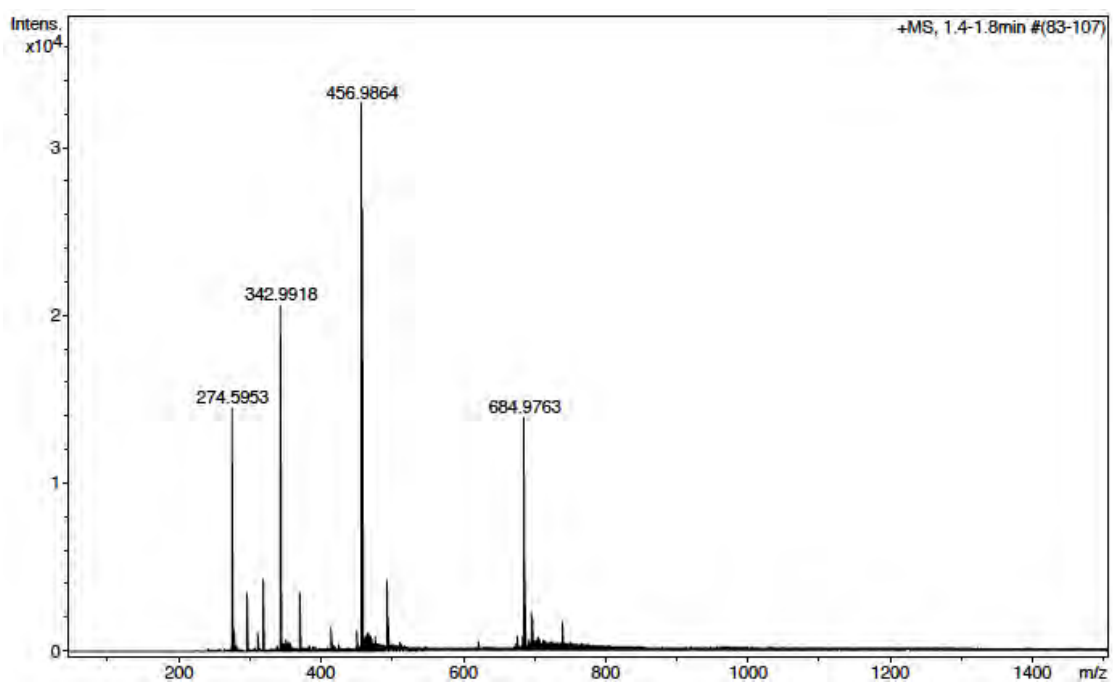


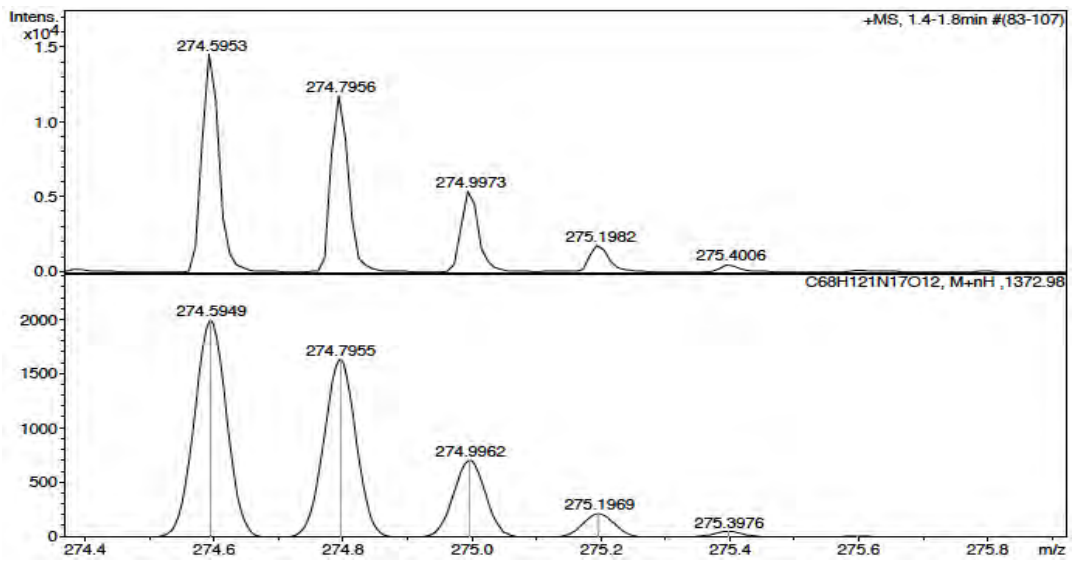
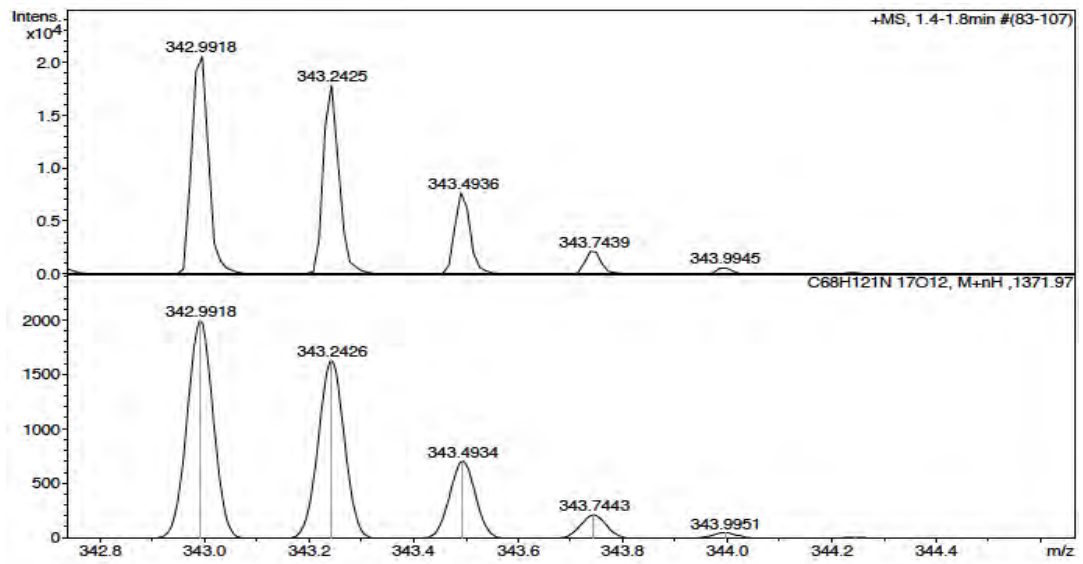
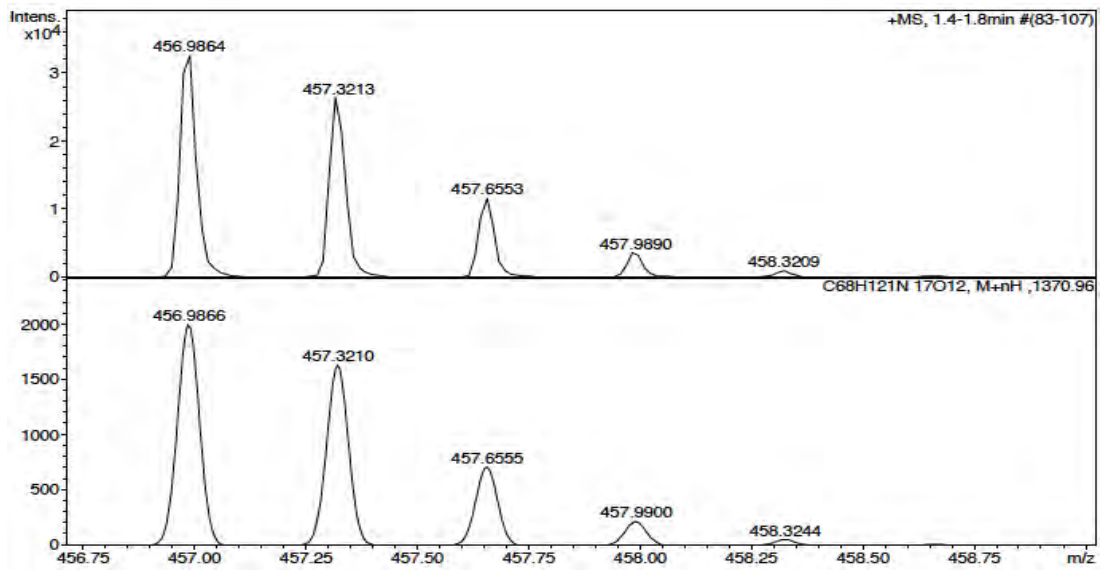
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,16	1488,182	148,755	36,99
2	6,49	489,061	53,783	13,37
3	6,77	588,803	199,595	49,63
Total:		2566,046	402,133	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



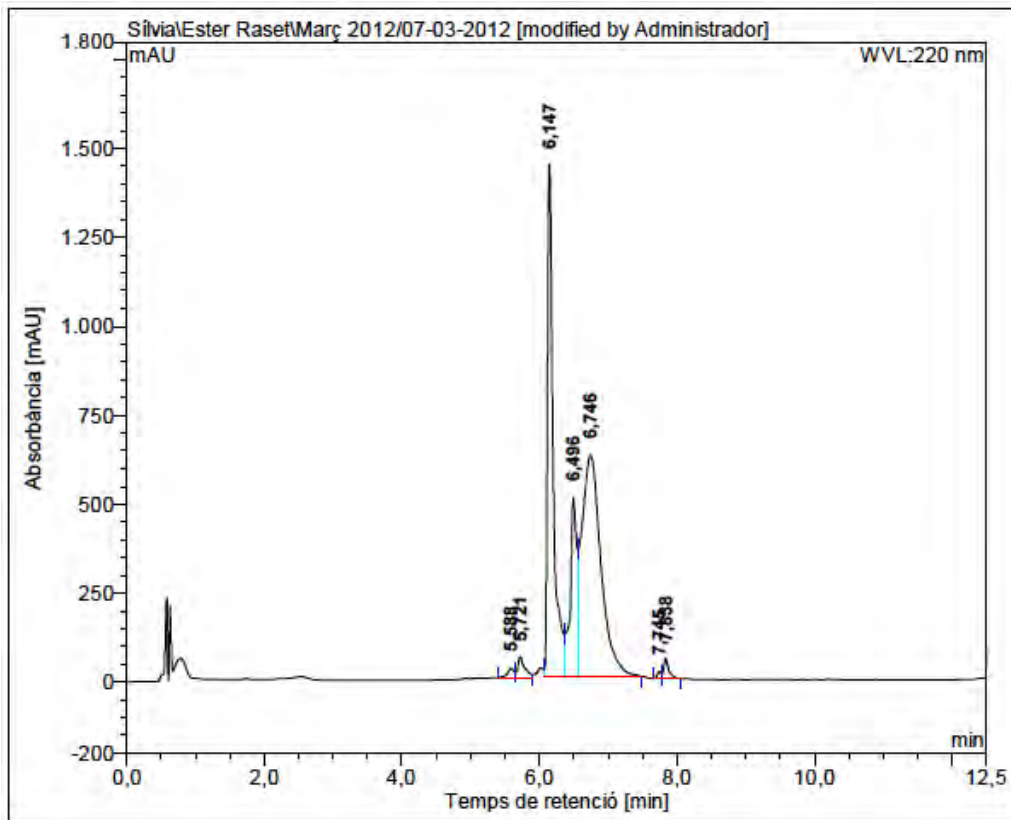
HRMS (ESI)  $m/z$





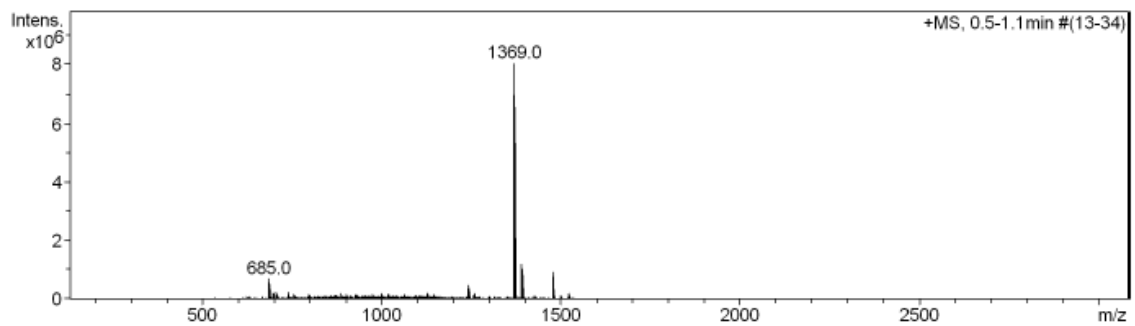
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-isoC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC626)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

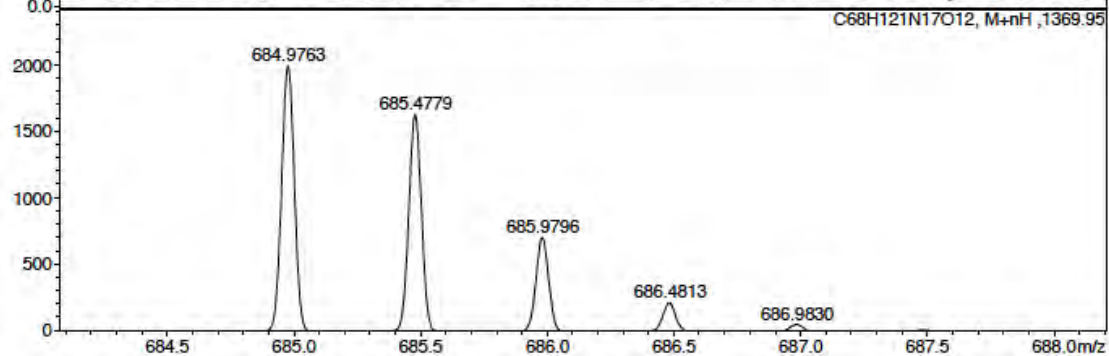
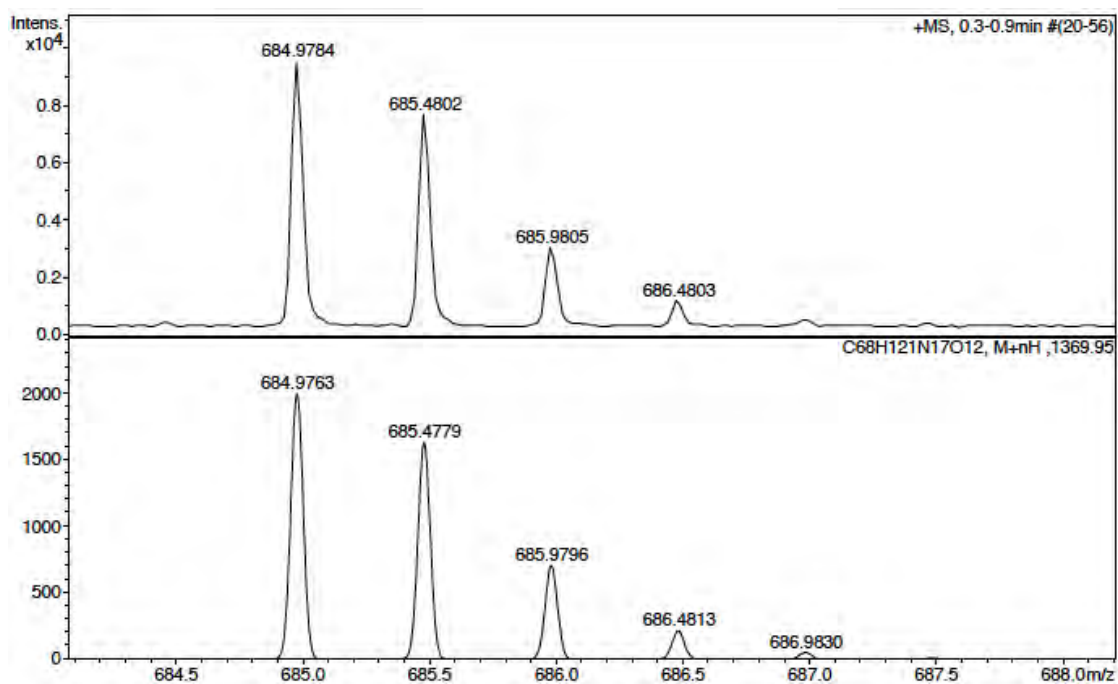
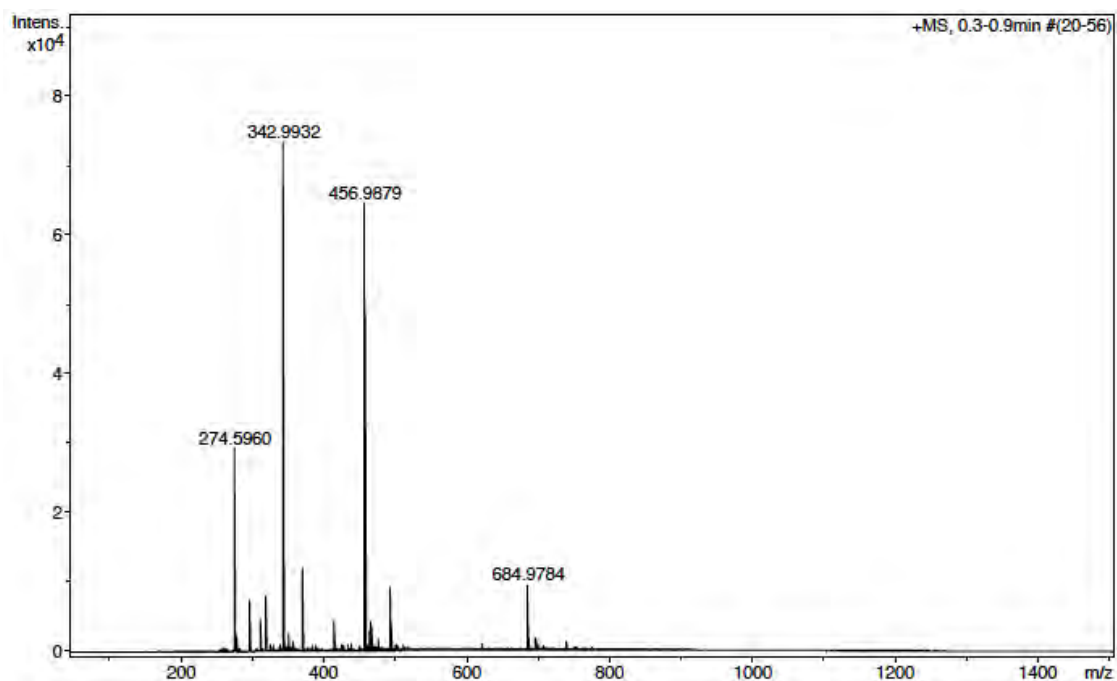


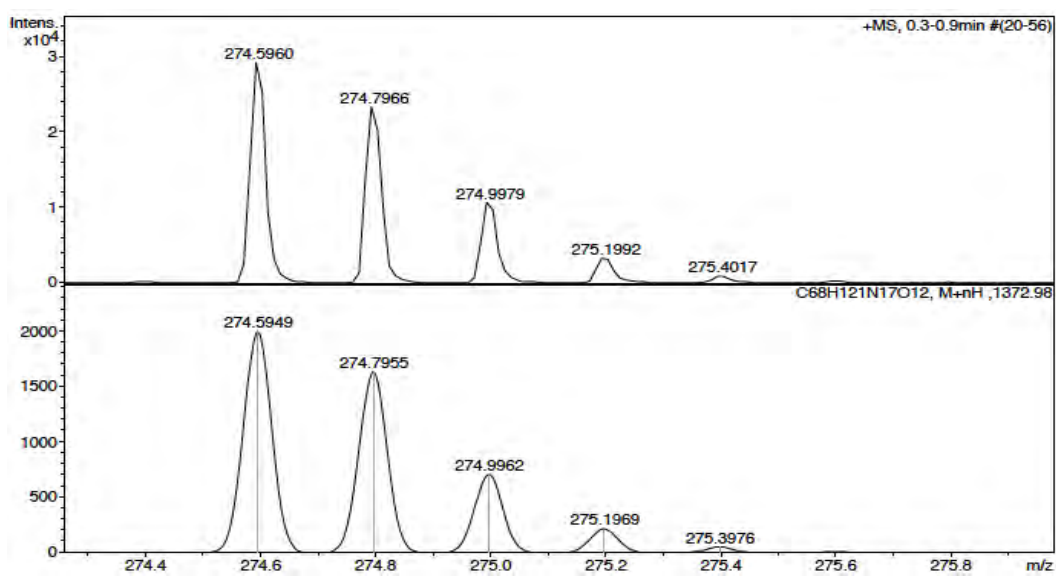
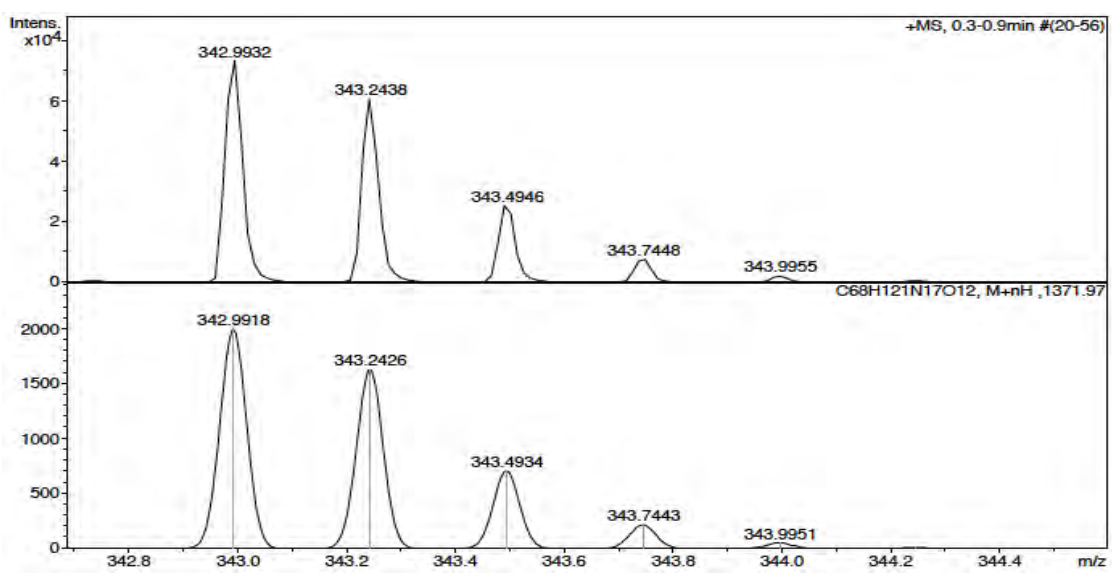
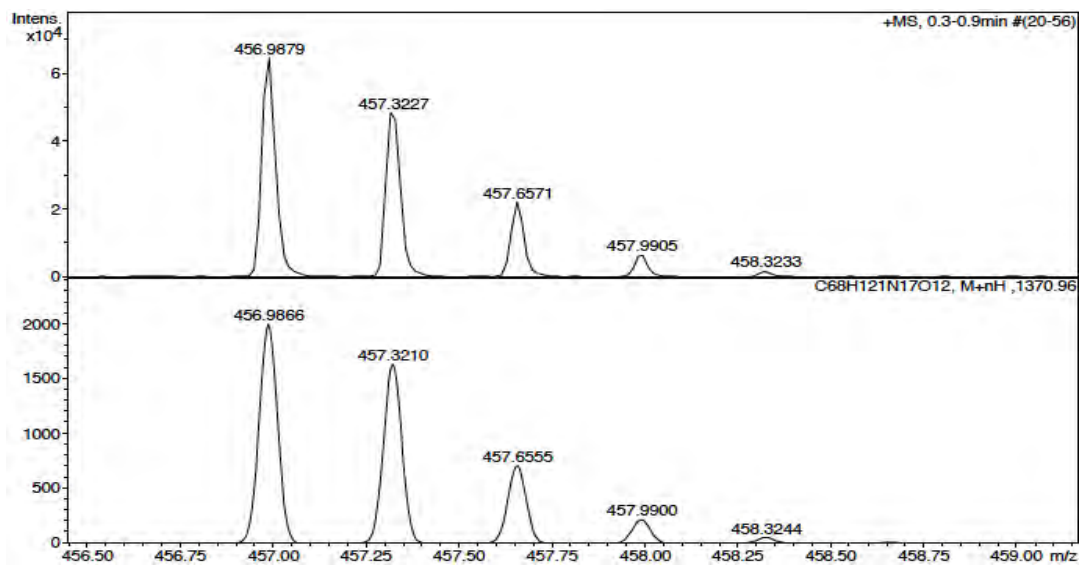
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,59	26,499	2,918	0,70
2	5,72	57,982	6,741	1,62
3	6,15	1439,305	140,758	33,91
4	6,50	503,092	56,530	13,62
5	6,75	621,483	202,152	48,70
6	7,75	19,768	1,262	0,30
7	7,84	56,782	4,726	1,14
Total:		2724,911	415,088	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

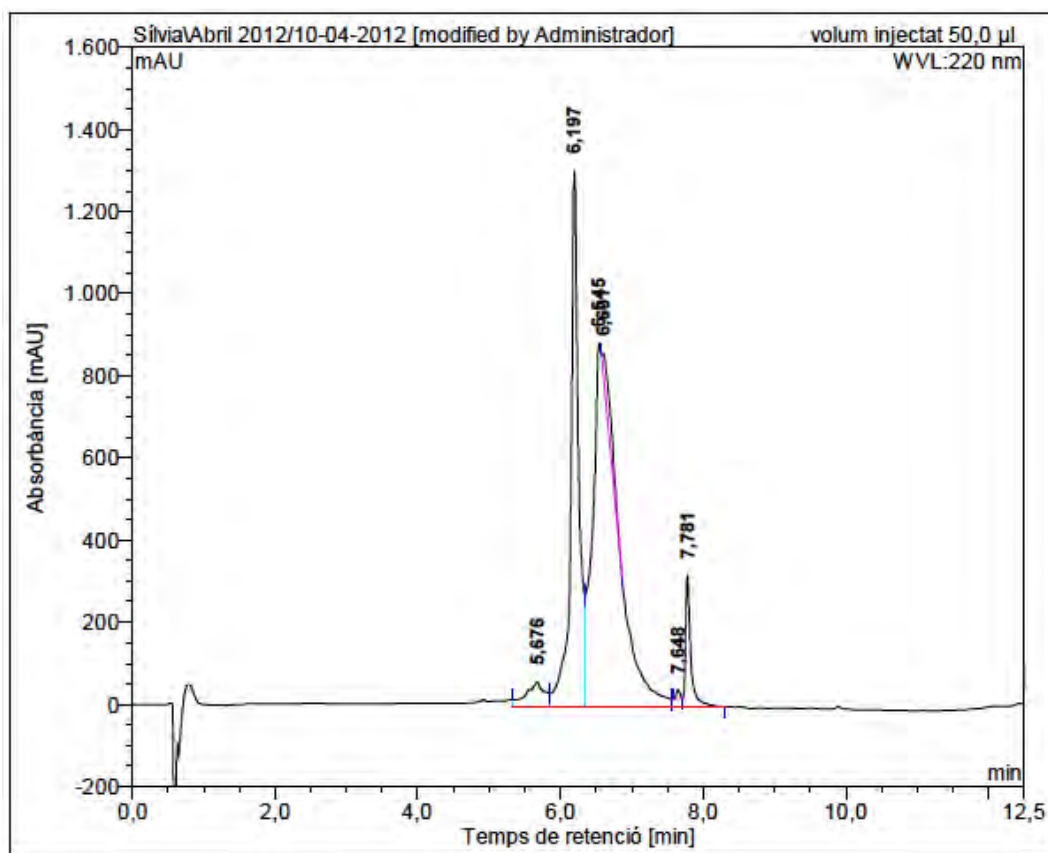






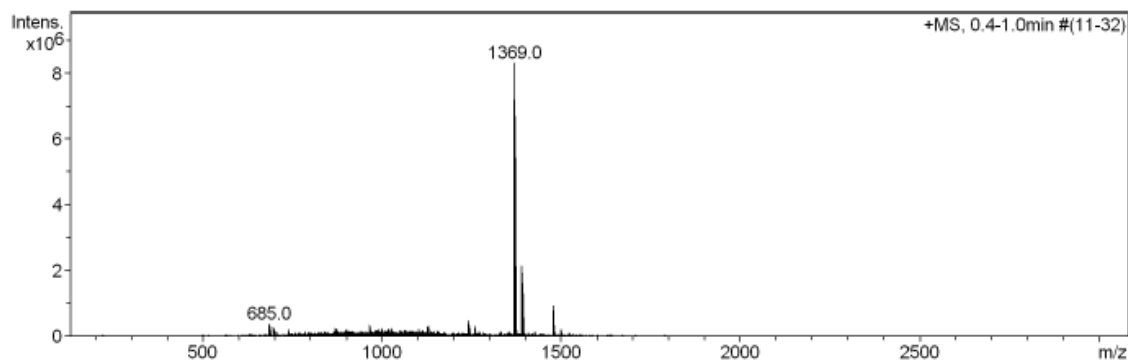
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC628)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

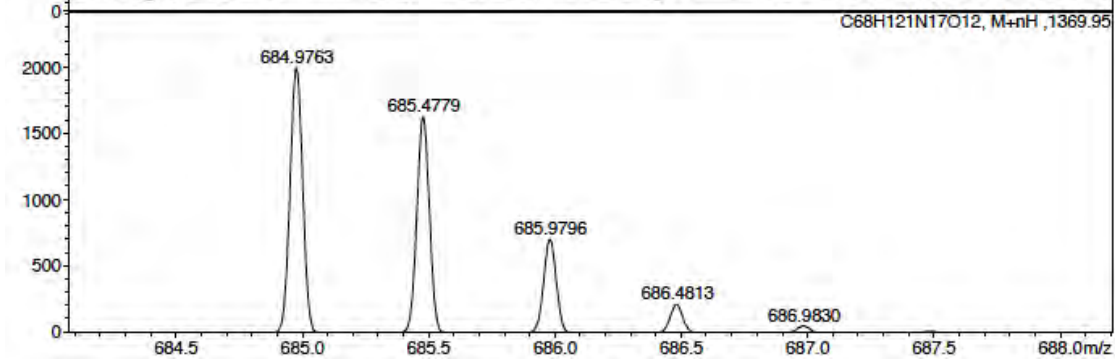
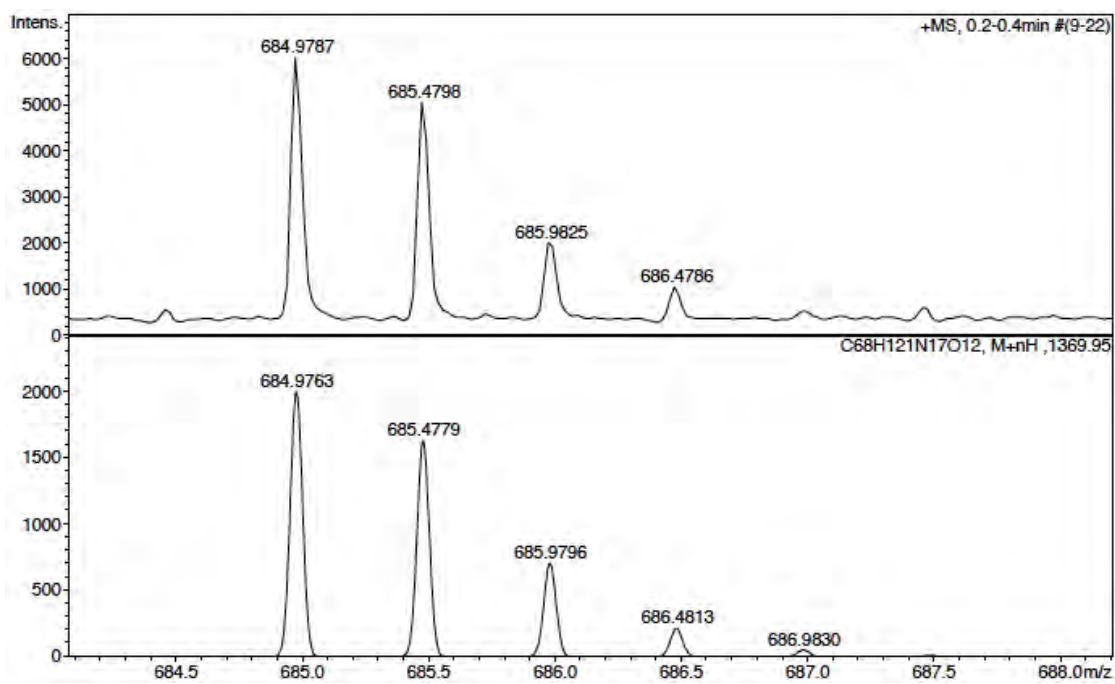
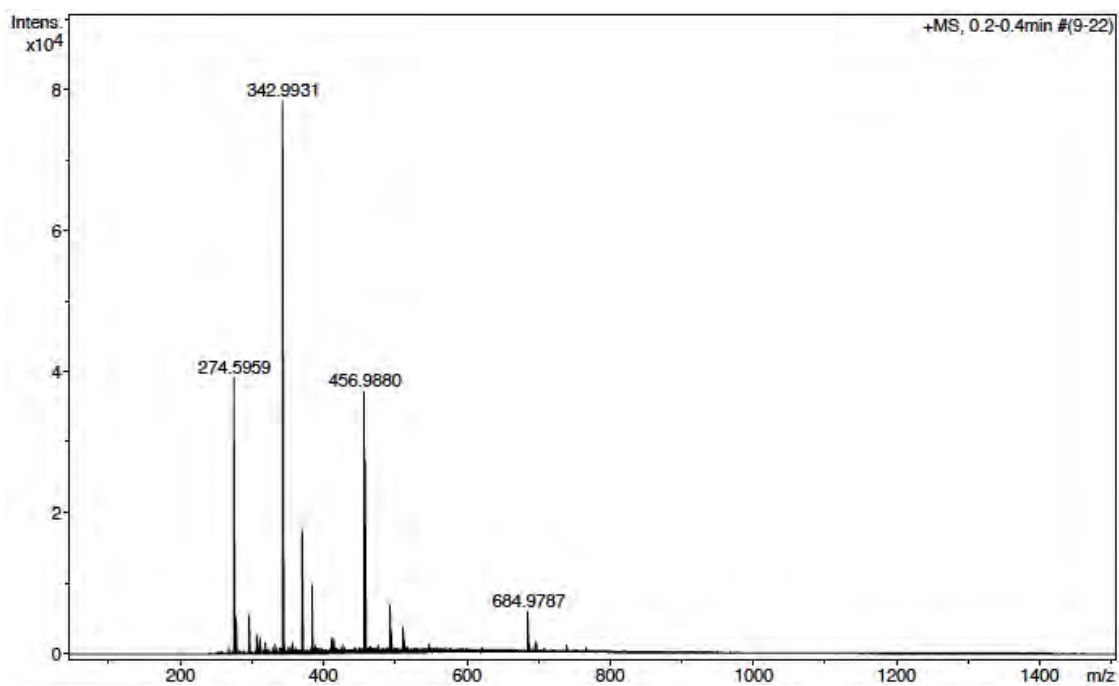


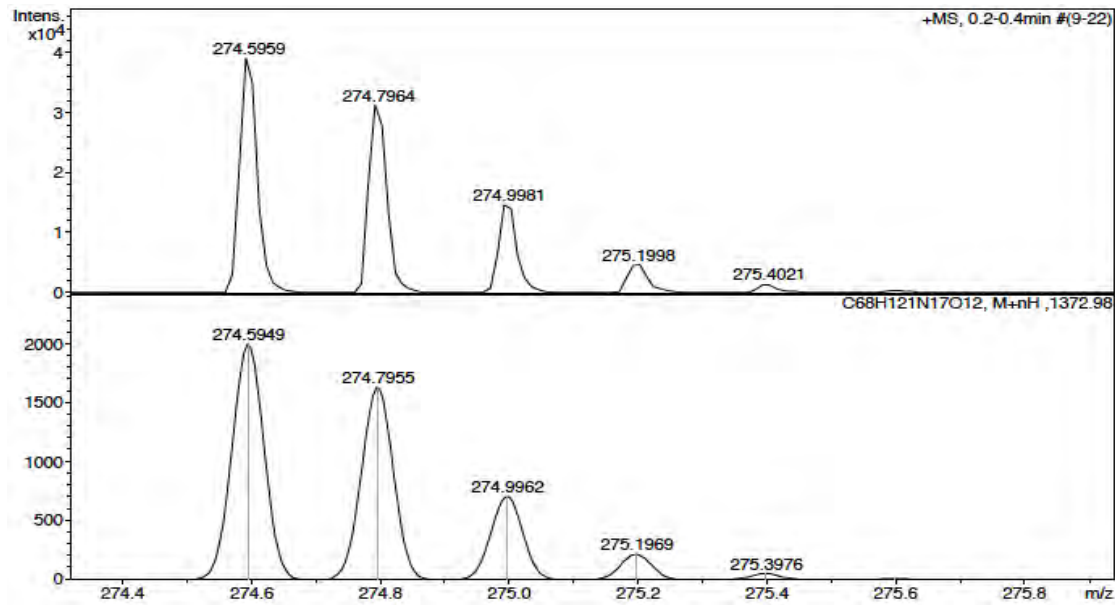
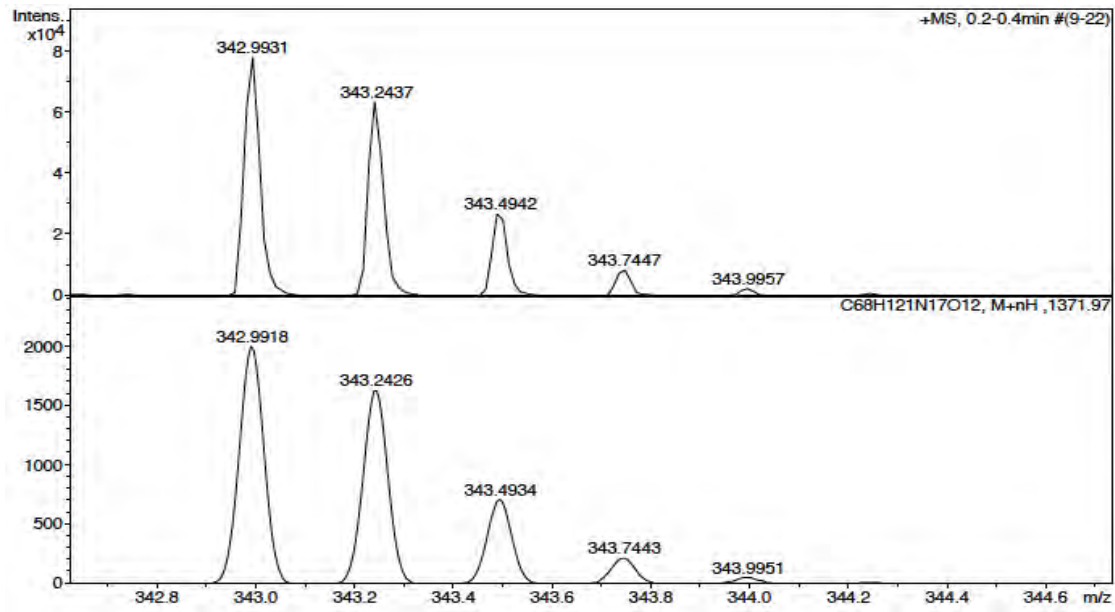
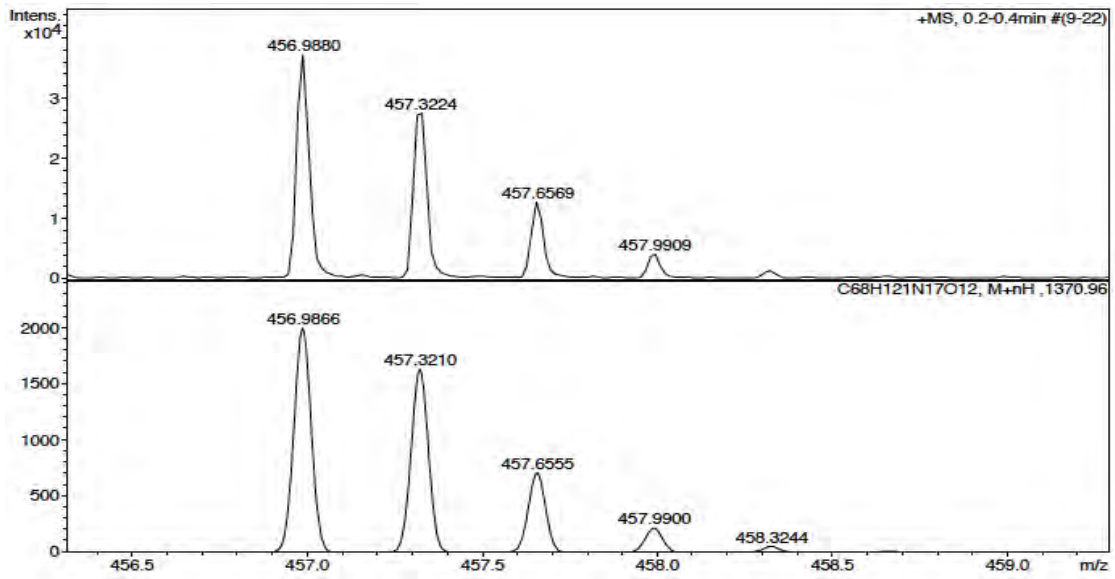
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,68	60,445	18,400	3,12
2	6,20	1305,733	171,820	29,11
3	6,54	885,935	355,109	60,15
4	6,60	42,248	13,699	2,32
5	7,65	21,964	1,265	0,21
6	7,78	320,722	30,033	5,09
Total:		2637,048	590,327	100,00

ESI-MS (*m/z*)



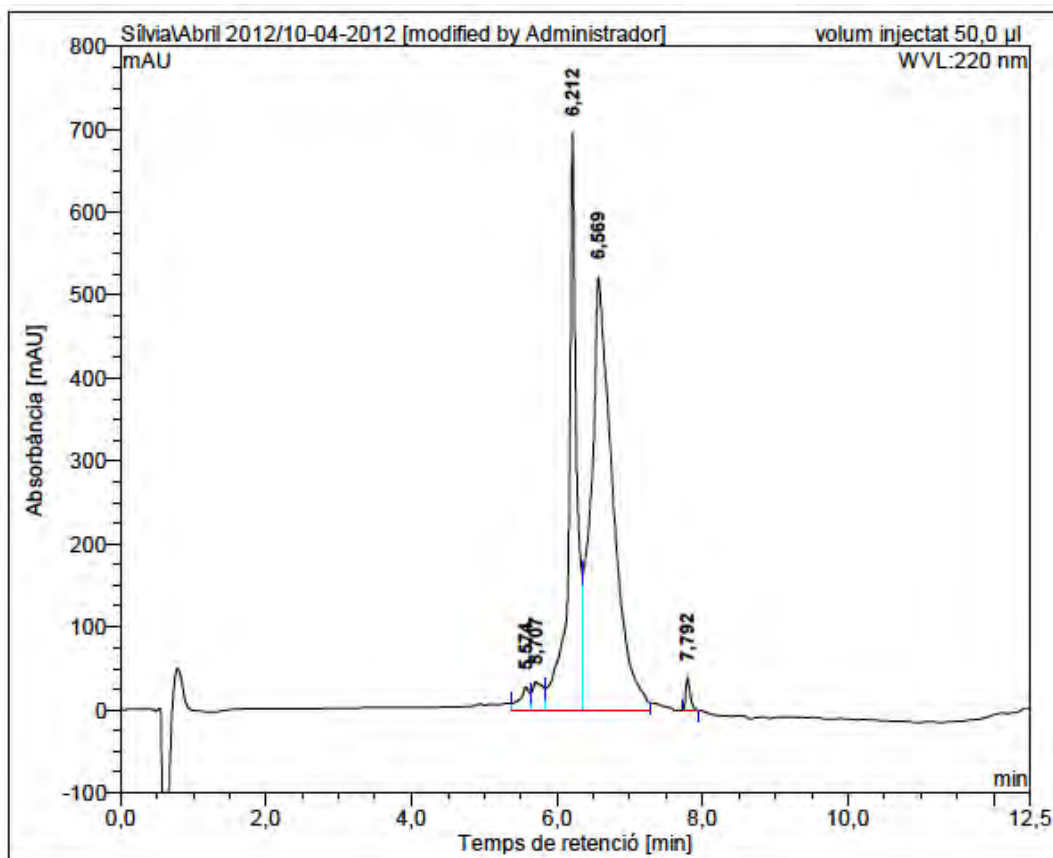
HRMS (ESI)  $m/z$





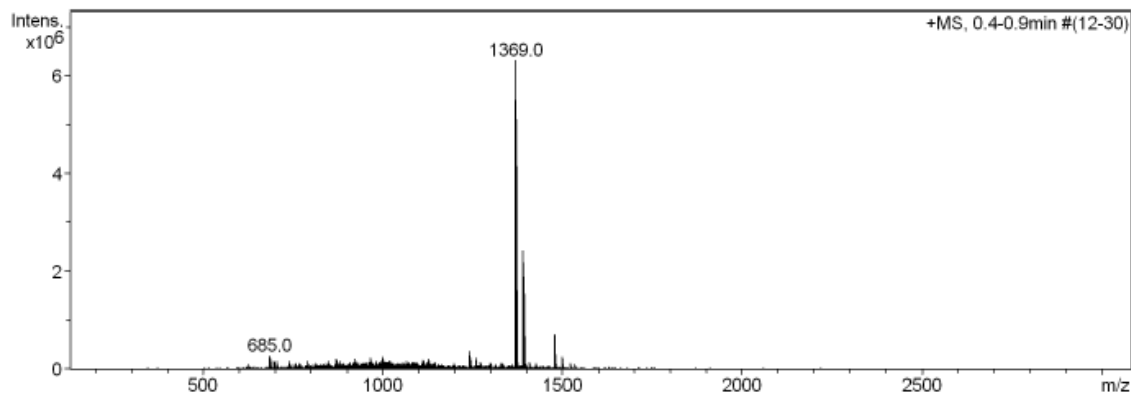
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-isoC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC630)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

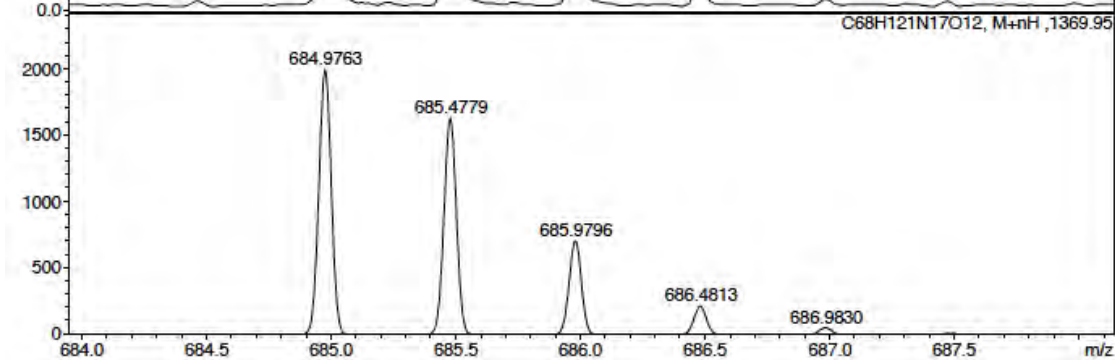
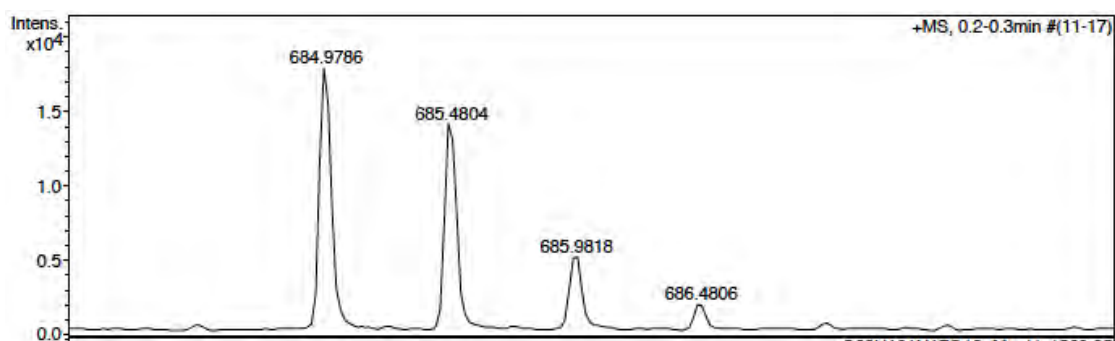
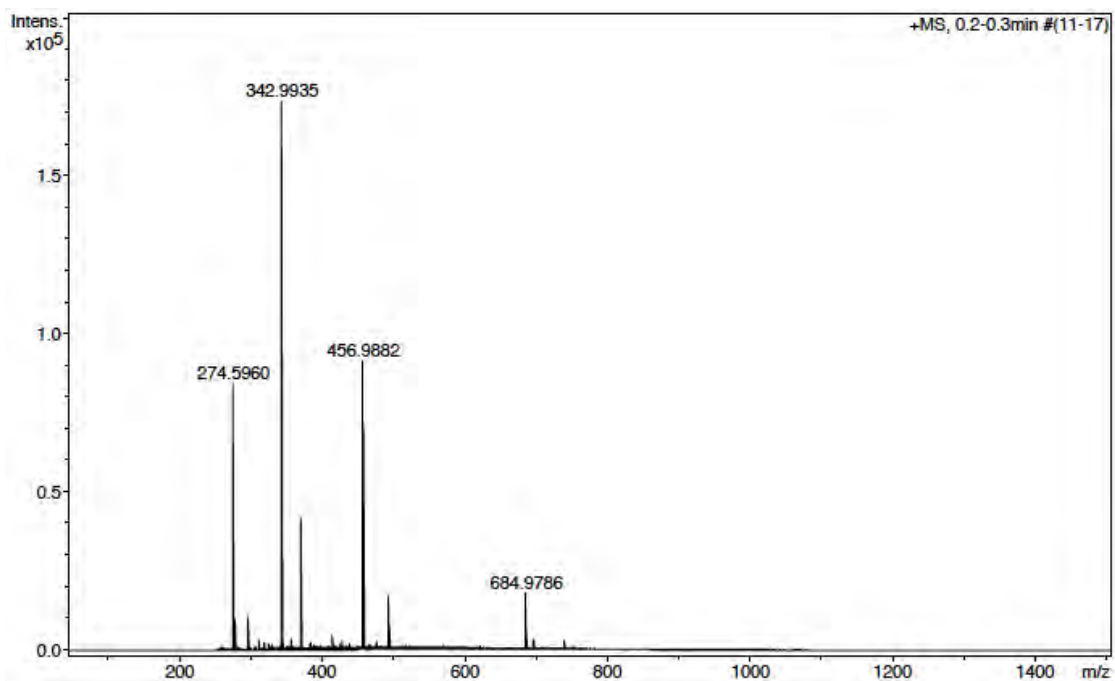


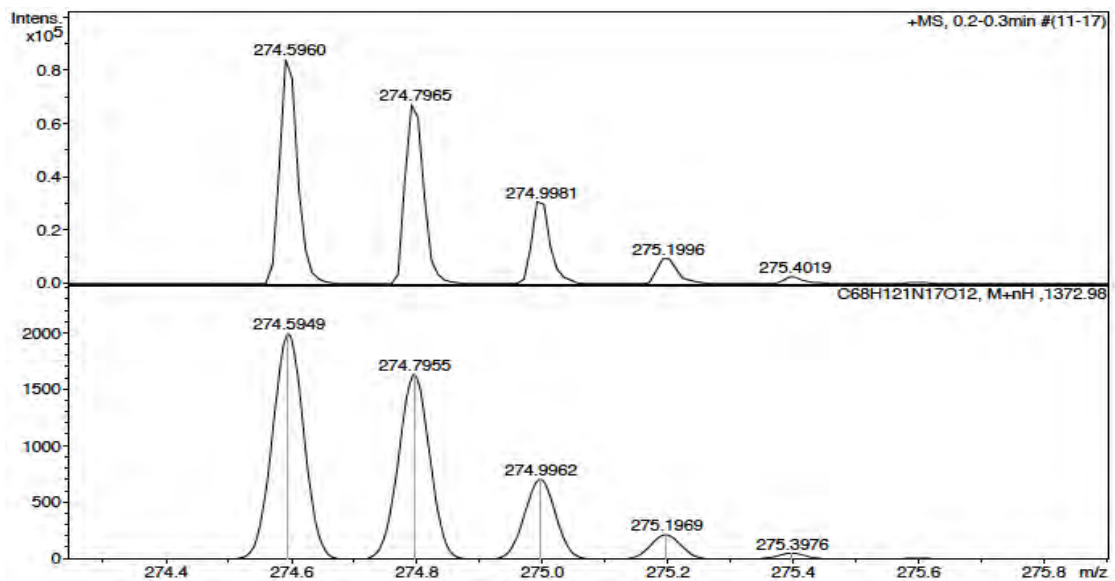
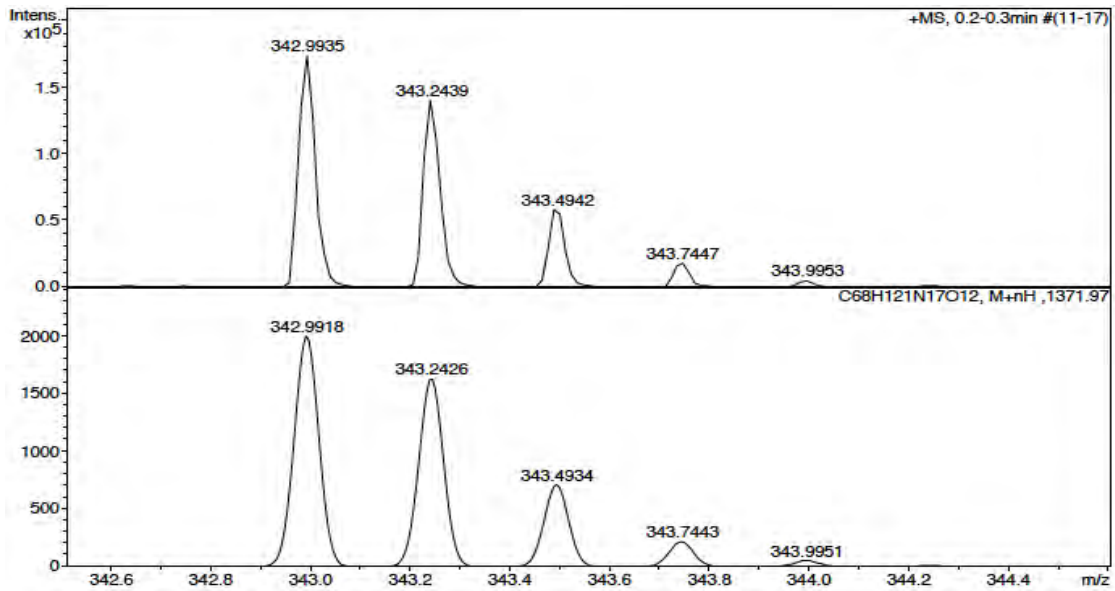
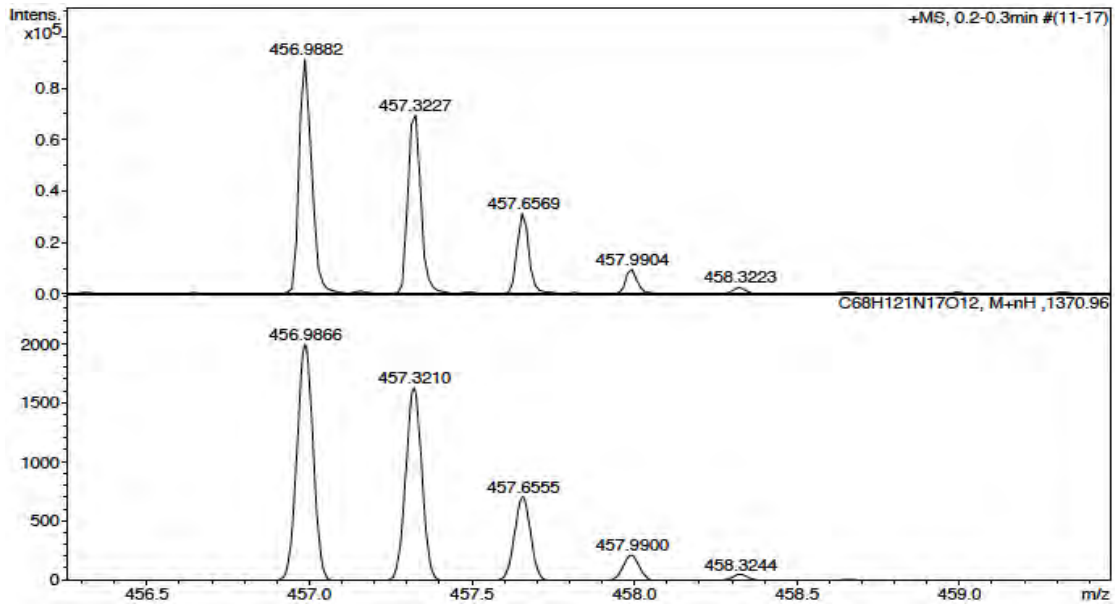
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,57	27,853	4,238	1,49
2	5,71	33,759	6,045	2,12
3	6,21	695,127	90,744	31,86
4	6,57	522,178	180,916	63,51
5	7,79	39,780	2,911	1,02
Total:		1318,696	284,853	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



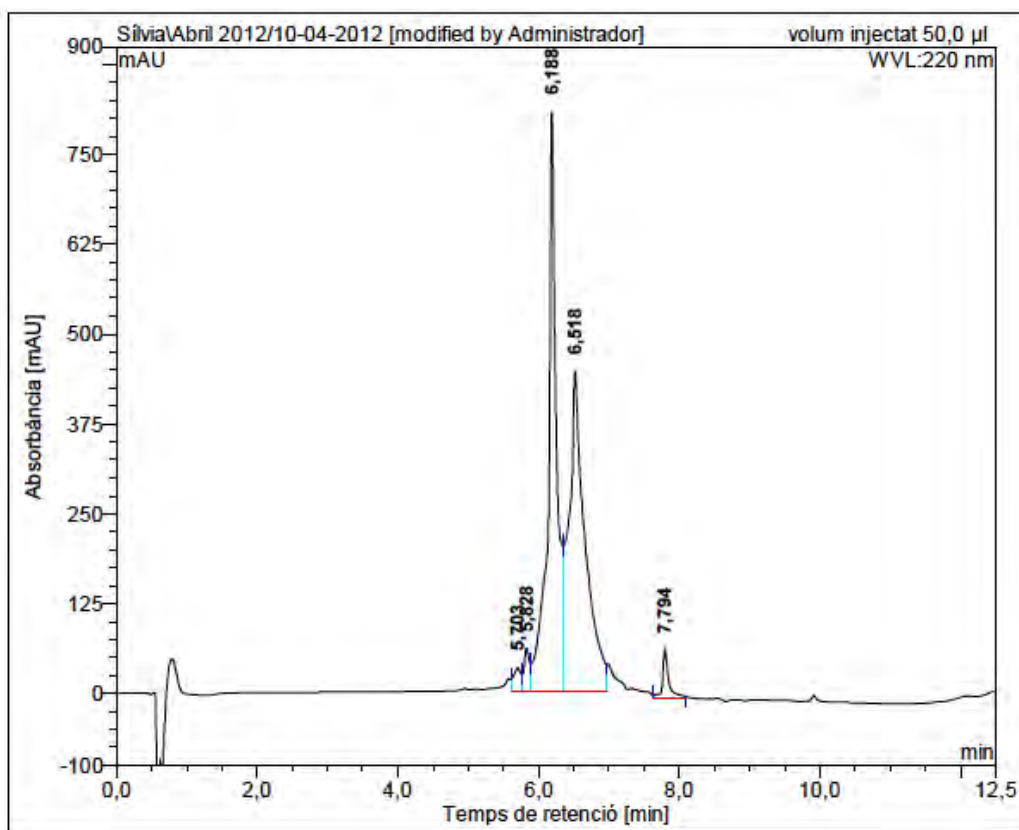
HRMS (ESI)  $m/z$





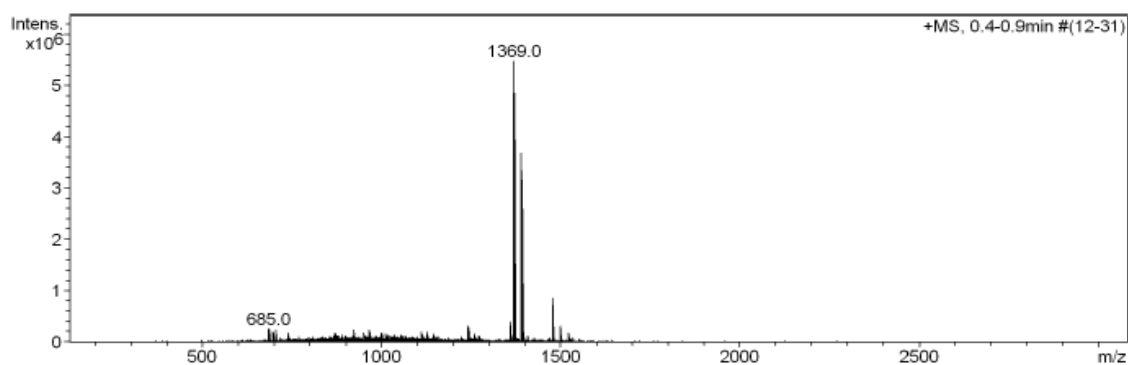
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC632)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

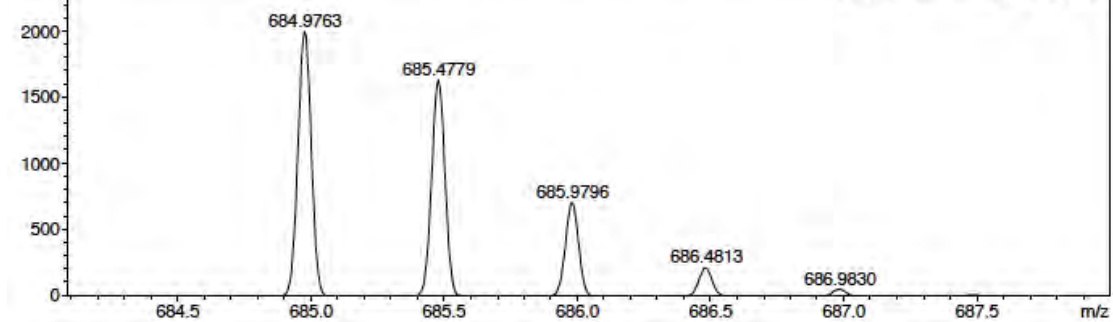
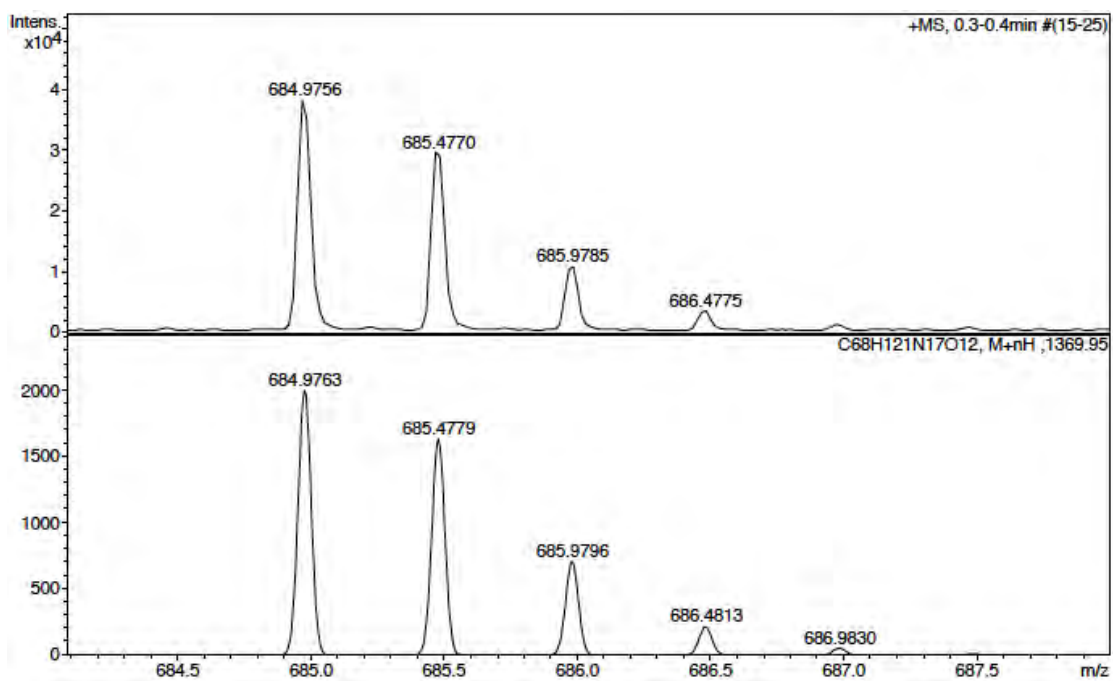
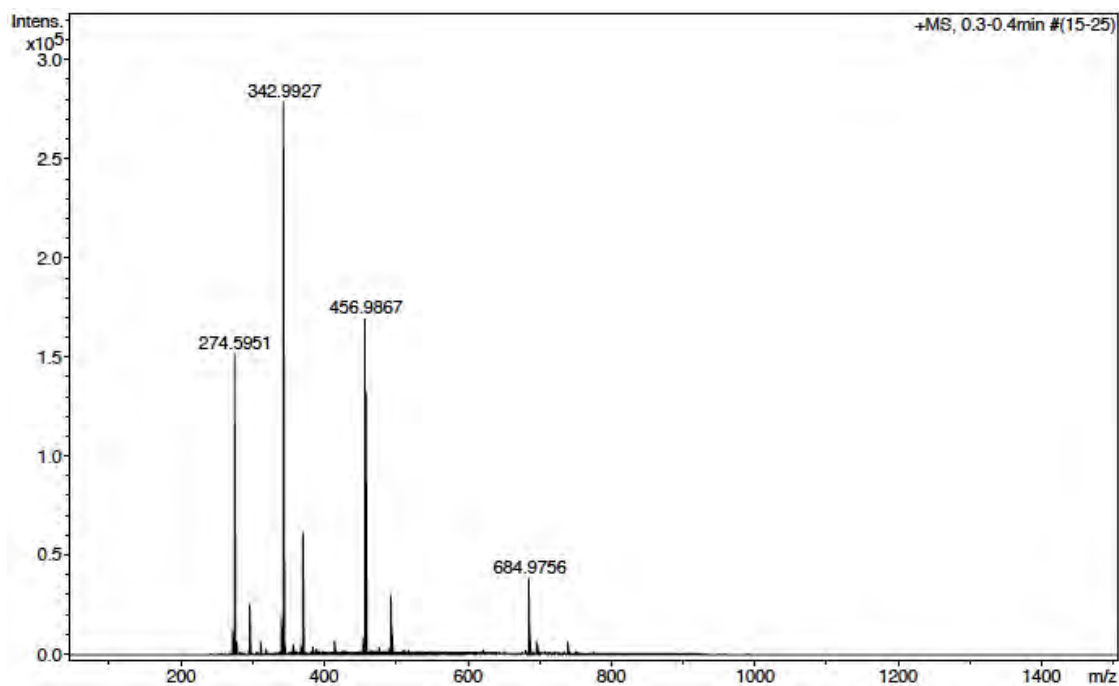


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,70	33,418	4,180	1,67
2	5,83	61,291	5,635	2,26
3	6,19	807,113	112,925	45,22
4	6,52	446,264	119,716	47,94
5	7,79	68,488	7,245	2,90
Total:		1416,574	249,702	100,00

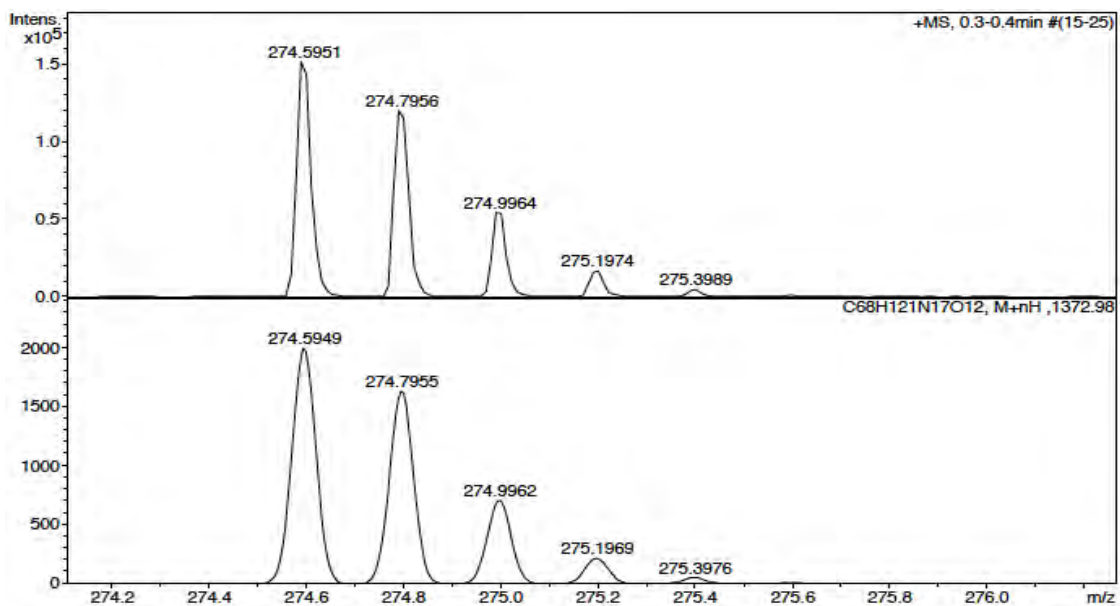
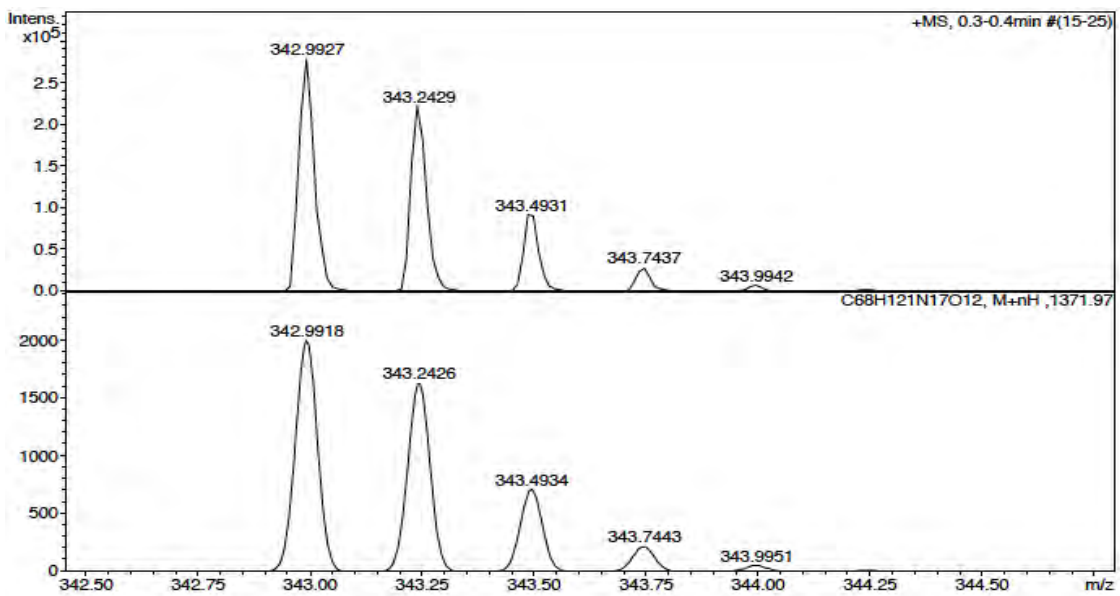
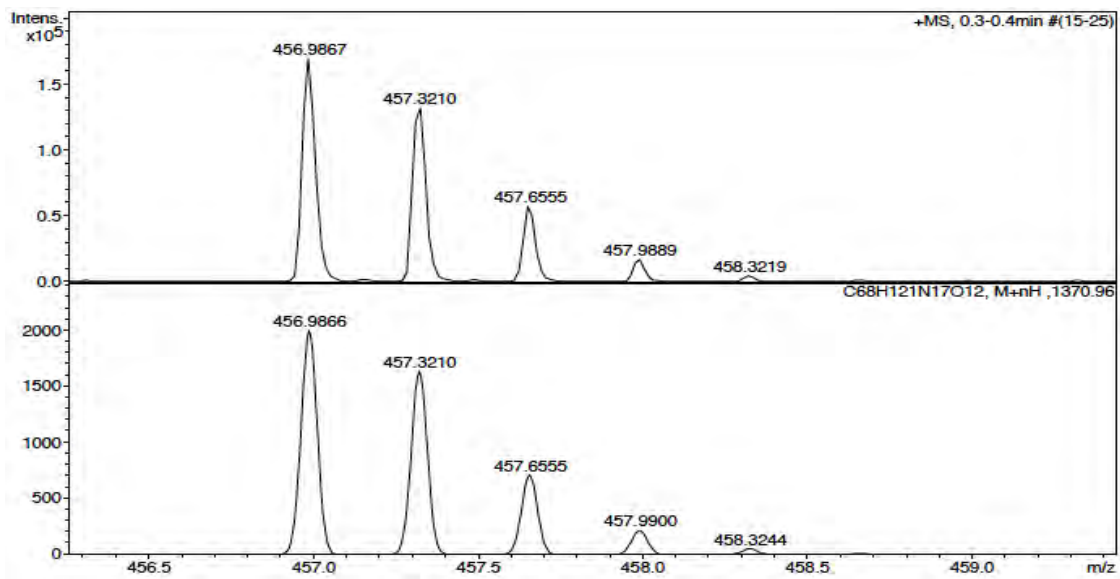
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

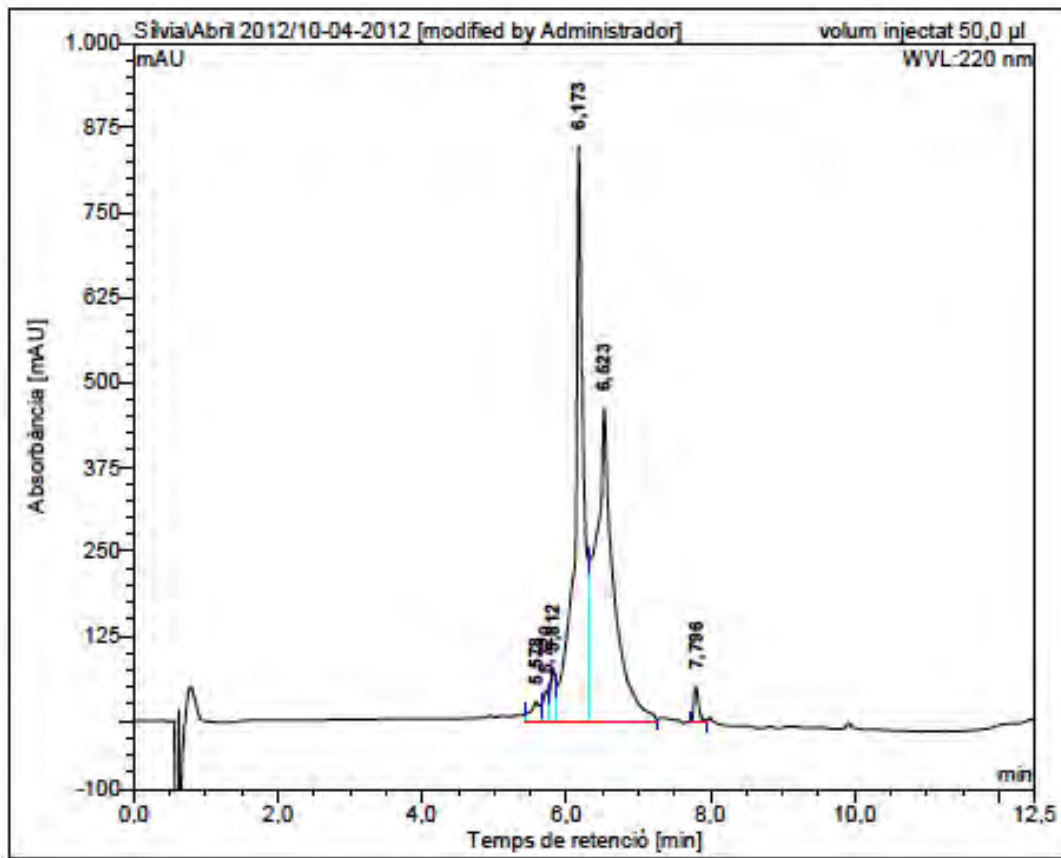






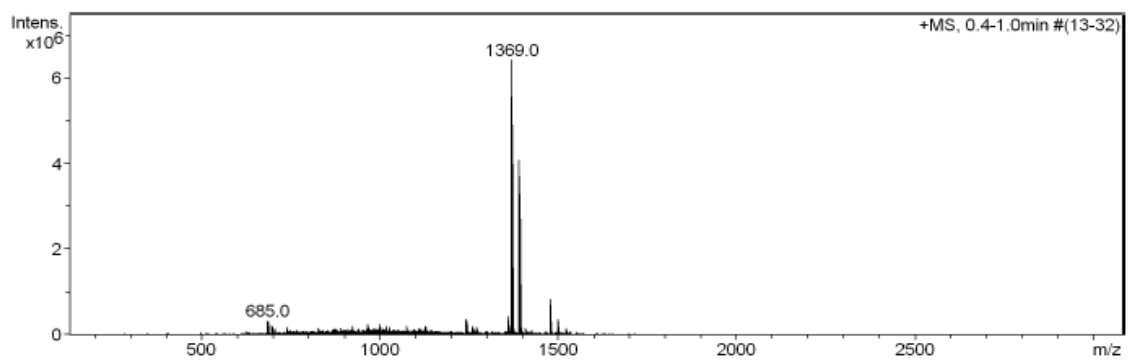
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-isoC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC634)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

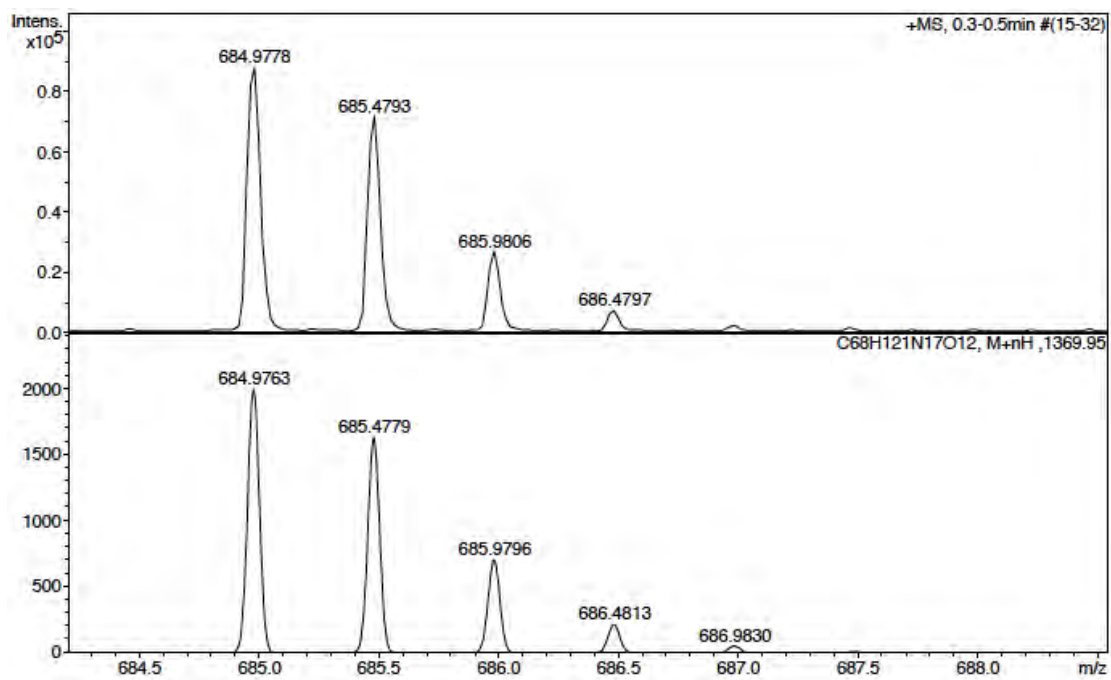
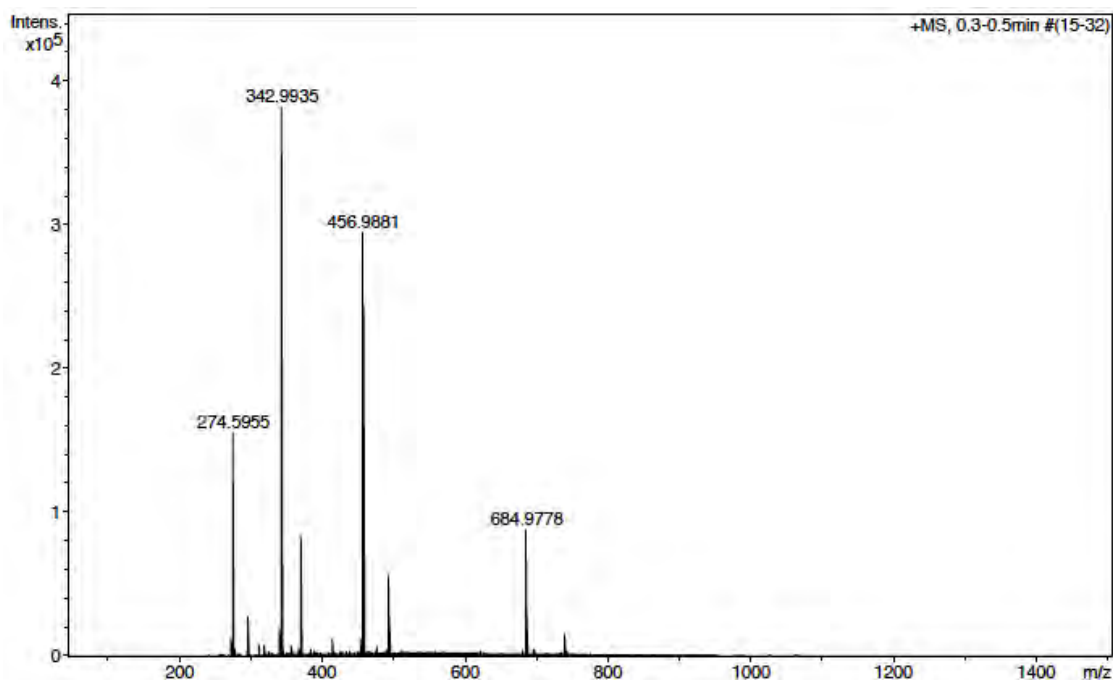


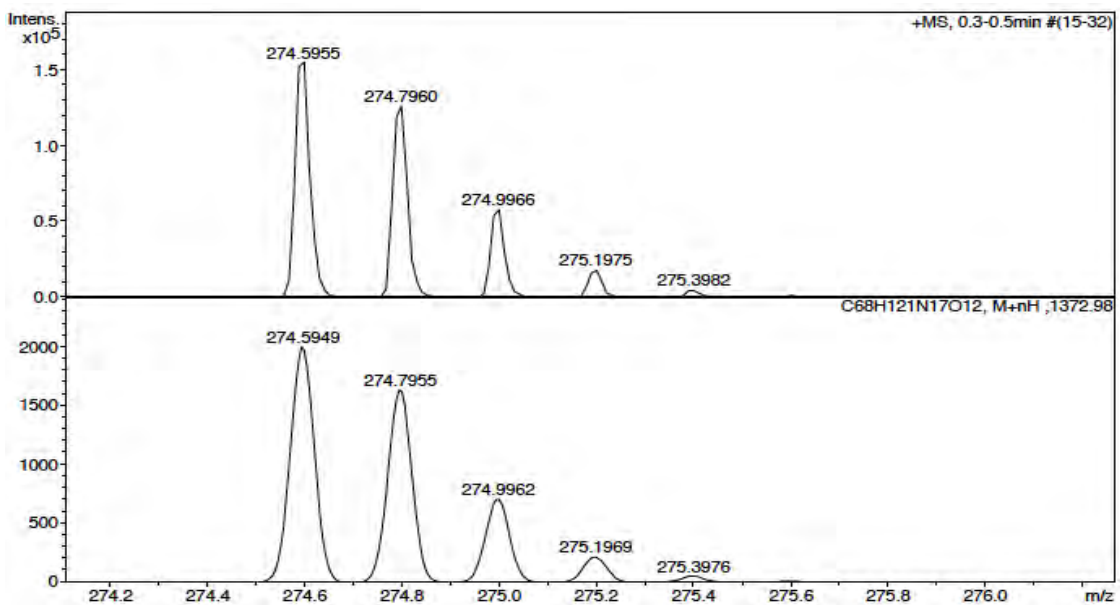
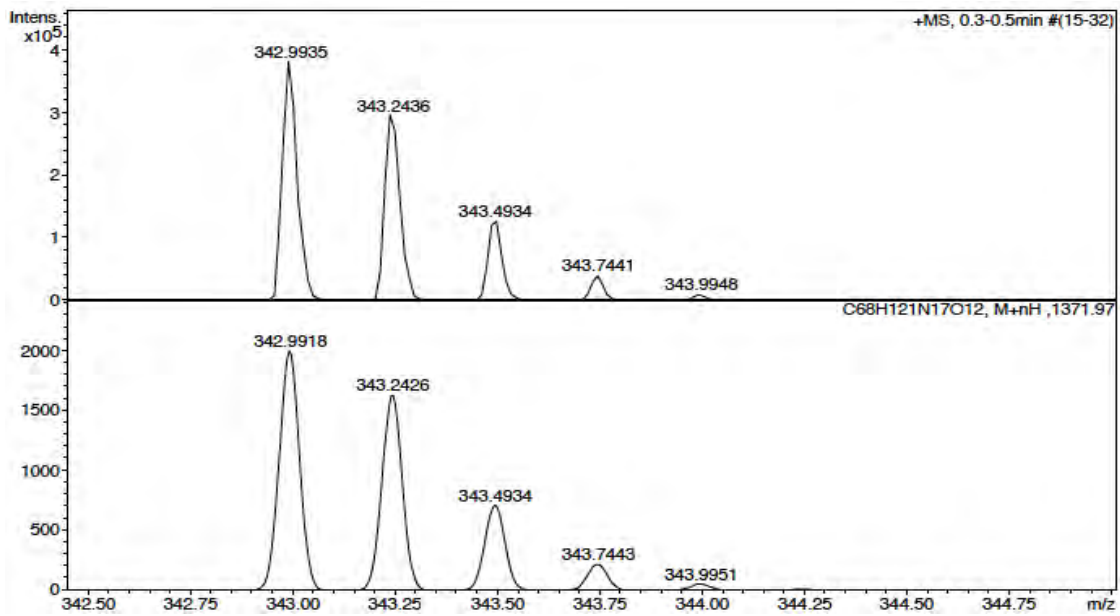
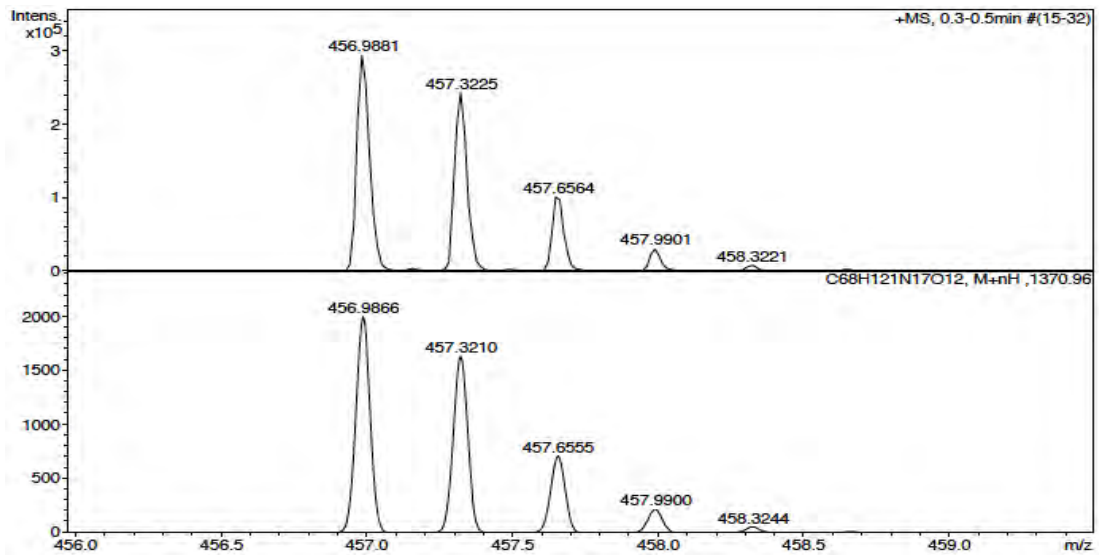
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,58	29,809	4,312	1,56
2	5,72	46,431	4,571	1,66
3	5,81	79,283	6,895	2,50
4	6,17	849,247	119,958	43,52
5	6,52	462,605	136,099	49,37
6	7,80	53,211	3,829	1,39
Total:		1520,586	275,663	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



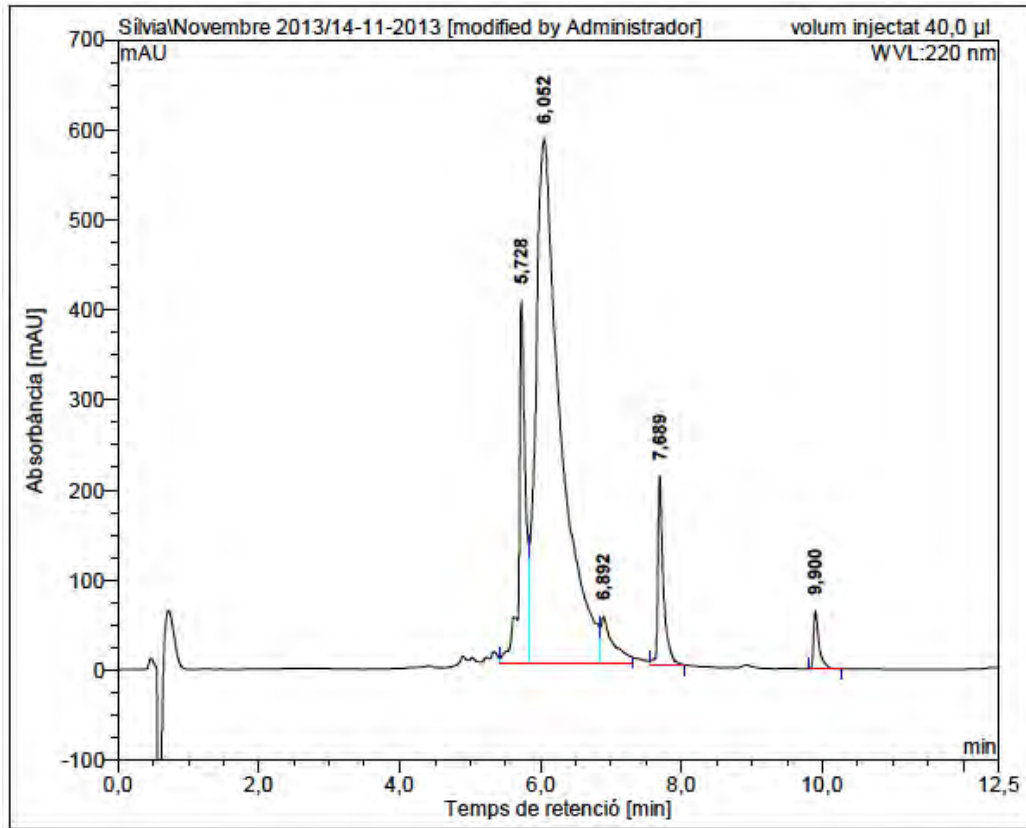
HRMS (ESI)  $m/z$





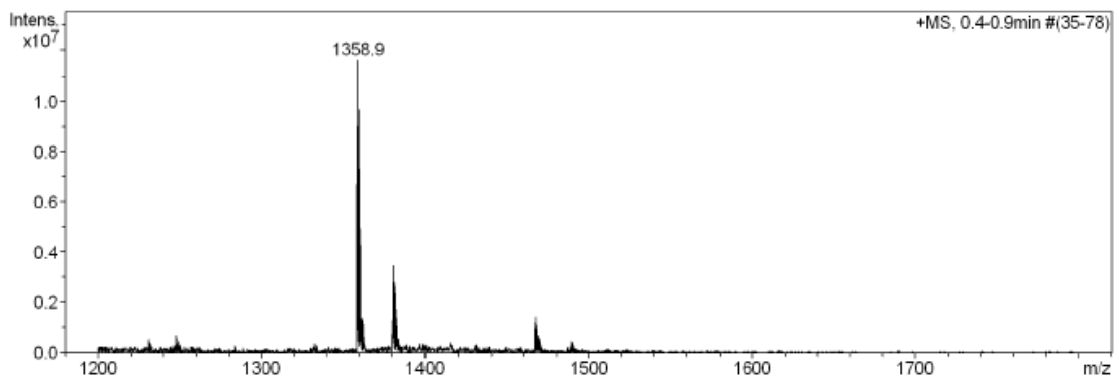
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC636)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

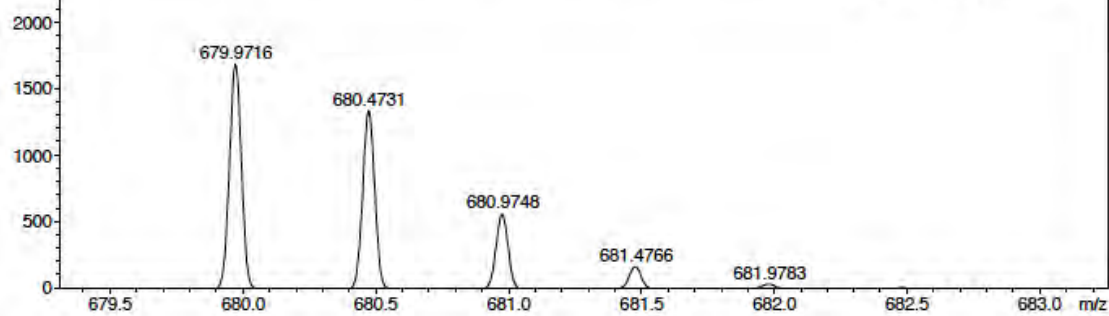
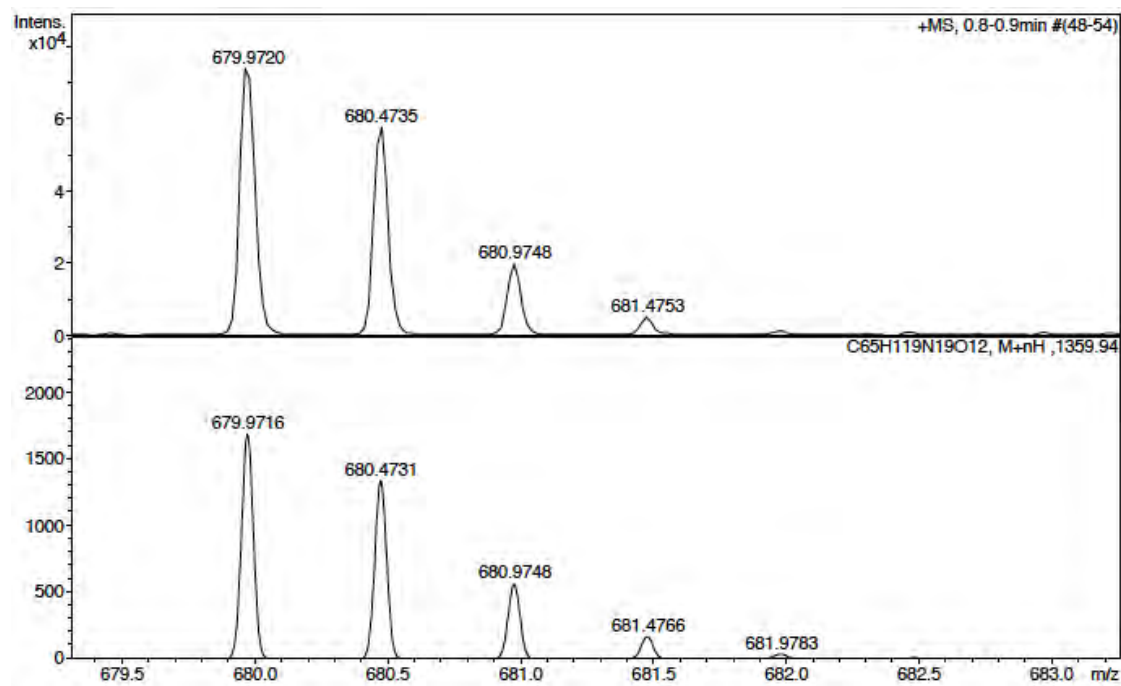
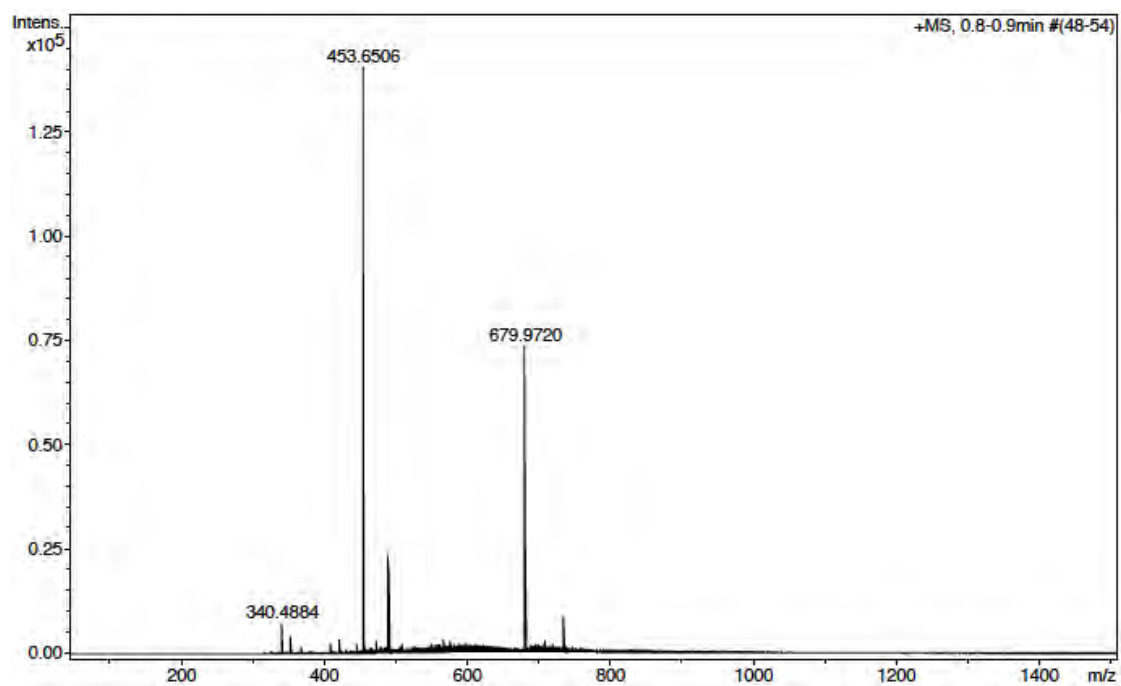


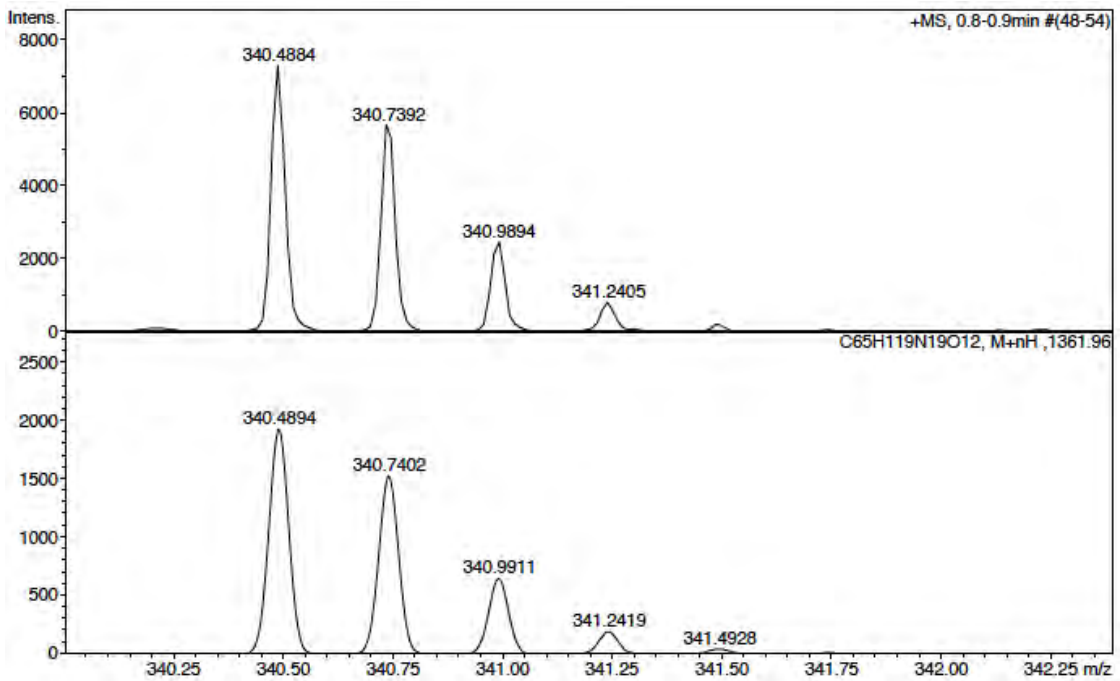
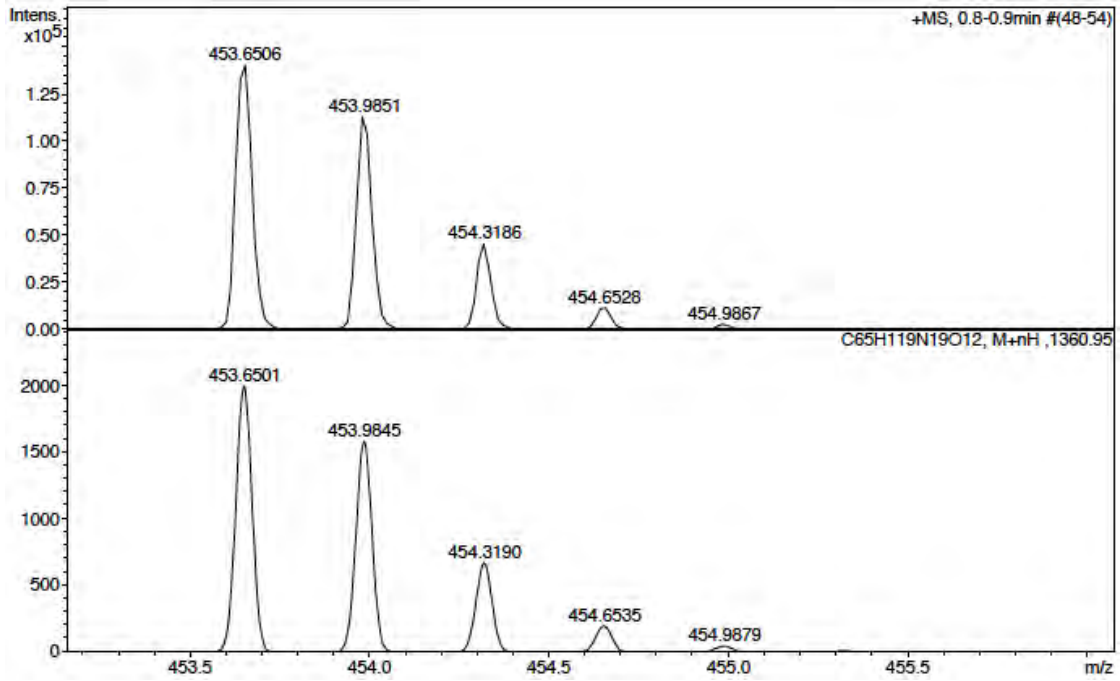
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,73	402,853	43,663	13,86
2	6,05	582,094	236,134	74,93
3	6,89	52,269	10,441	3,31
4	7,69	209,306	19,069	6,05
5	9,90	64,548	5,814	1,84
<b>Total:</b>		<b>1311,071</b>	<b>315,121</b>	<b>100,00</b>

ESI-MS ( $m/z$ )



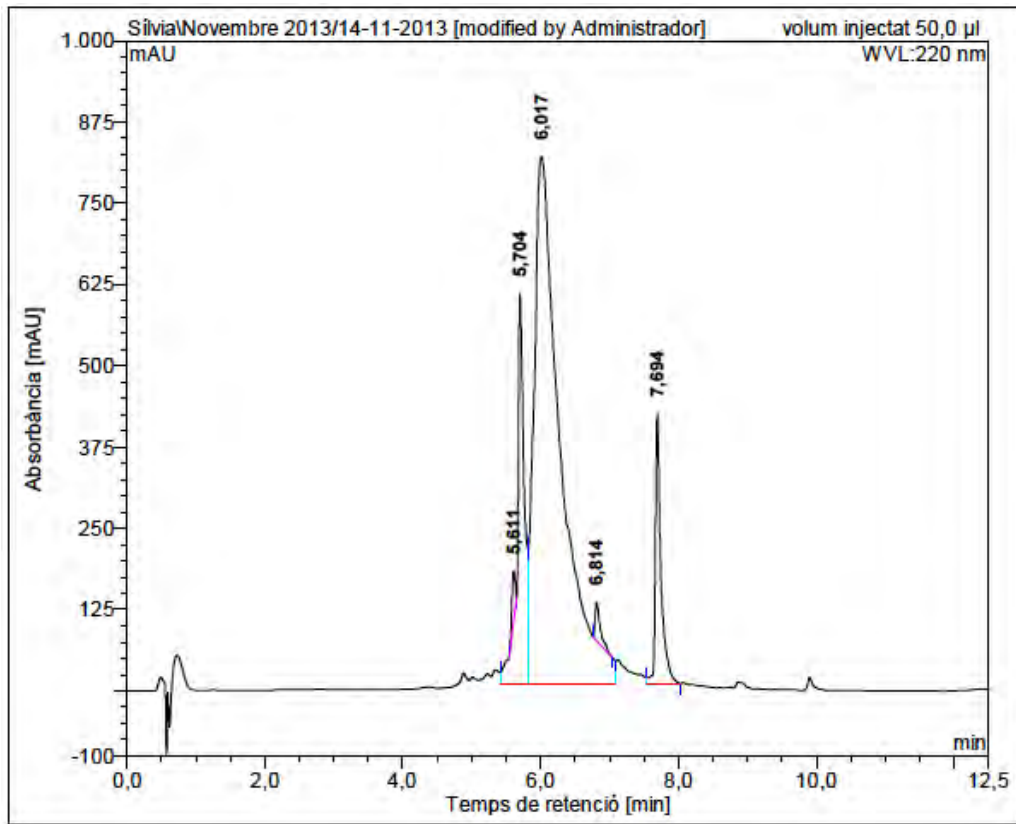
HRMS (ESI)  $m/z$





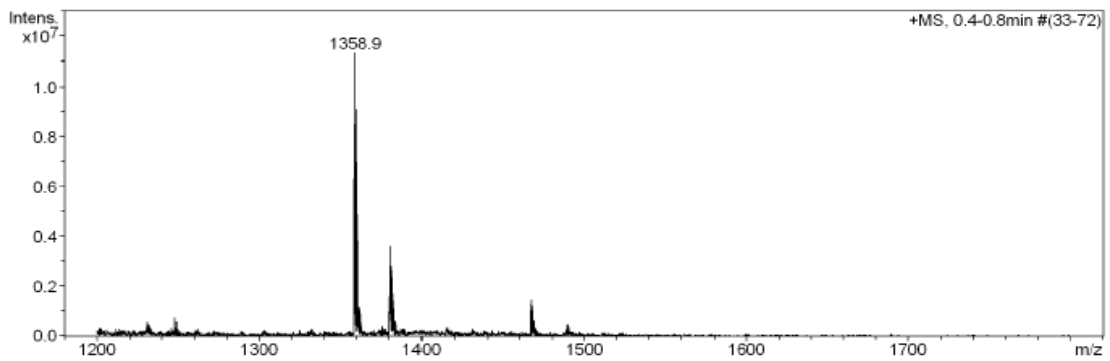
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-isoC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC638)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



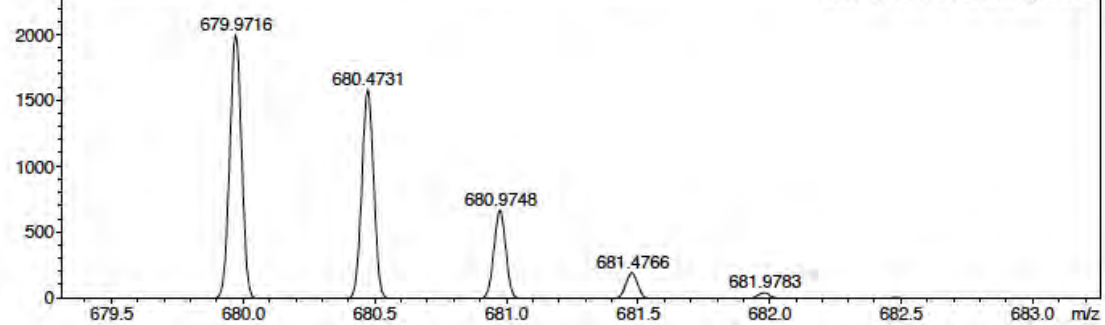
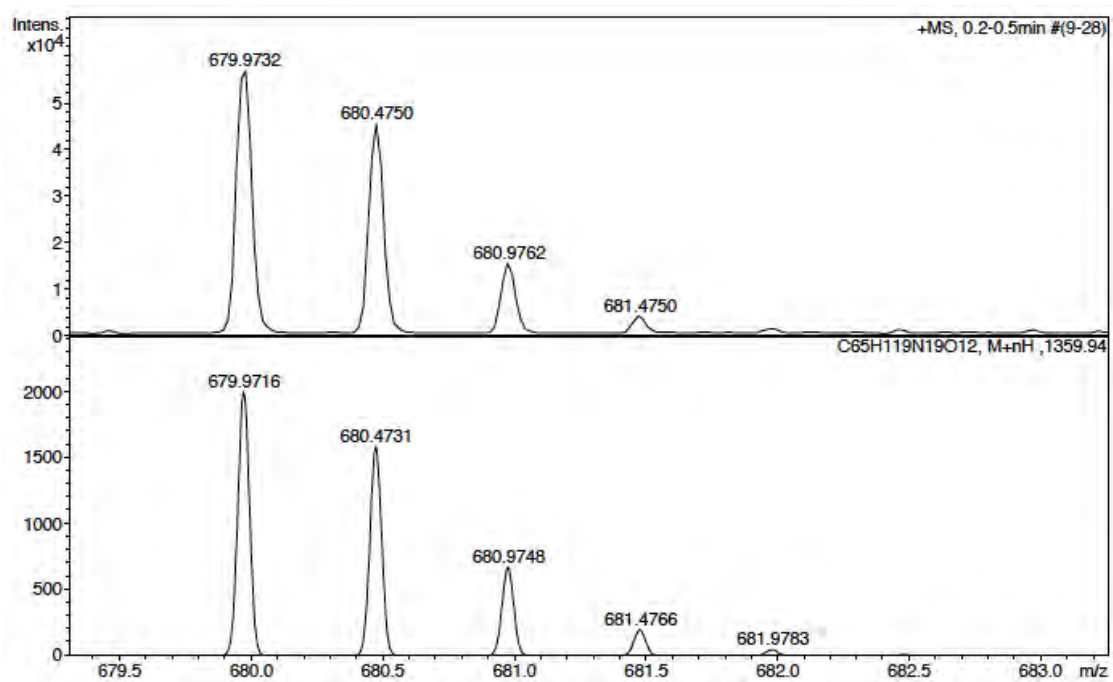
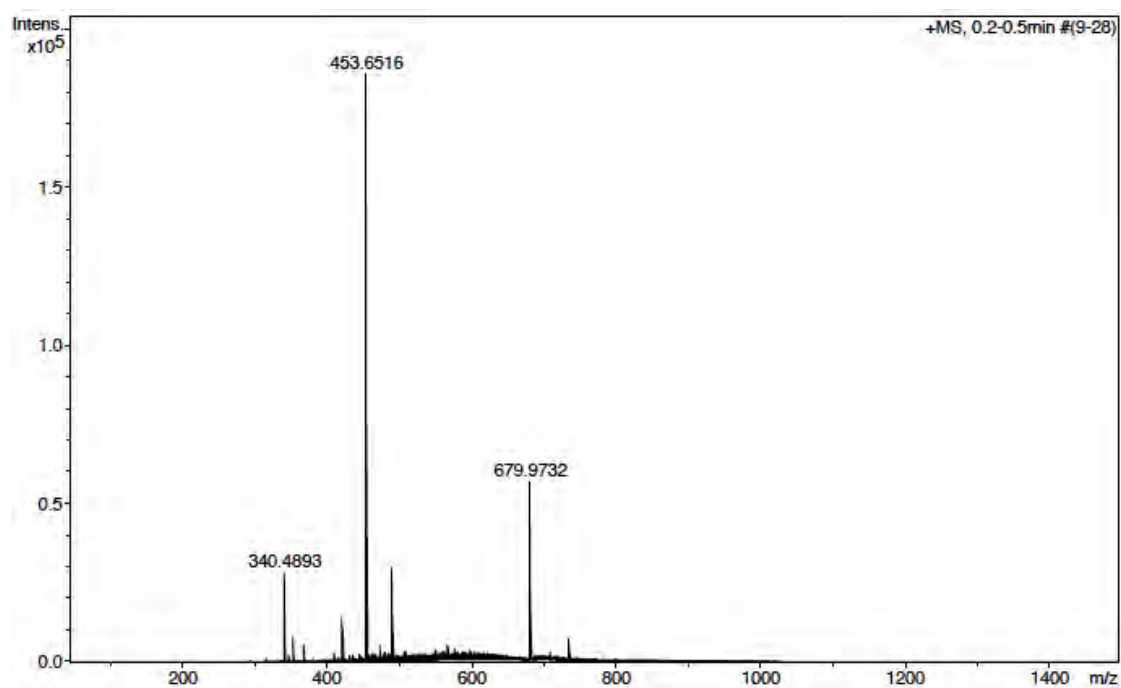
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,61	76,031	4,269	0,89
2	5,70	601,664	71,883	14,92
3	6,02	811,494	362,573	75,25
4	6,81	58,813	4,979	1,03
5	7,69	415,012	38,103	7,91
Total:		1963,014	481,807	100,00

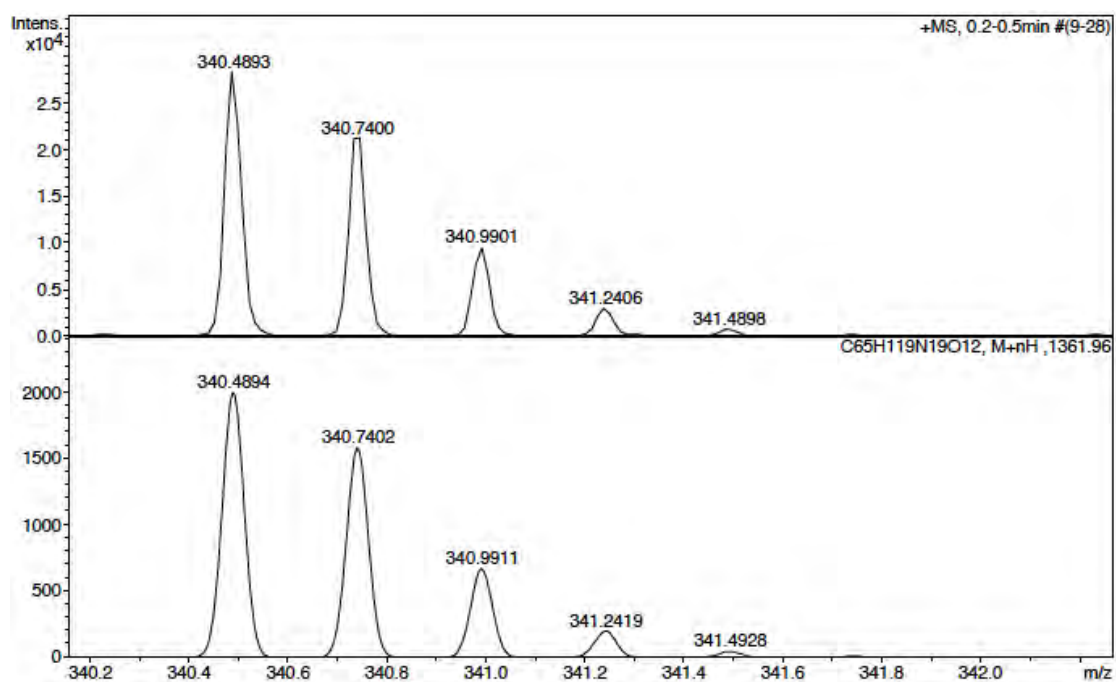
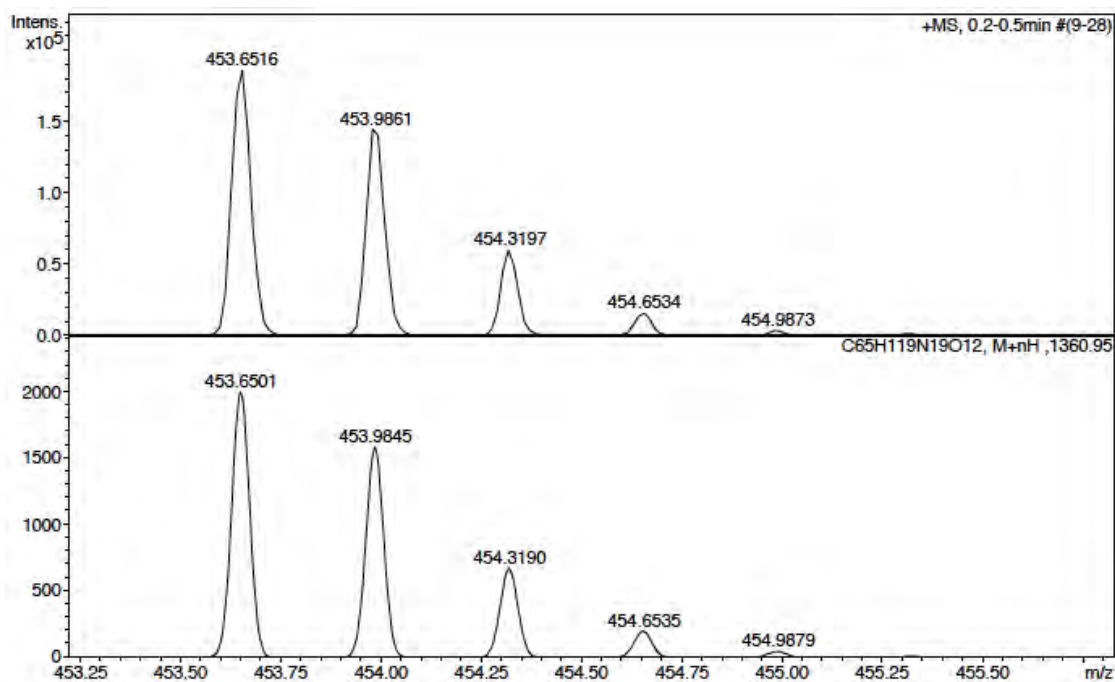
ESI-MS ( $m/z$ )





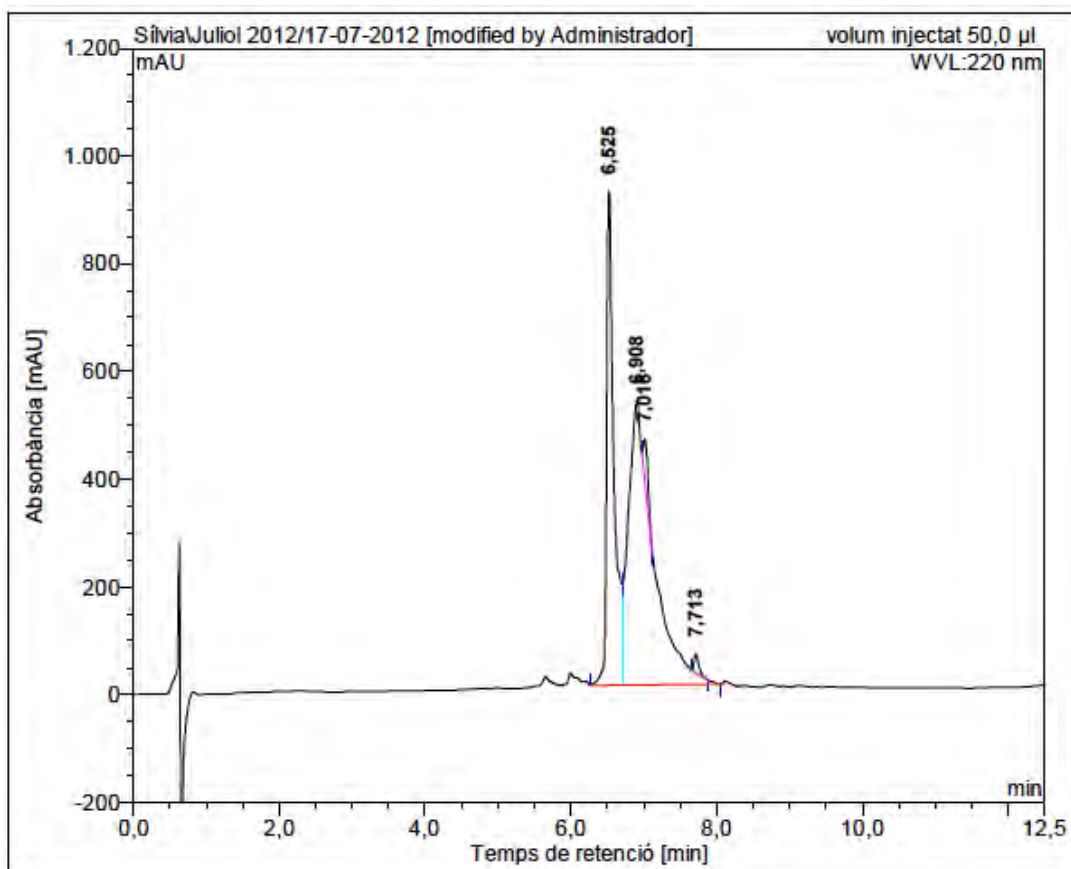
HRMS (ESI)  $m/z$





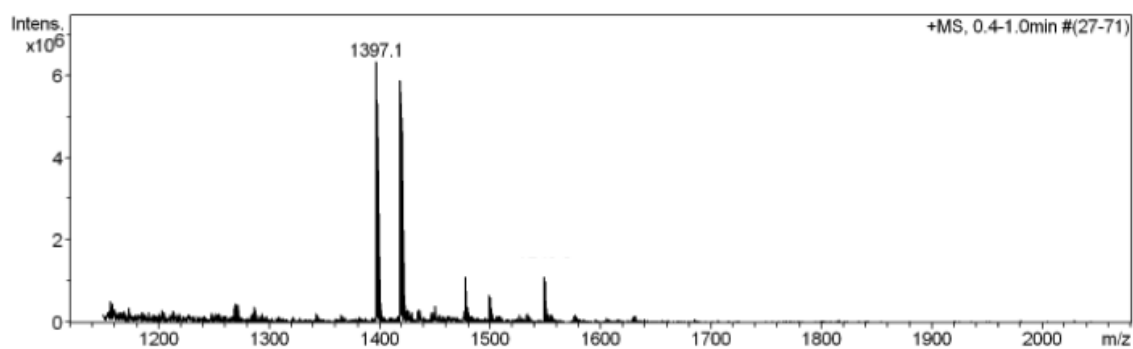
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC666)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

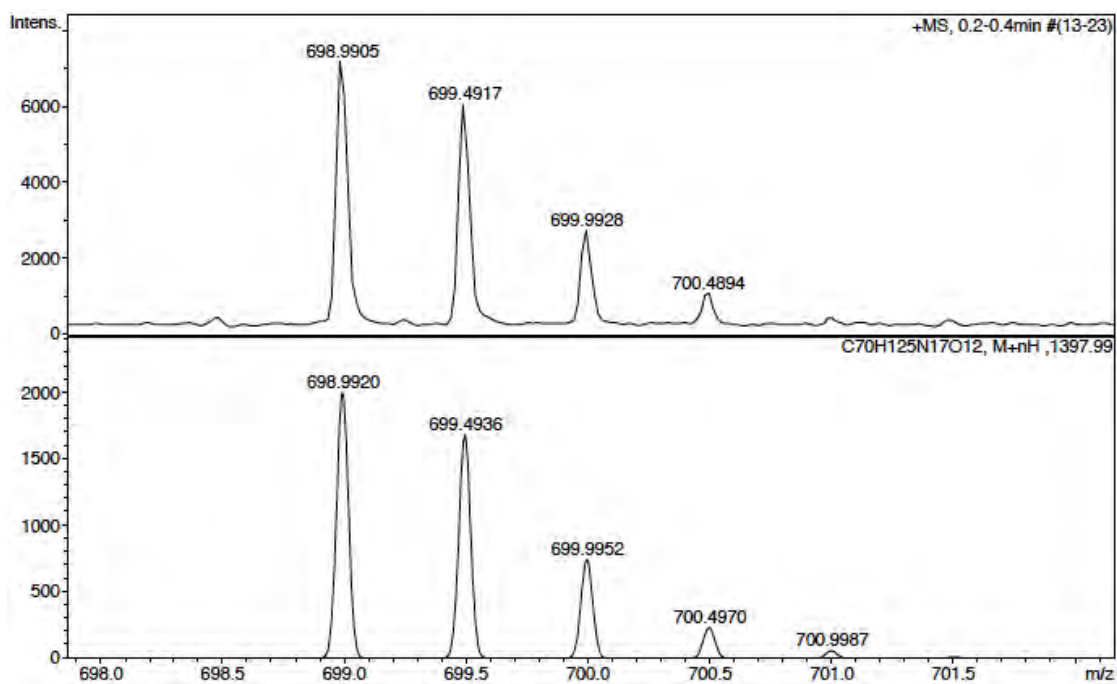
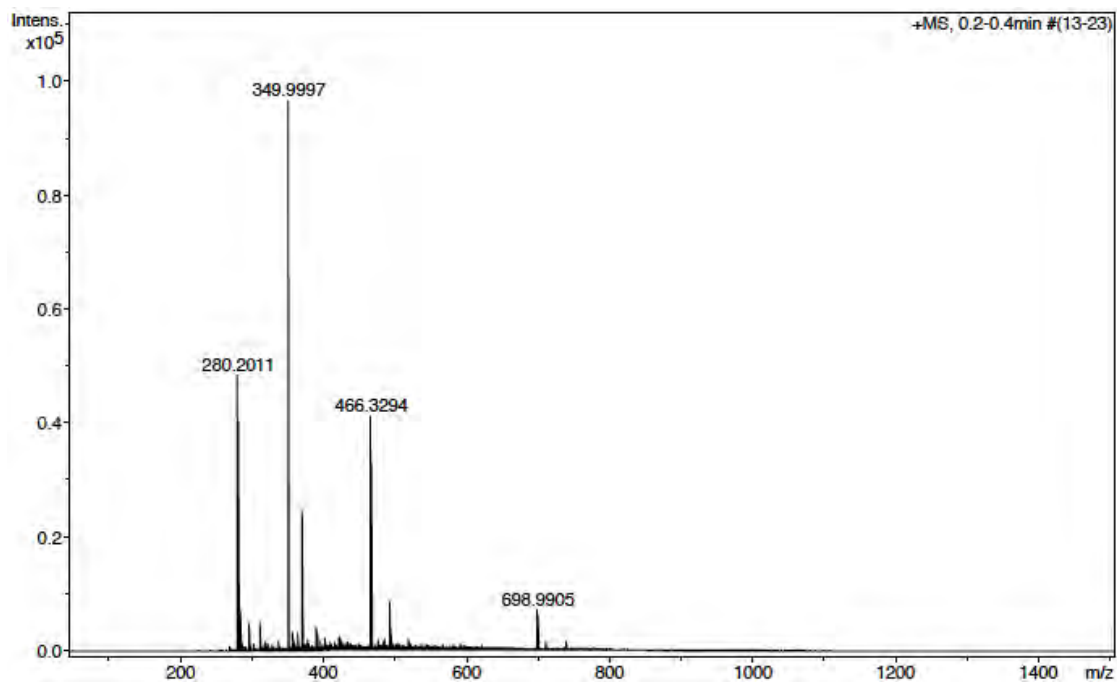


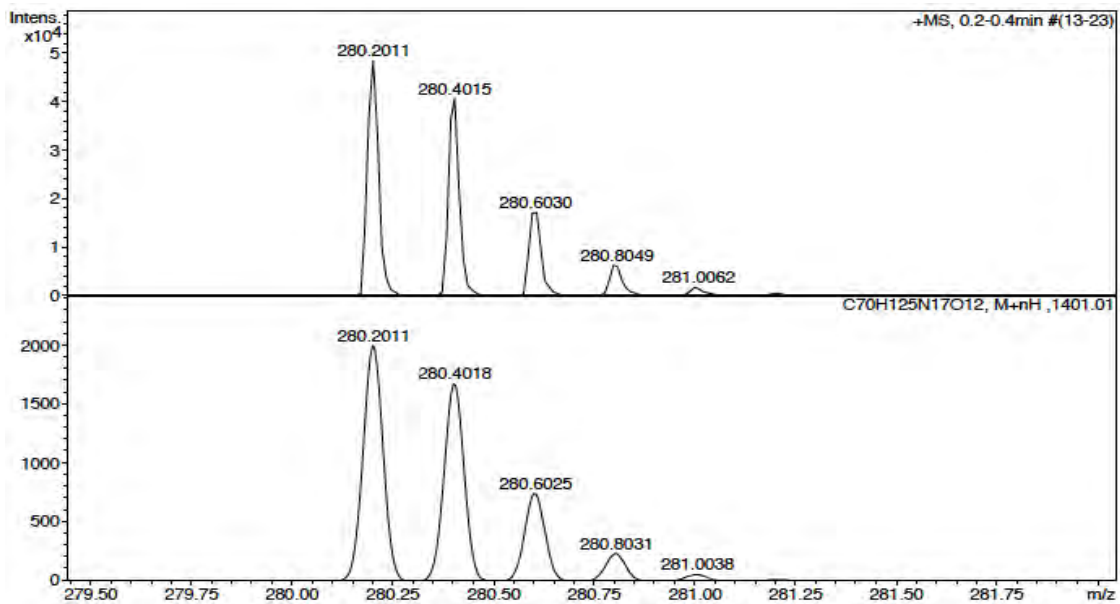
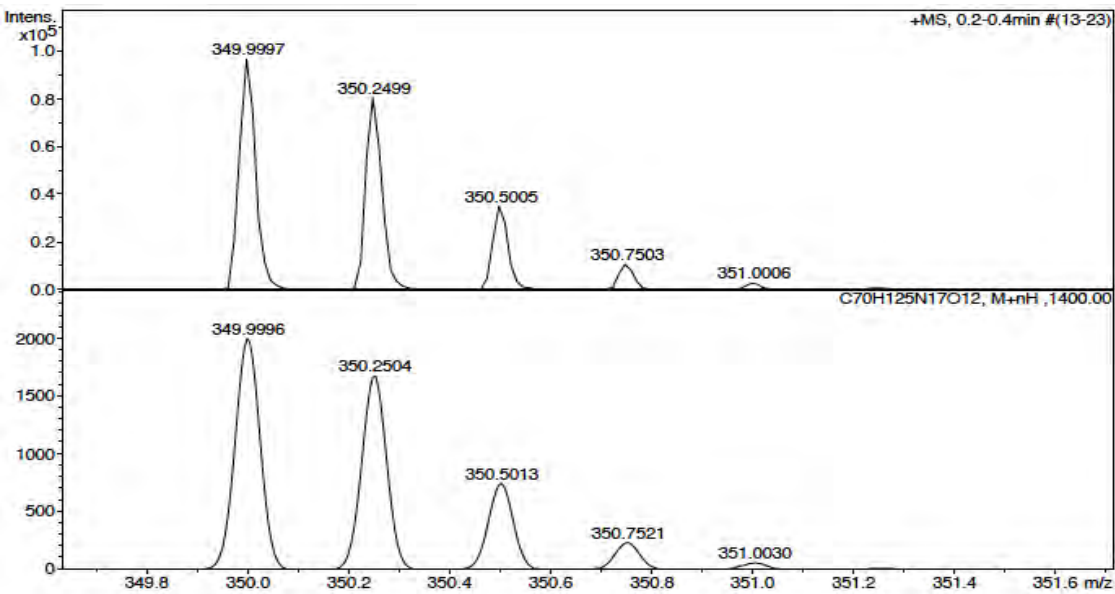
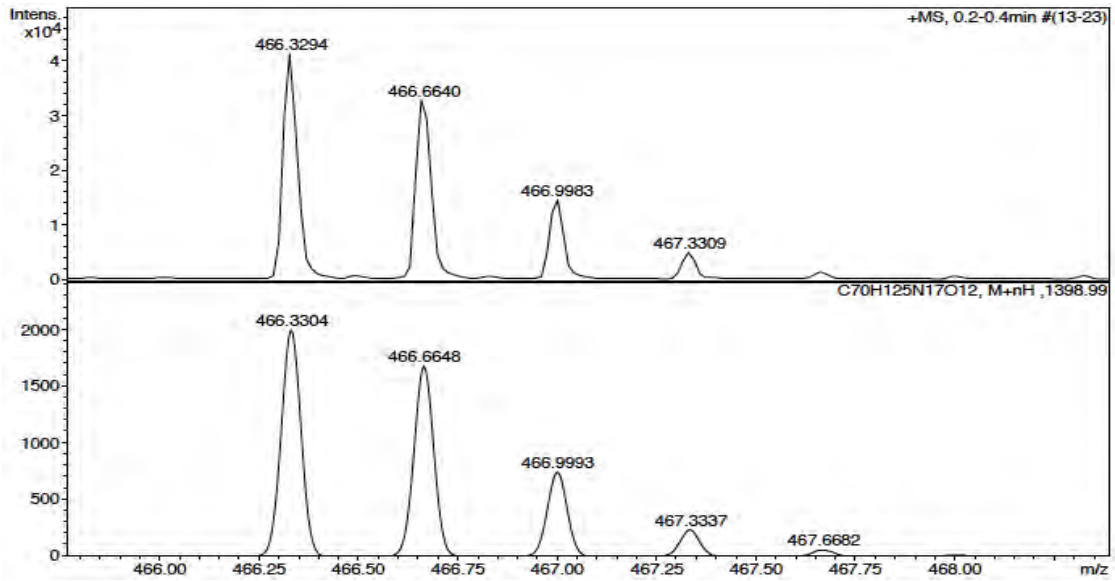
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,53	916,915	106,157	32,62
2	6,91	526,798	210,735	64,75
3	7,02	74,598	6,026	1,85
4	7,71	34,685	2,565	0,79
Total:		1552,996	325,483	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



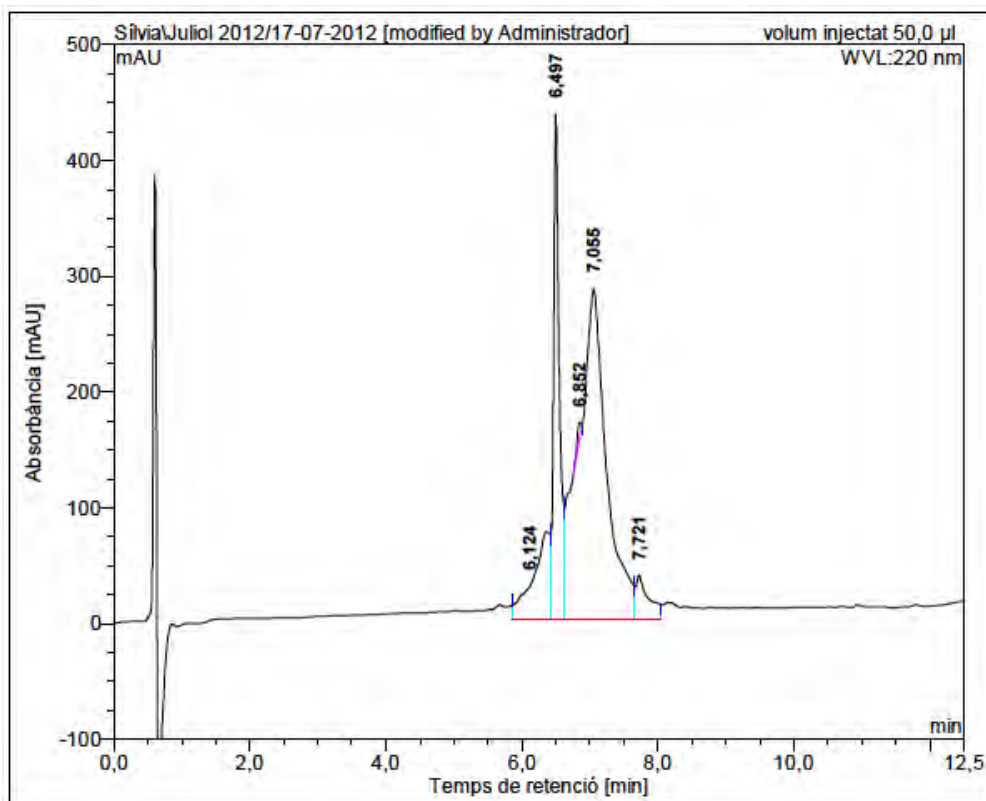
HRMS (ESI)  $m/z$





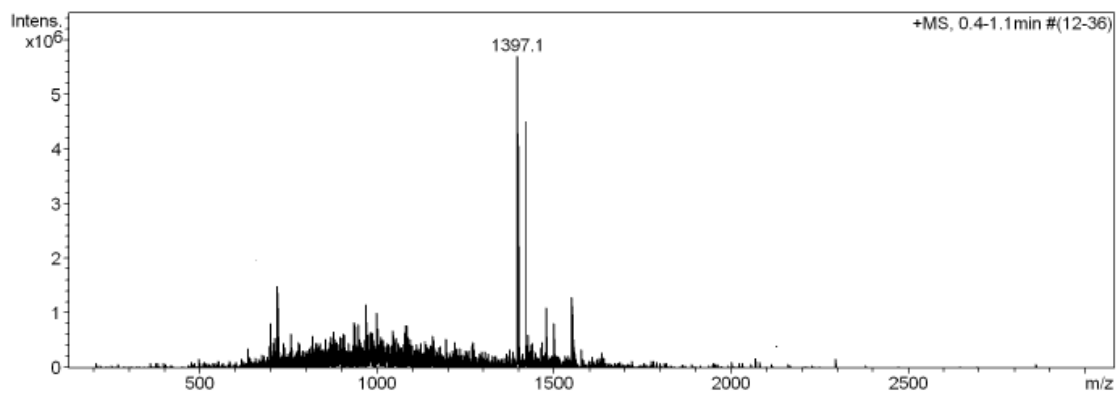
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC668)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

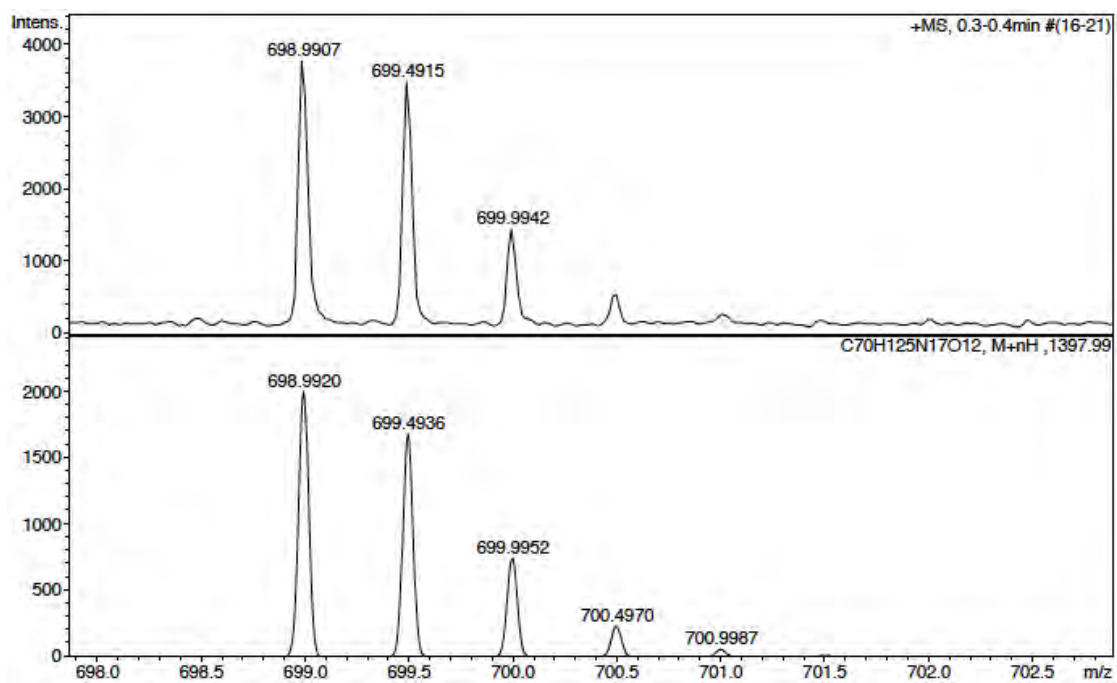
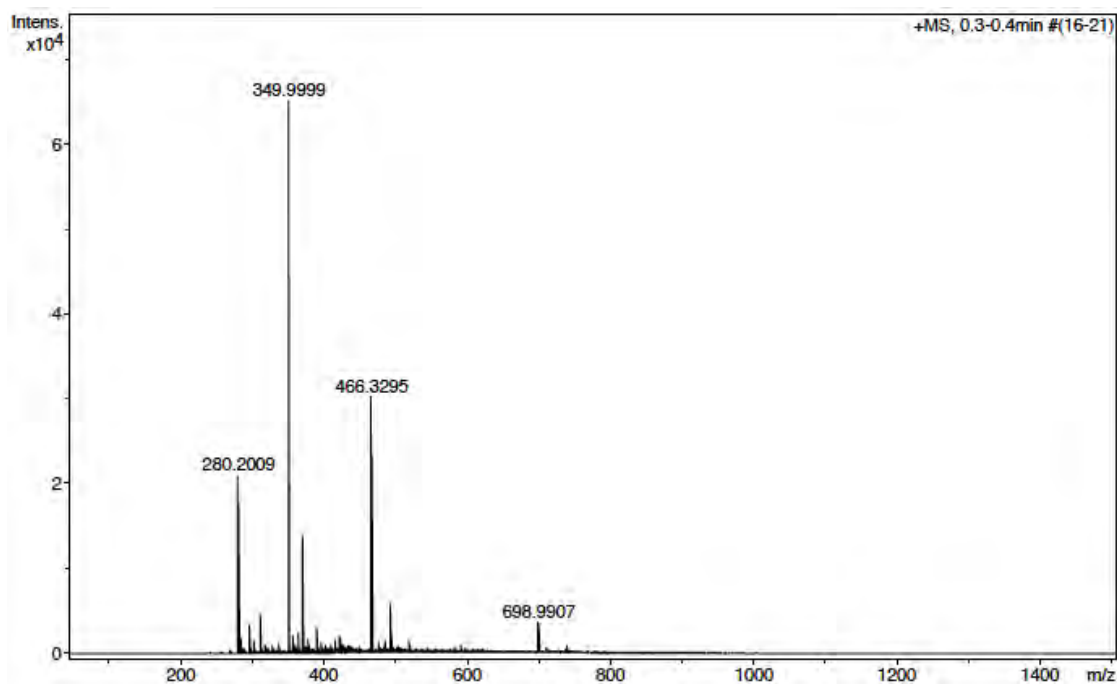


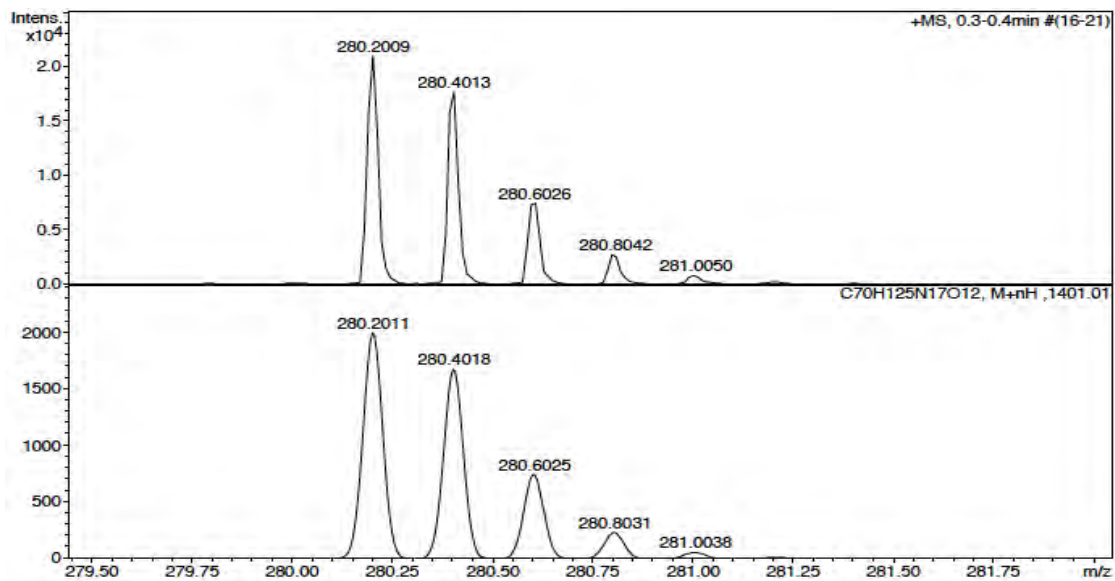
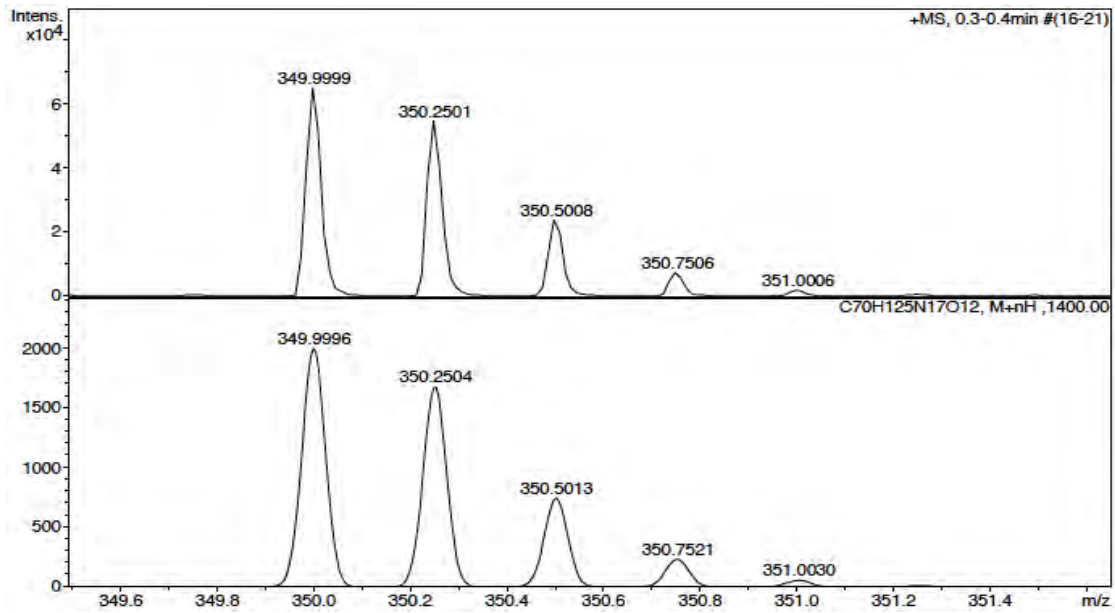
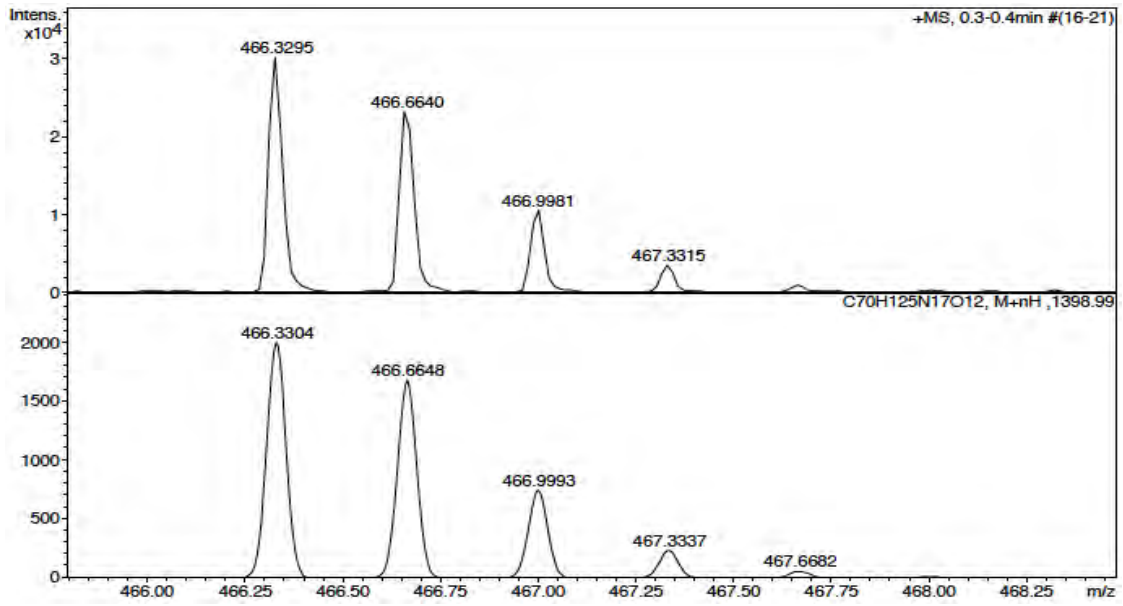
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,12	28,748	21,527	10,22
2	6,50	436,223	43,850	20,81
3	6,85	12,624	0,997	0,47
4	7,06	284,823	135,996	64,55
5	7,72	37,739	8,324	3,95
Total:		800,158	210,693	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

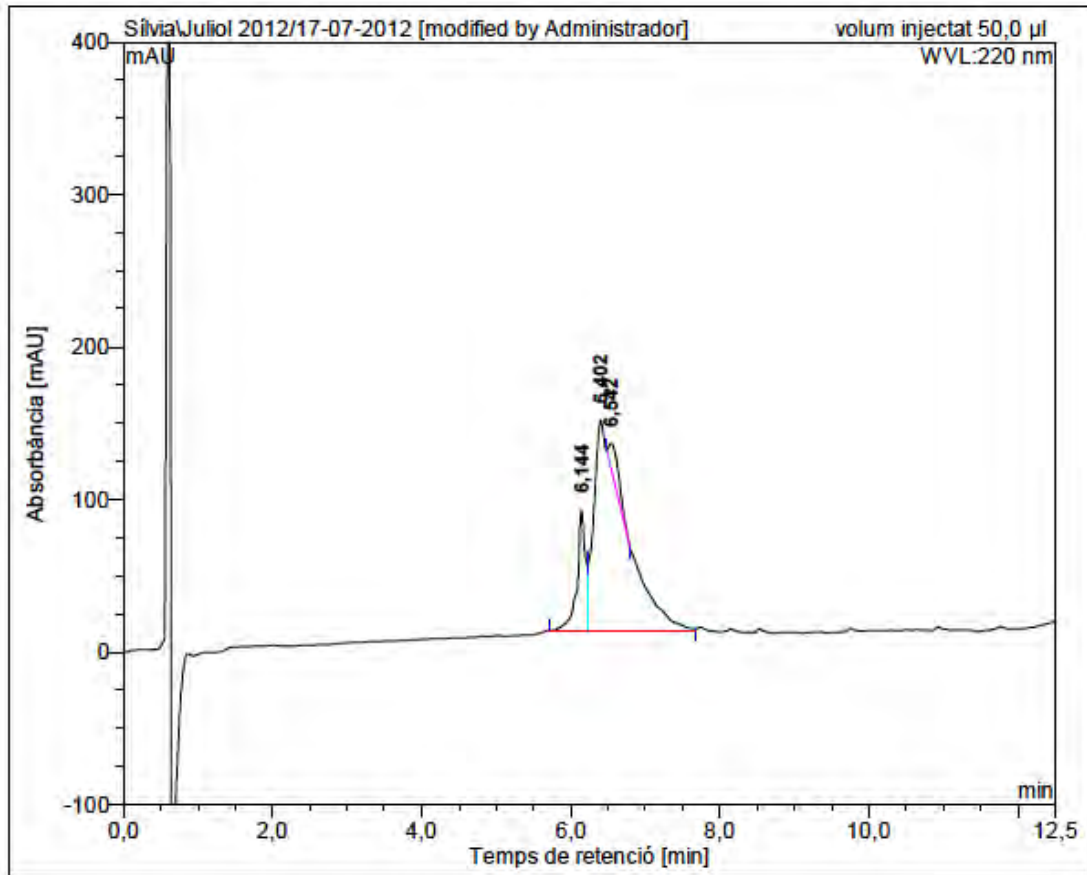






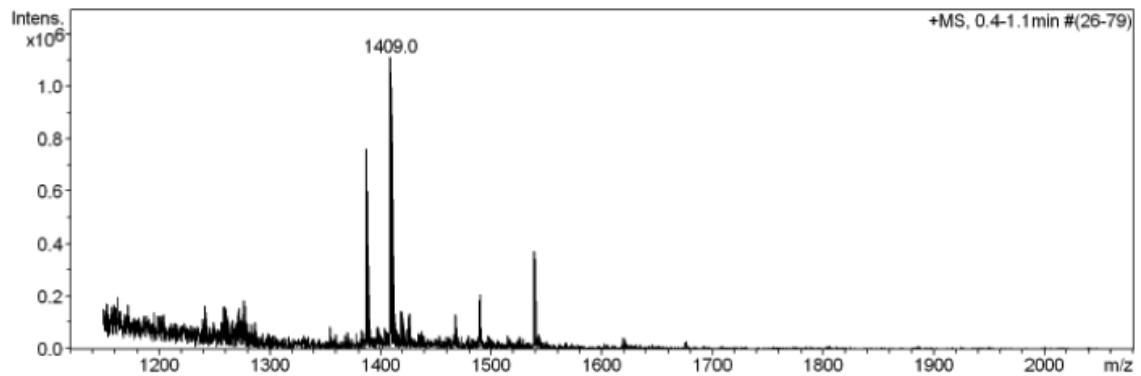
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC670)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

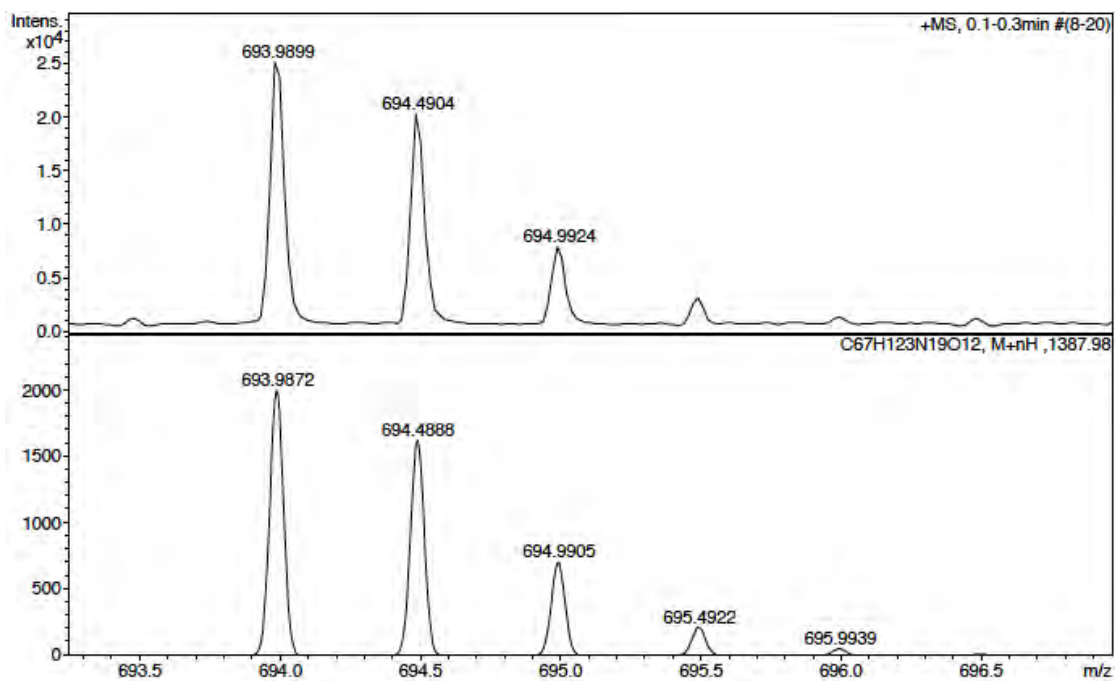
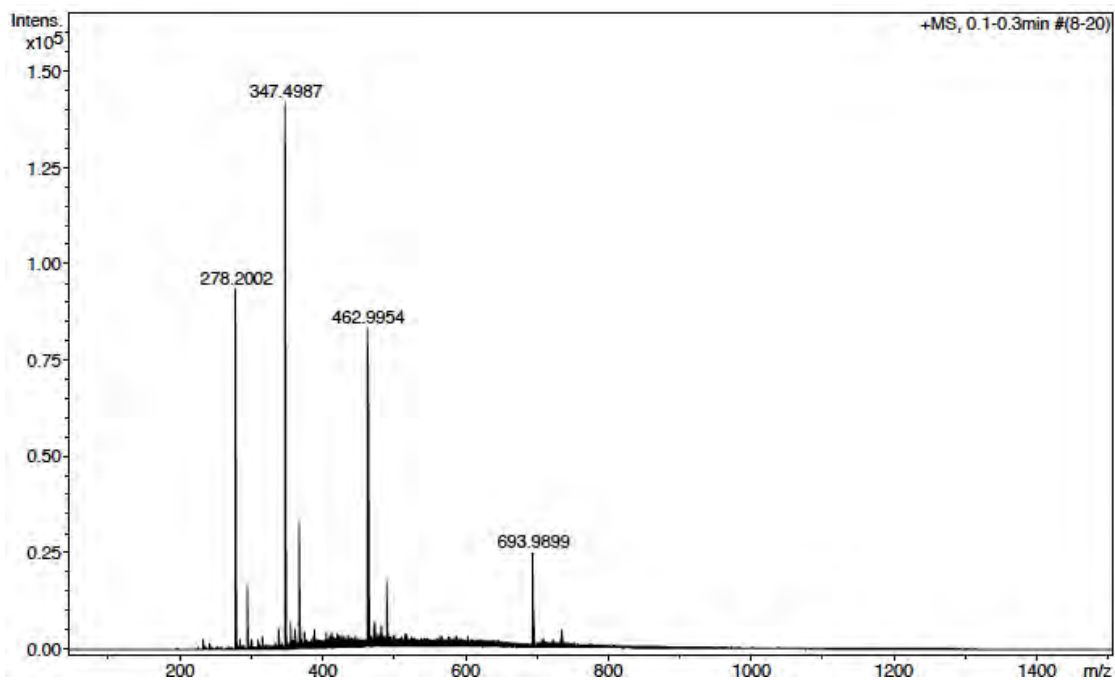


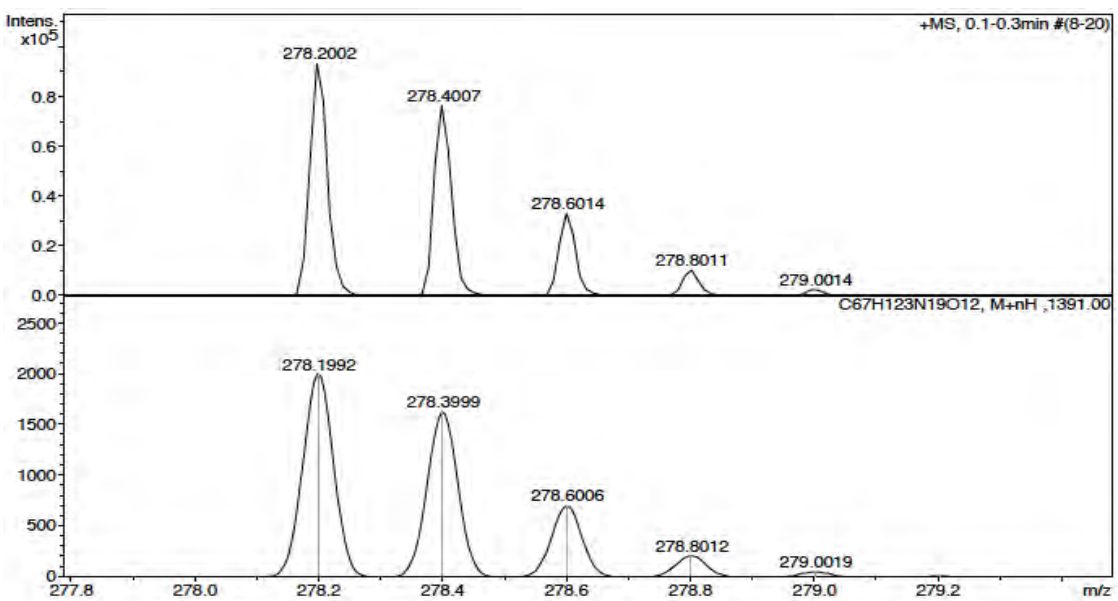
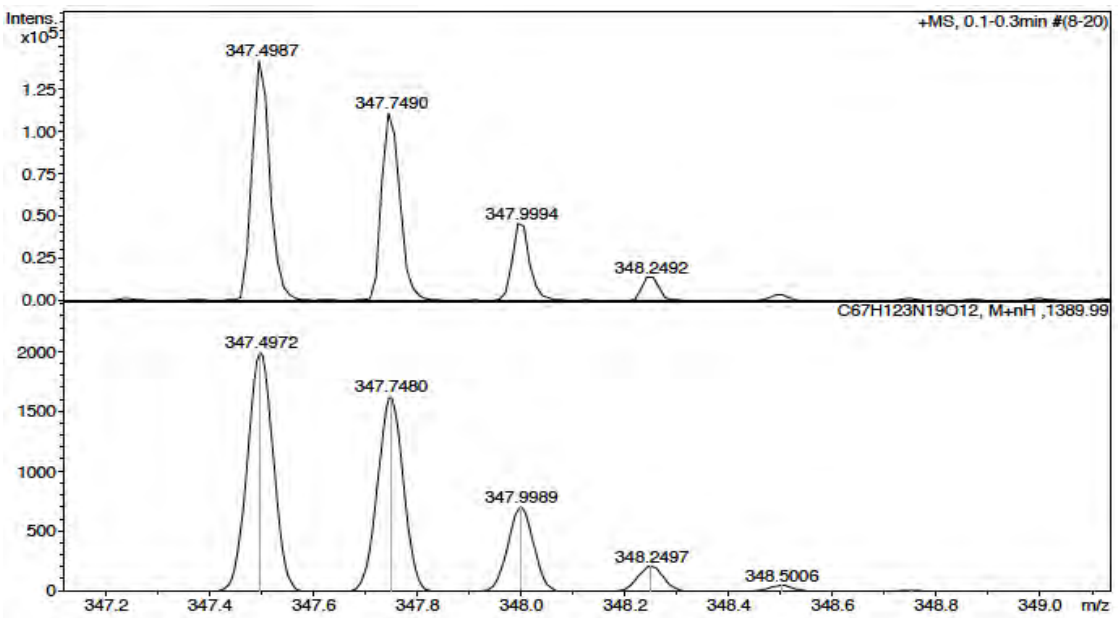
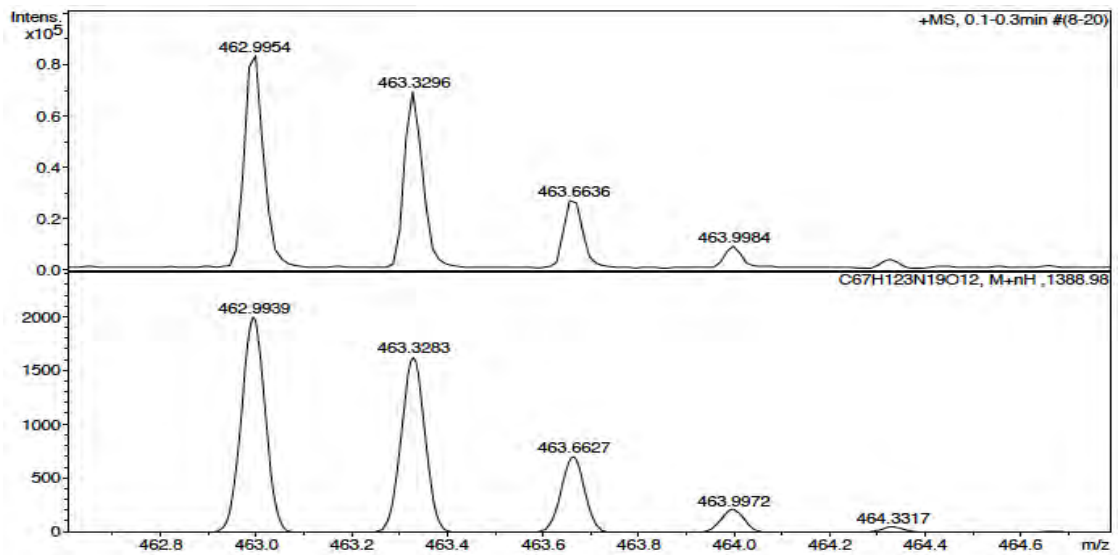
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,14	78,756	10,009	12,31
2	6,40	137,976	67,930	83,56
3	6,54	17,139	3,359	4,13
Total:		233,871	81,298	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



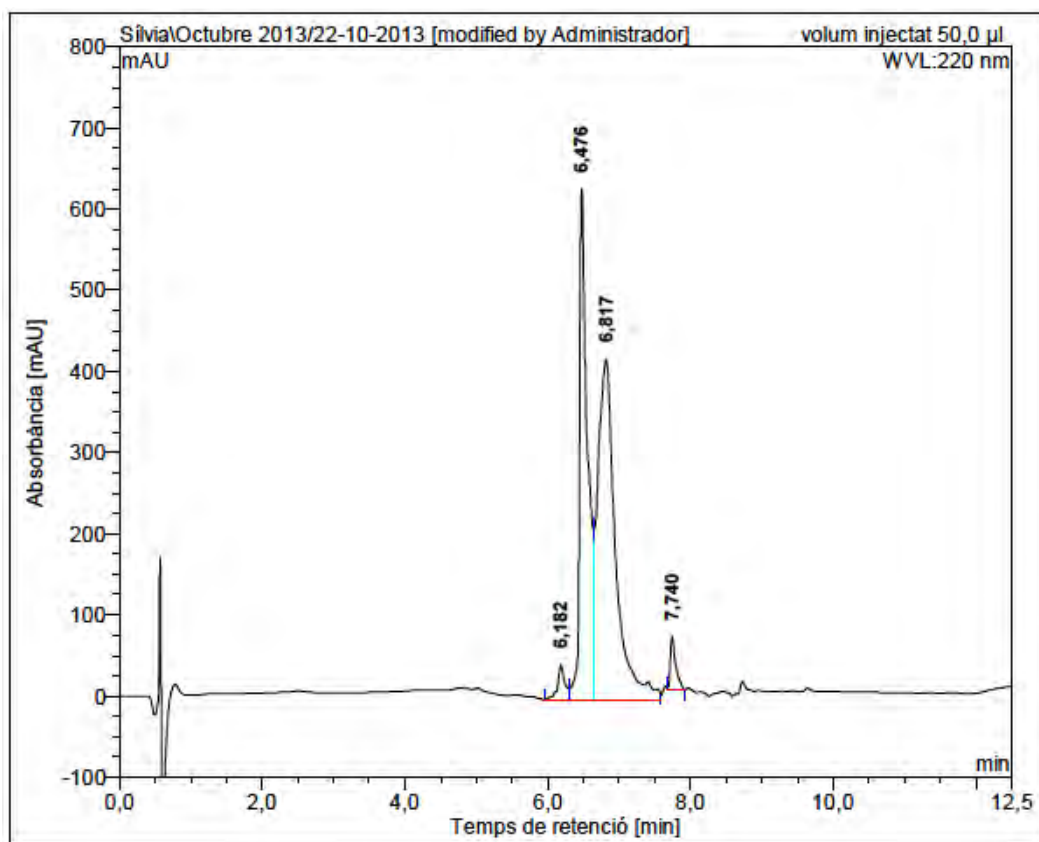
HRMS (ESI)  $m/z$





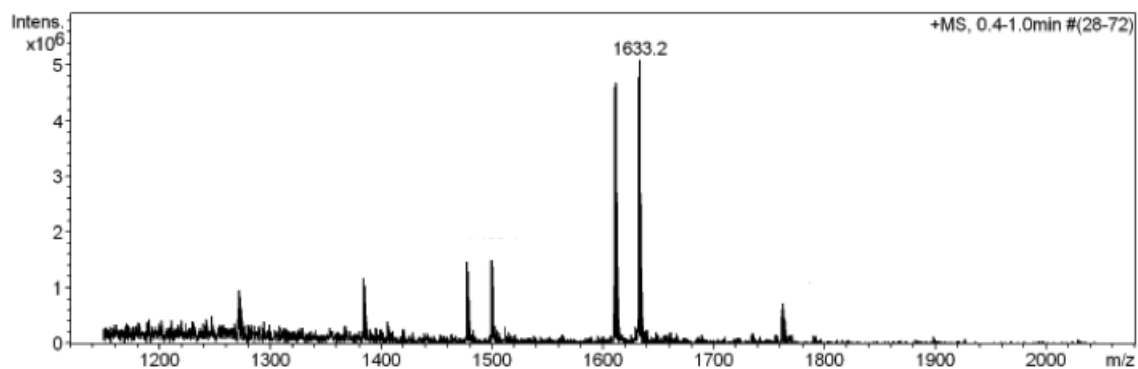
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(Leu-Lys-CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC672)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

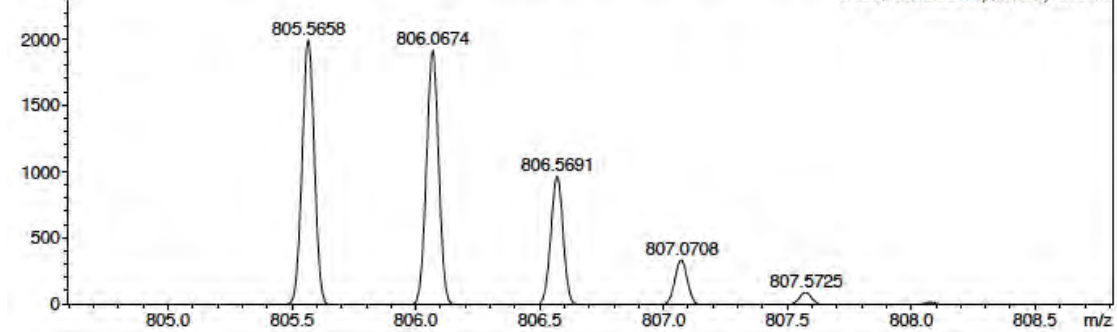
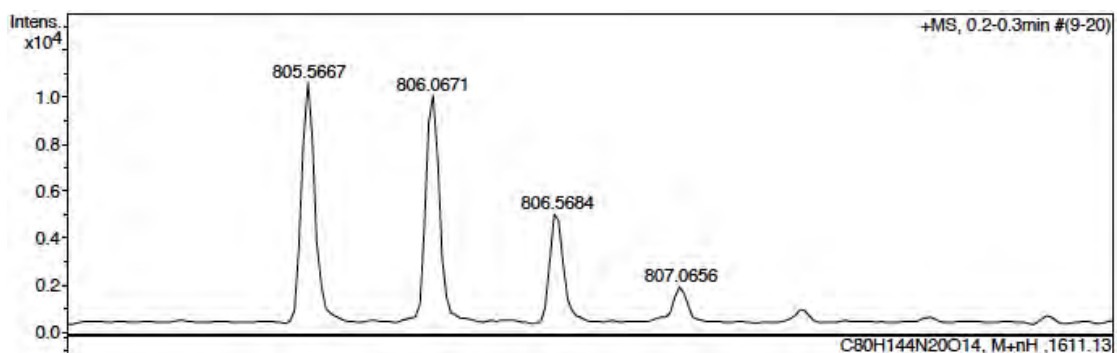
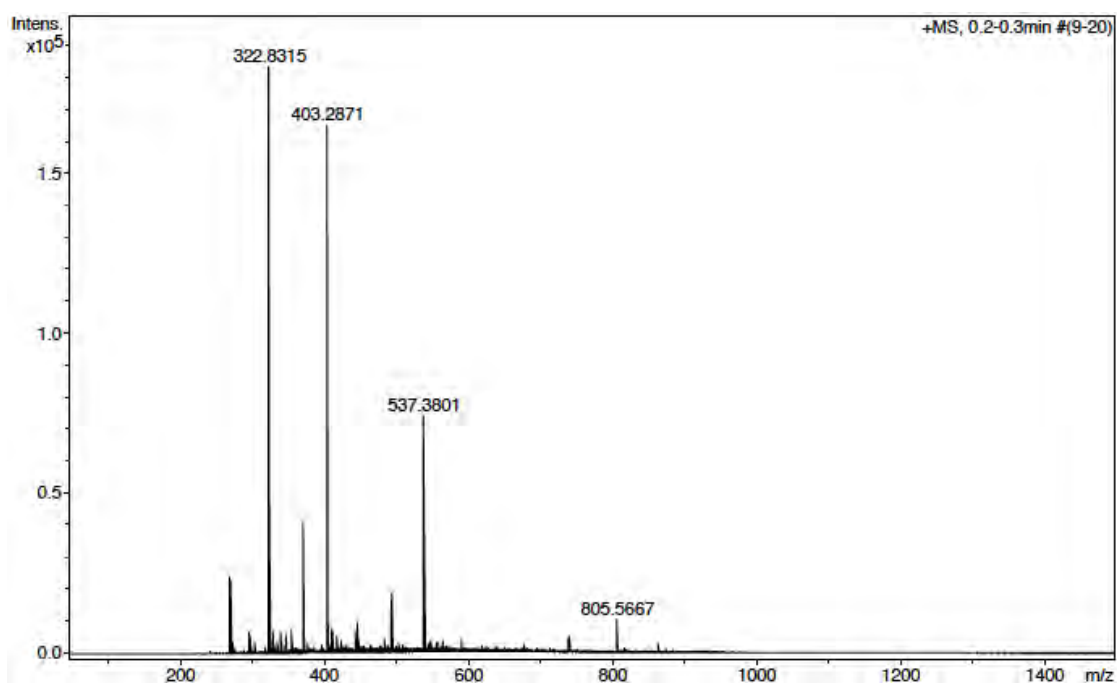


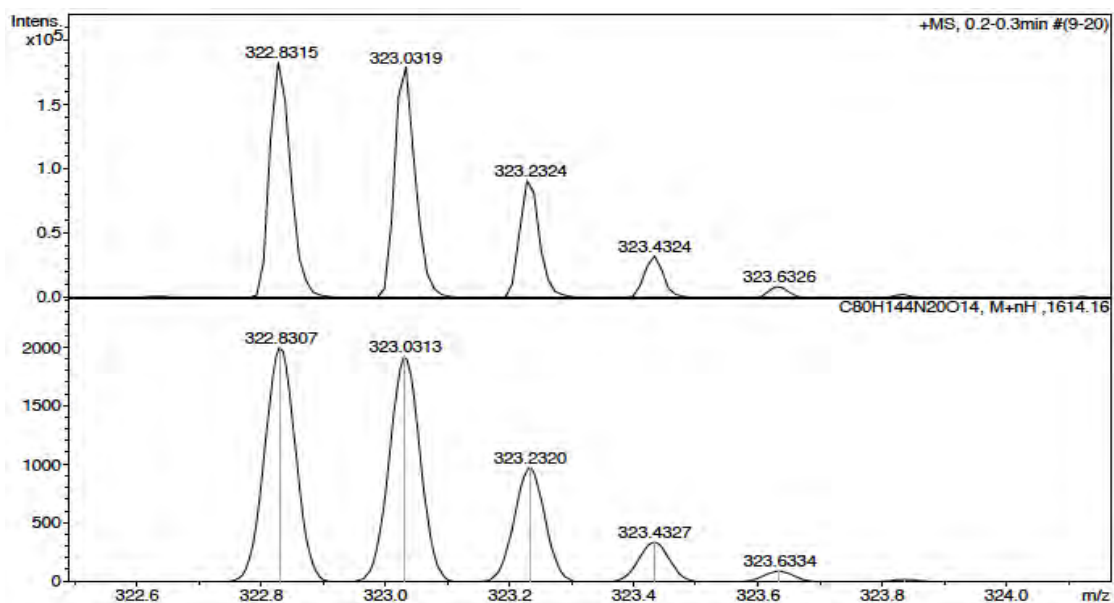
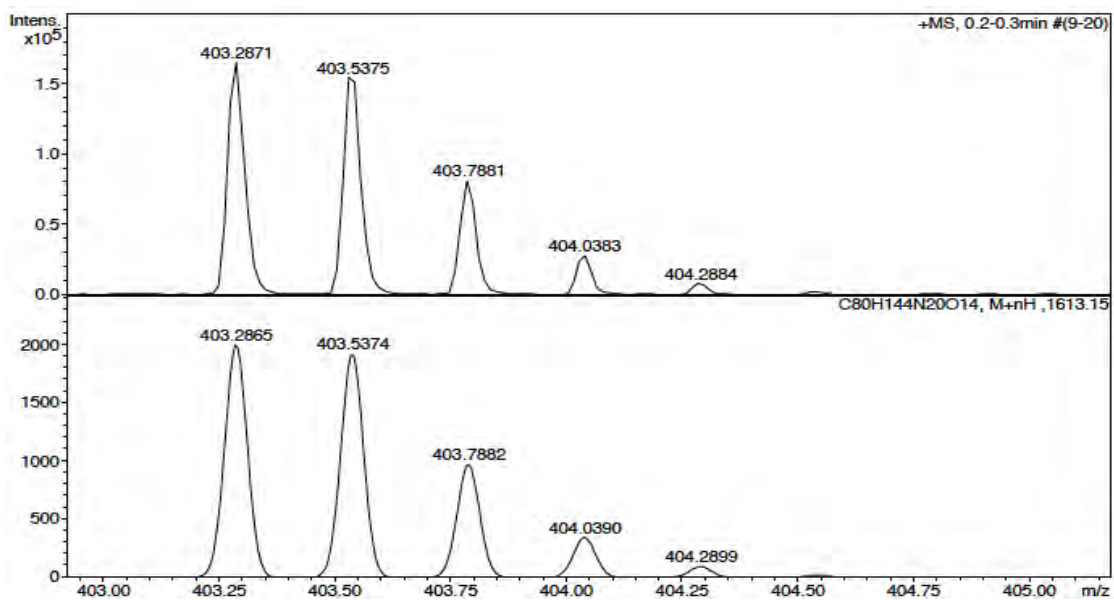
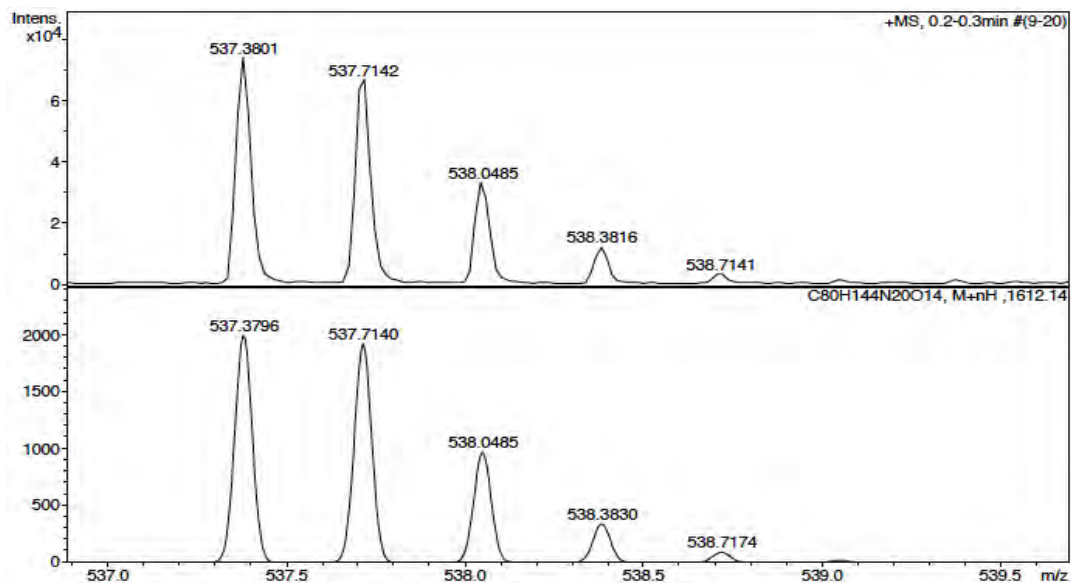
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,18	42,323	4,957	2,30
2	6,48	629,726	81,111	37,67
3	6,82	419,487	123,594	57,41
4	7,74	64,993	5,632	2,62
Total:		1156,528	215,293	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



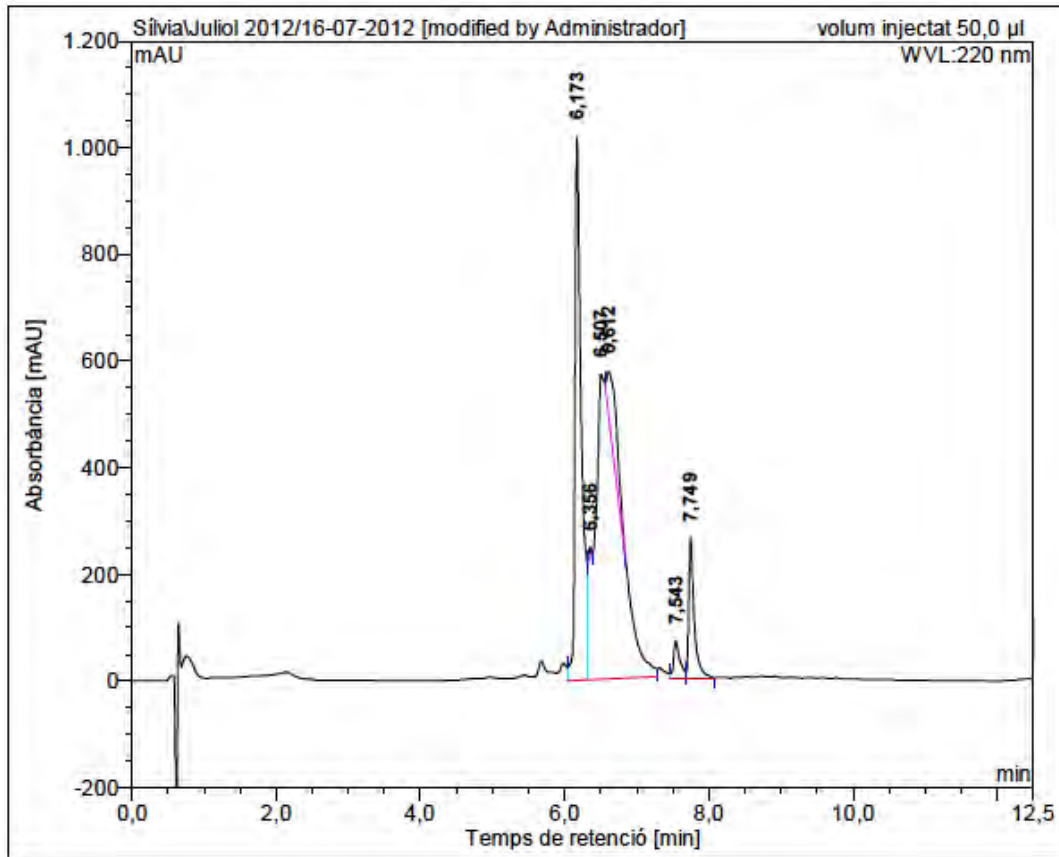
HRMS (ESI)  $m/z$





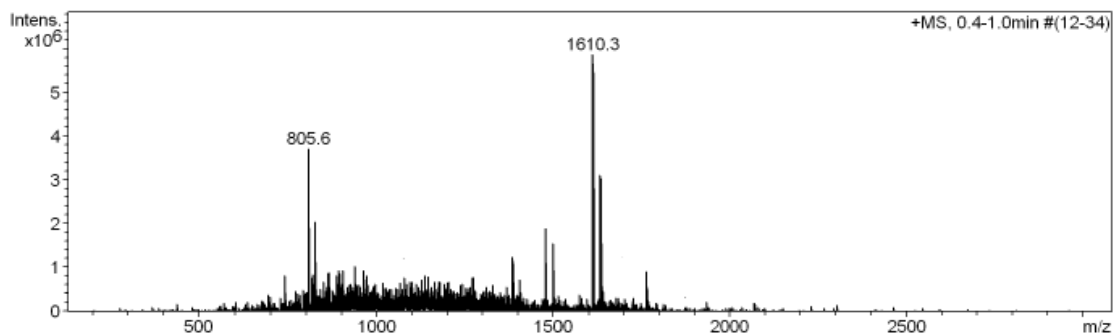
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(Leu-Lys-CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC674)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

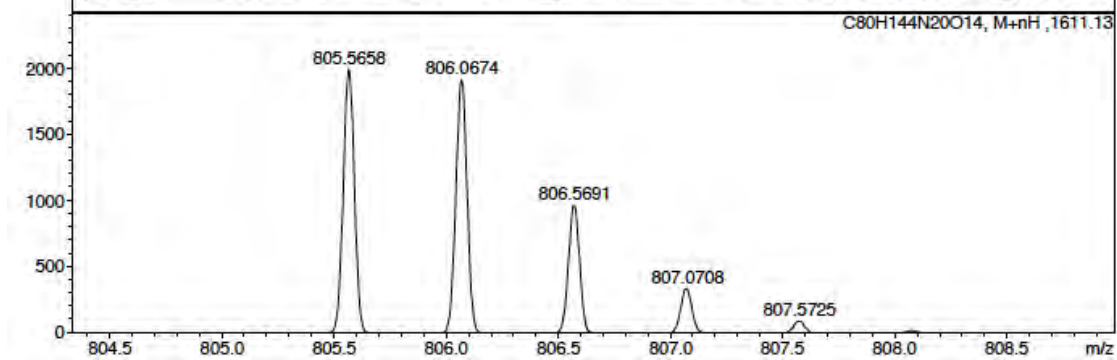
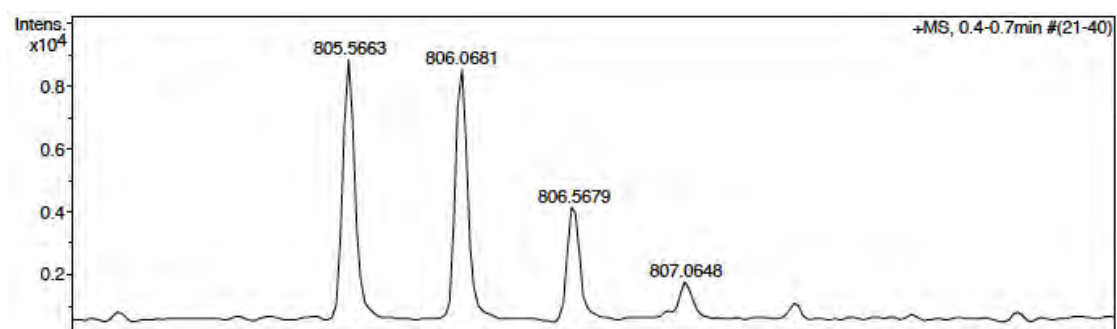
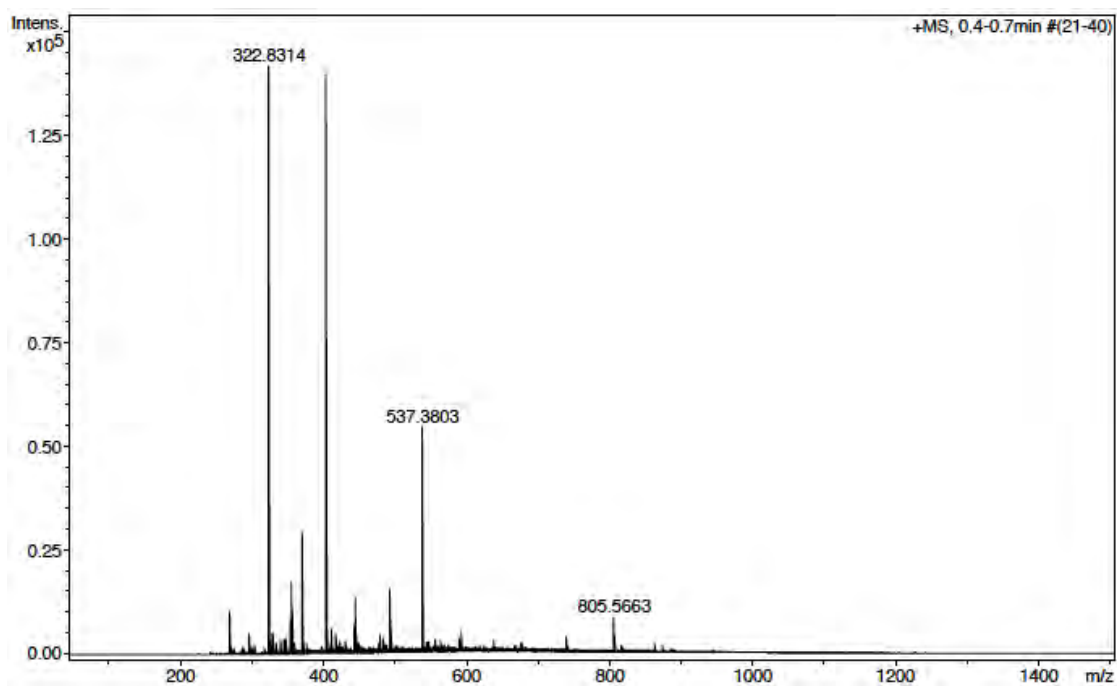


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,17	1019,366	105,584	27,29
2	6,36	18,460	0,630	0,16
3	6,51	571,828	231,977	59,97
4	6,61	81,716	19,141	4,95
5	7,54	68,270	6,854	1,77
6	7,75	262,086	22,642	5,85
<b>Total:</b>		<b>2021,726</b>	<b>386,827</b>	<b>100,00</b>

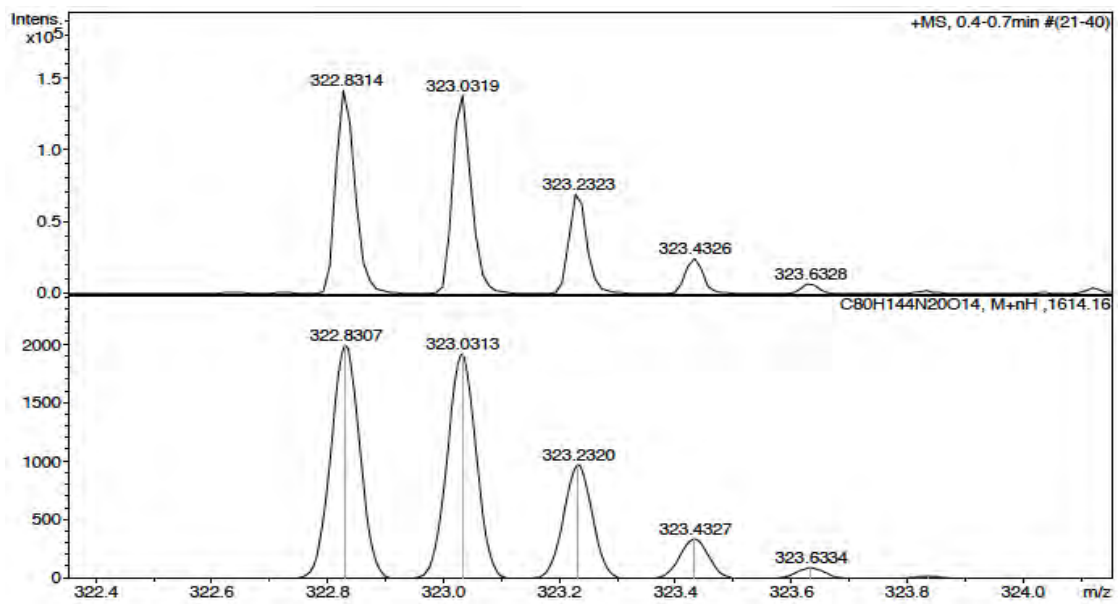
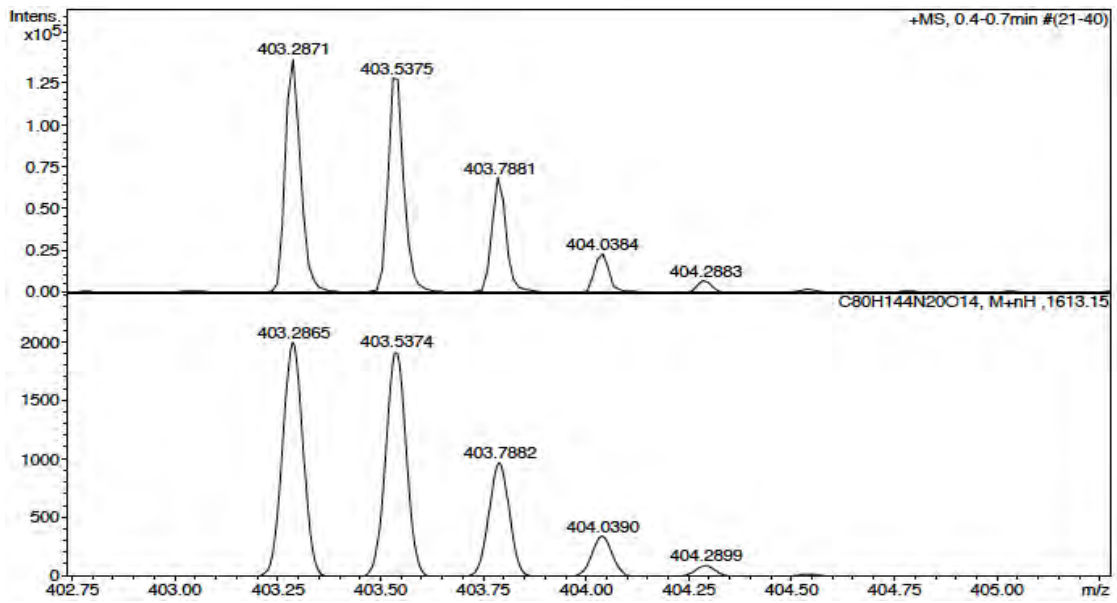
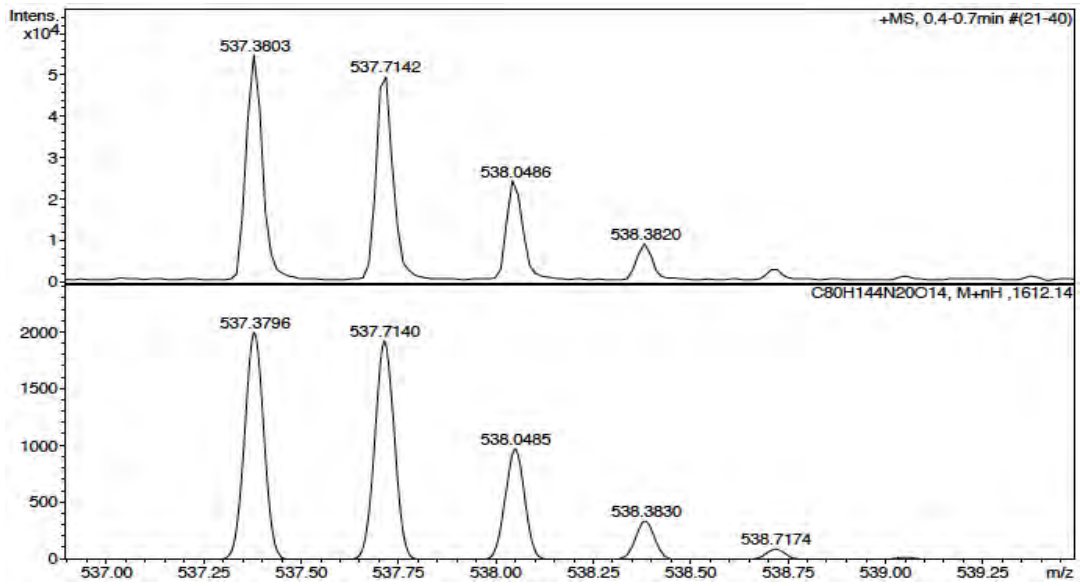
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

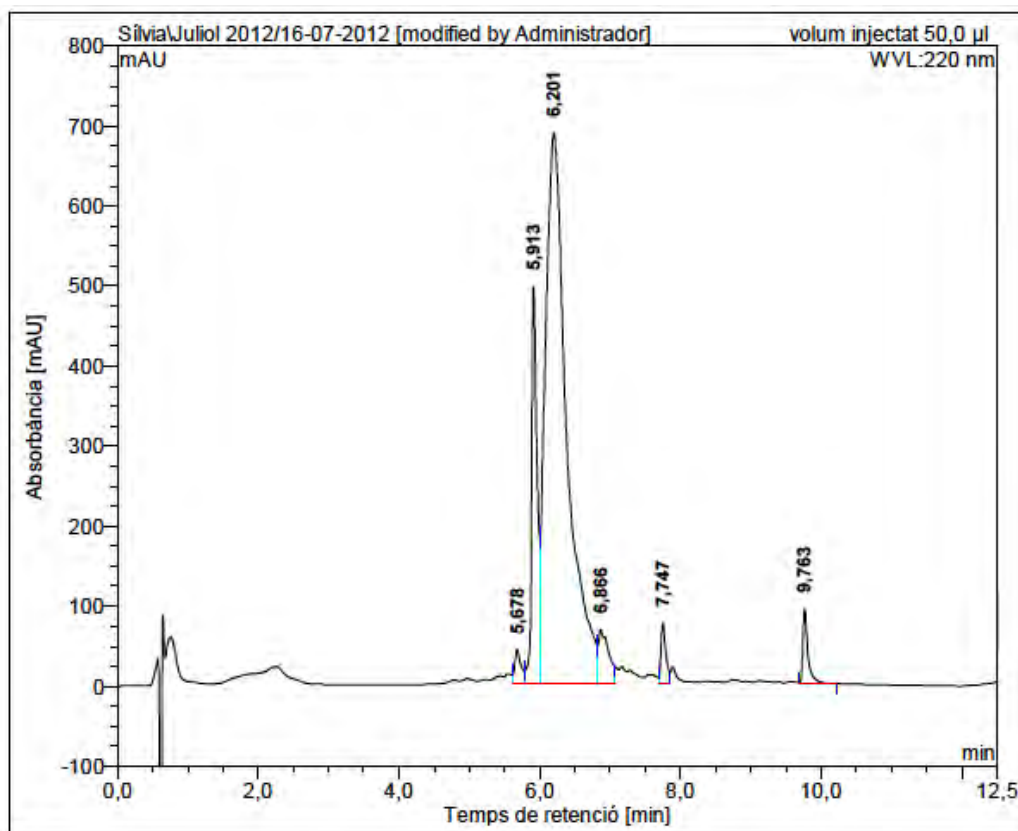






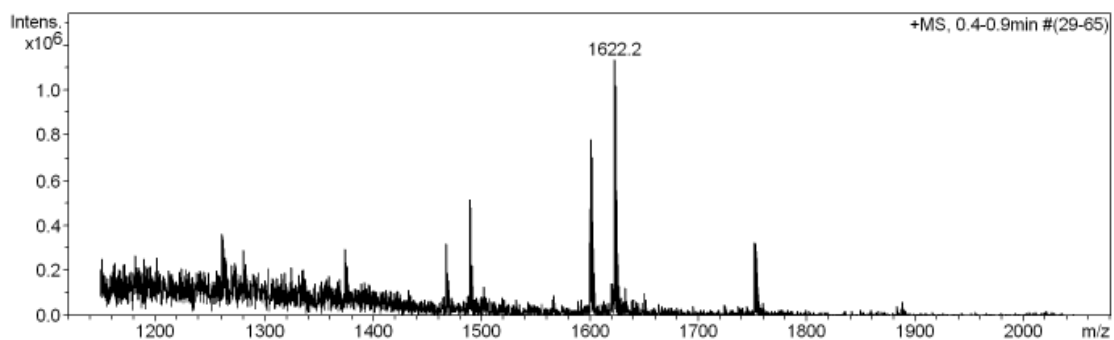
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(Lys-Lys-CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC676)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

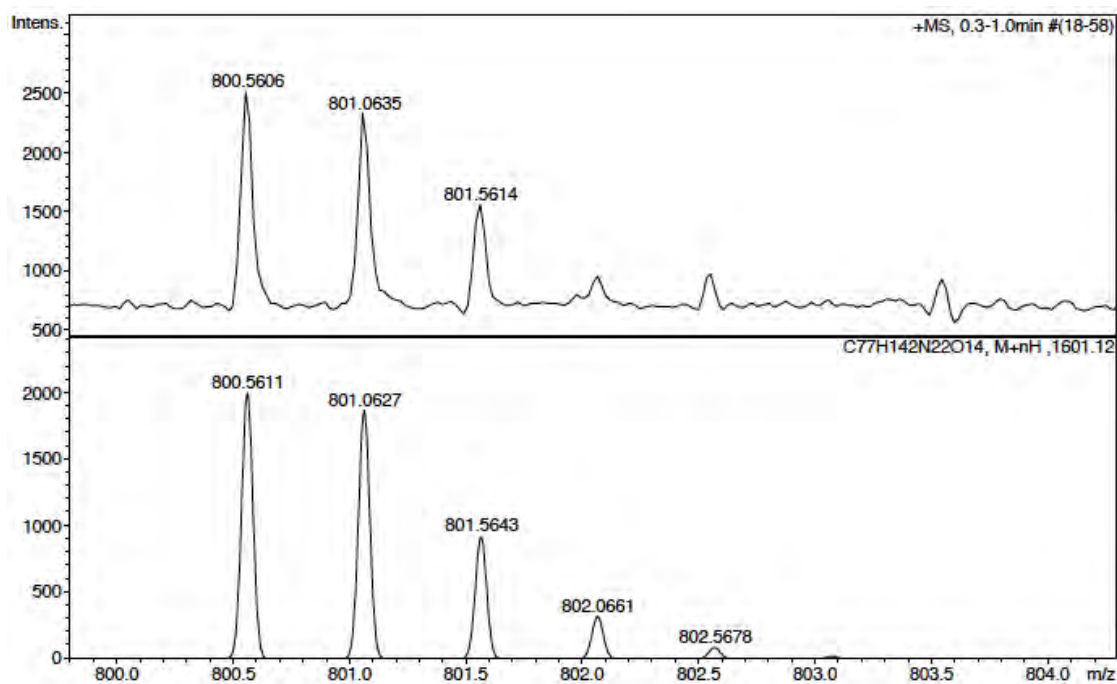
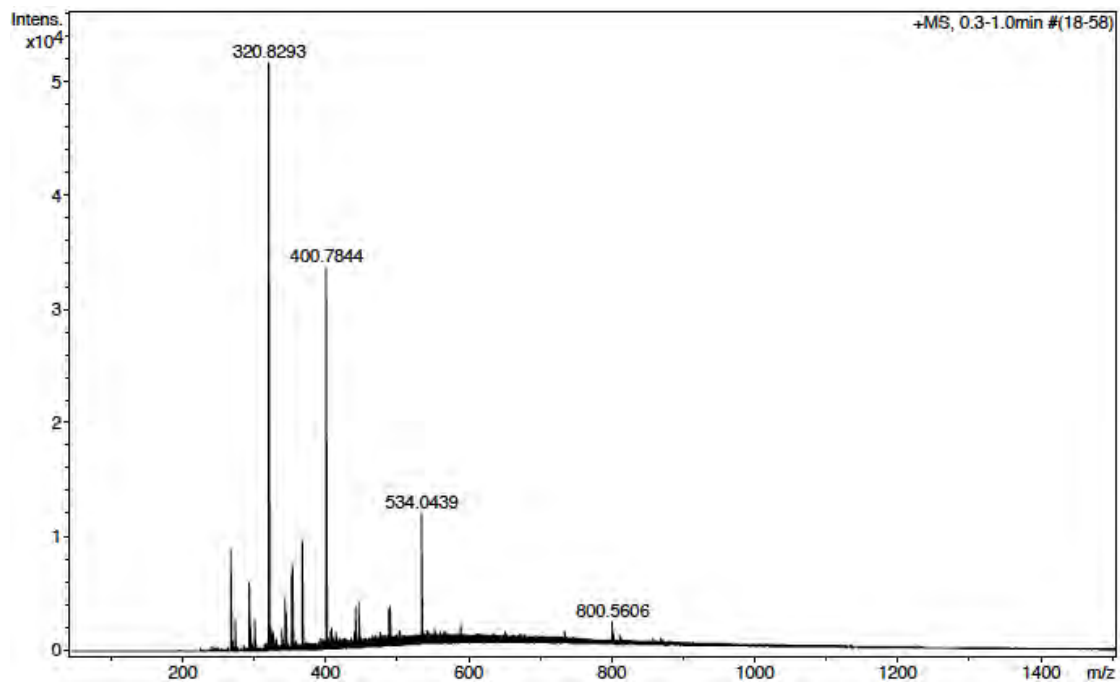


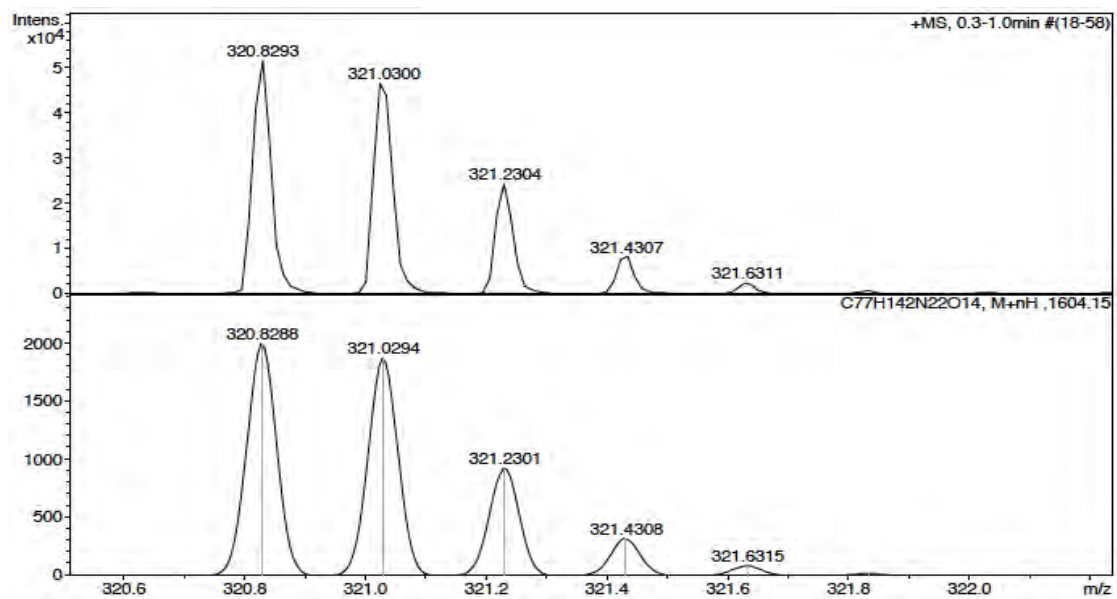
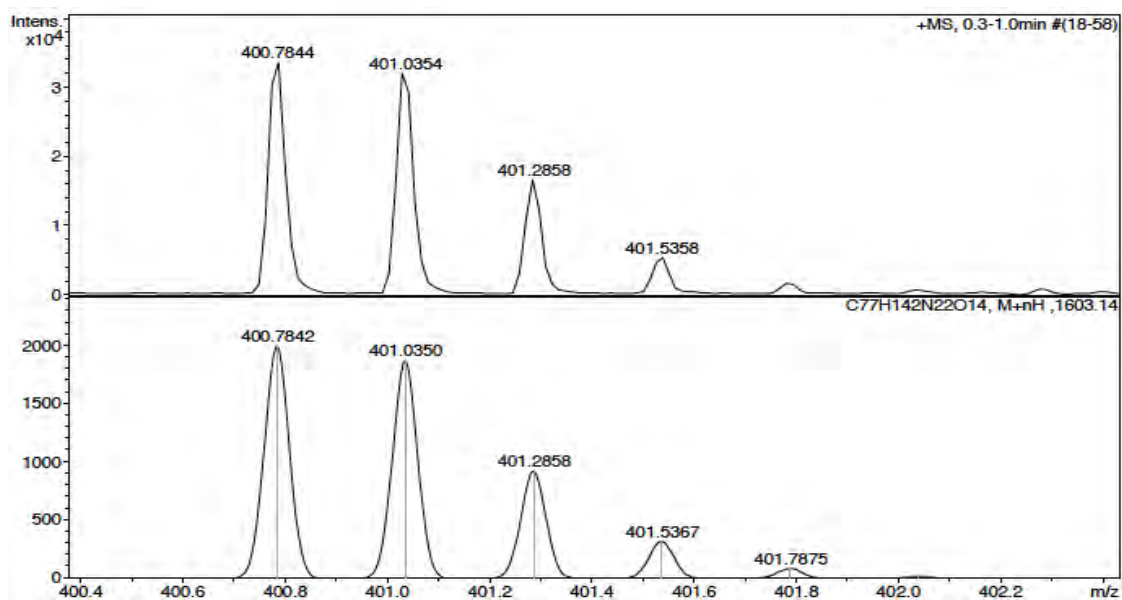
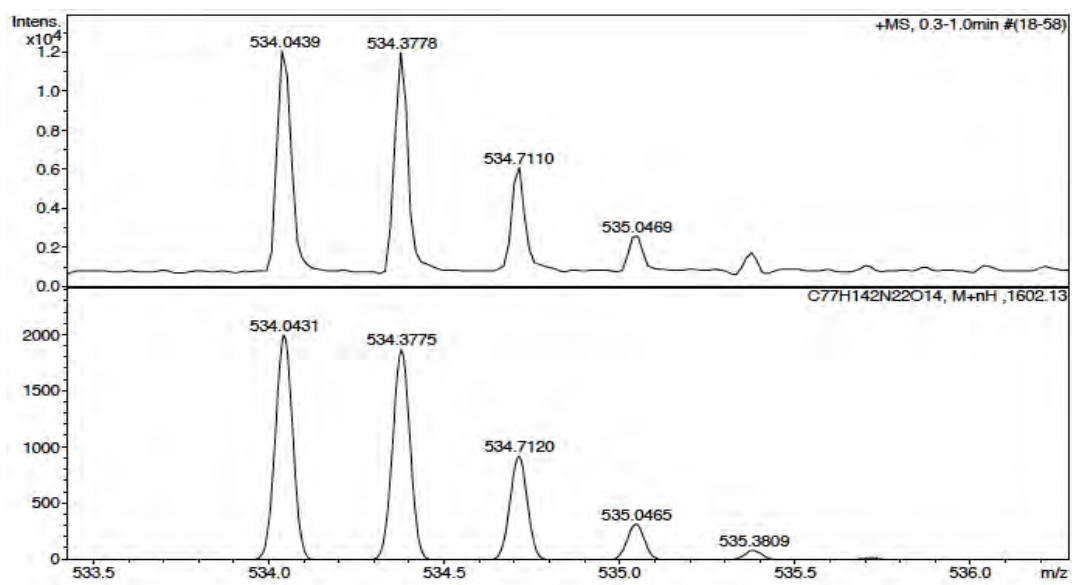
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,68	40,762	4,146	1,31
2	5,91	495,477	43,661	13,78
3	6,20	686,808	243,948	77,02
4	6,87	65,948	10,869	3,43
5	7,75	75,633	6,222	1,96
6	9,76	93,517	7,895	2,49
Total:		1458,144	316,741	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



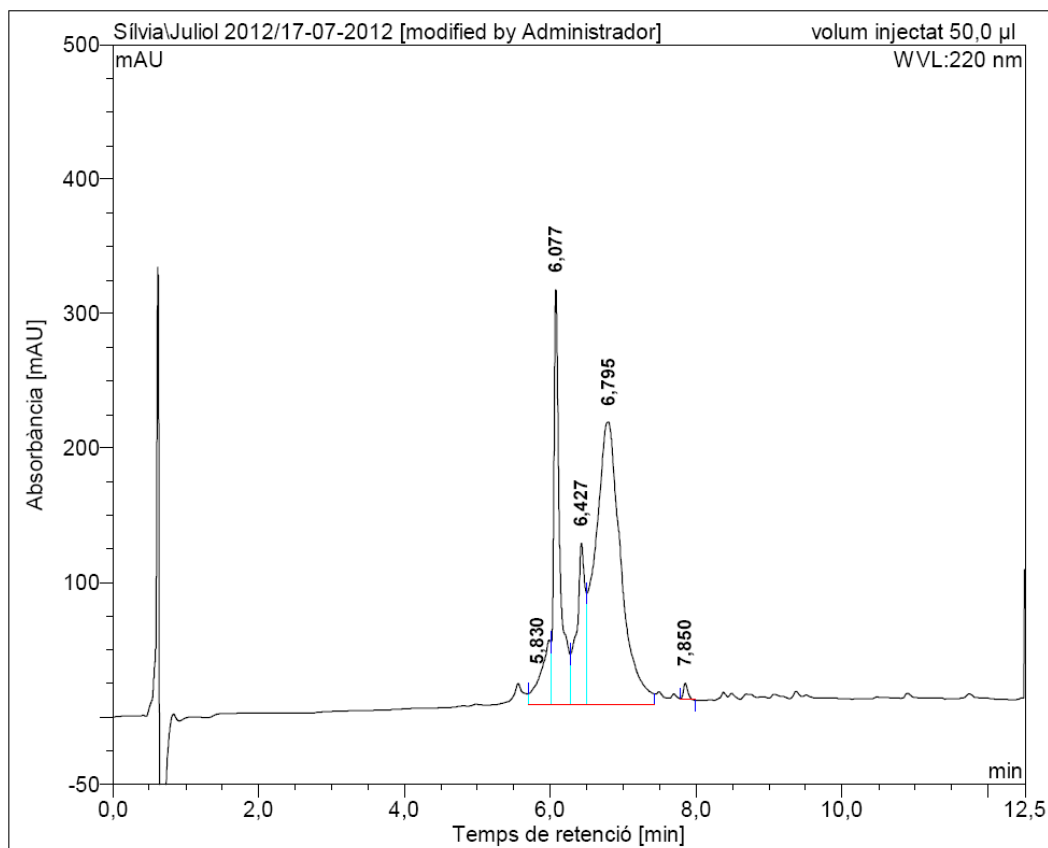
HRMS (ESI)  $m/z$





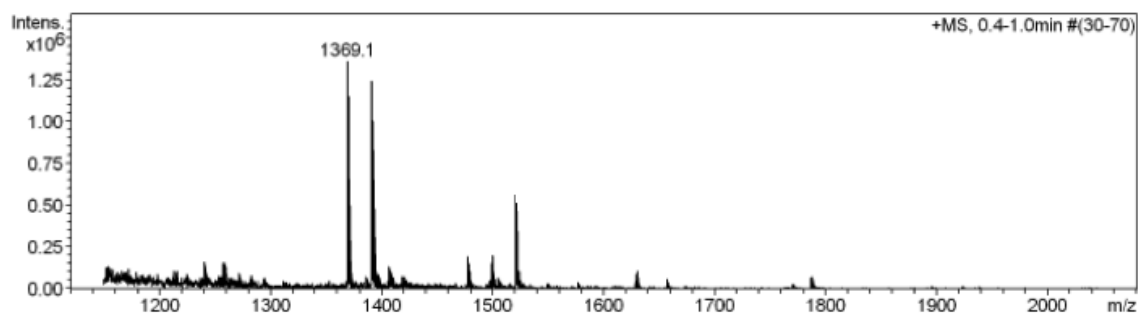
**c(Lys-D-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC678)**

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

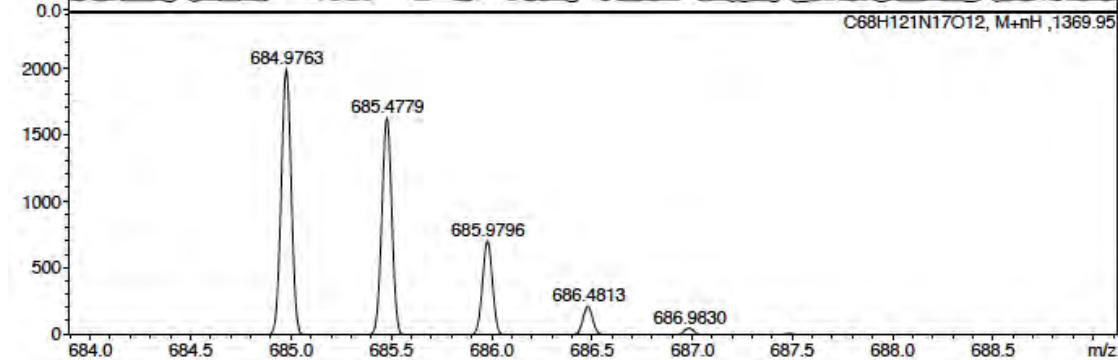
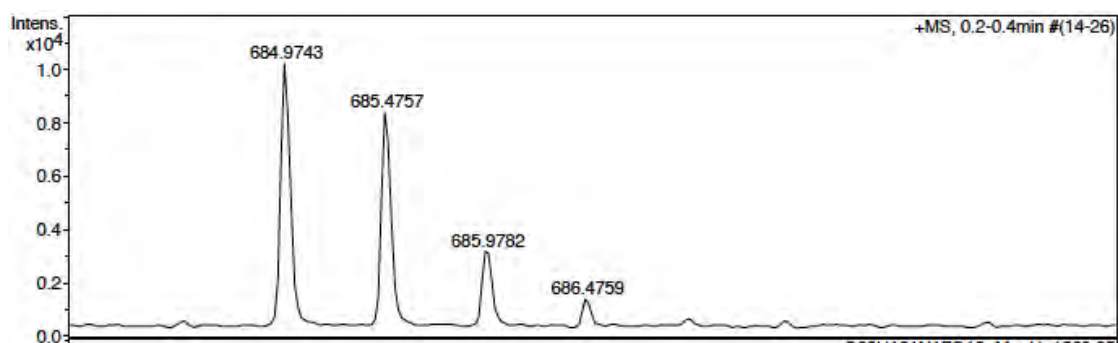
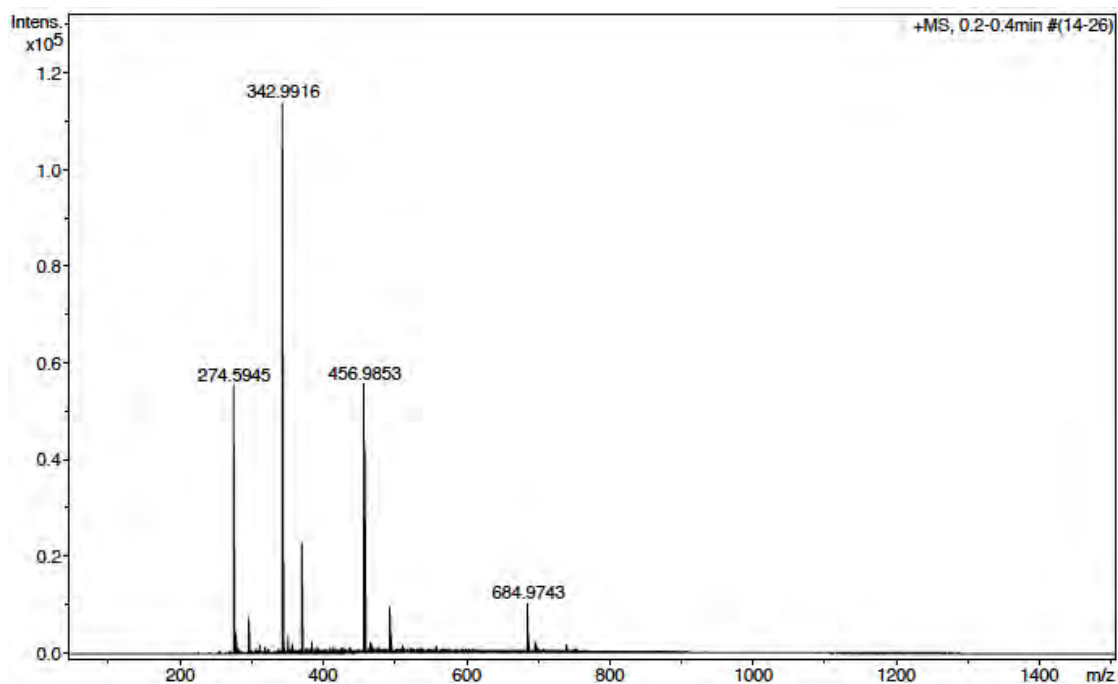


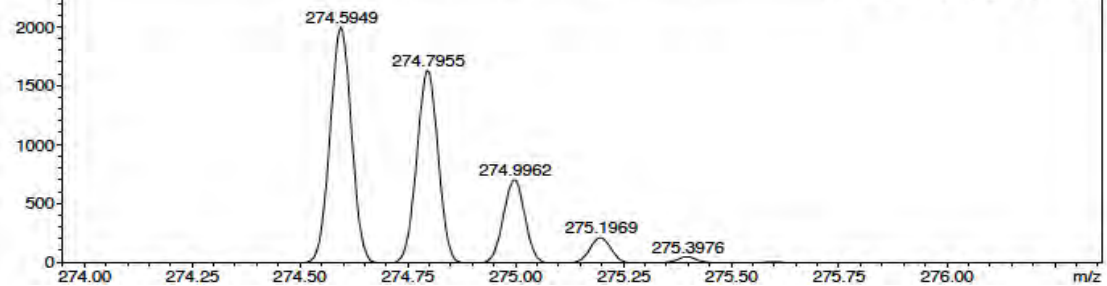
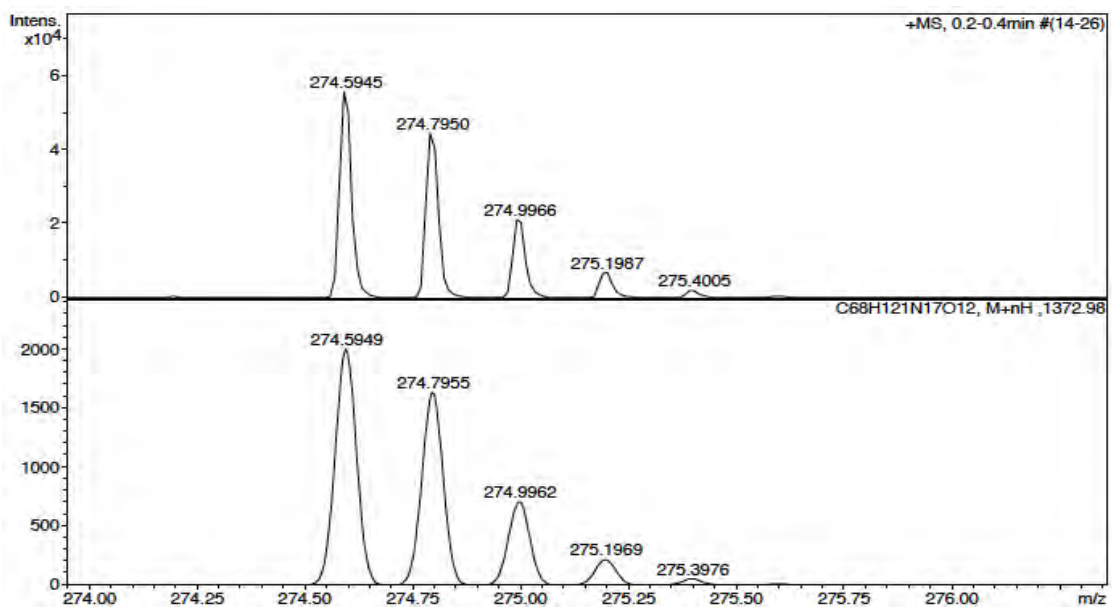
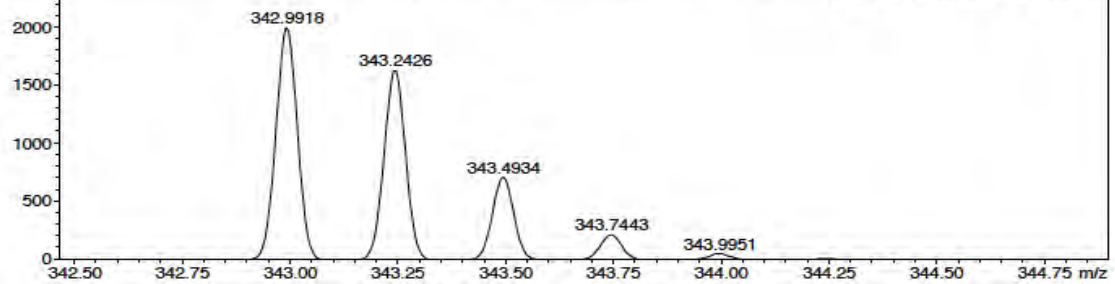
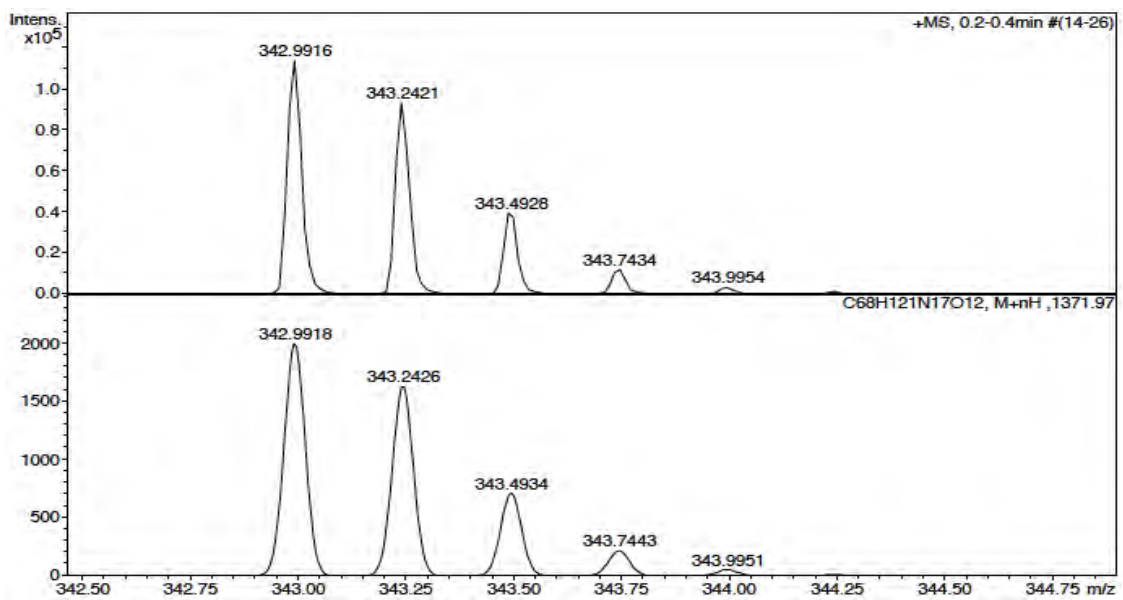
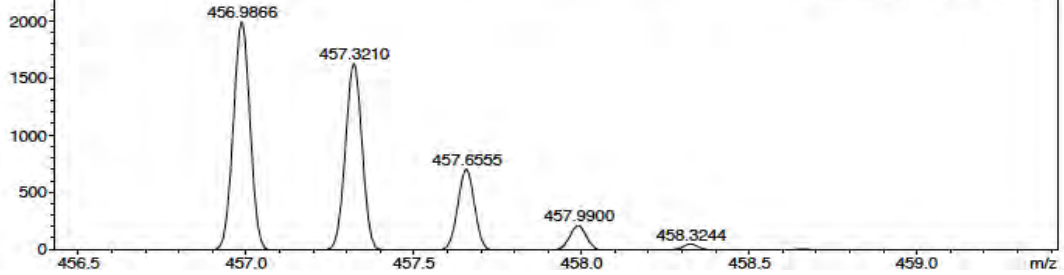
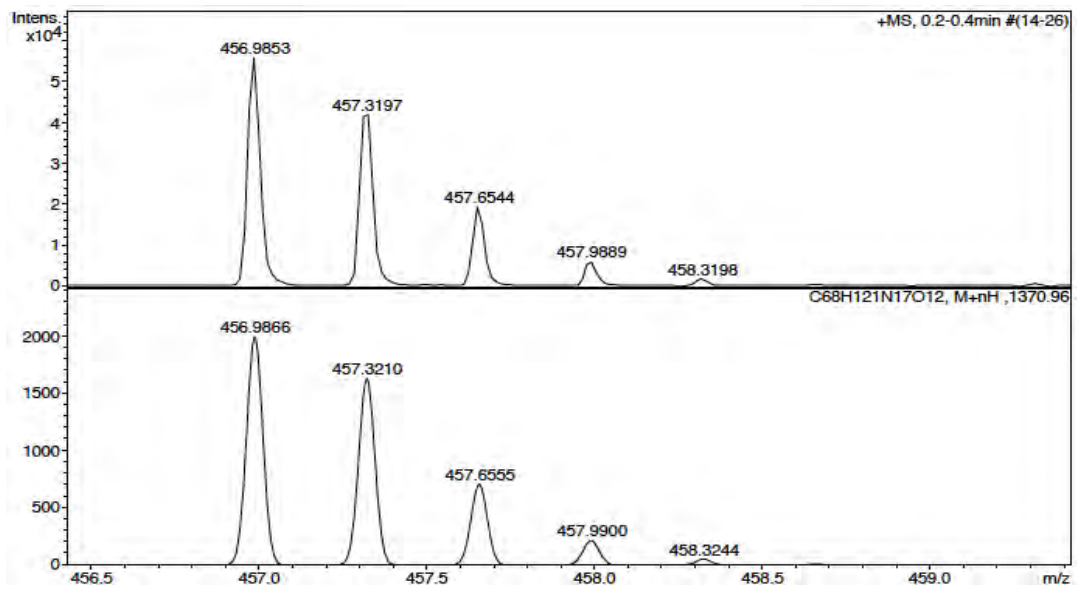
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,83	17,722	7,479	5,34
2	6,08	308,315	29,752	21,23
3	6,43	119,947	17,029	12,15
4	6,80	210,399	85,198	60,78
5	7,85	11,437	0,717	0,51
Total:		667,820	140,175	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



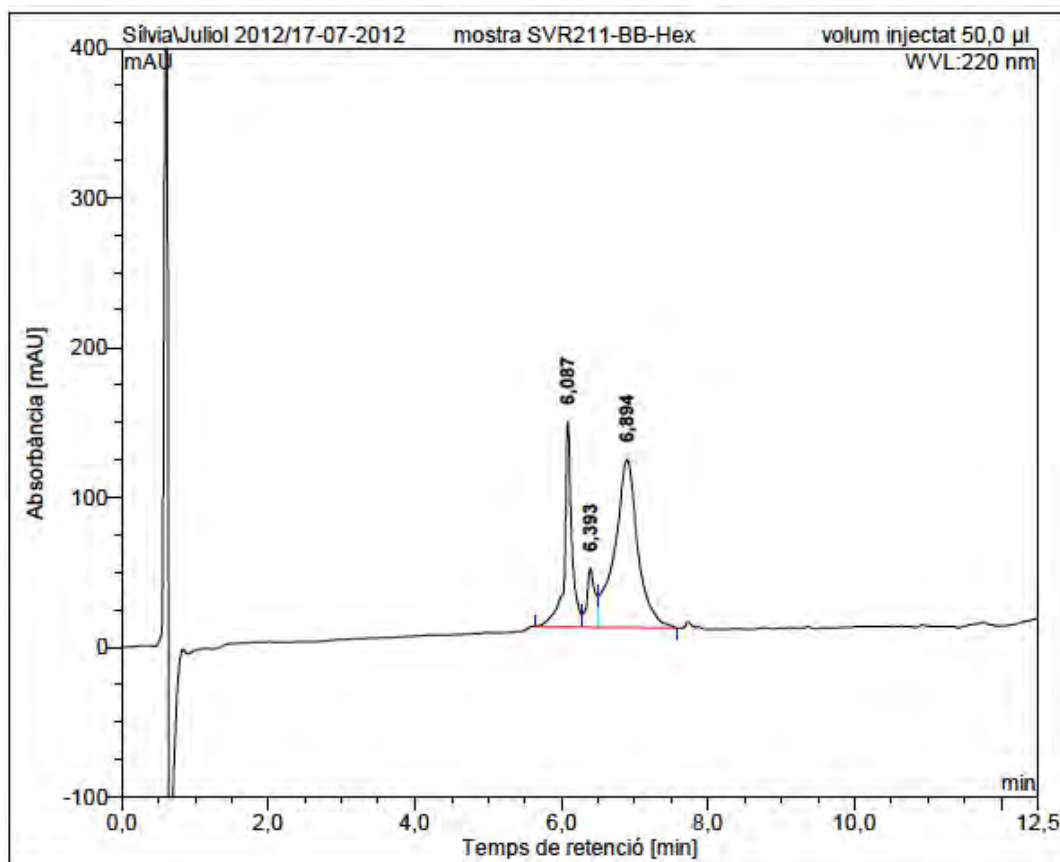
HRMS (ESI)  $m/z$





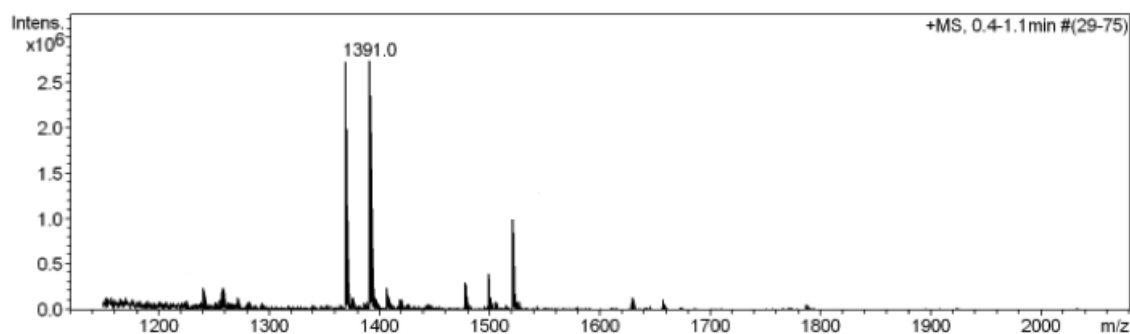
**c(Lys-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC680)**

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



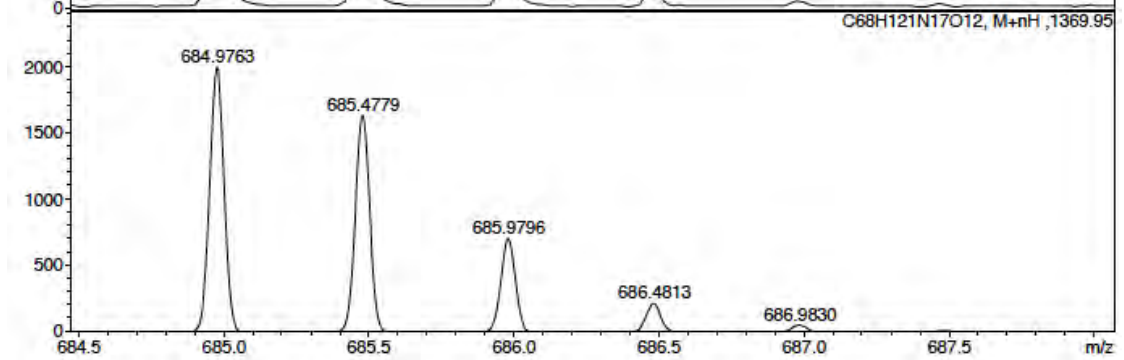
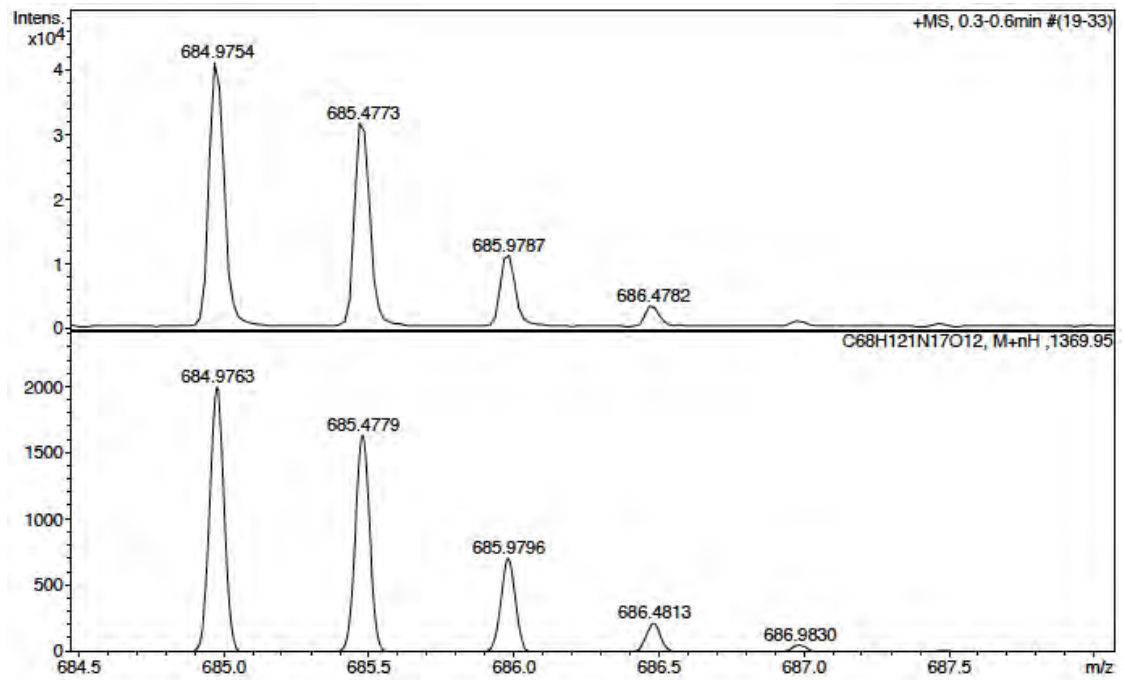
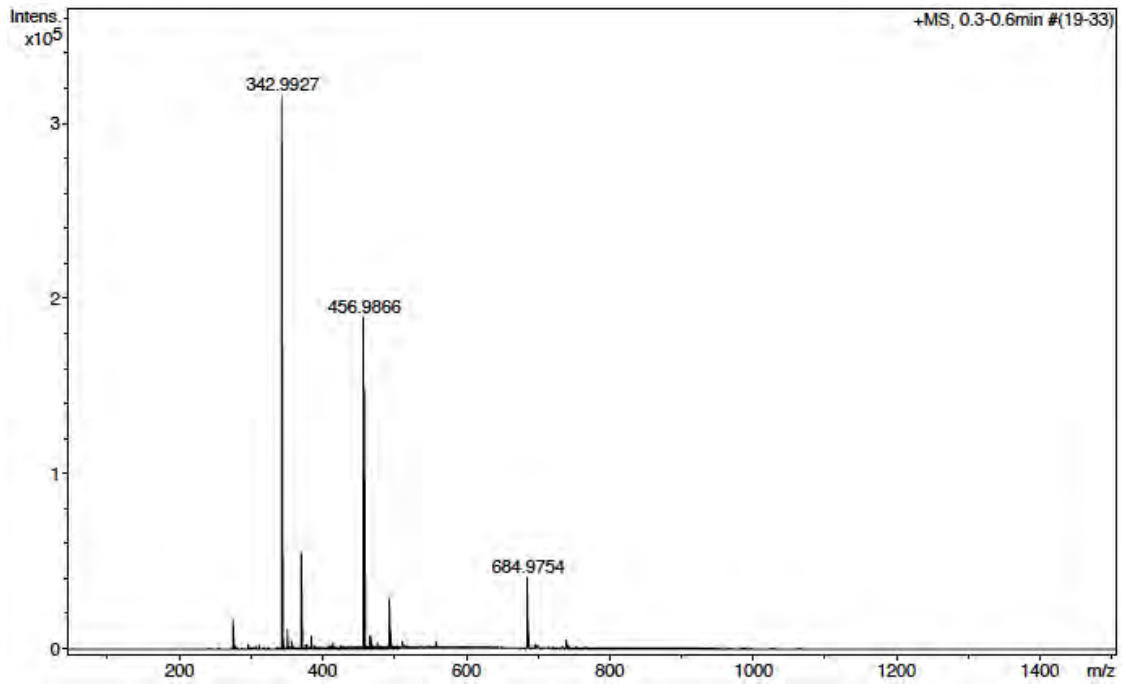
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,09	137,389	16,197	25,96
2	6,39	39,219	5,069	8,13
3	6,89	112,158	41,120	65,91
Total:		288,765	62,386	100,00

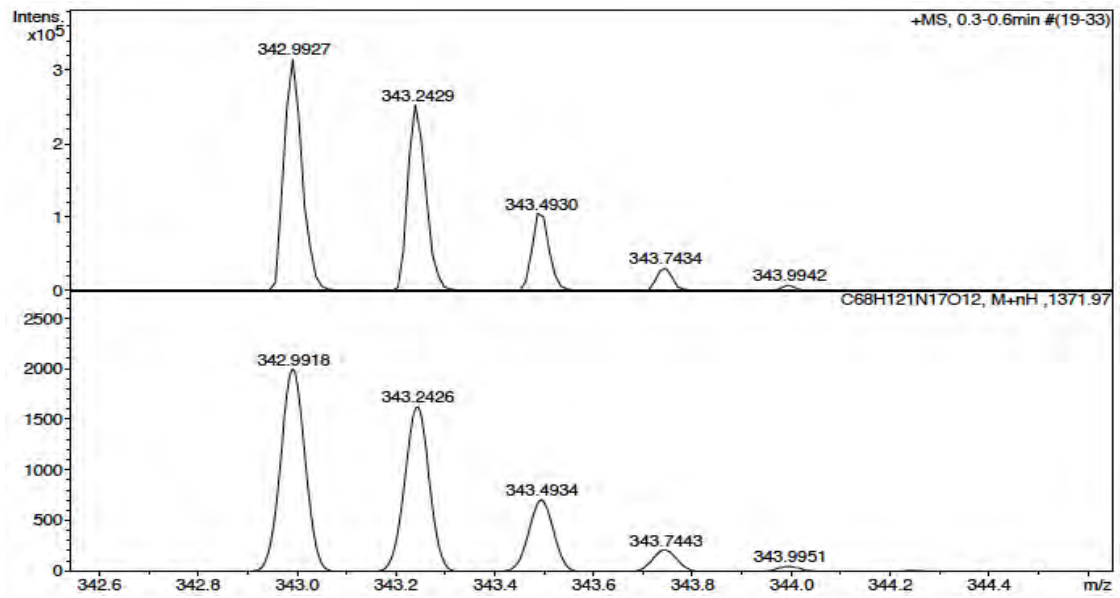
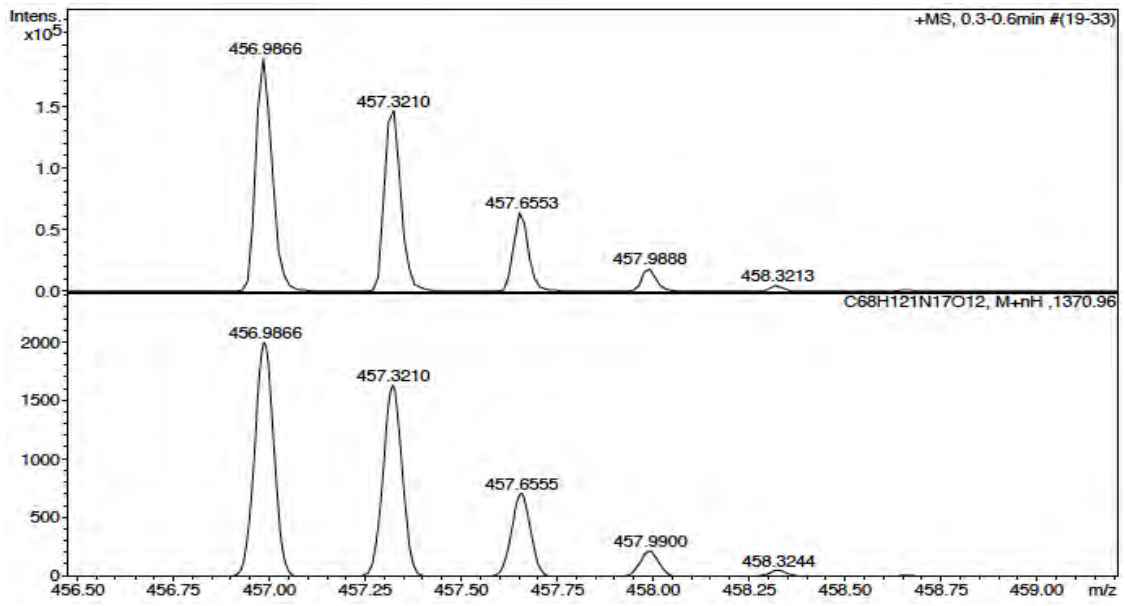
ESI-MS ( $m/z$ )





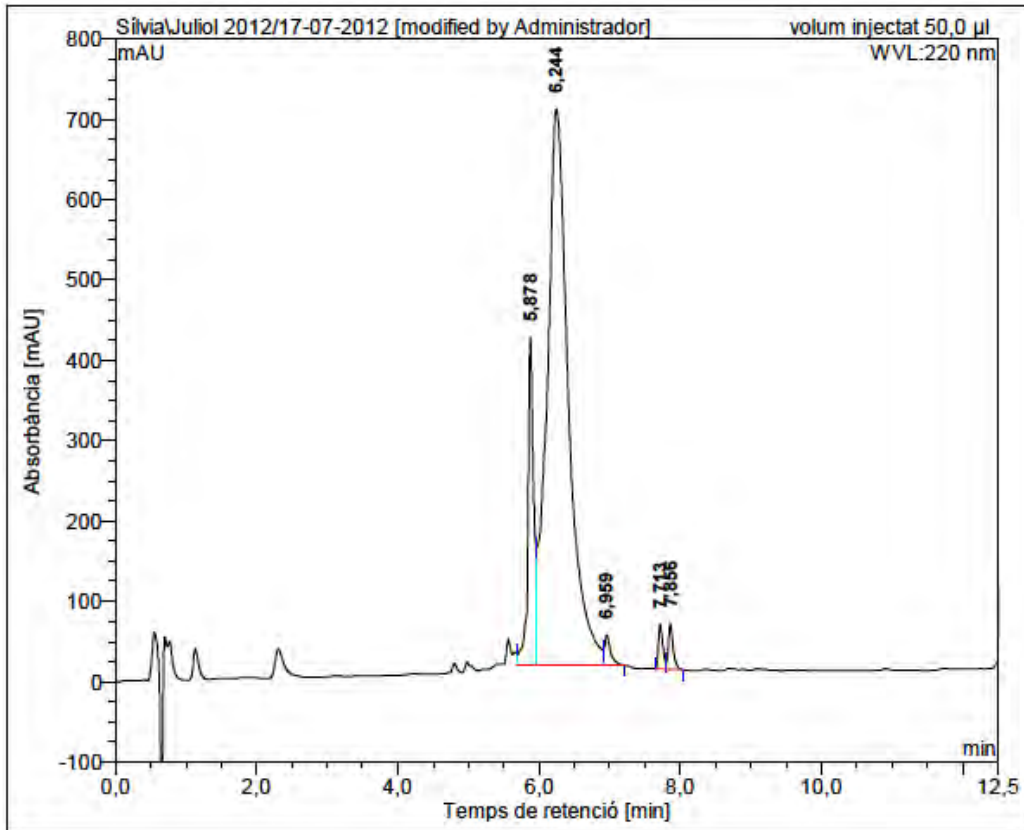
HRMS (ESI)  $m/z$





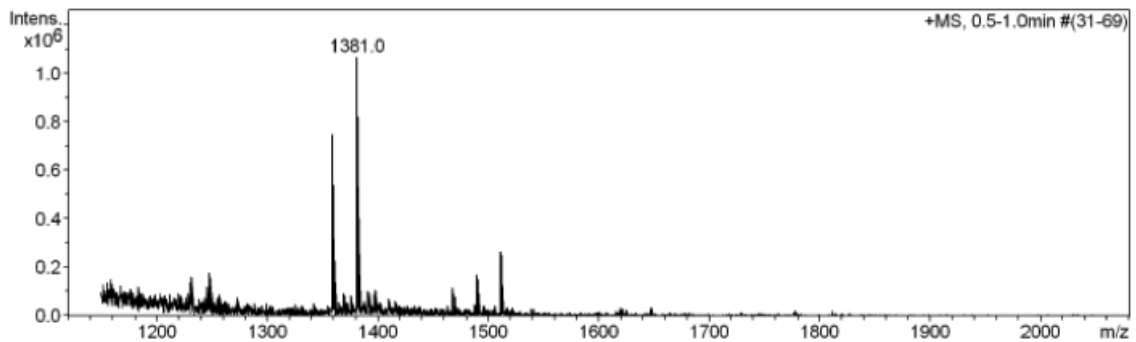
c(Lys-Lys(CO-*n*C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC682)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

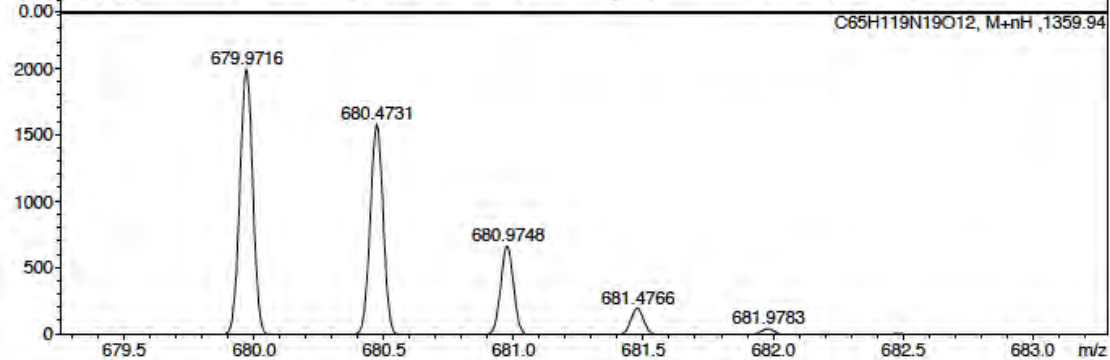
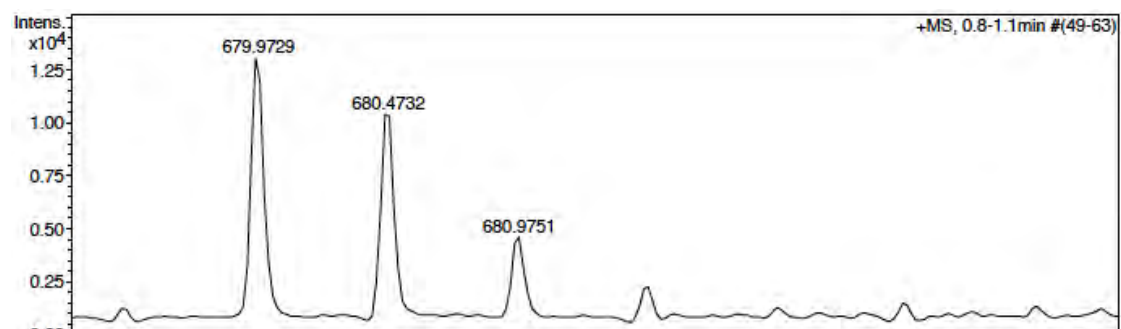
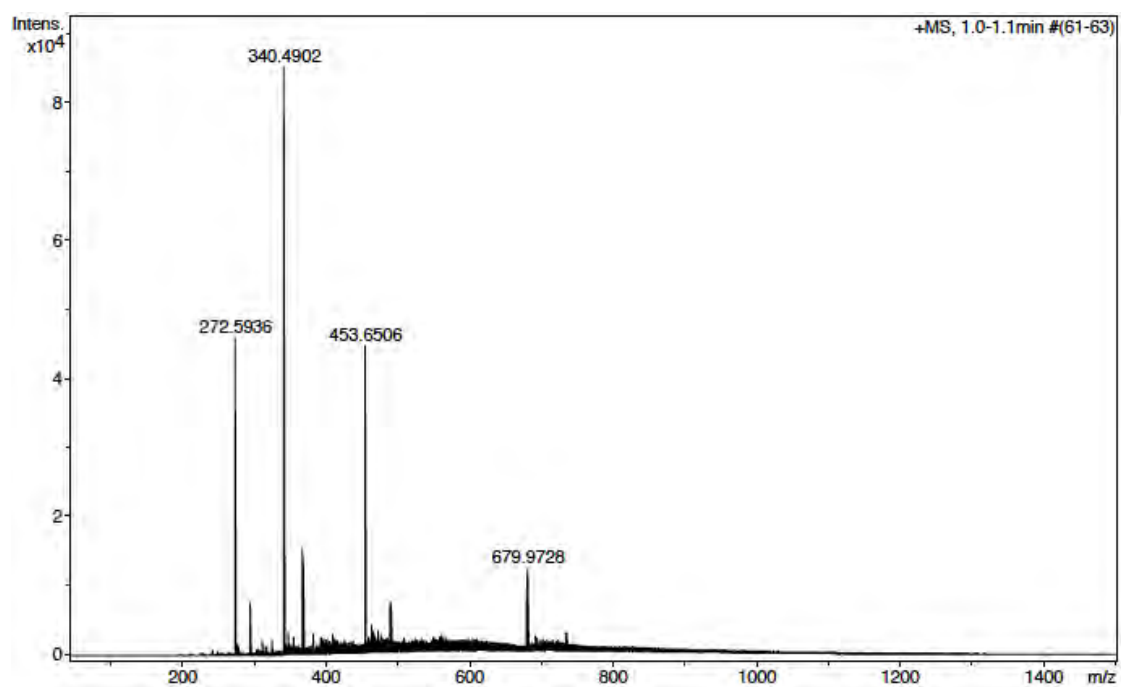


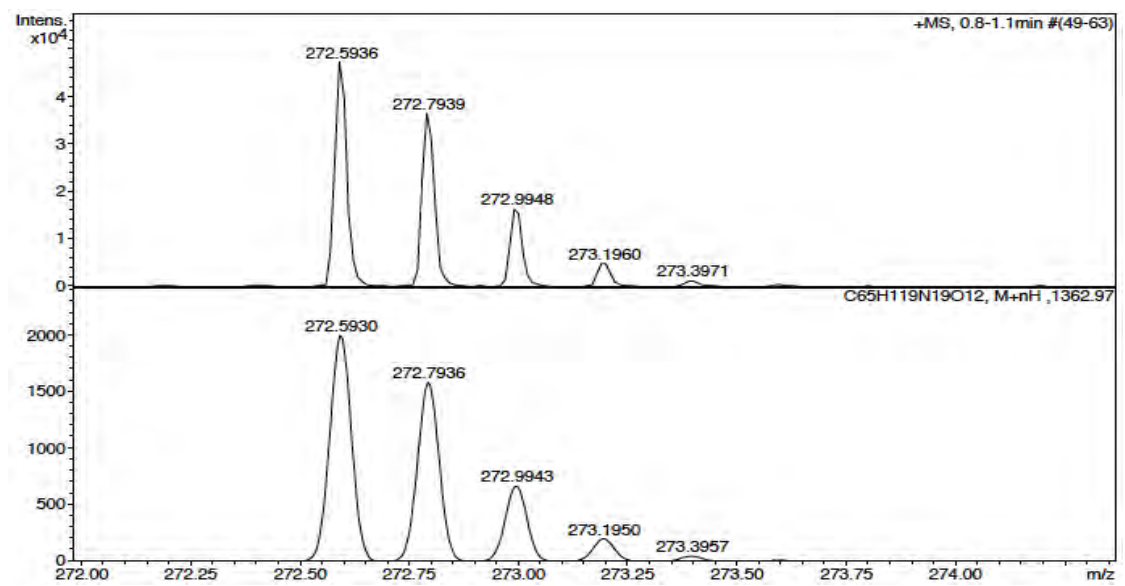
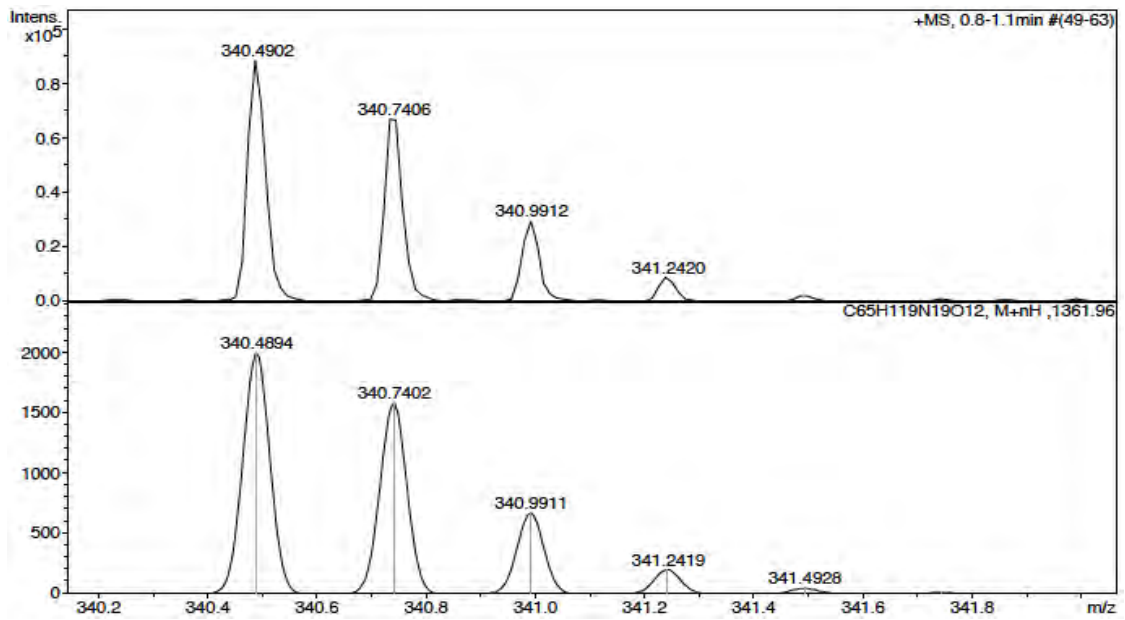
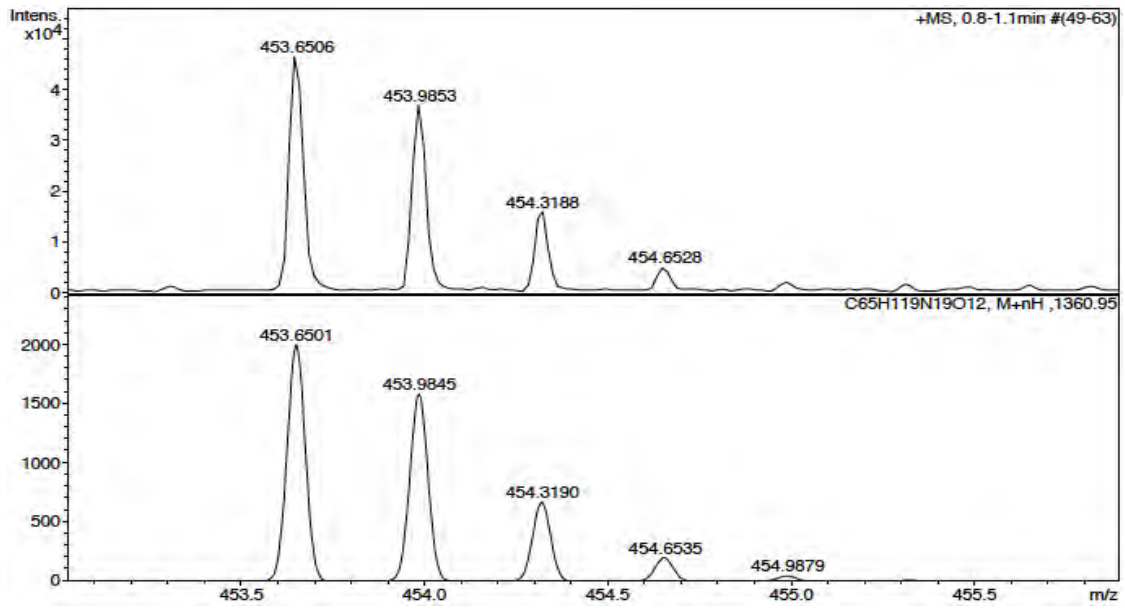
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,88	409,098	38,156	12,94
2	6,24	692,589	244,386	82,88
3	6,96	37,949	3,901	1,32
4	7,71	55,637	4,002	1,36
5	7,86	57,199	4,413	1,50
Total:		1252,471	294,860	100,00

ESI-MS (*m/z*)



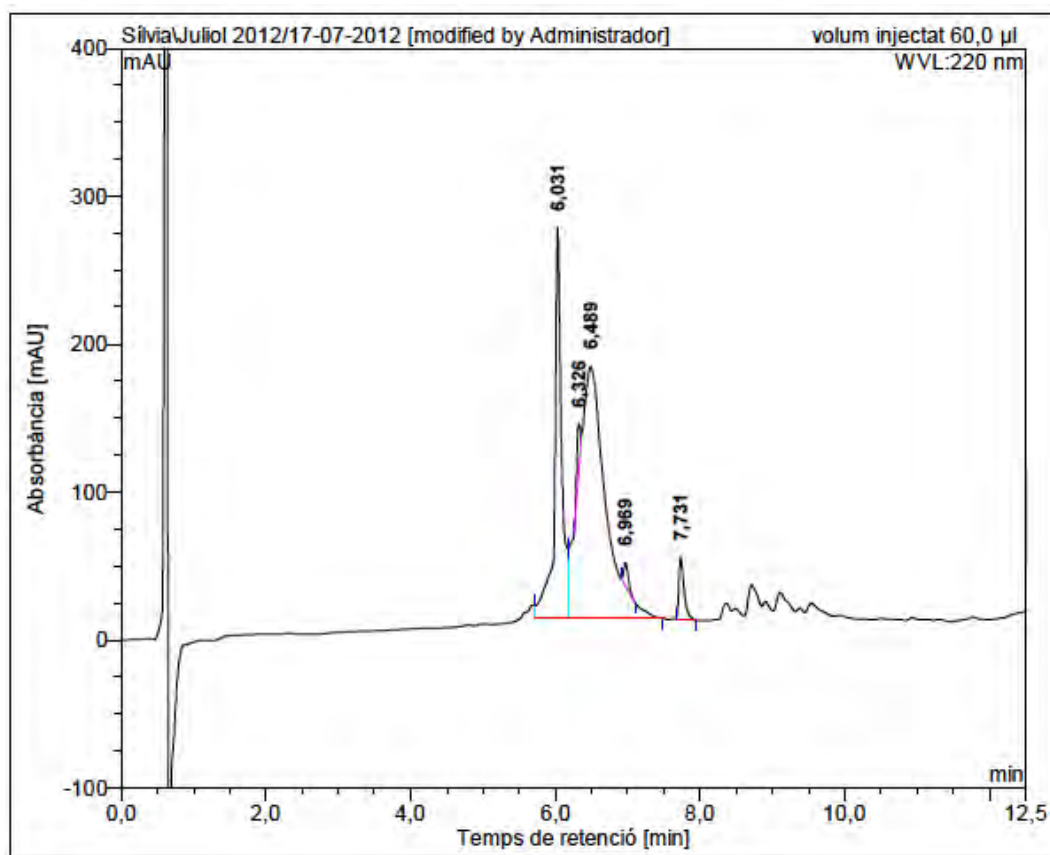
HRMS (ESI)  $m/z$





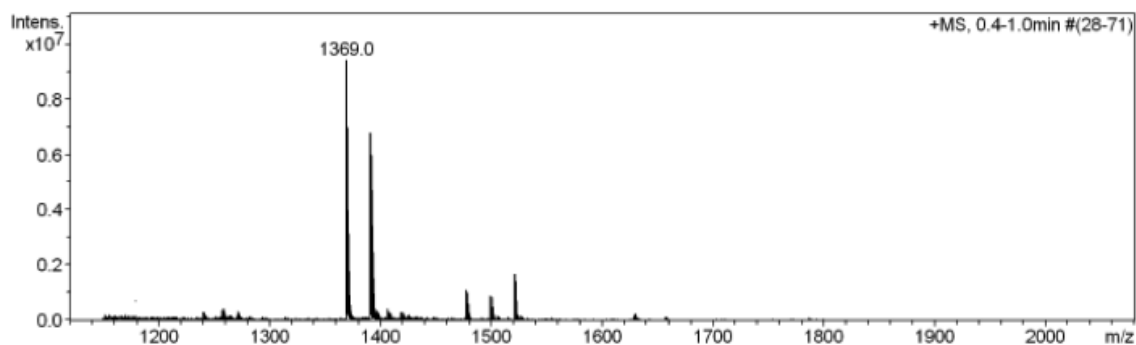
c(D-Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>))-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC684)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

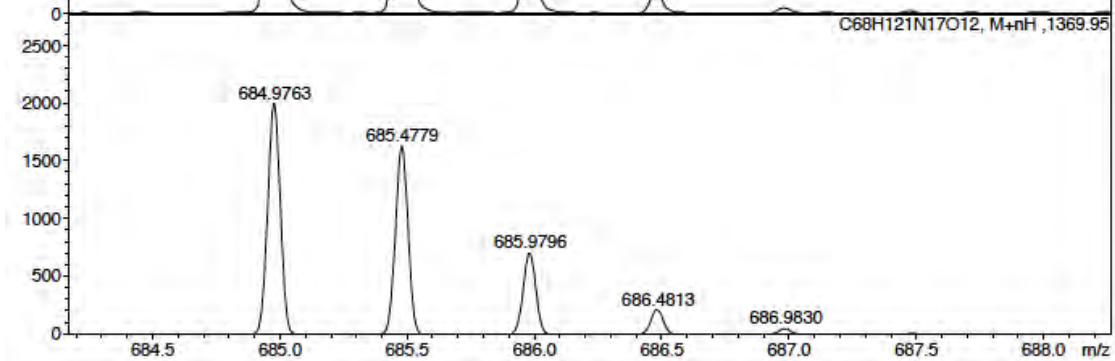
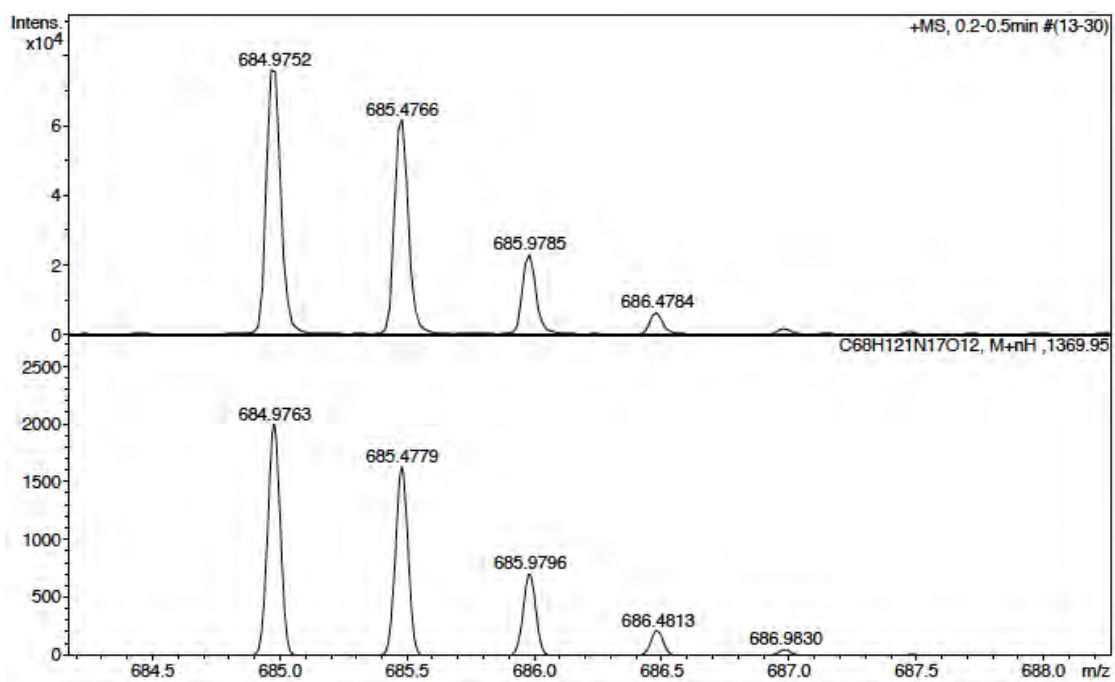
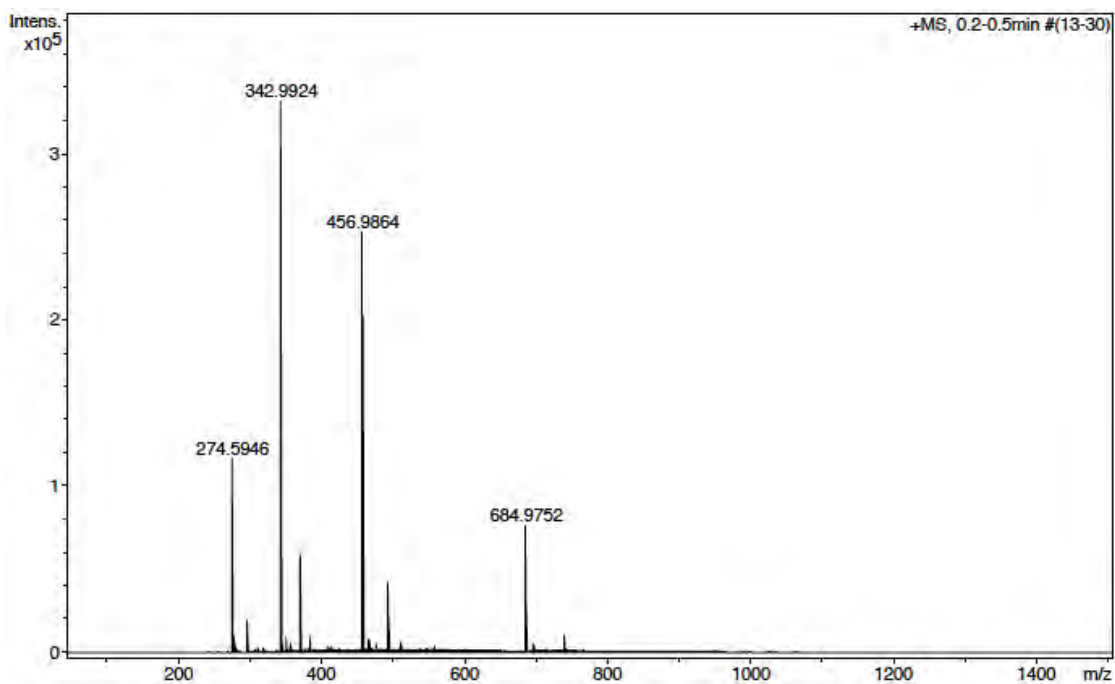


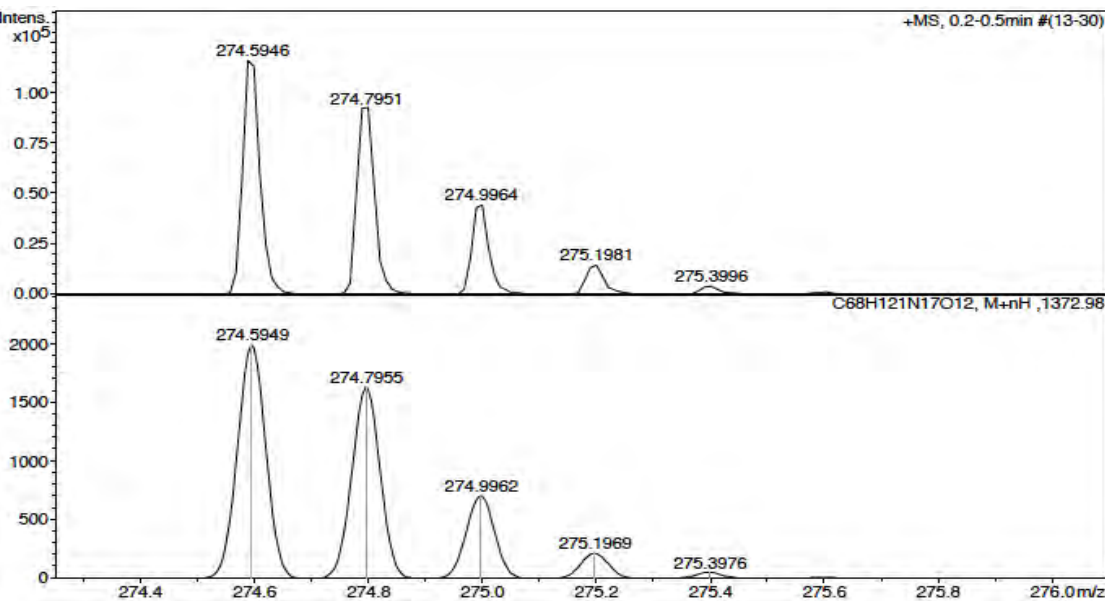
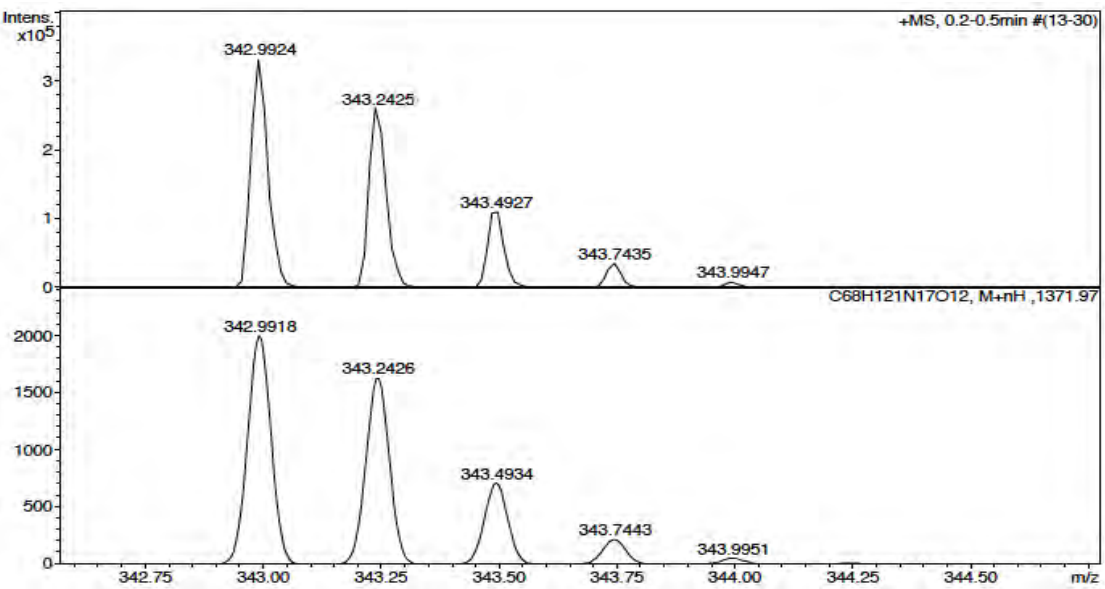
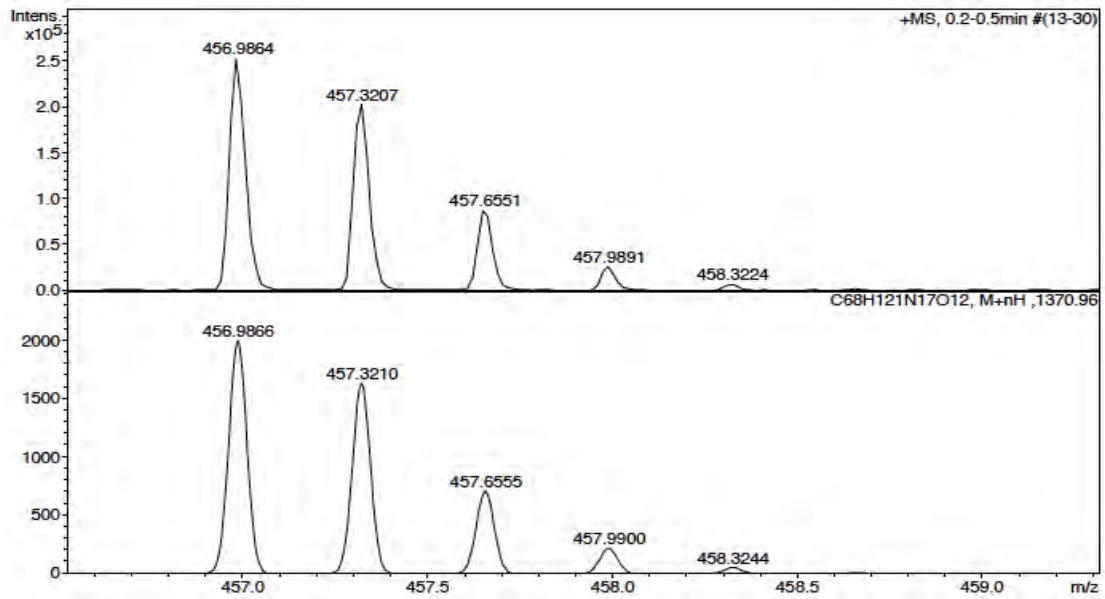
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU <sup>2</sup> min	Area relativa %
1	6,03	264,059	30,081	27,13
2	6,33	30,905	1,926	1,74
3	6,49	169,876	74,036	66,77
4	6,97	15,913	1,181	1,06
5	7,73	42,445	3,665	3,31
Total:		523,198	110,889	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

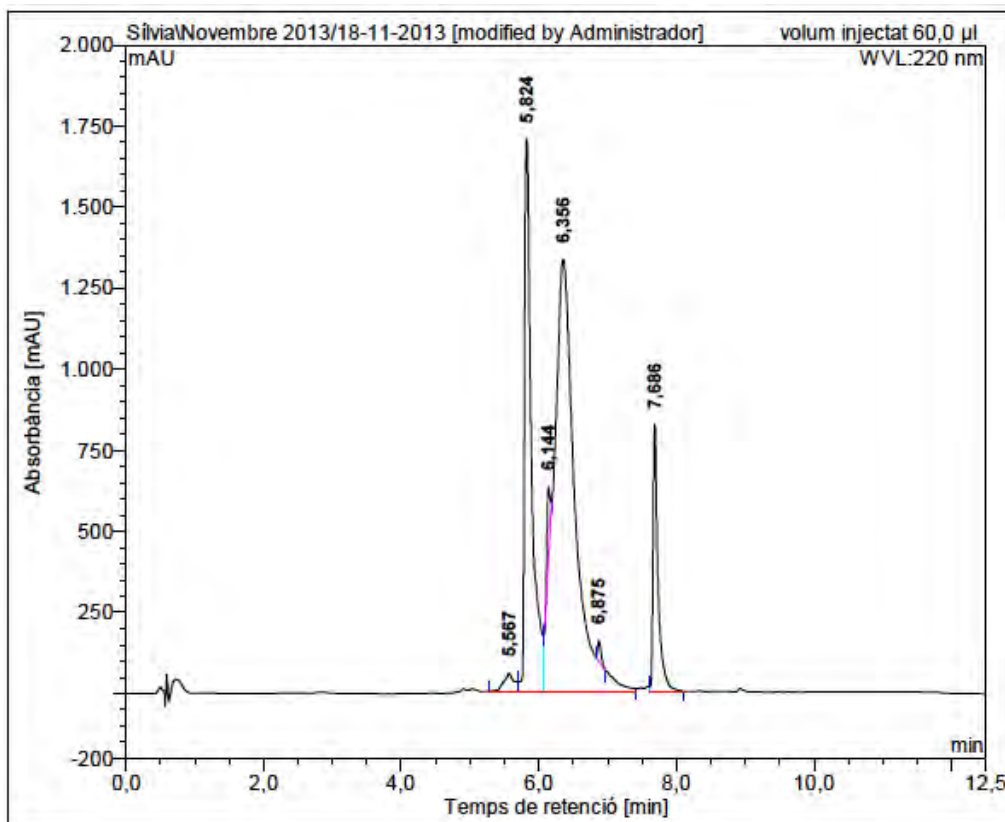






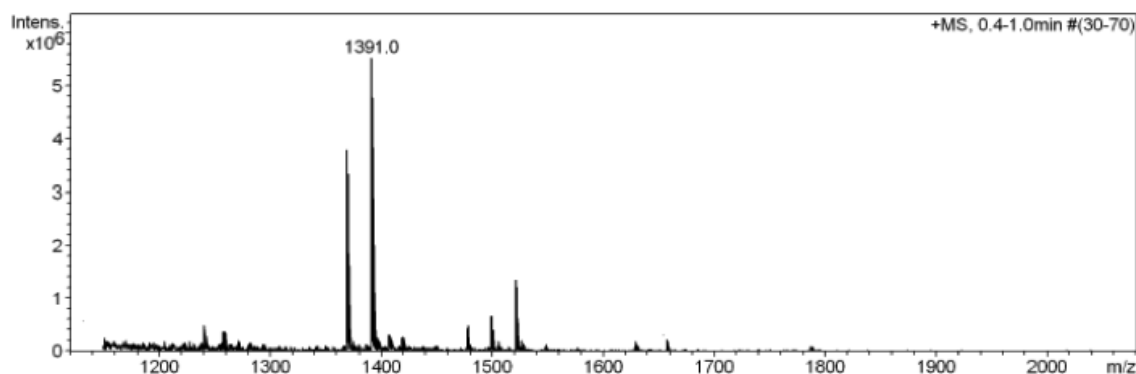
c(Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC686)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

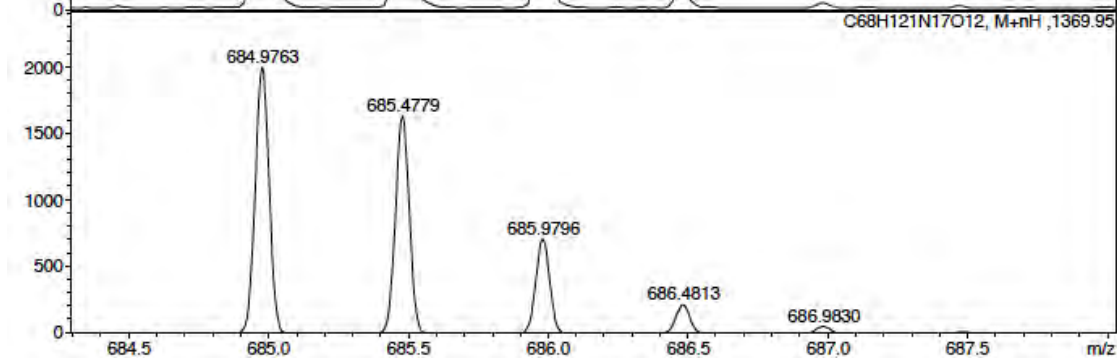
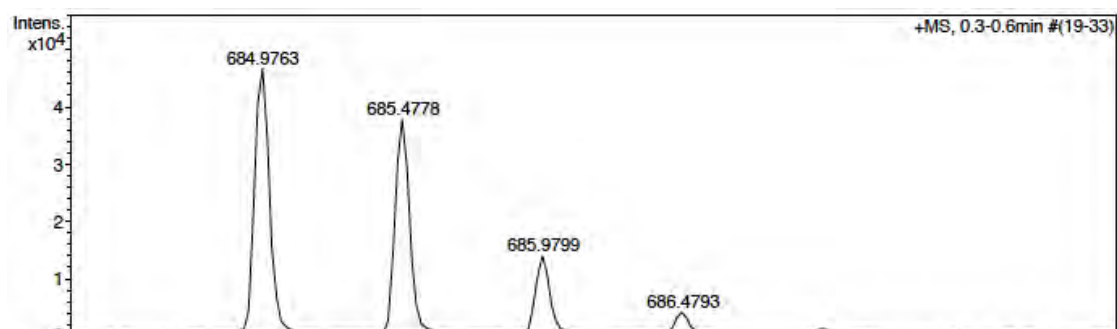
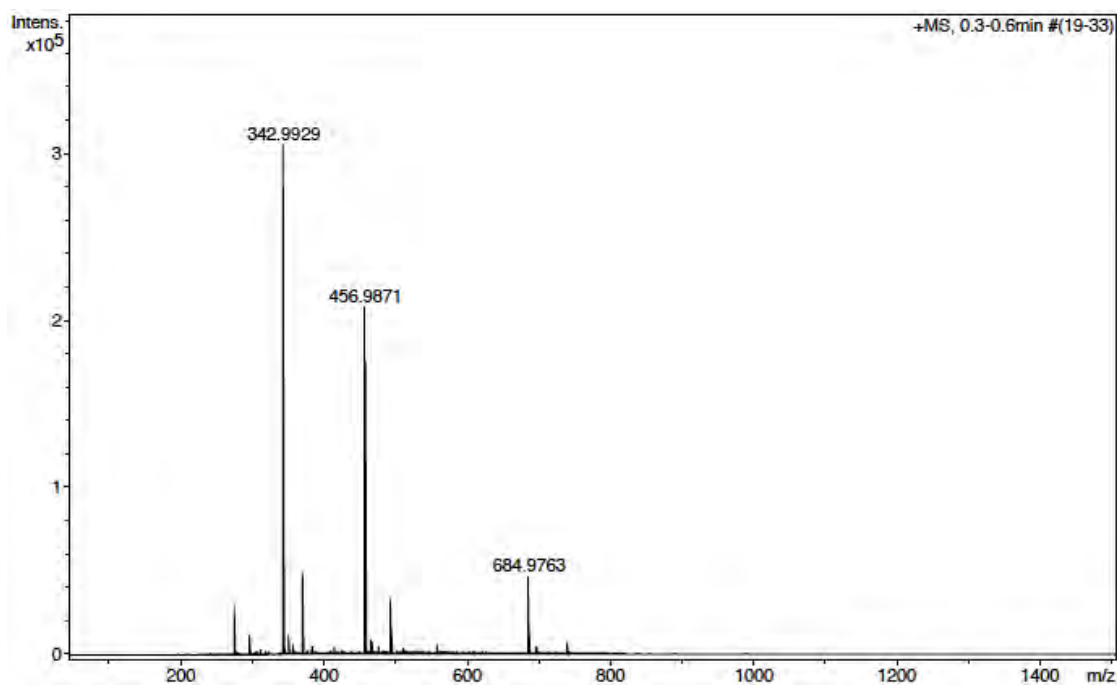


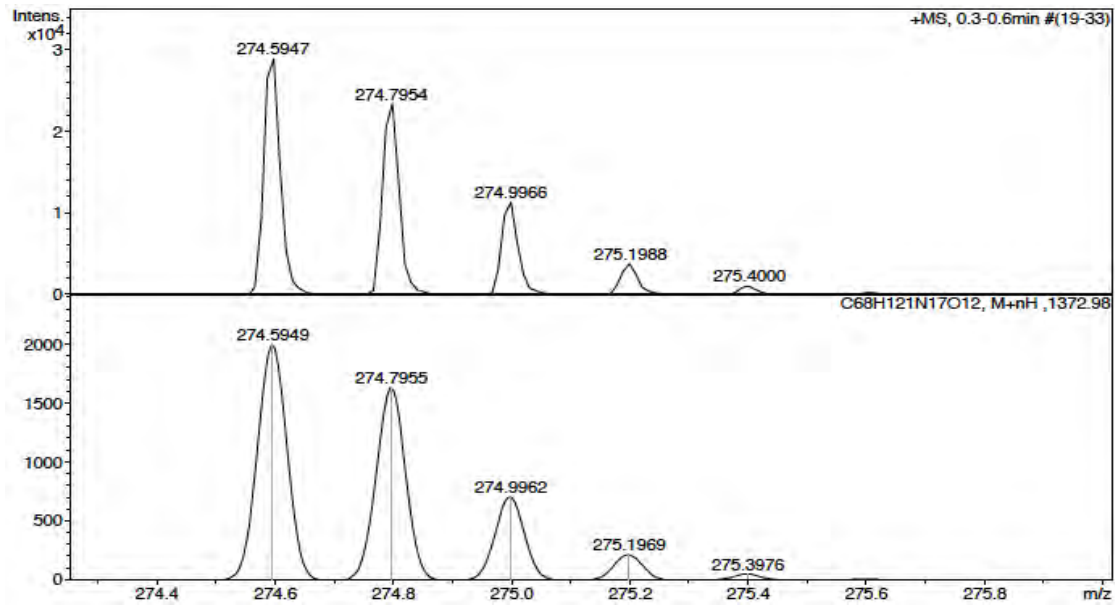
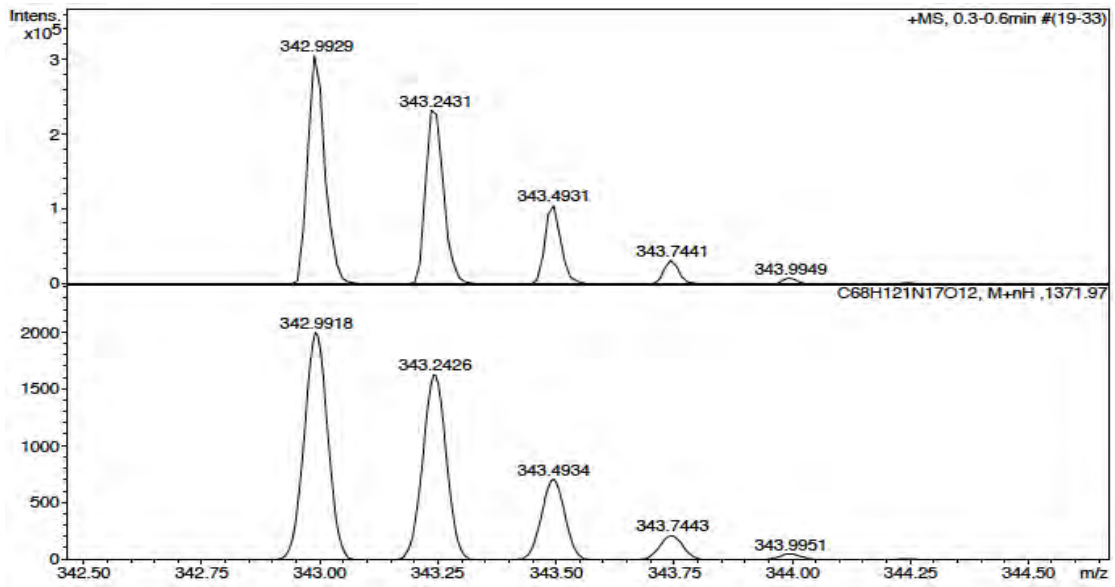
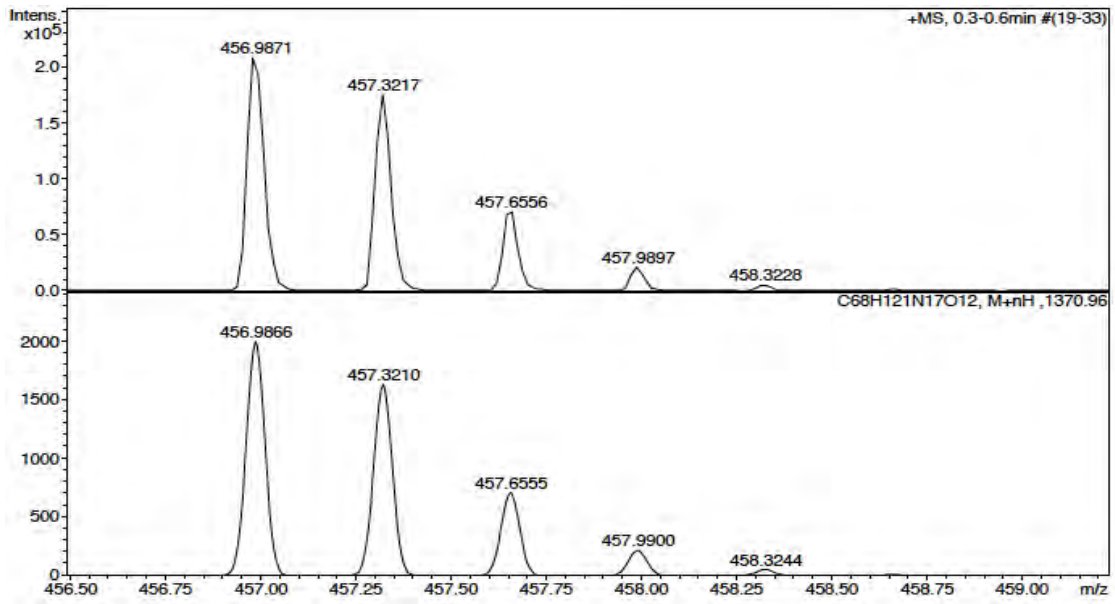
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,57	54,309	9,332	1,21
2	5,82	1703,252	202,311	26,28
3	6,14	208,791	11,002	1,43
4	6,36	1331,655	475,298	61,73
5	6,88	62,718	3,766	0,49
6	7,69	821,464	68,203	8,86
<b>Total:</b>		<b>4182,189</b>	<b>769,912</b>	<b>100,00</b>

ESI-MS ( $m/z$ )



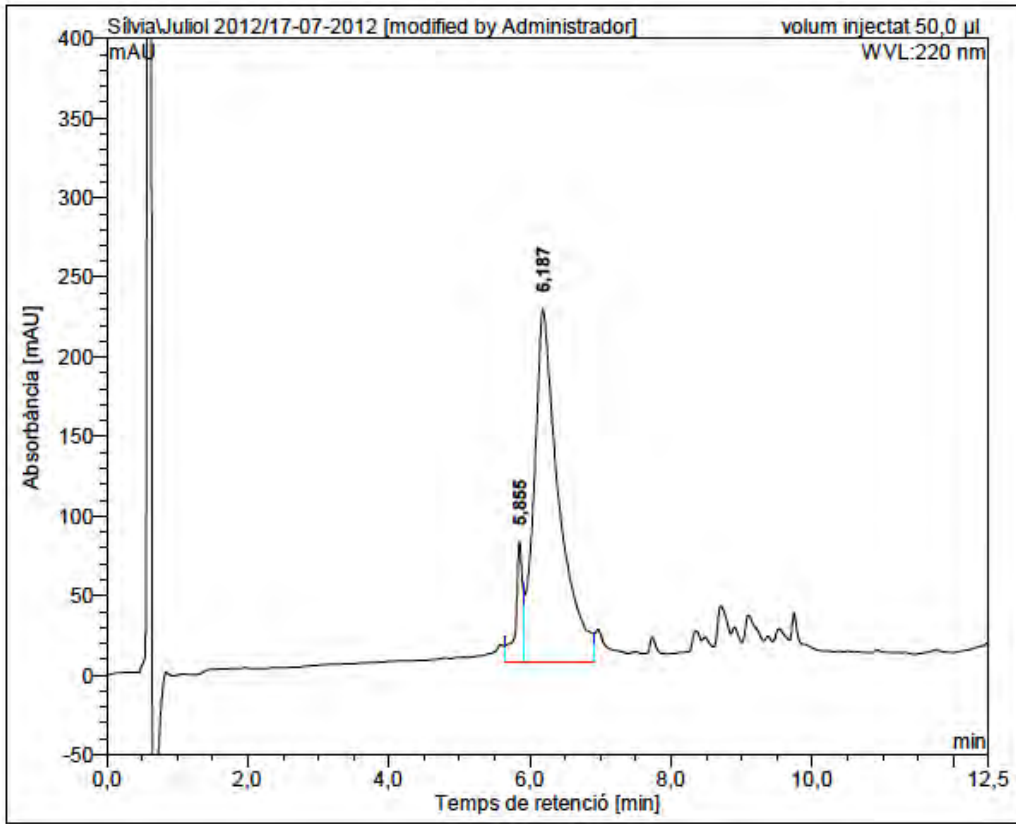
HRMS (ESI)  $m/z$





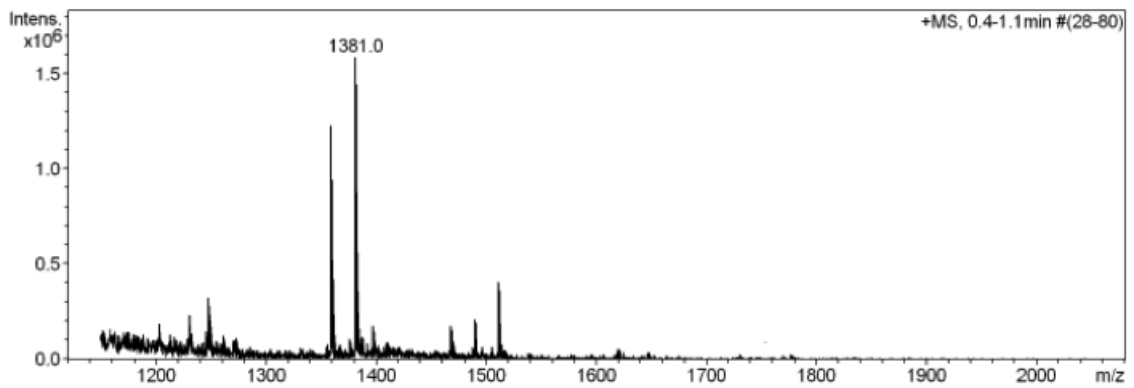
c(Lys(CO-nC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC688)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

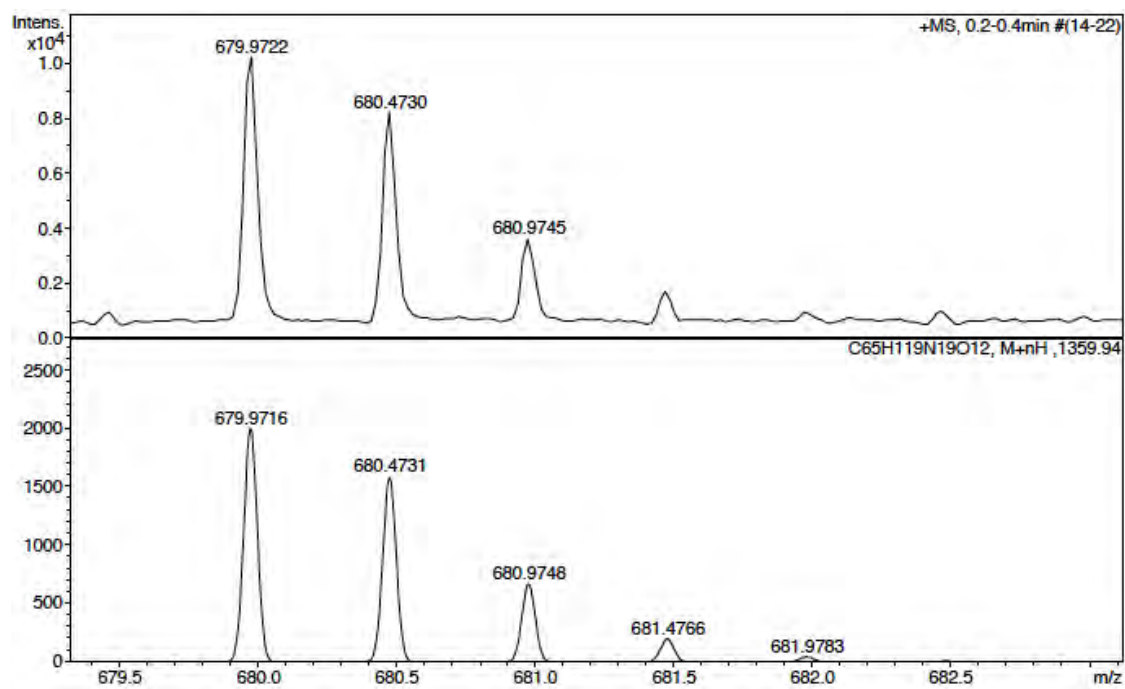
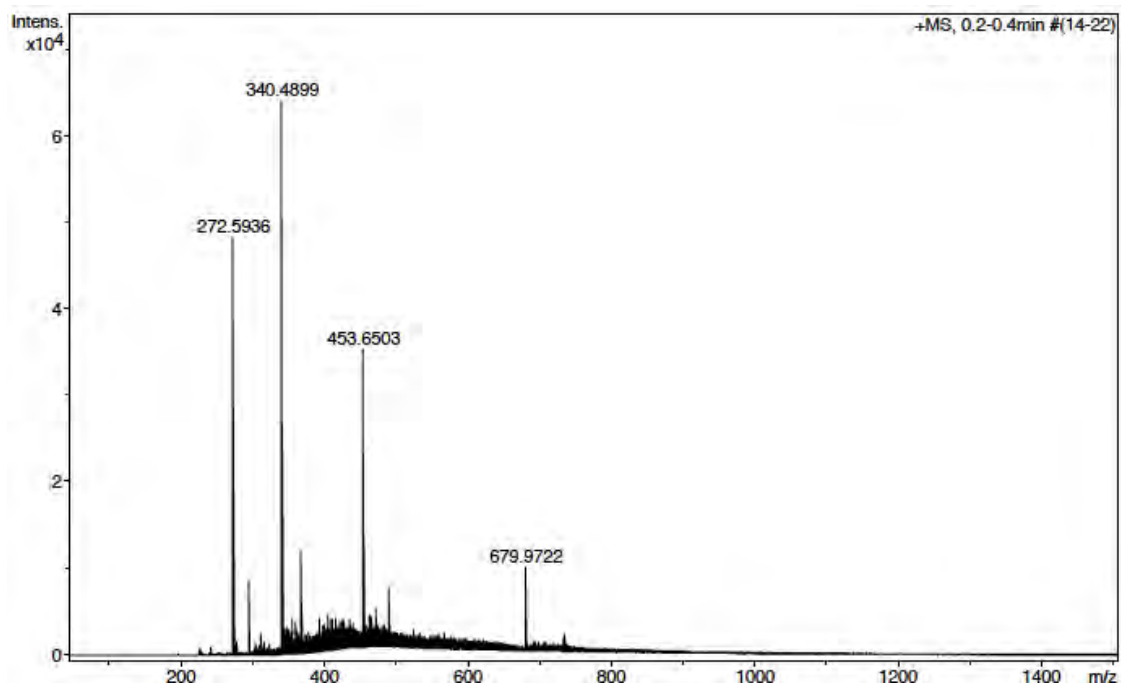


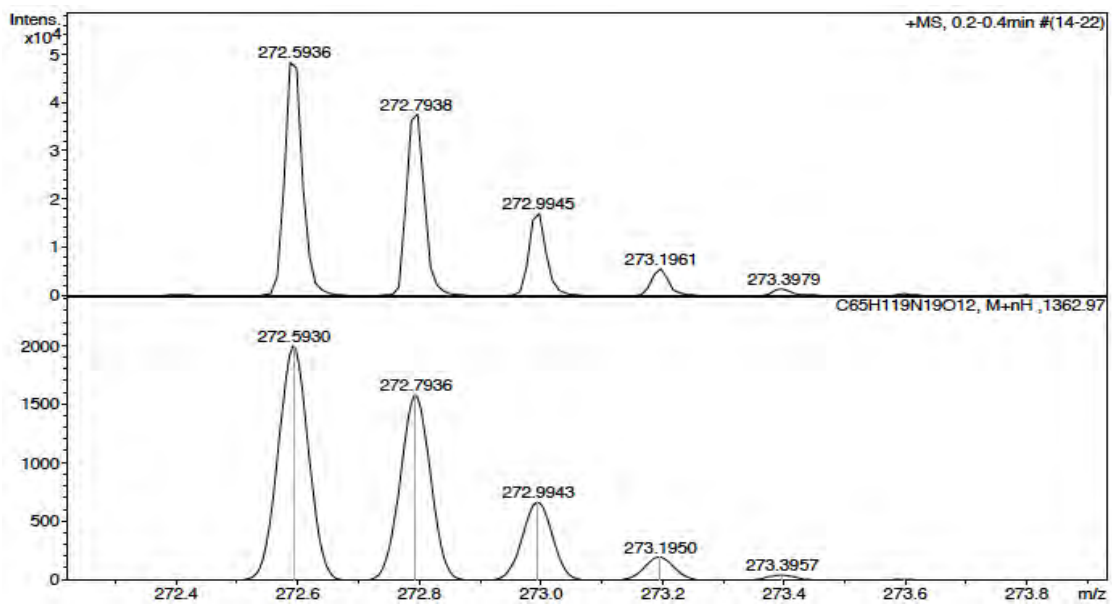
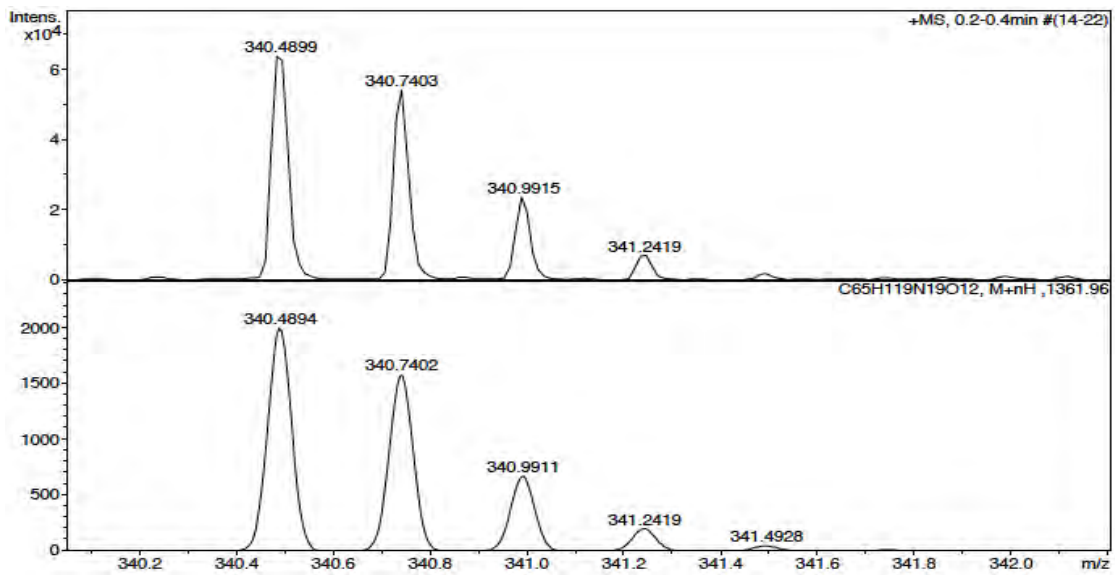
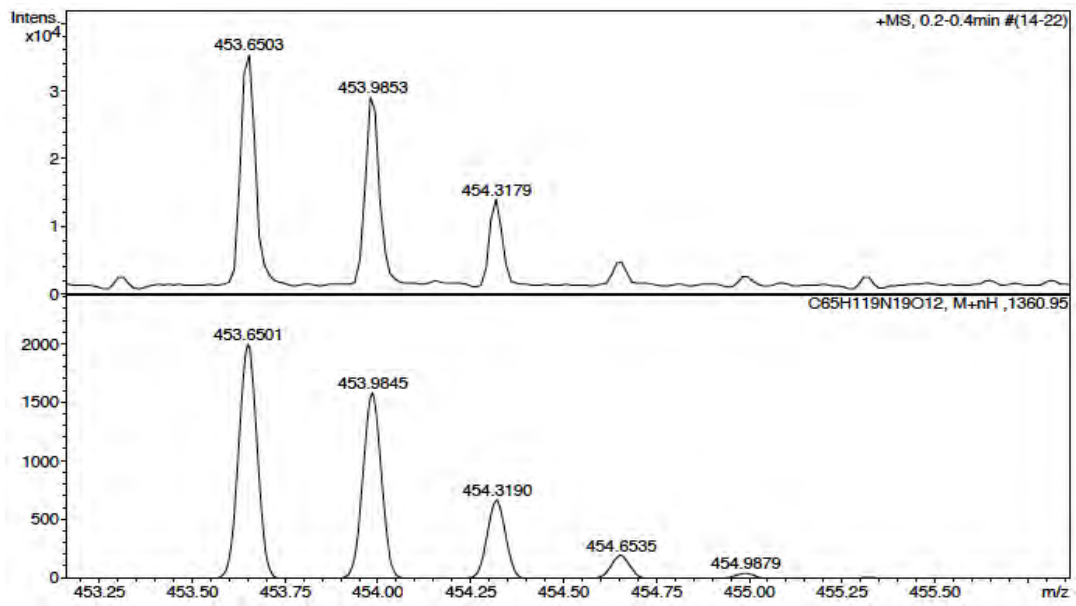
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,85	75,530	8,791	9,03
2	6,19	221,111	88,610	90,97
Total:		296,640	97,401	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



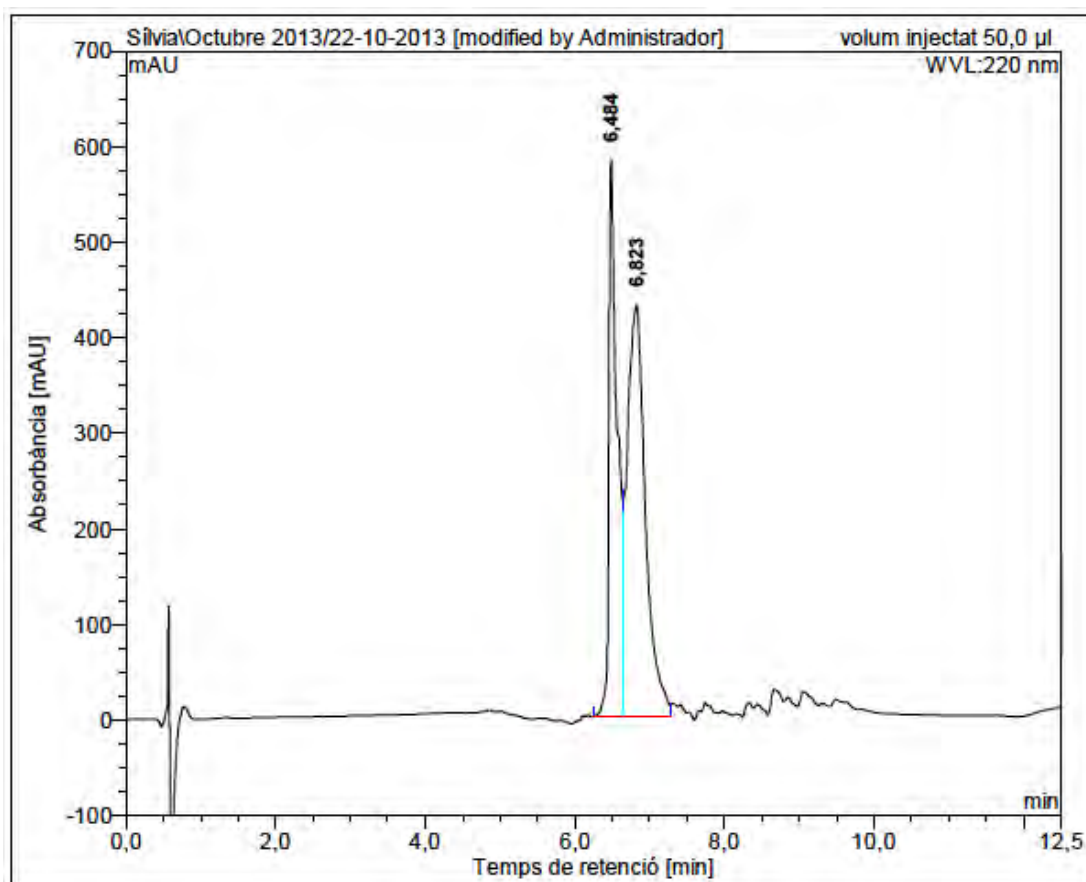
HRMS (ESI)  $m/z$





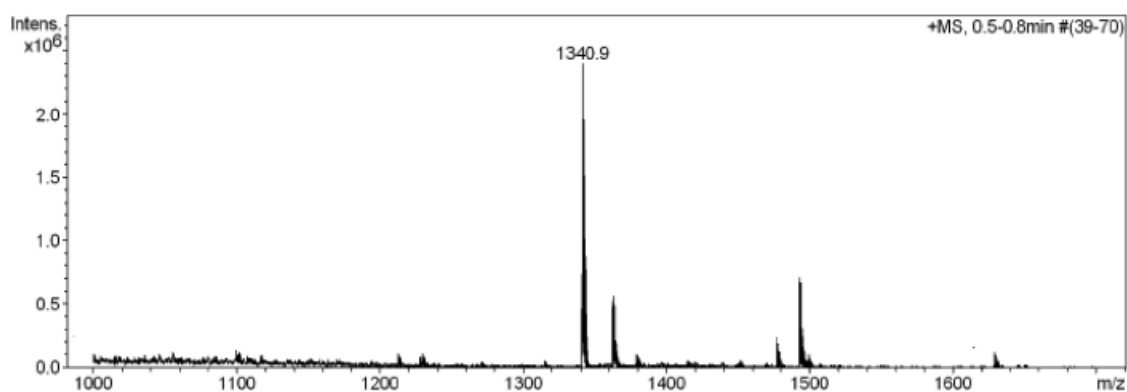
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC702)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

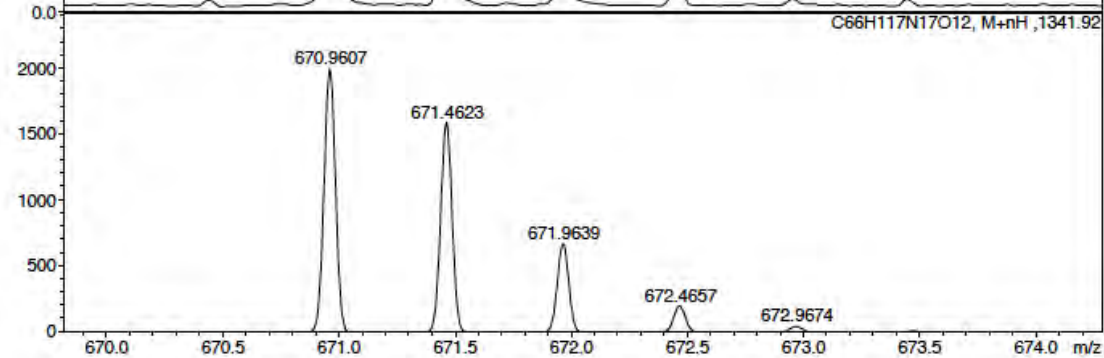
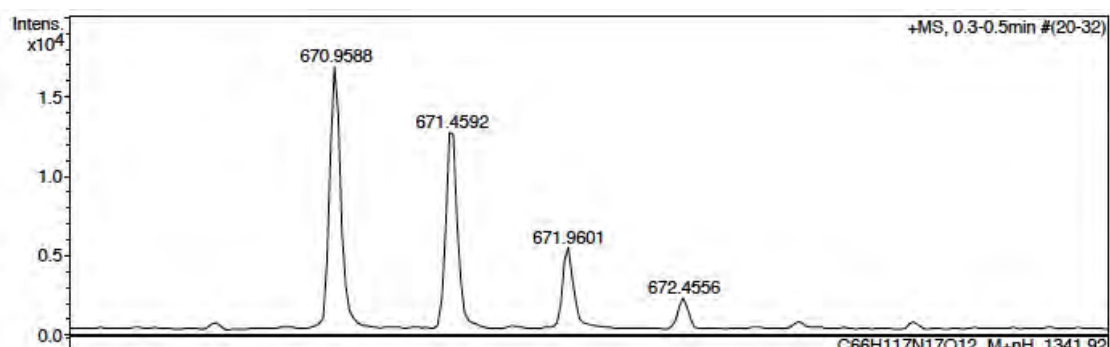
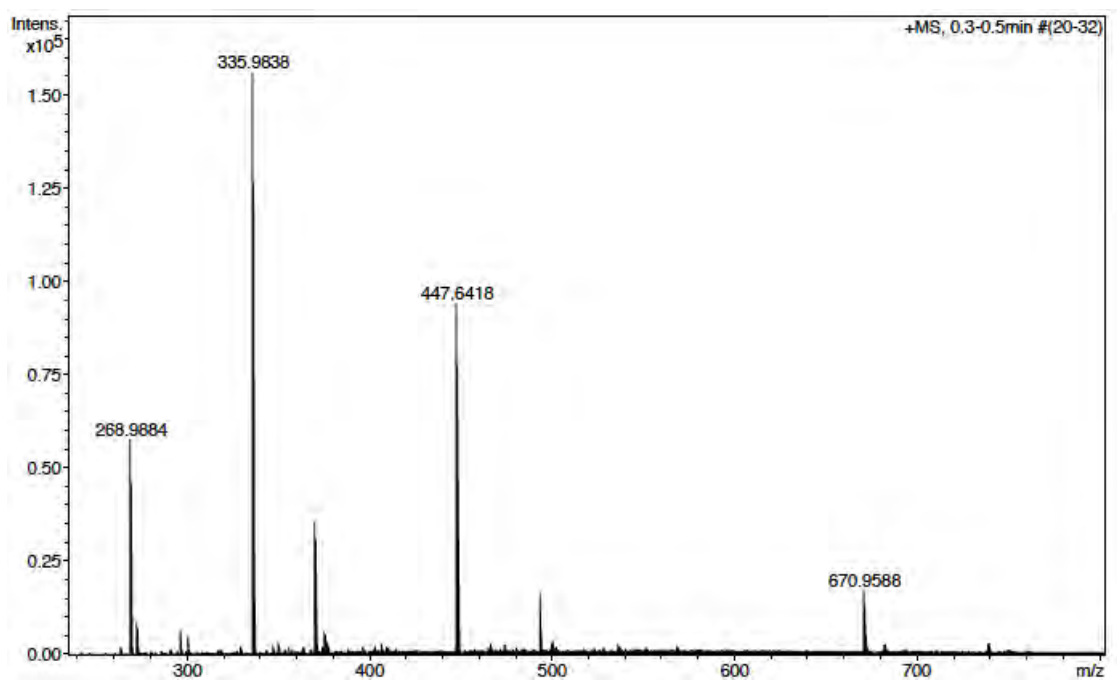


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,48	583,895	75,550	37,81
2	6,82	430,756	124,266	62,19
Total:		1014,650	199,816	100,00

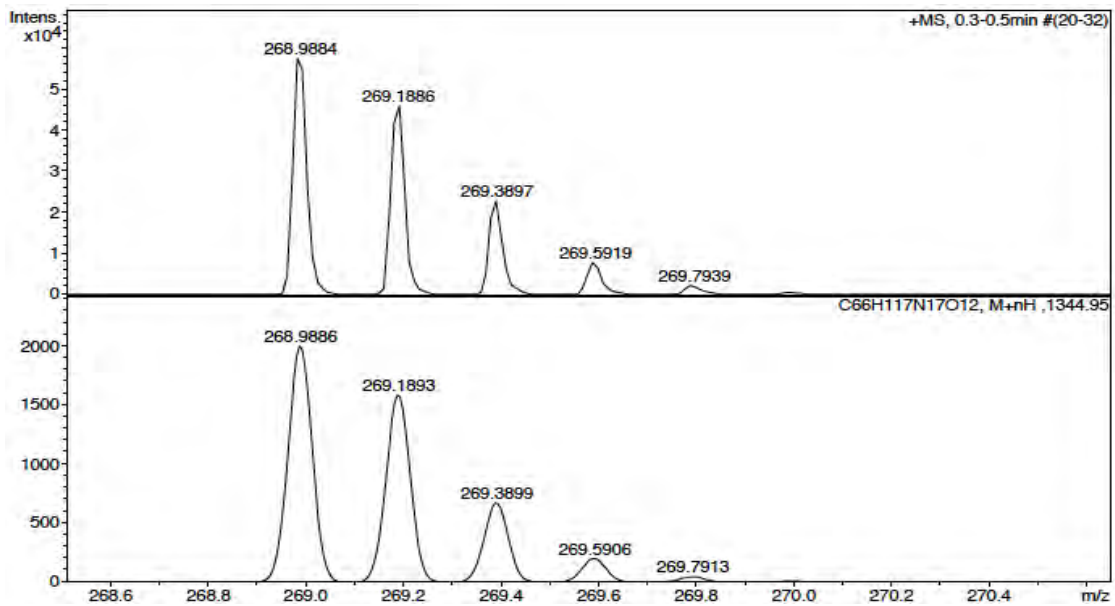
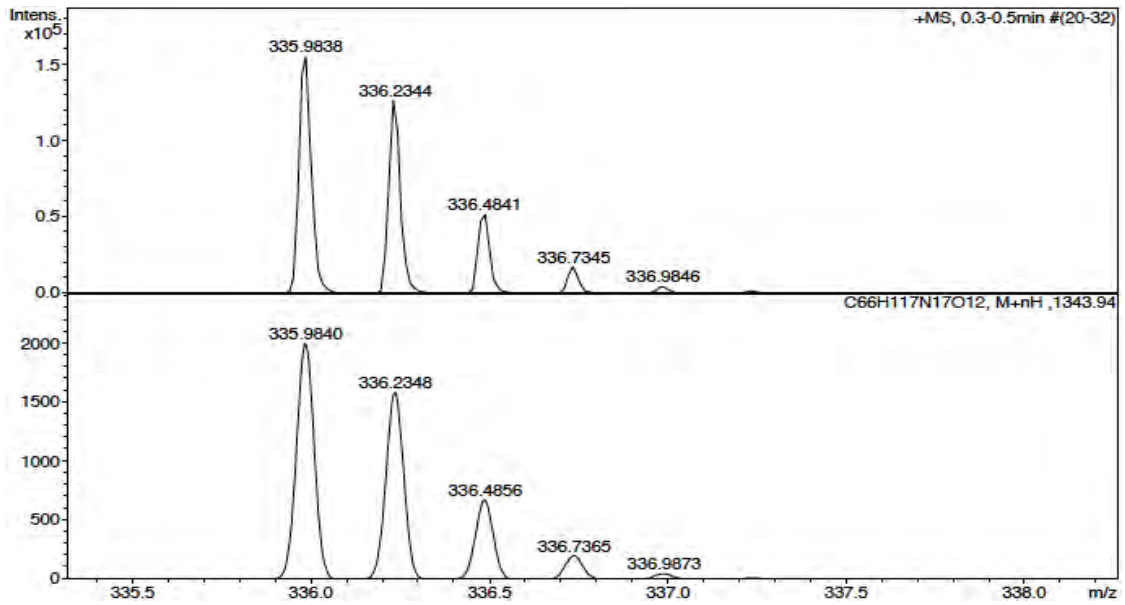
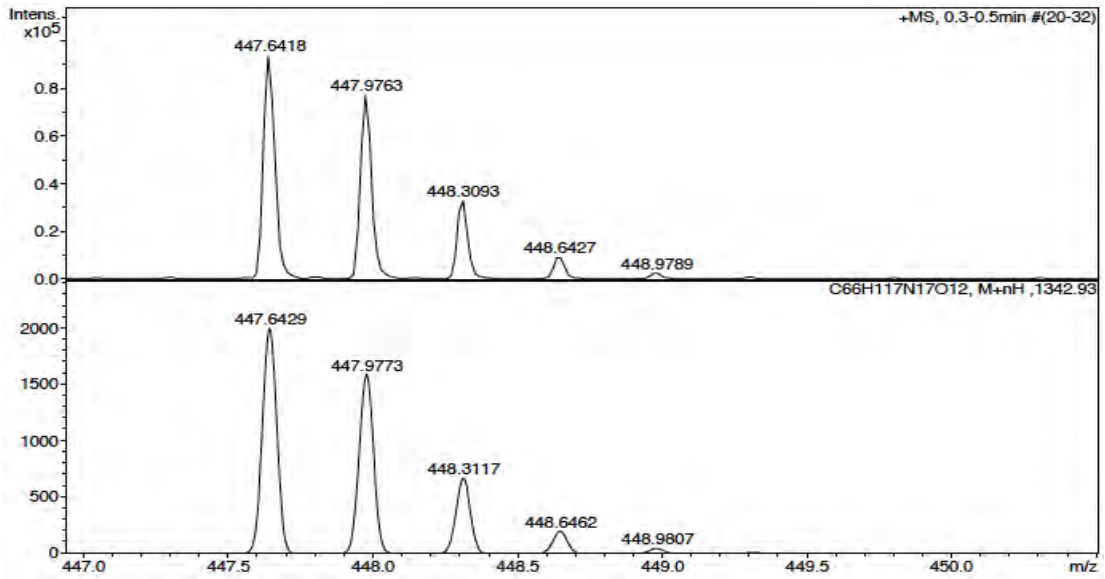
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

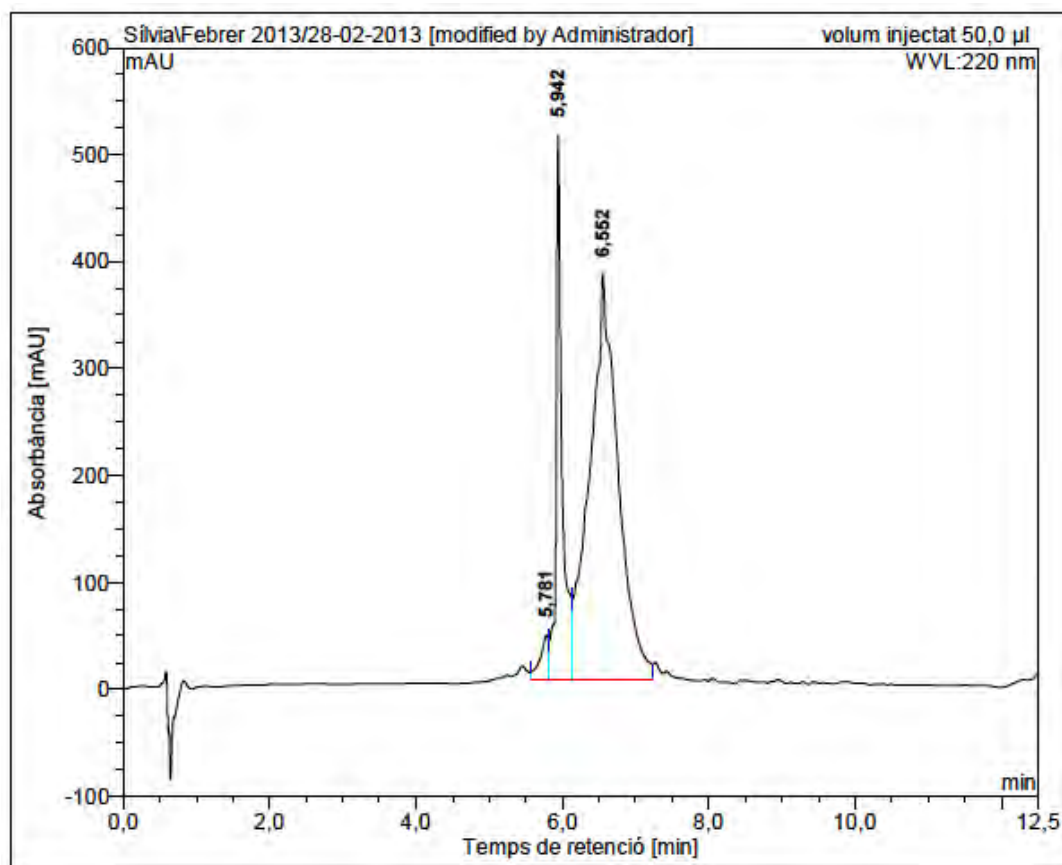






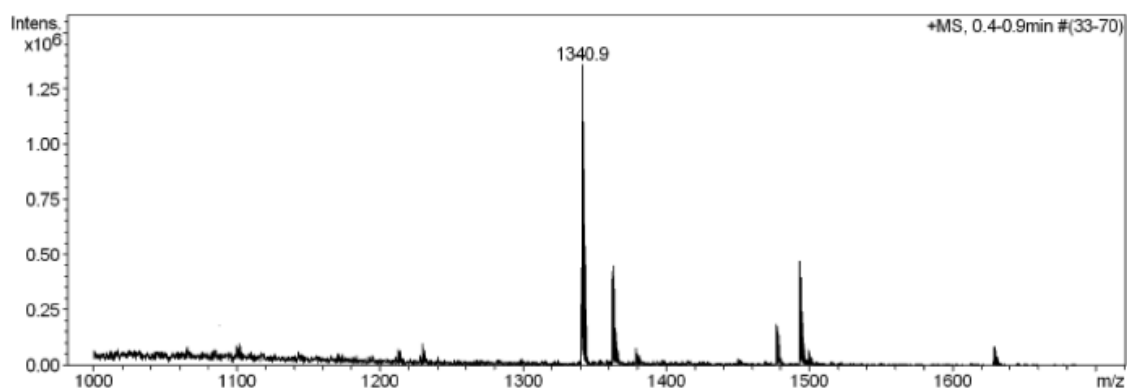
c(Lys-D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC704)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

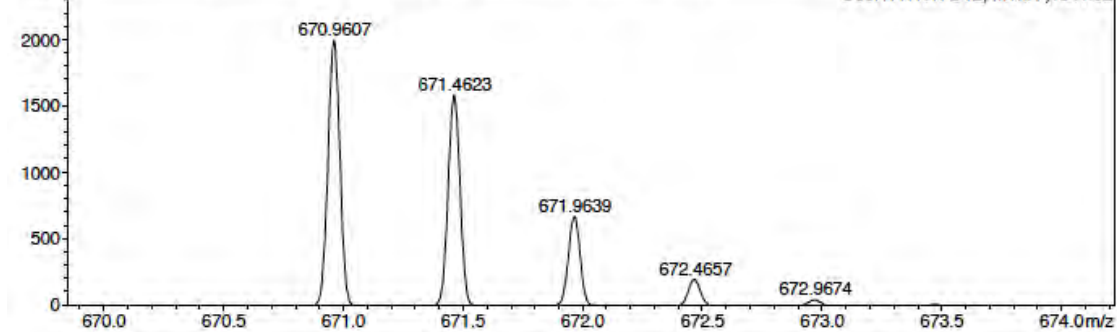
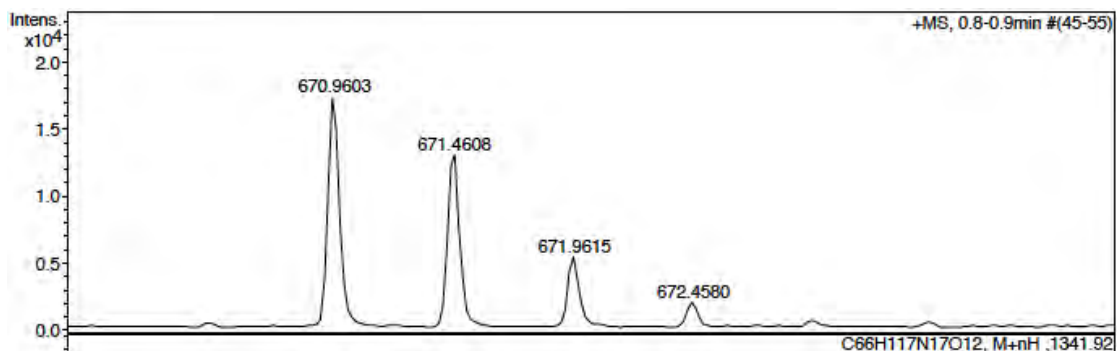
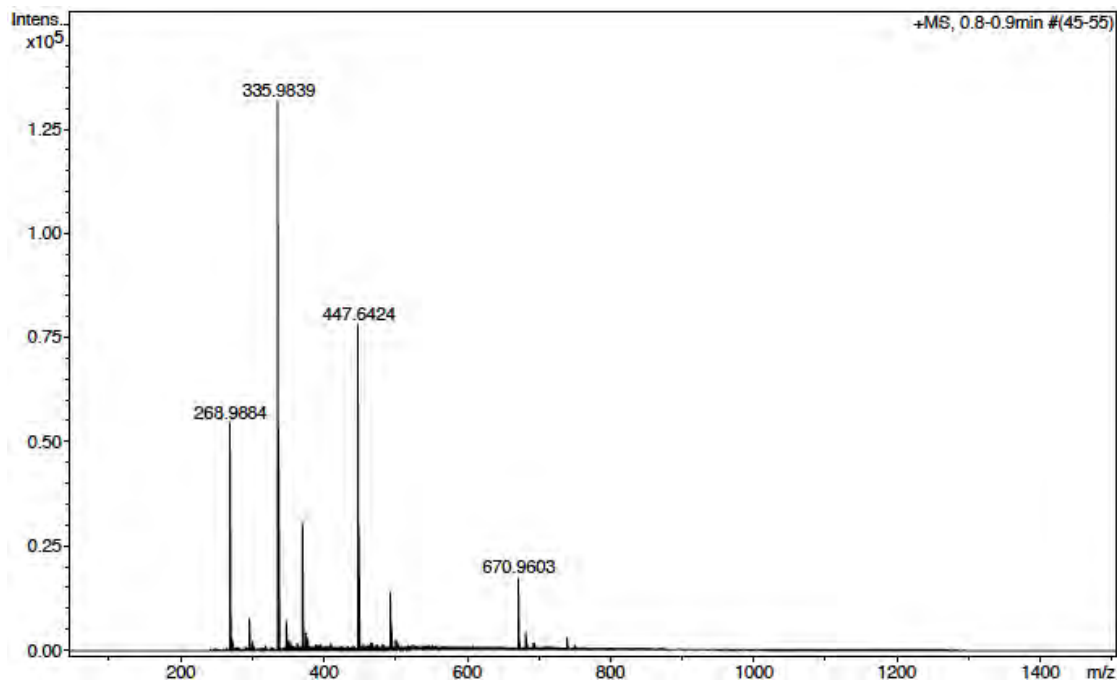


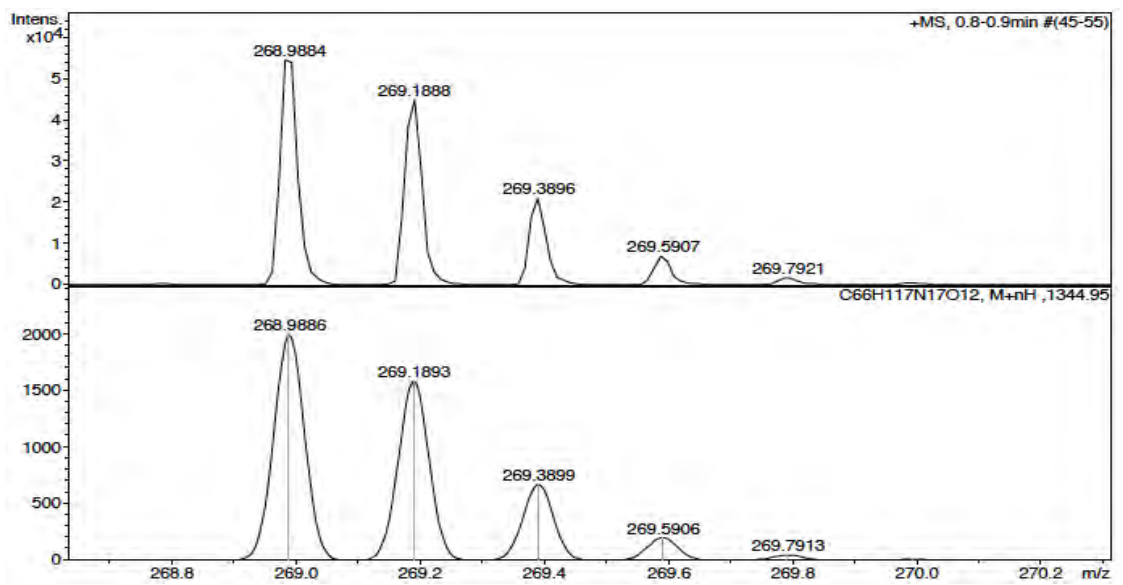
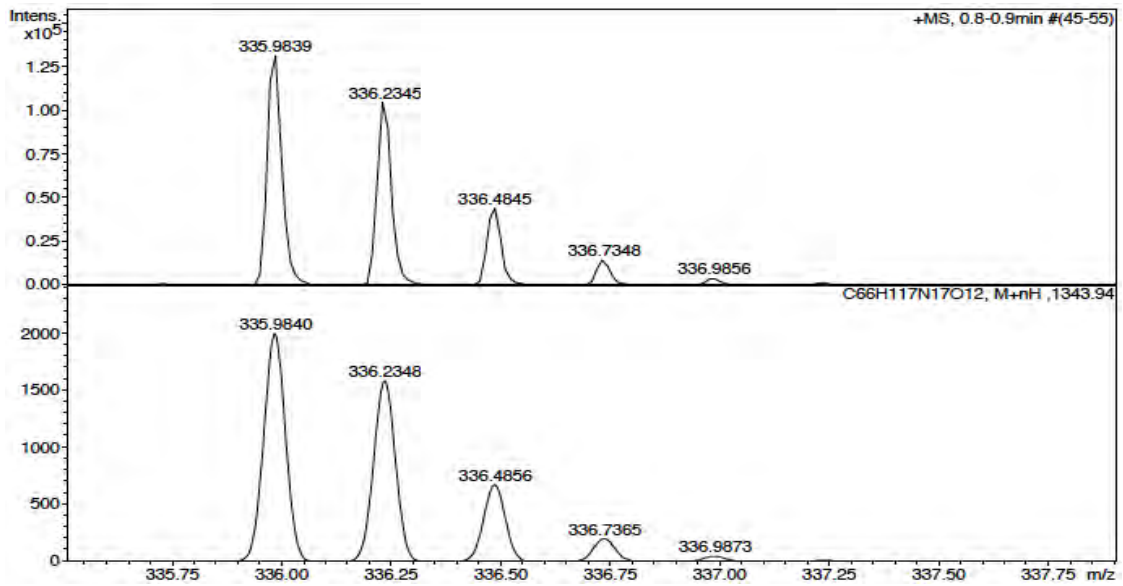
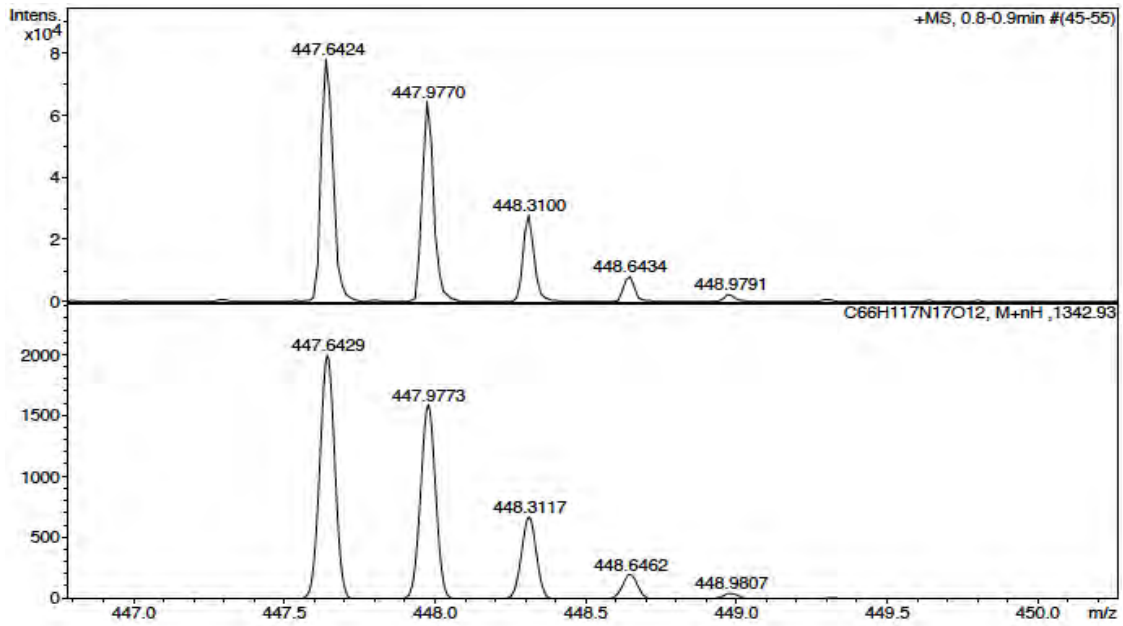
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,78	42,036	5,627	2,51
2	5,94	509,614	49,211	21,92
3	6,55	379,505	169,660	75,57
Total:		931,155	224,498	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



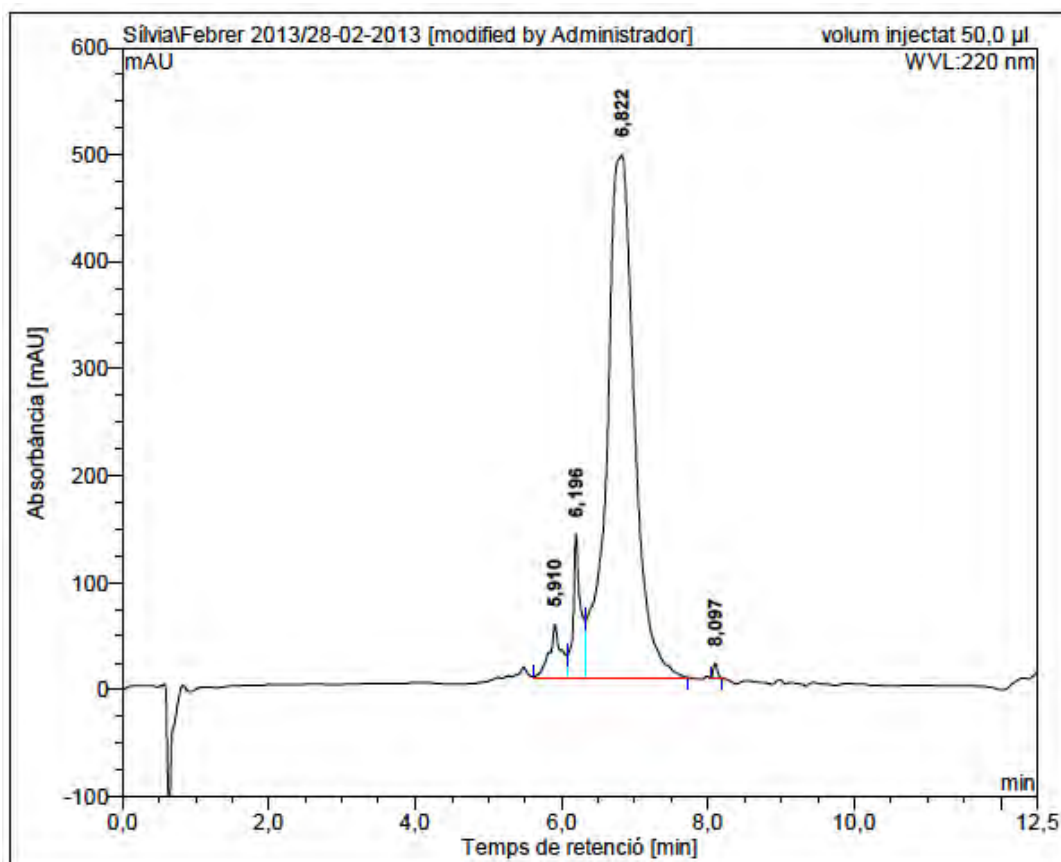
HRMS (ESI)  $m/z$





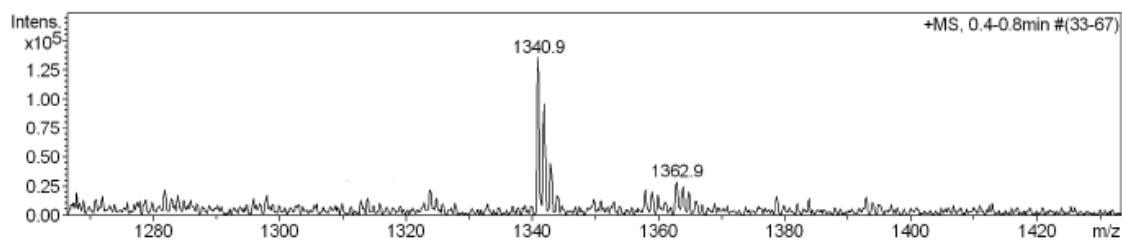
c(D-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC706)

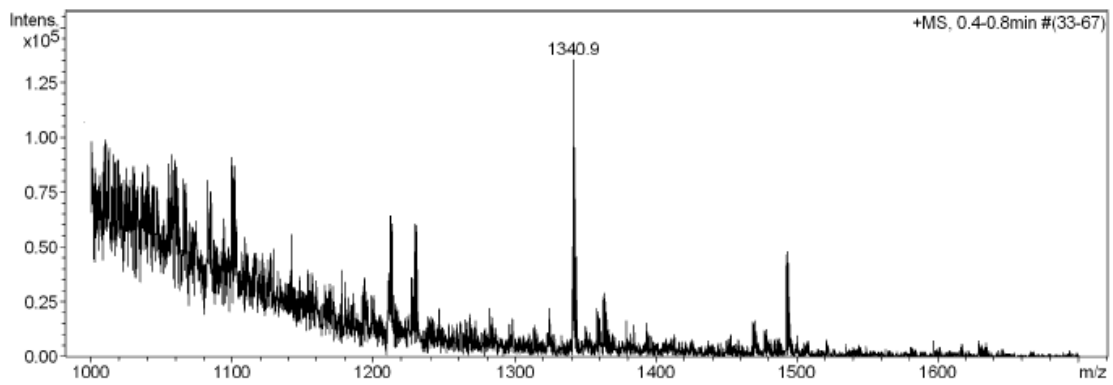
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



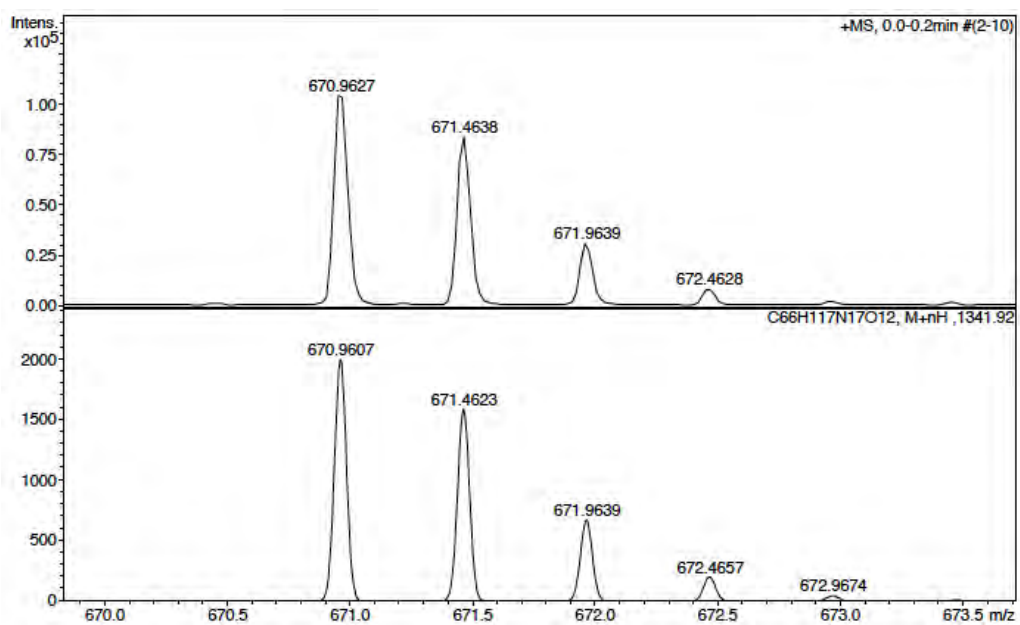
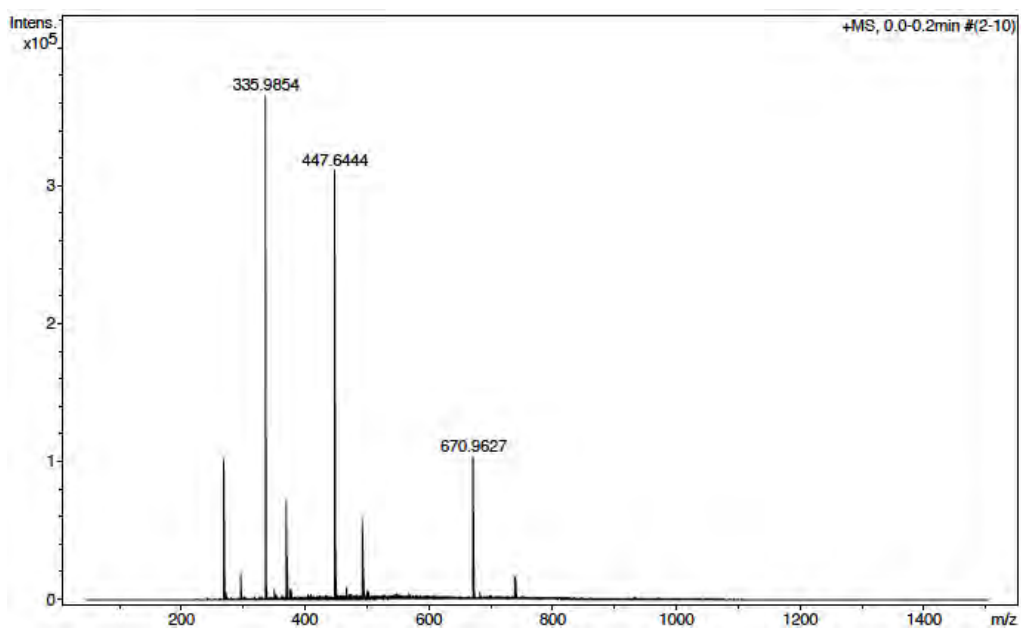
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,91	49,778	9,096	3,81
2	6,20	134,624	16,090	6,74
3	6,82	488,525	212,444	89,04
4	8,10	14,028	0,952	0,40
Total:		686,955	238,581	100,00

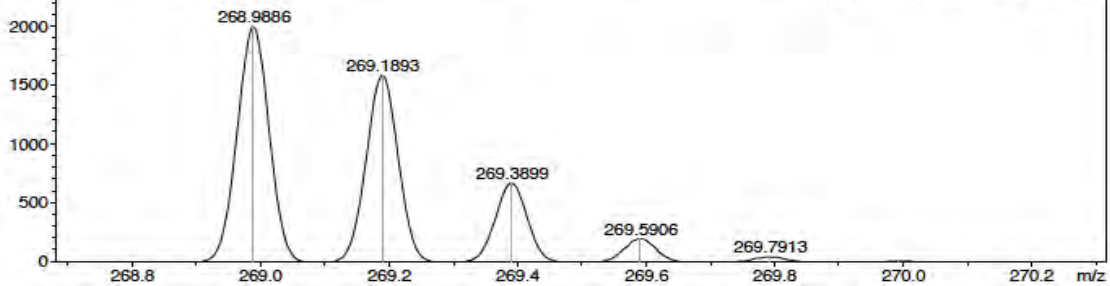
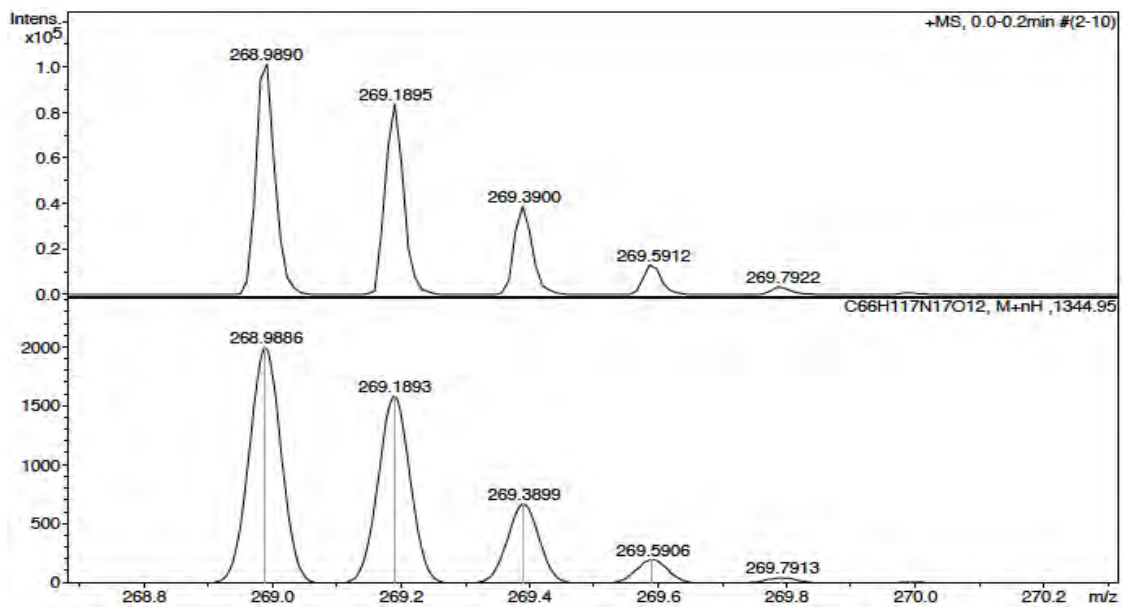
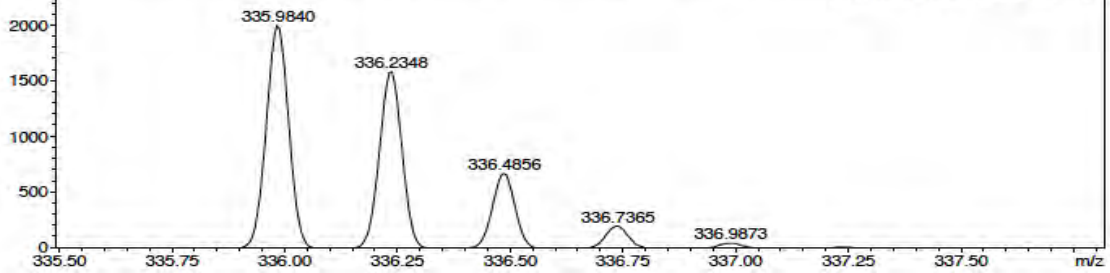
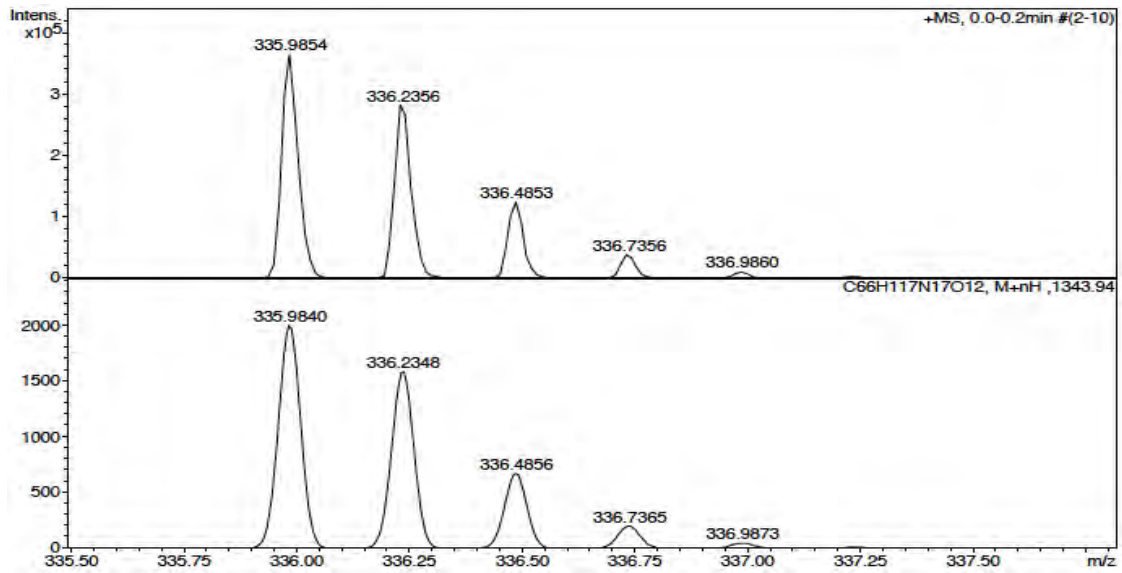
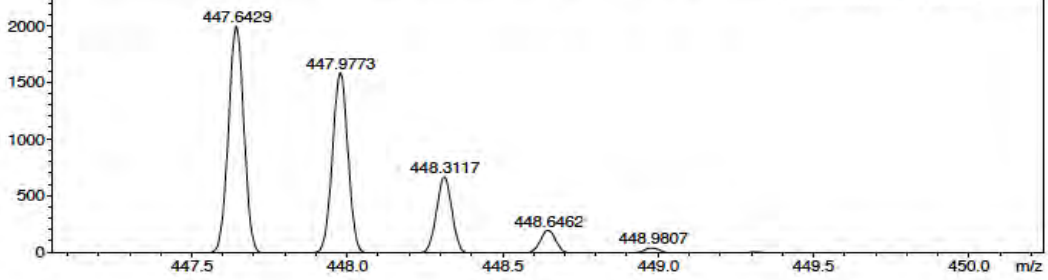
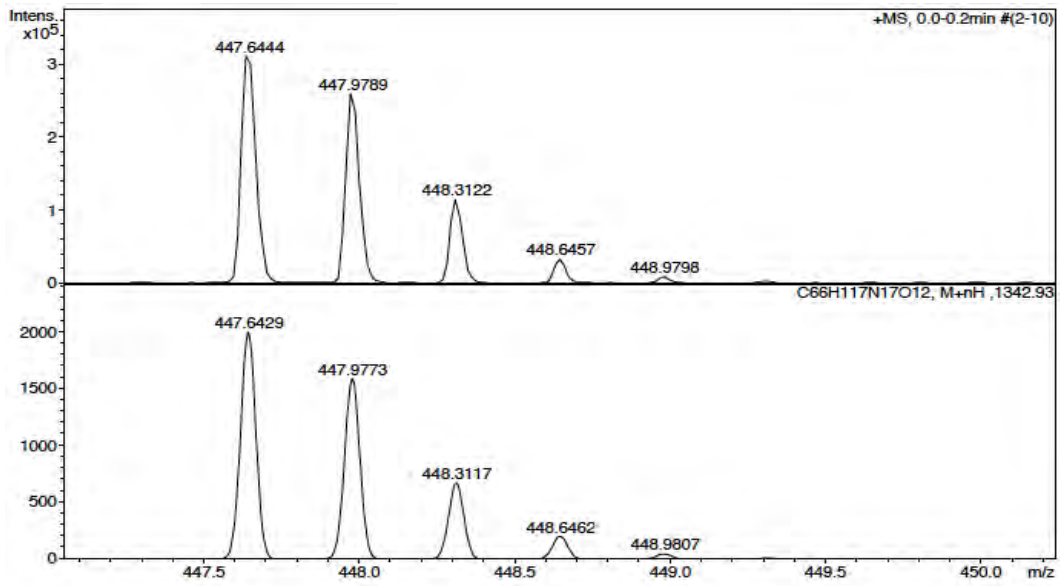
ESI-MS ( $m/z$ )





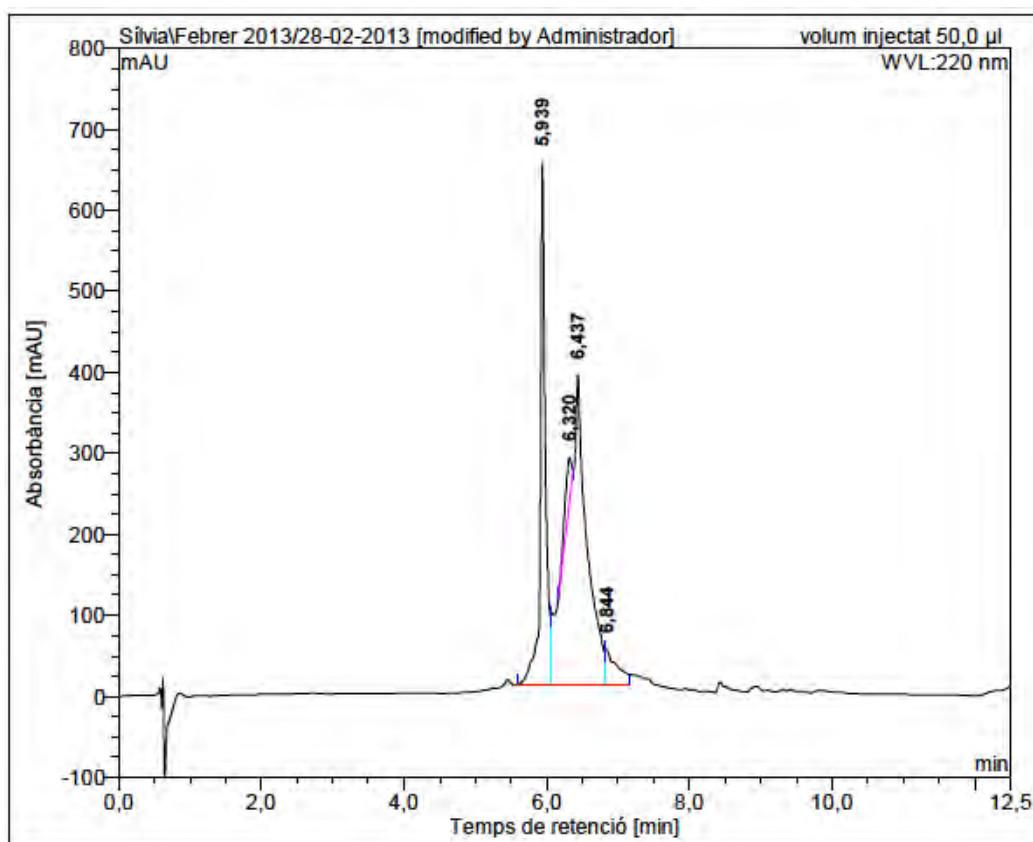
HRMS (ESI) m/z





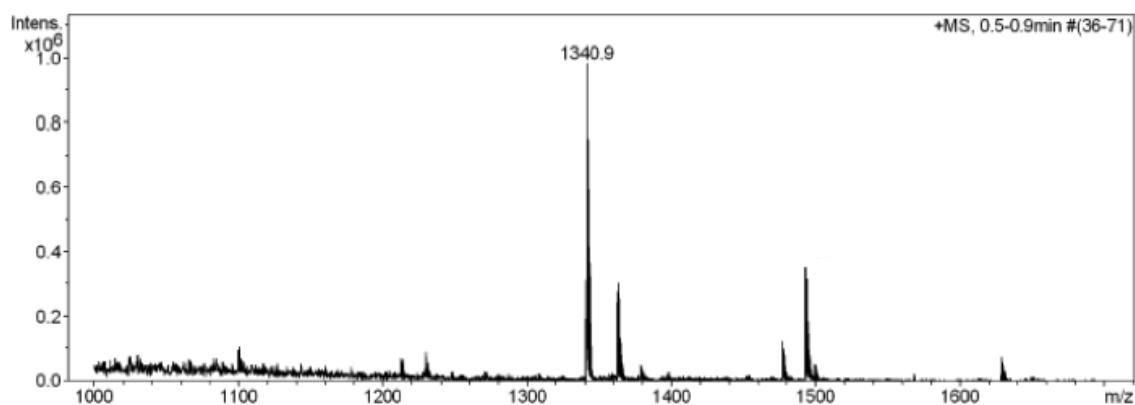
c(Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC708)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



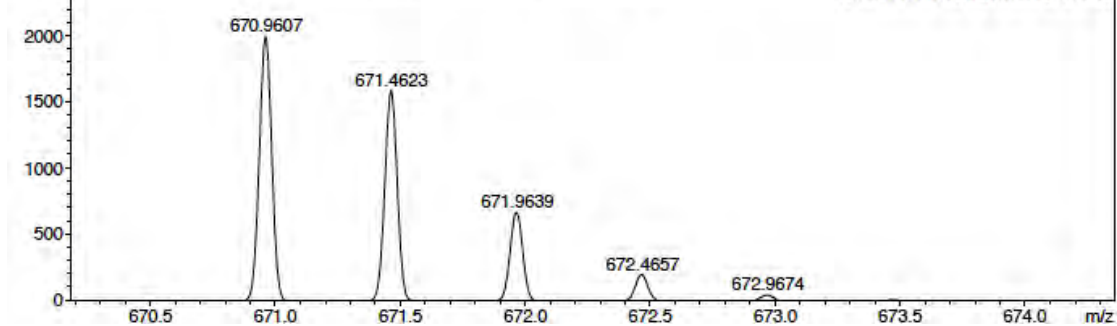
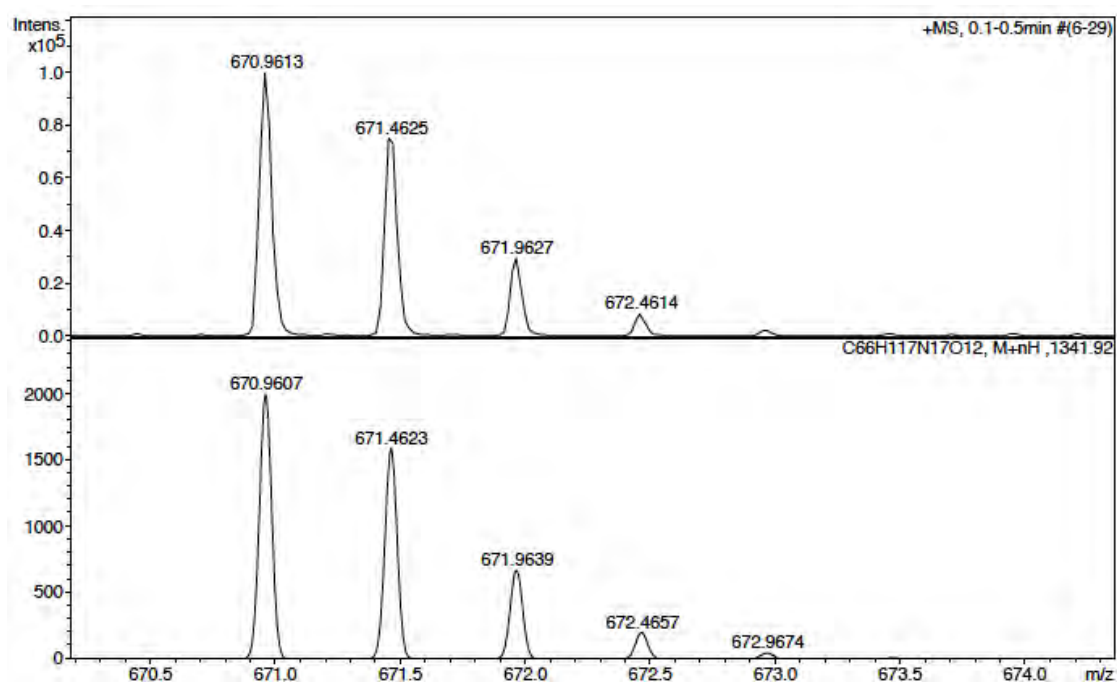
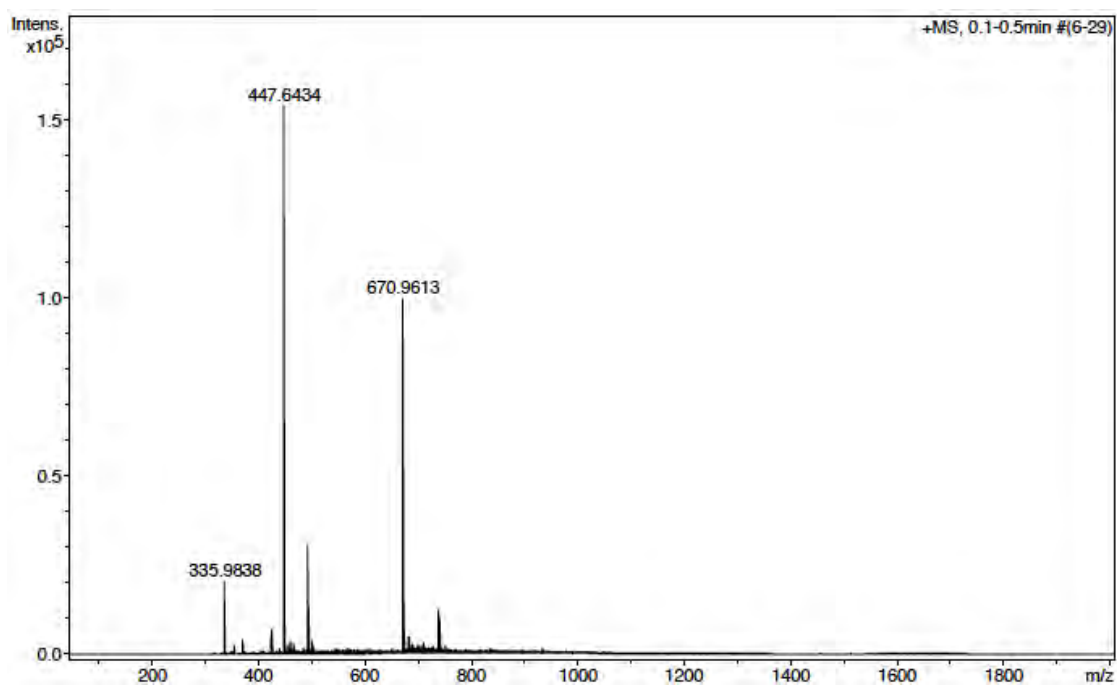
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,94	645,932	53,815	27,67
2	6,32	54,292	6,591	3,39
3	6,44	382,359	125,513	64,53
4	6,84	42,876	8,584	4,41
Total:		1125,460	194,503	100,00

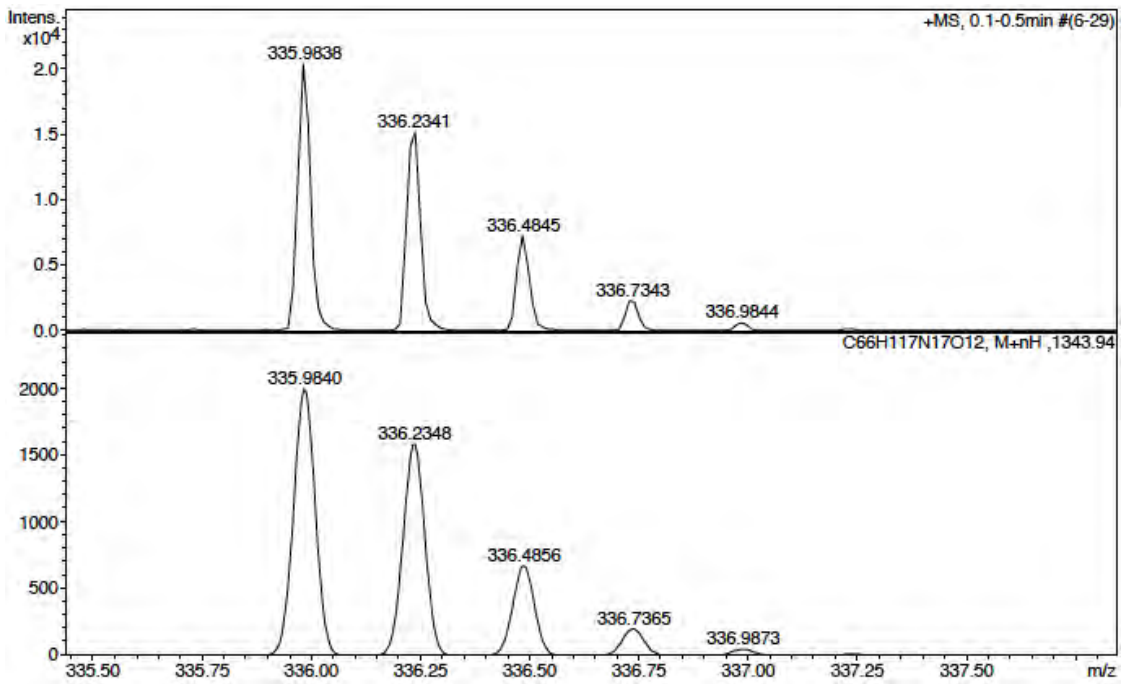
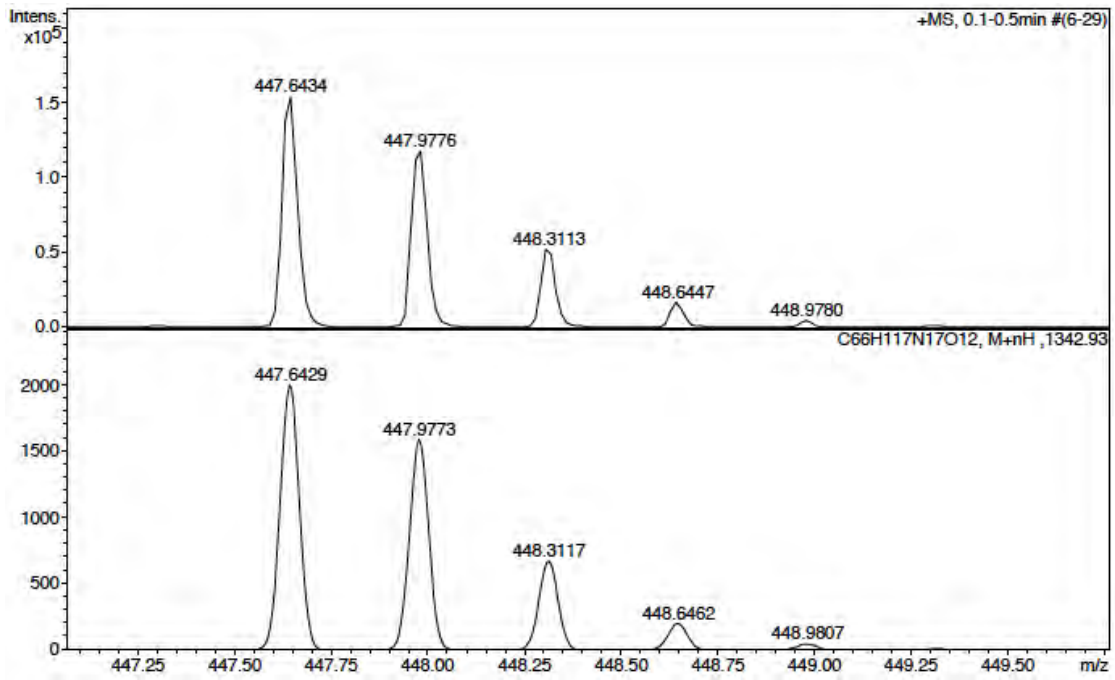
ESI-MS ( $m/z$ )





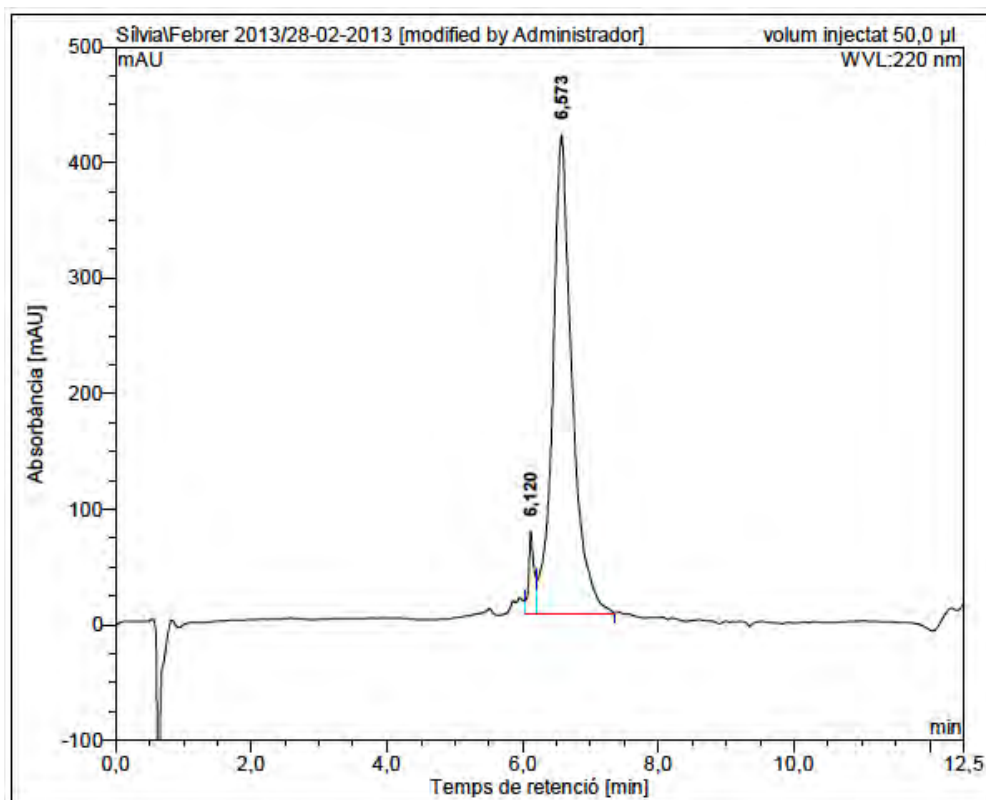
HRMS (ESI)  $m/z$





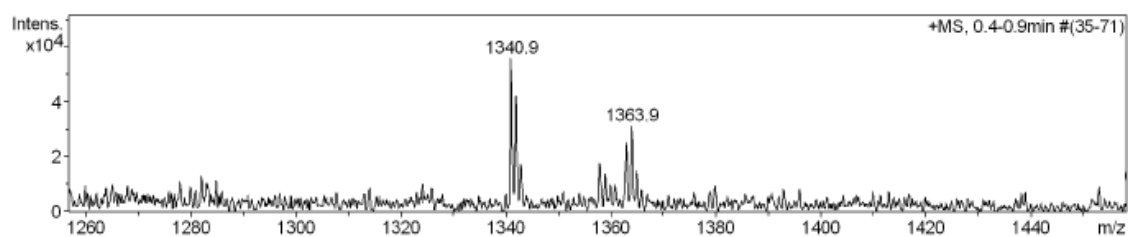
c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC710)

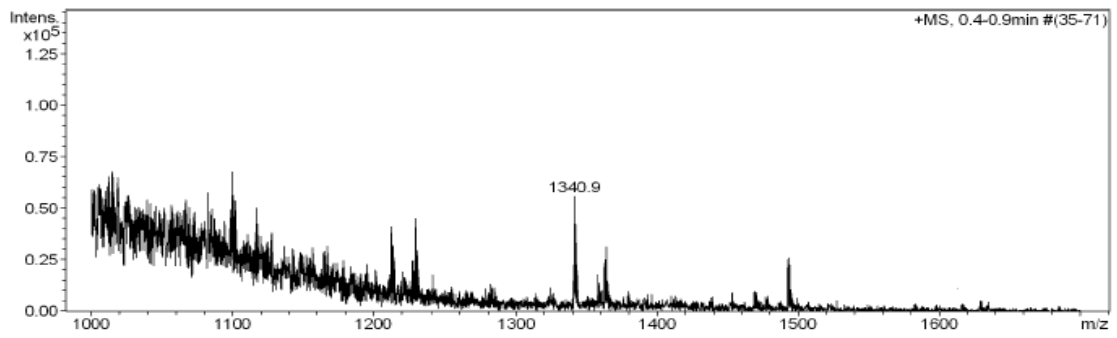
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



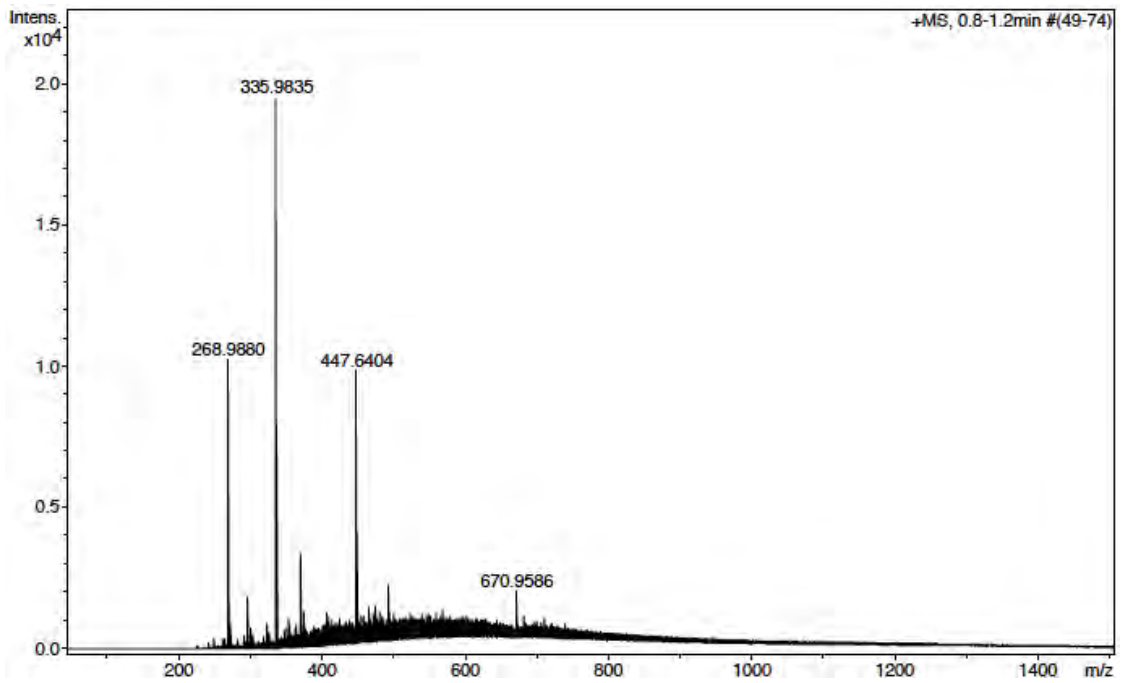
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,12	70,711	6,909	4,84
2	6,57	413,365	135,779	95,16
Total:		484,076	142,688	100,00

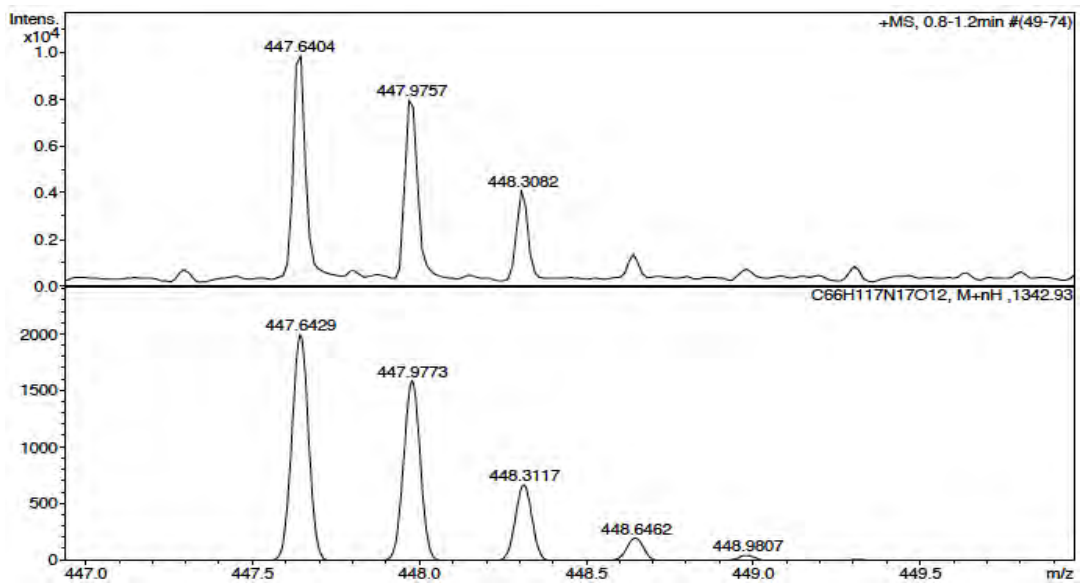
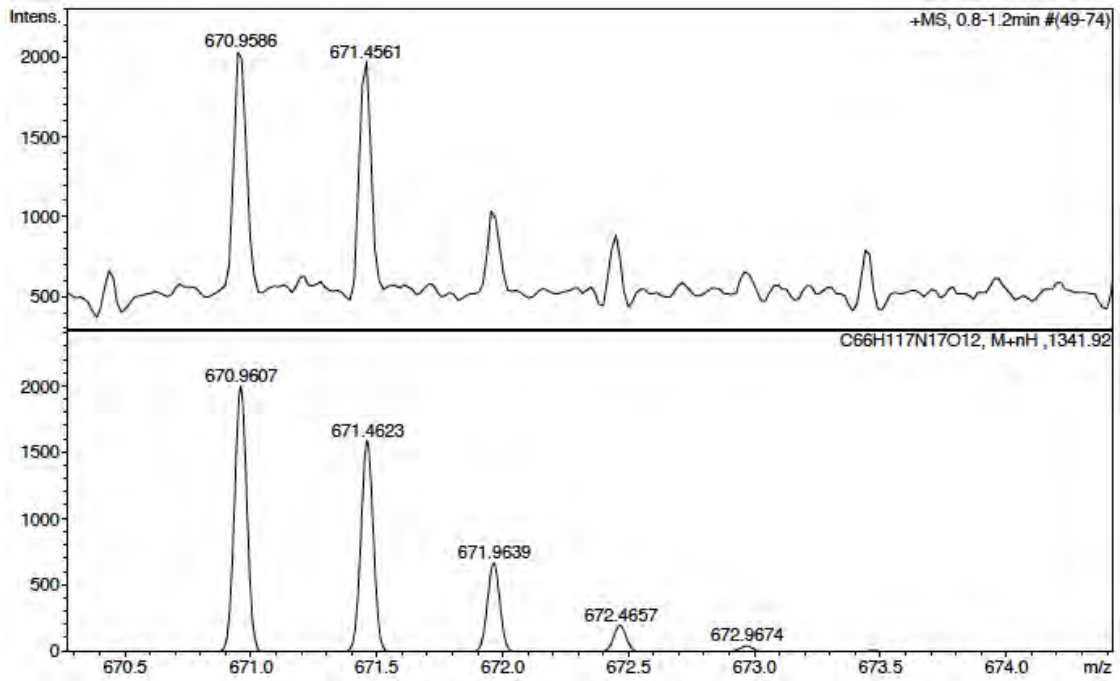
ESI-MS ( $m/z$ )

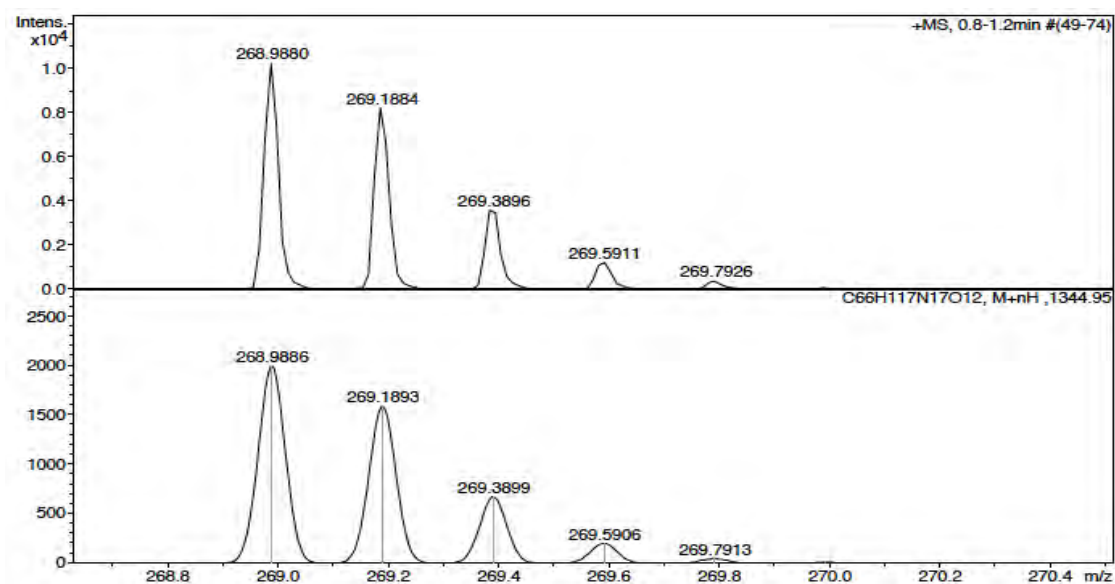
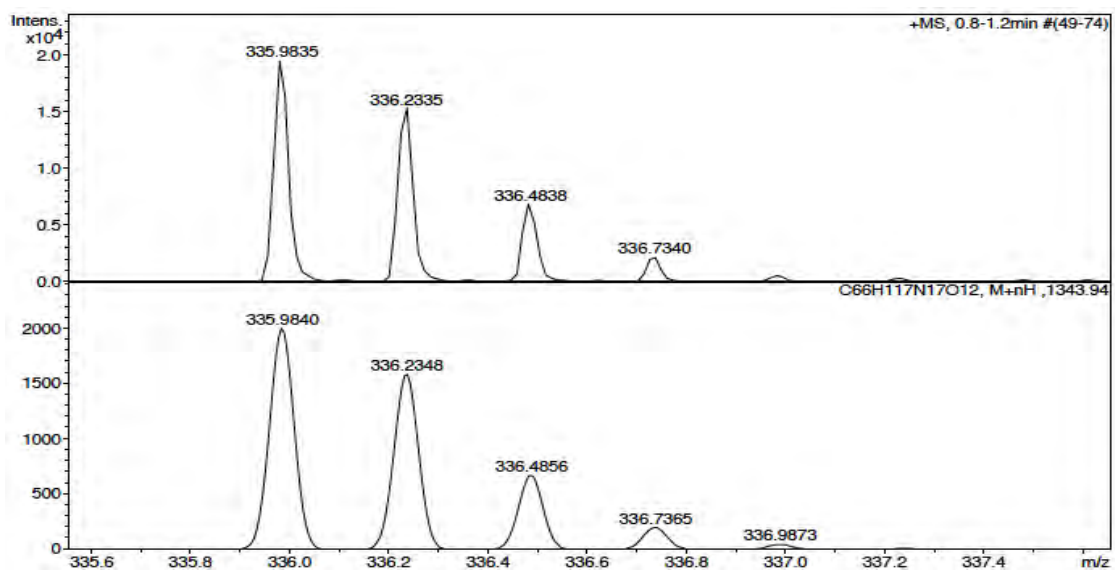




HRMS (ESI) *m/z*

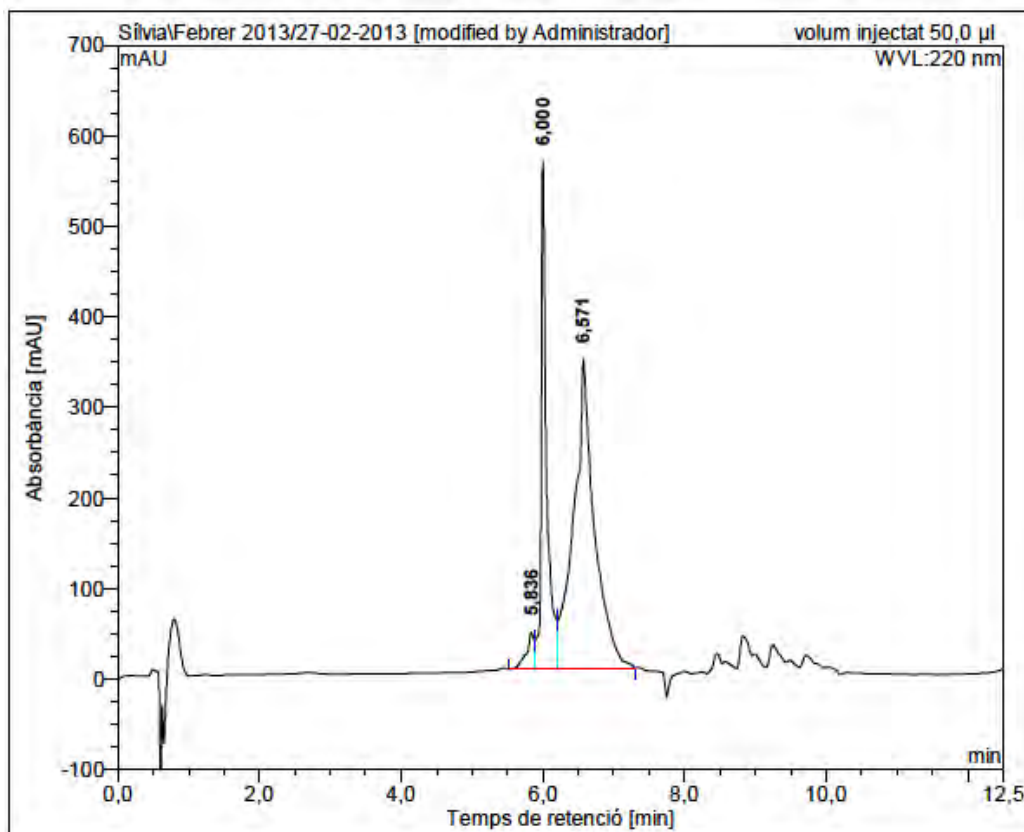






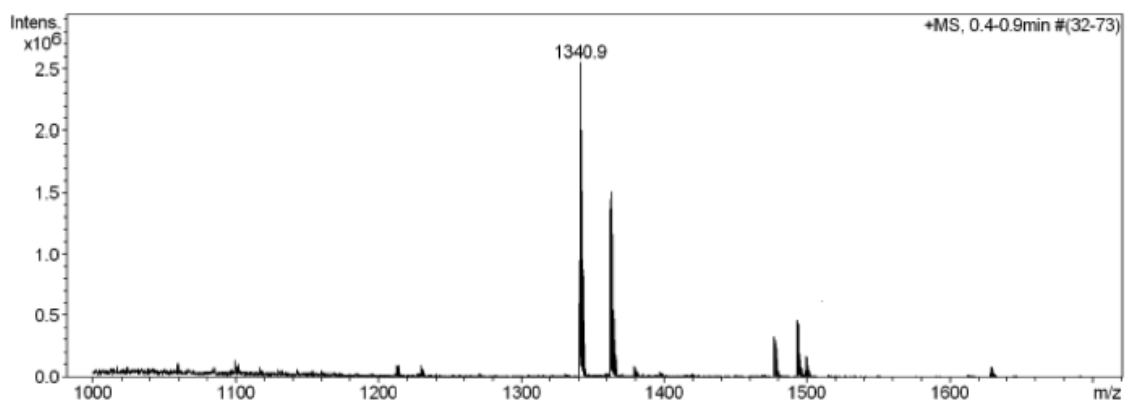
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC712)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

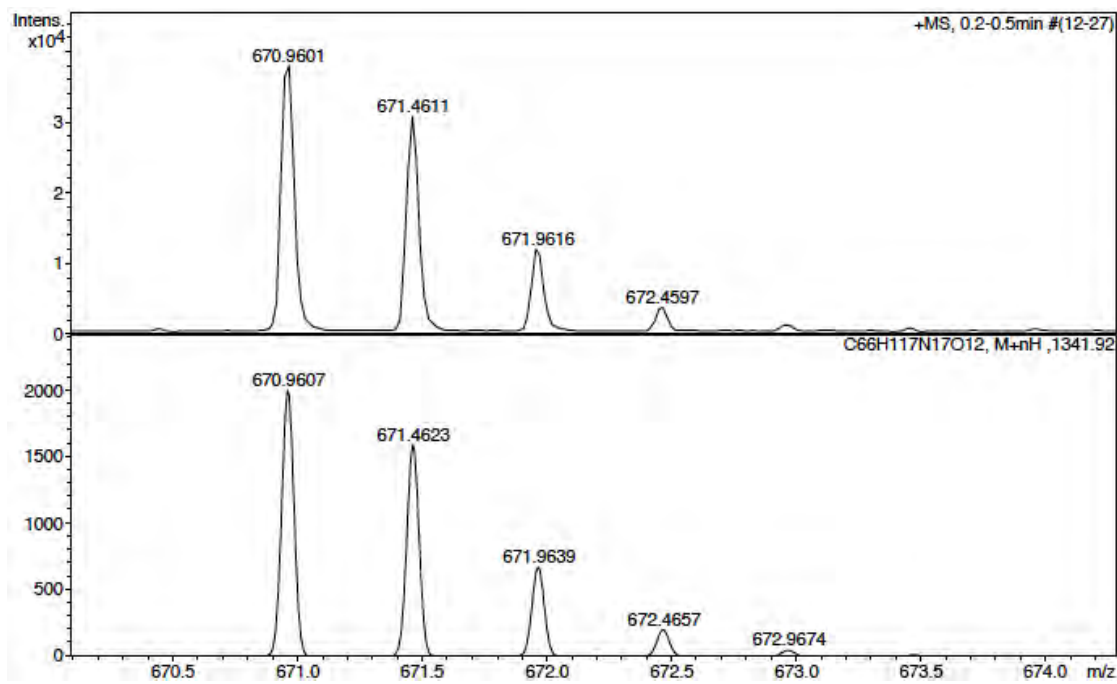
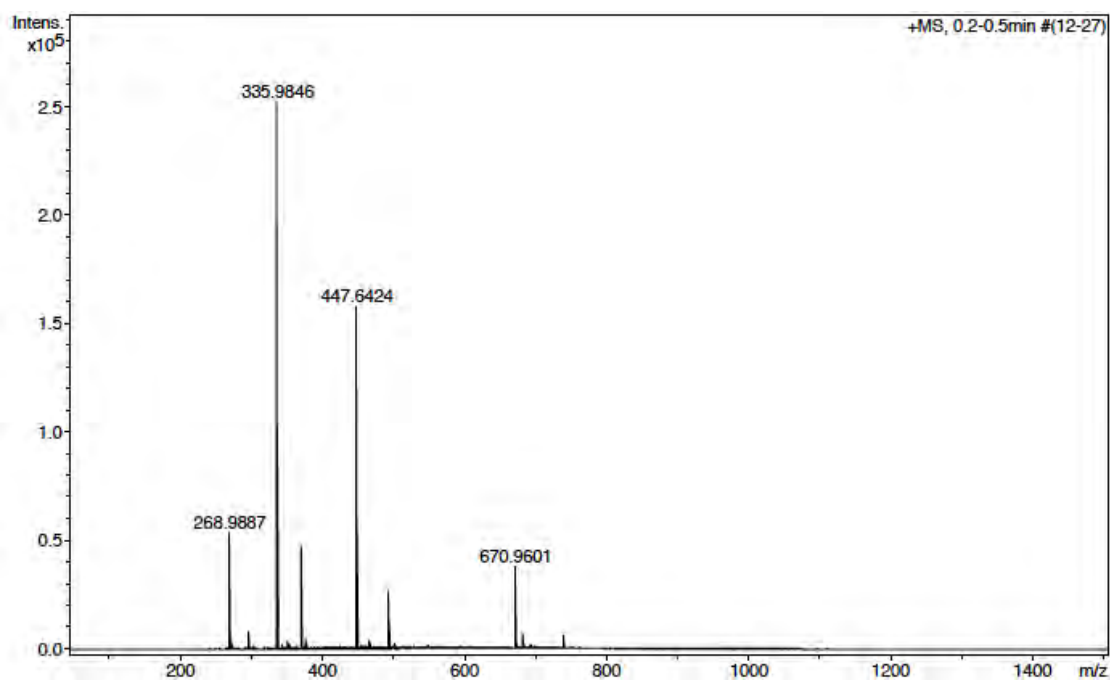


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,84	40,591	5,224	3,04
2	6,00	560,828	50,286	29,27
3	6,57	342,505	116,264	67,68
Total:		943,924	171,774	100,00

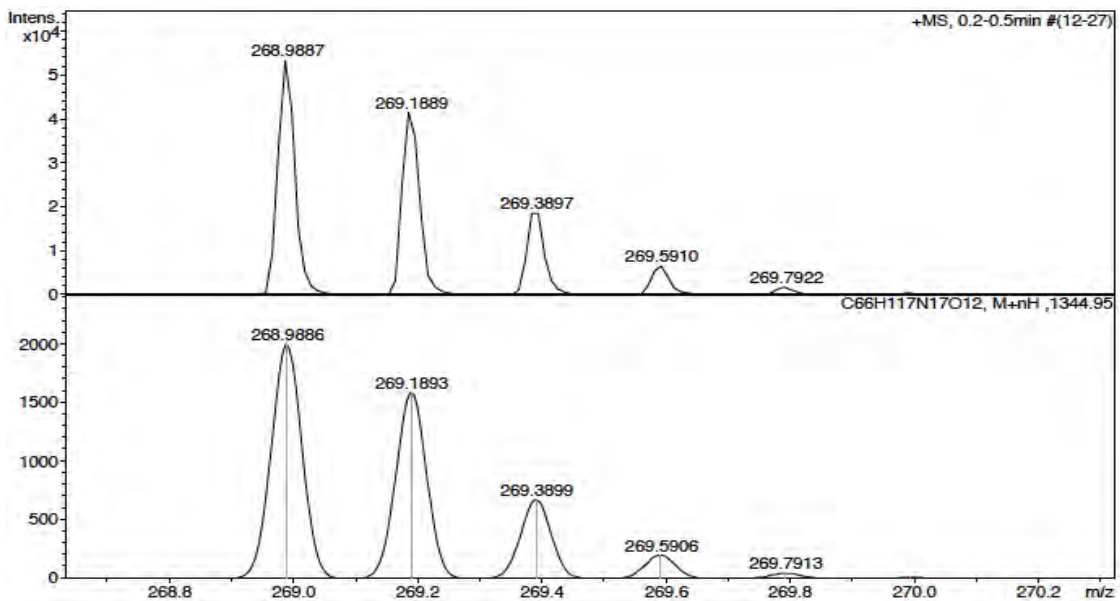
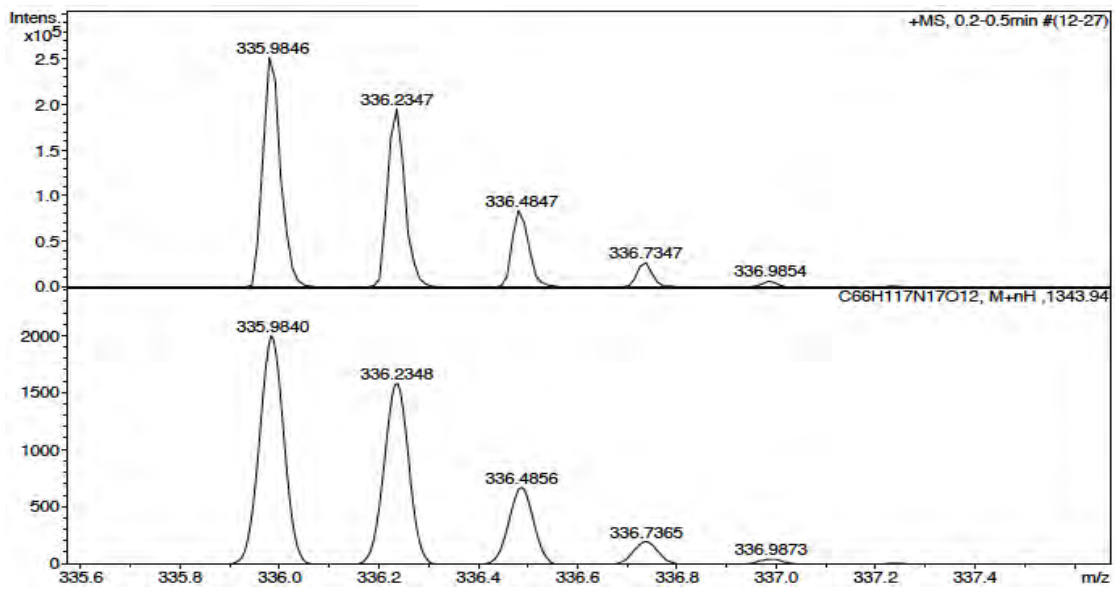
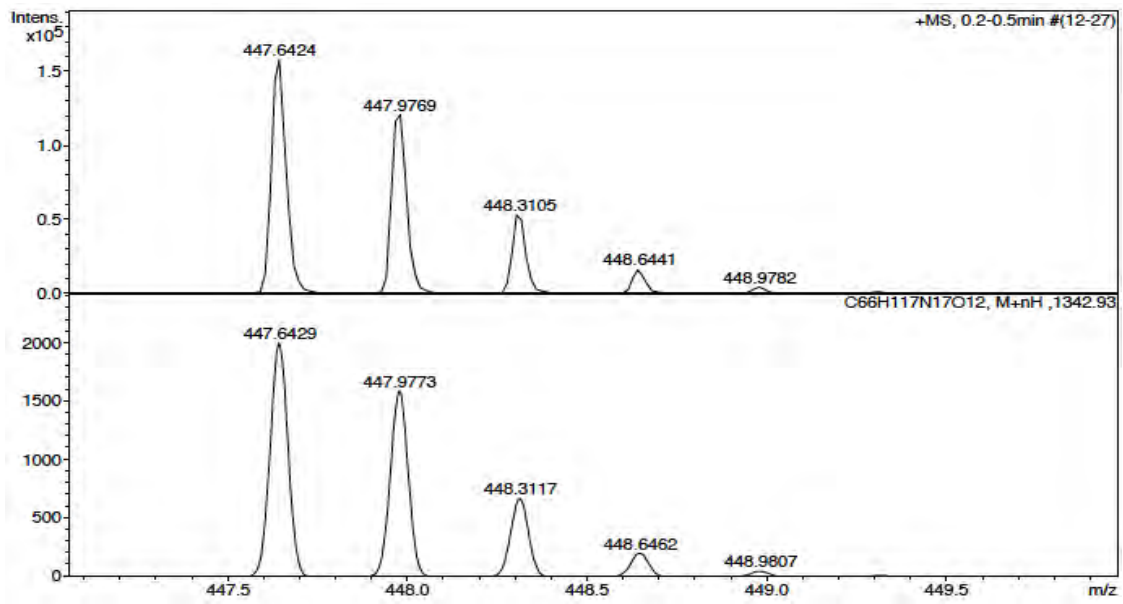
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

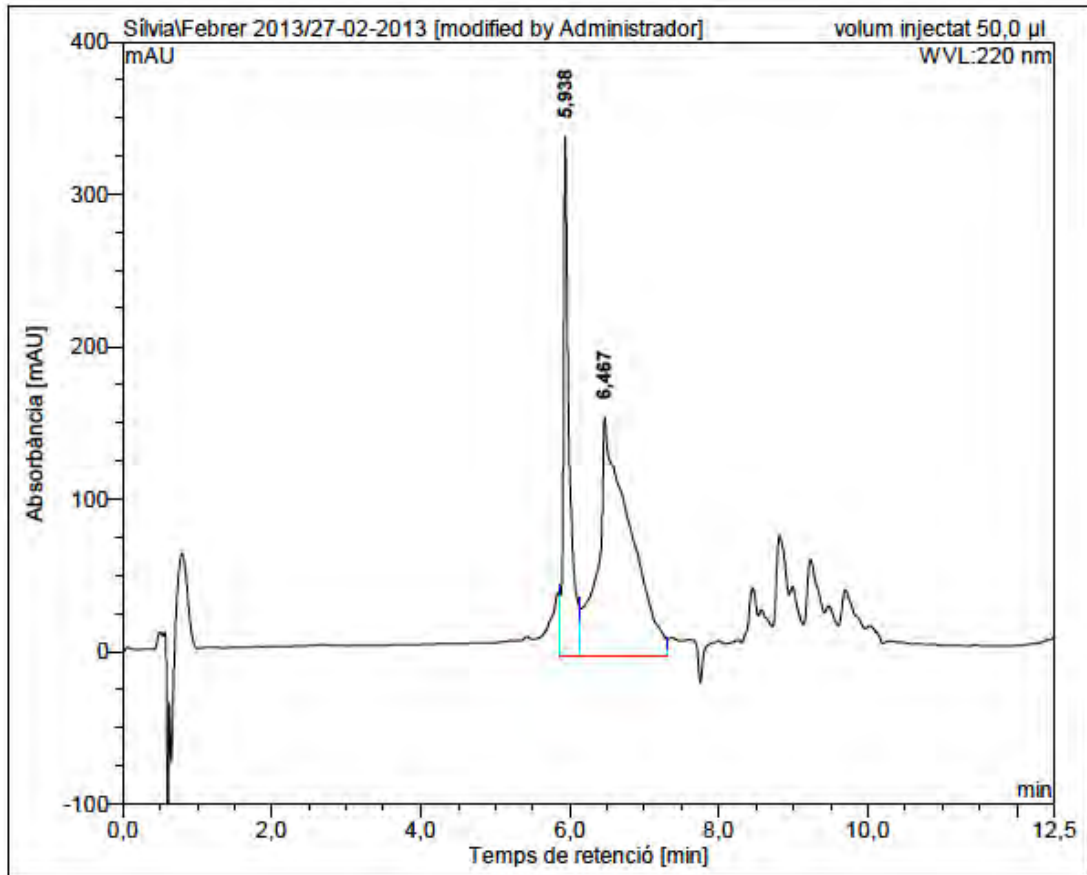






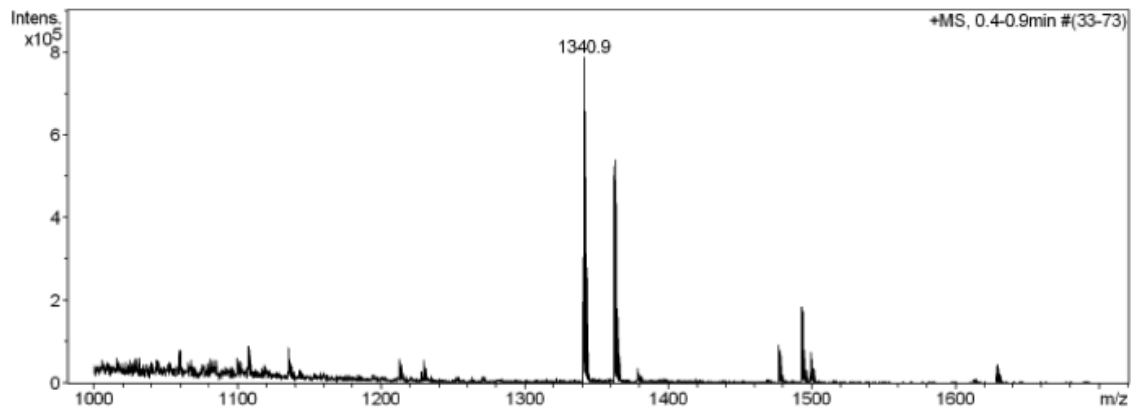
c(Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC714)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

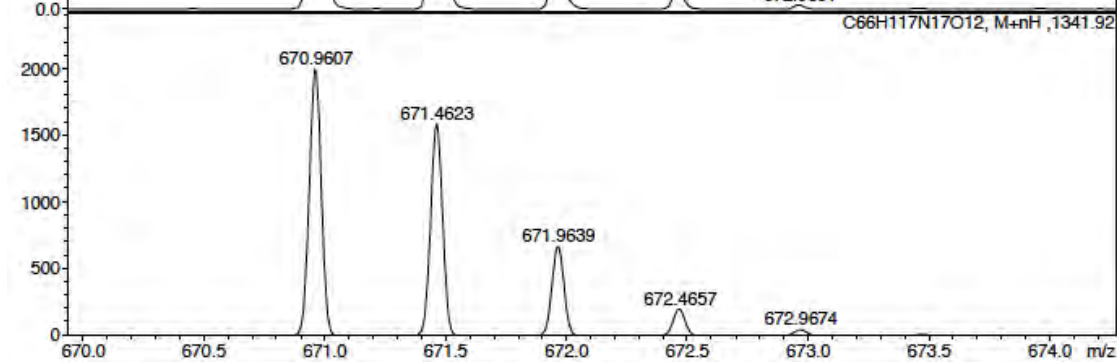
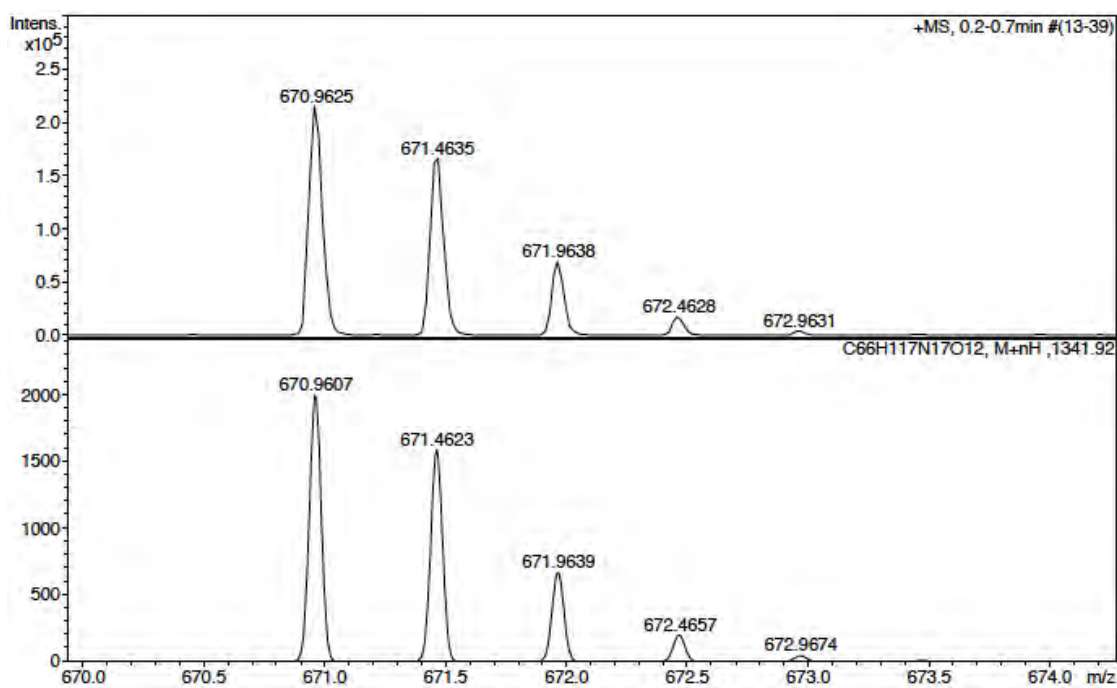
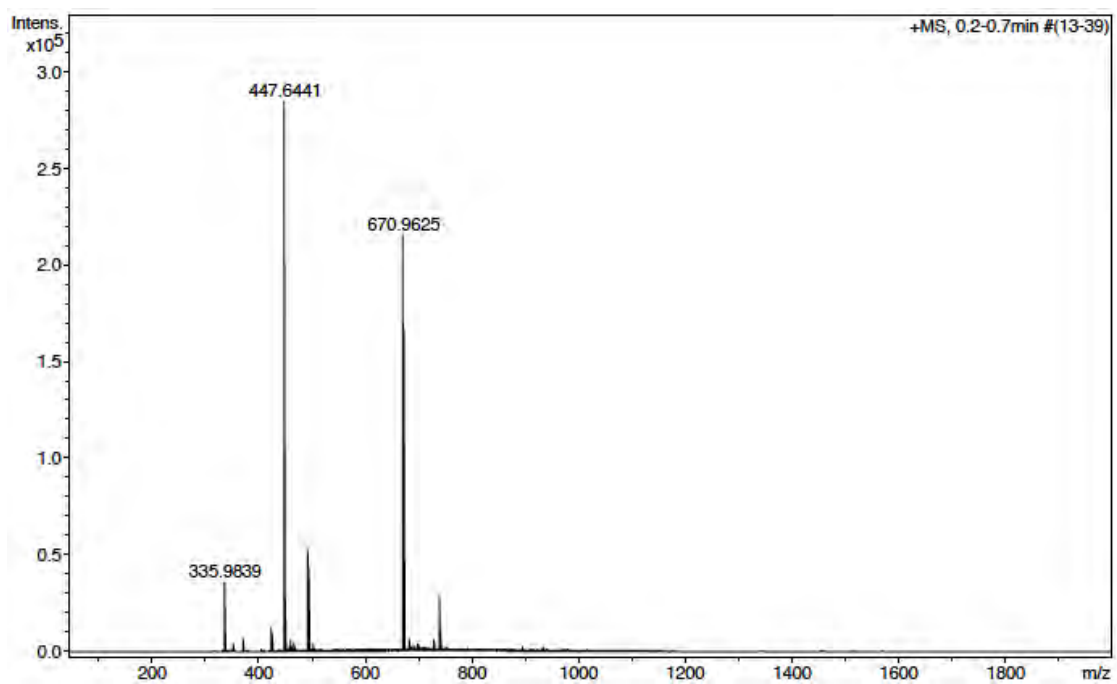


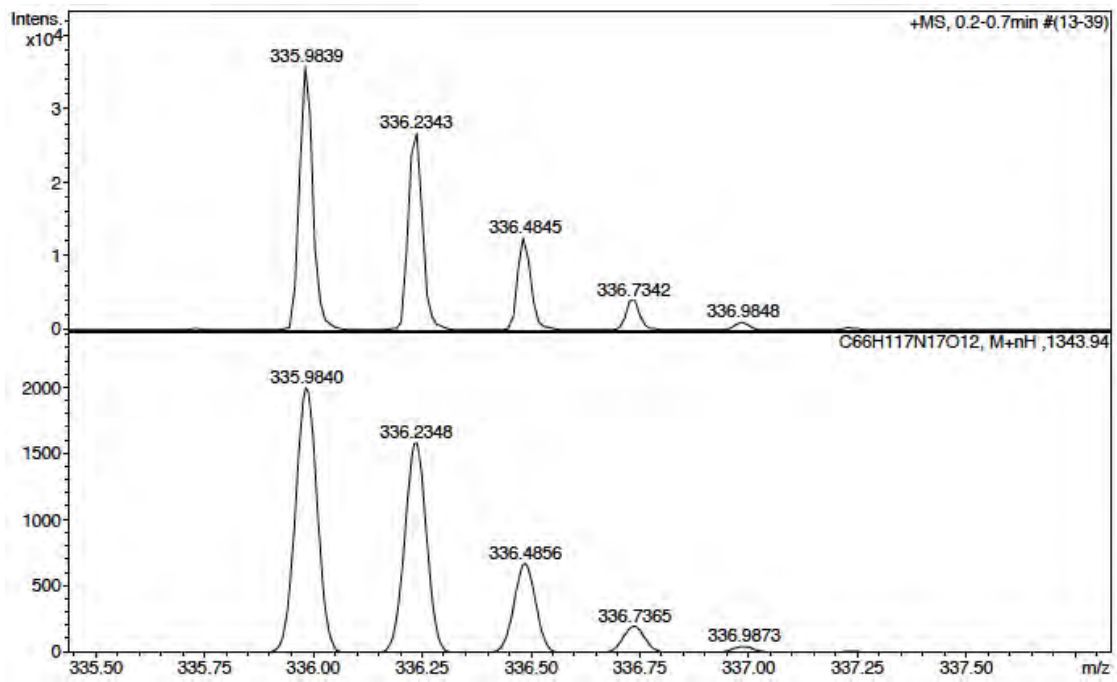
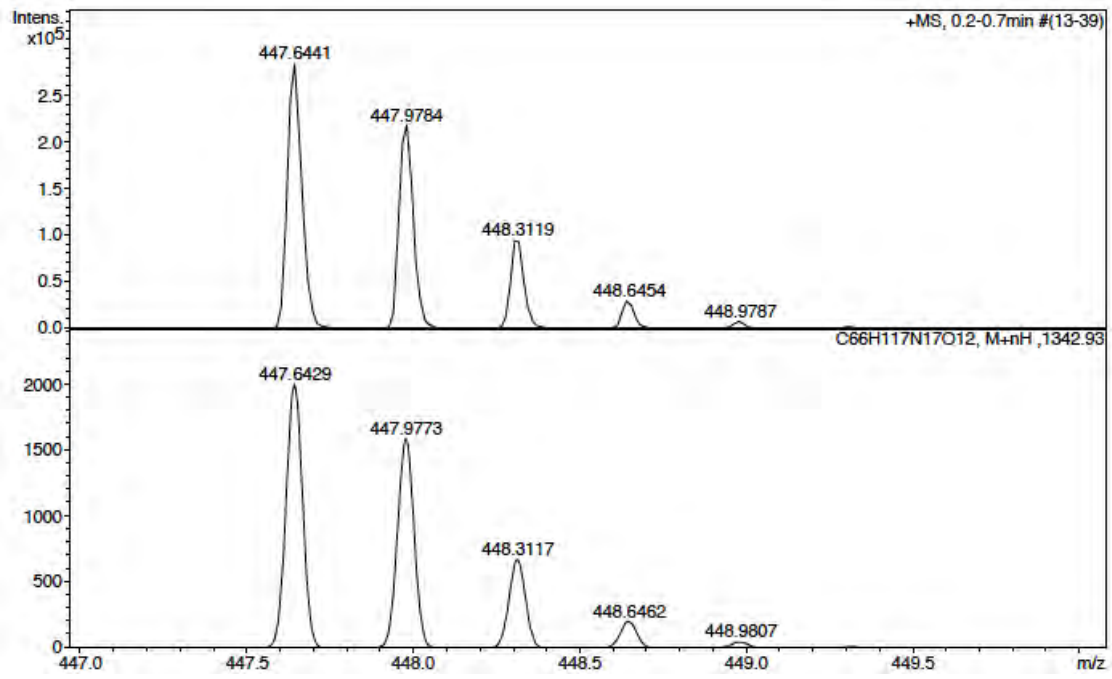
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,94	340,585	30,592	28,62
2	6,47	155,832	76,286	71,38
Total:		496,417	106,878	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



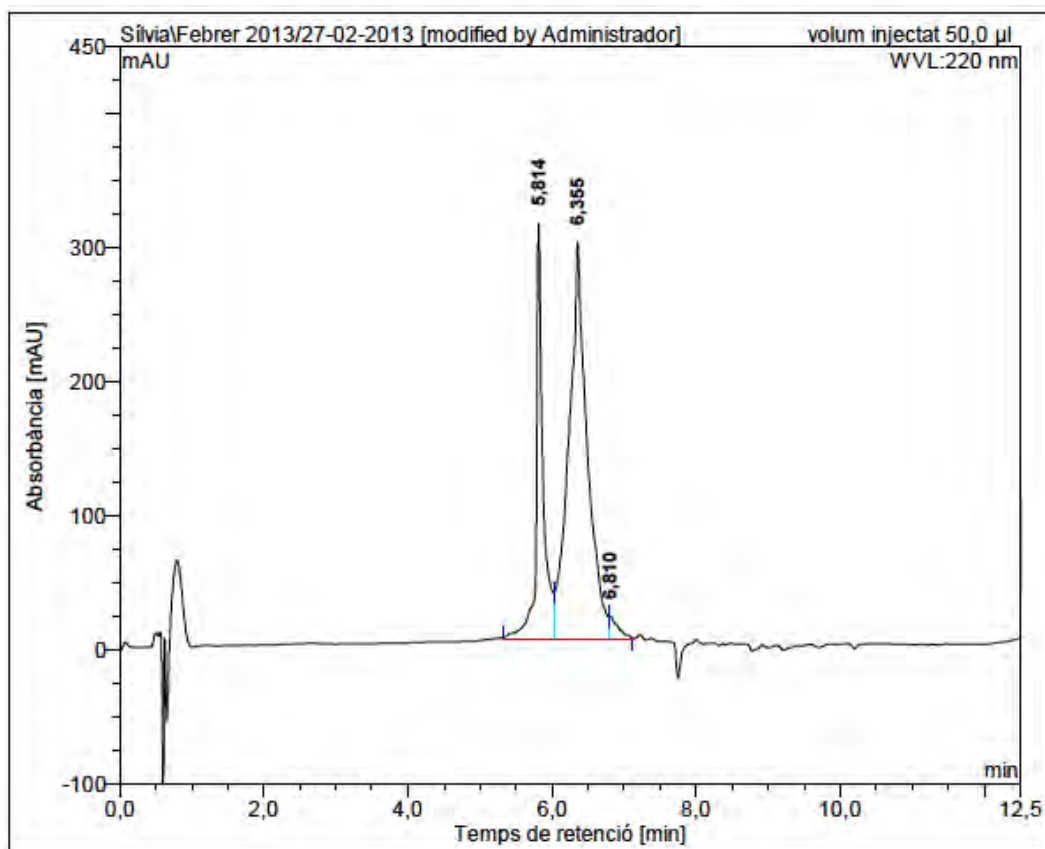
HRMS (ESI)  $m/z$





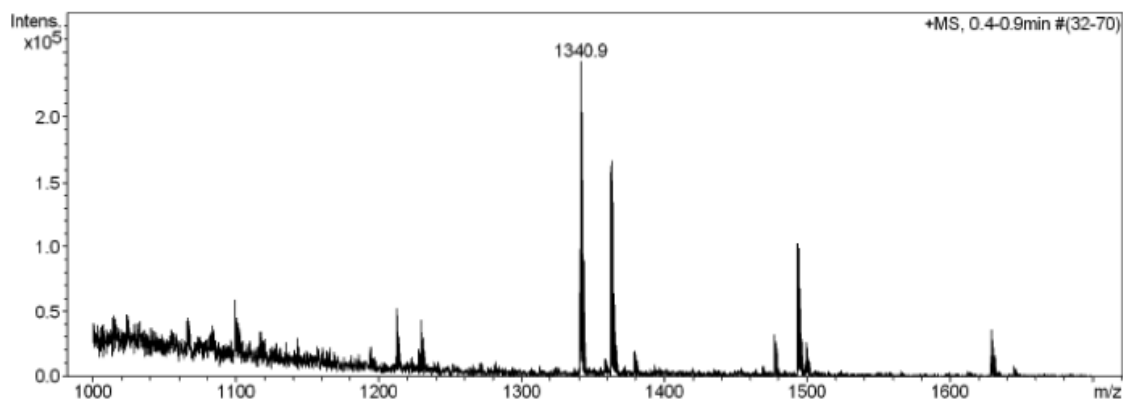
c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC716)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

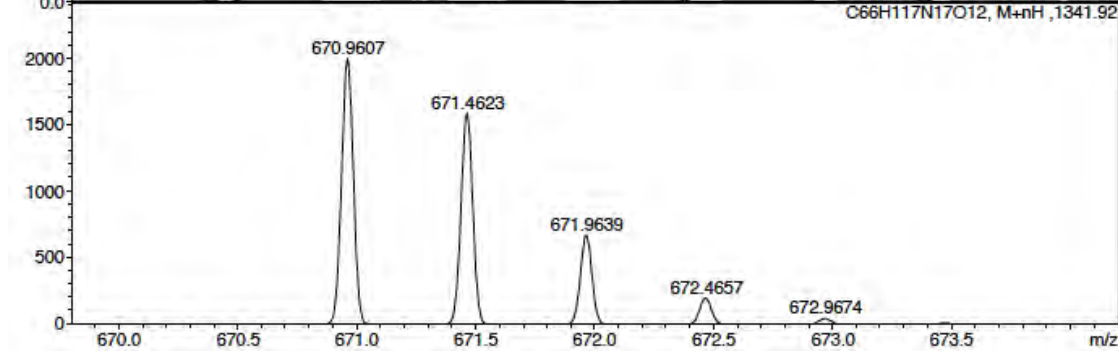
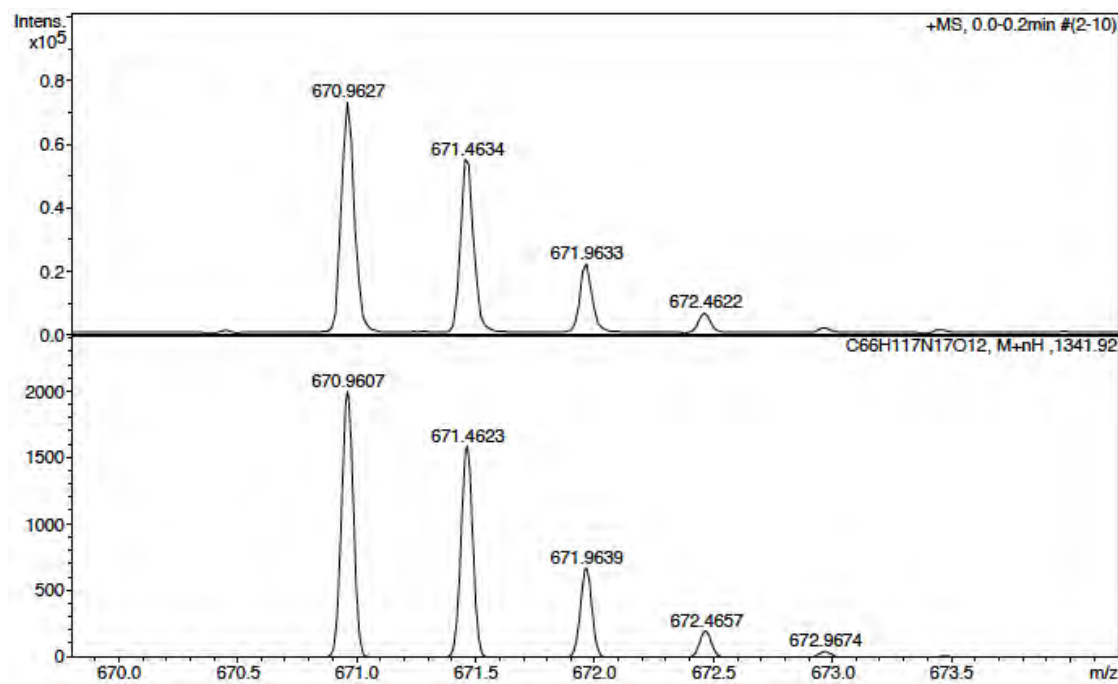
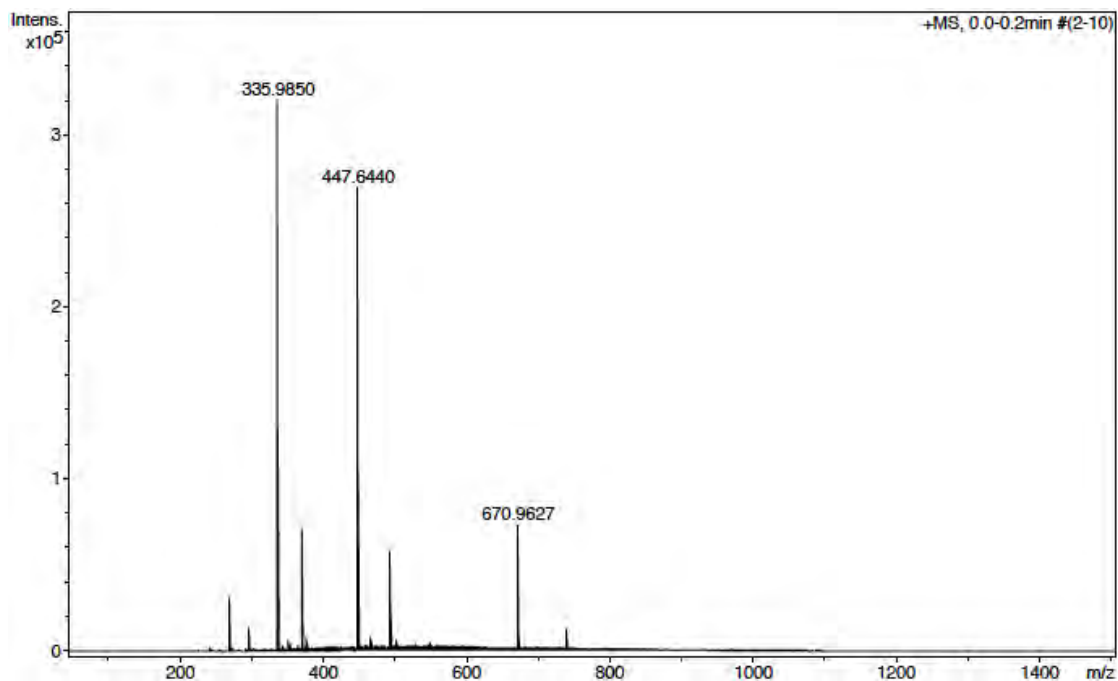


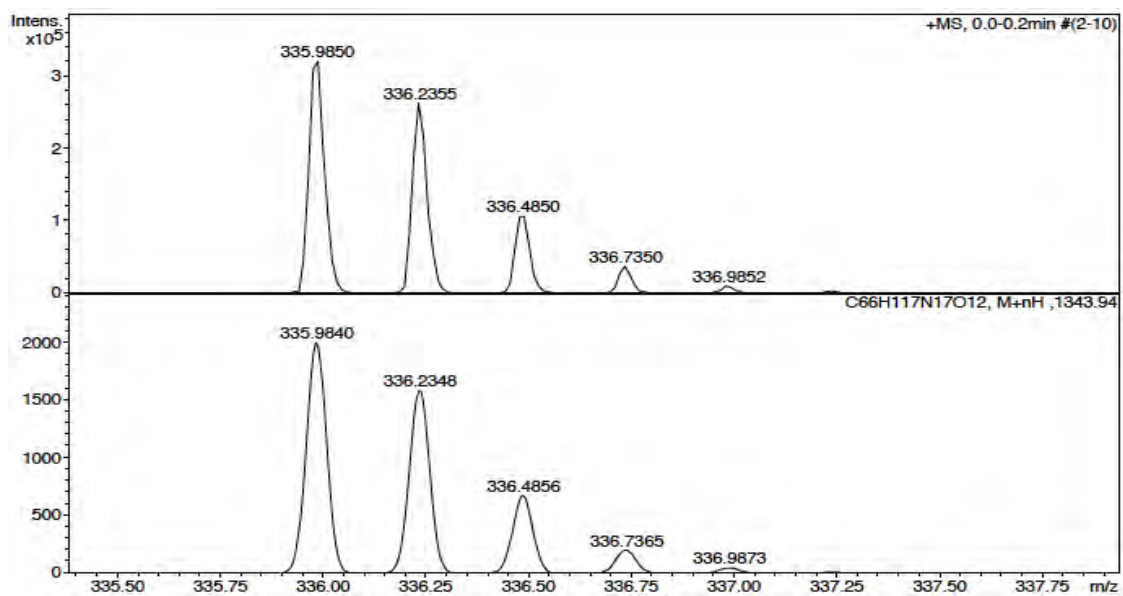
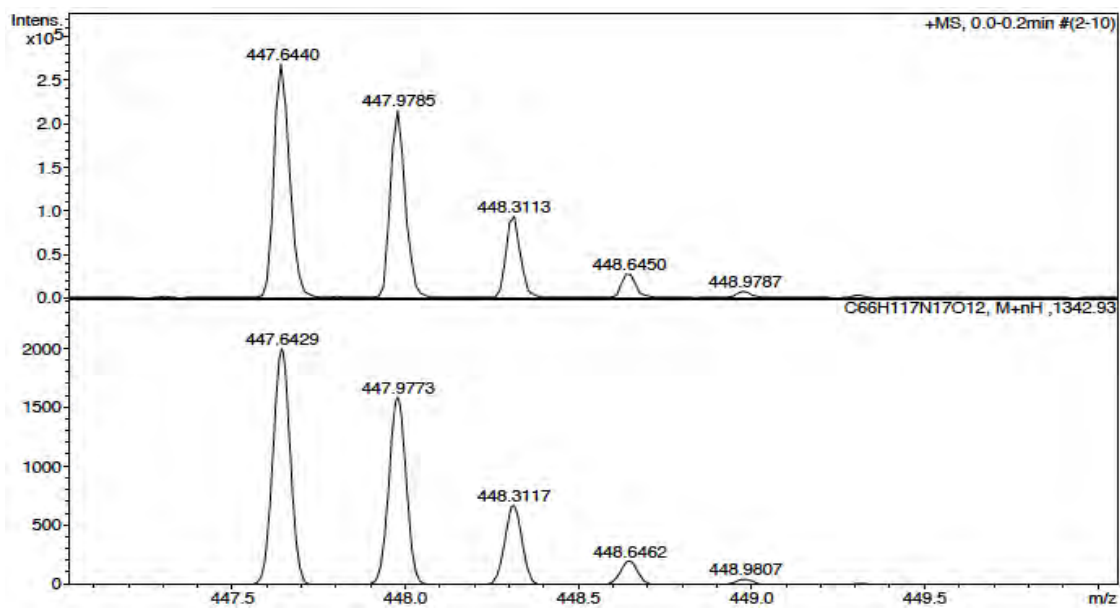
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,81	309,626	33,618	27,32
2	6,35	295,129	87,021	70,72
3	6,81	16,440	2,415	1,96
Total:		621,195	123,054	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



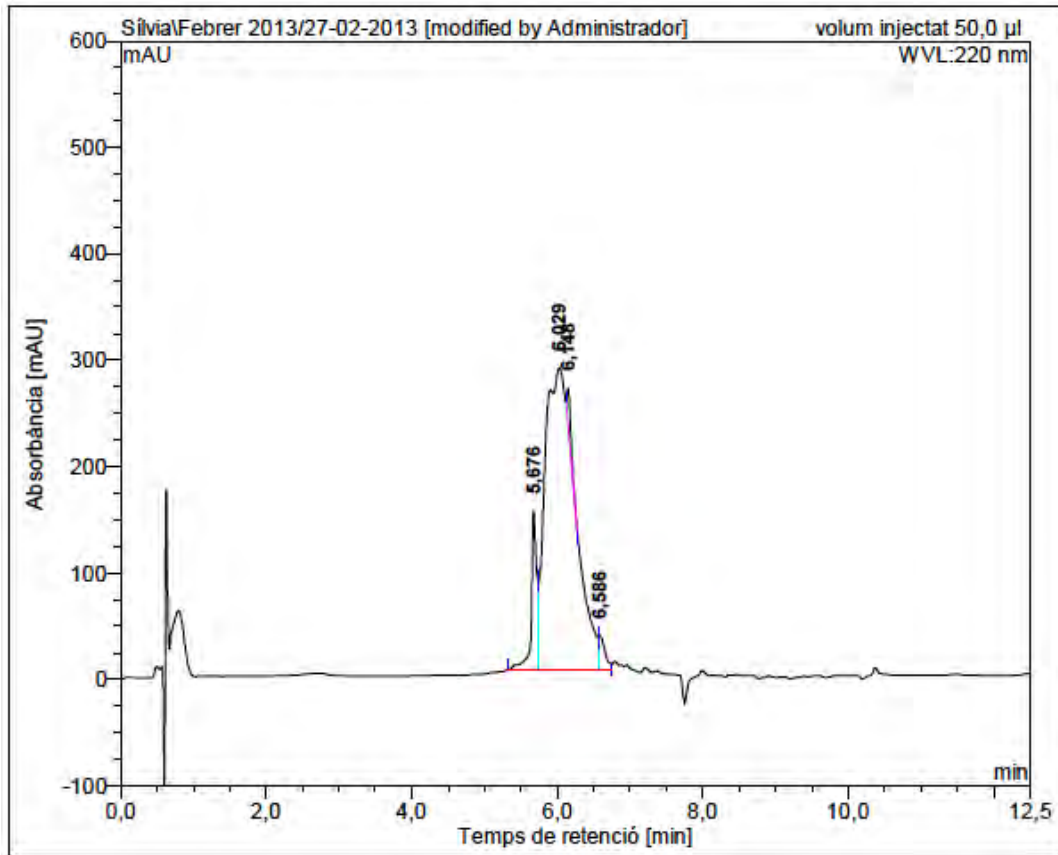
HRMS (ESI)  $m/z$





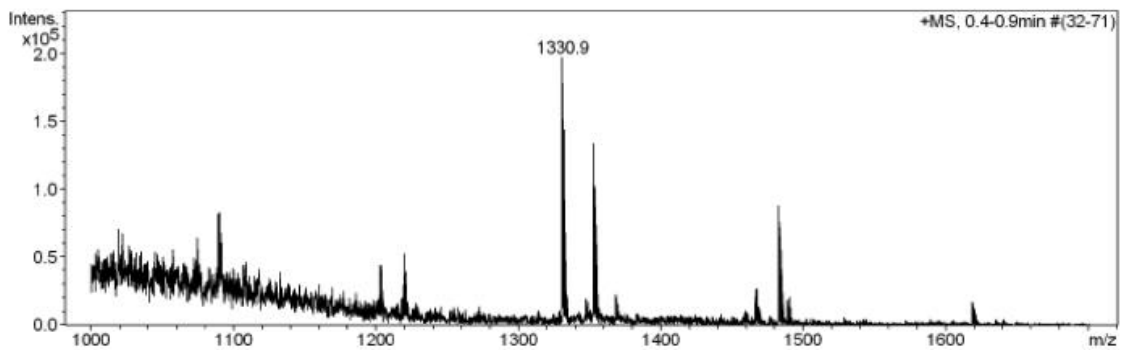
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC718)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



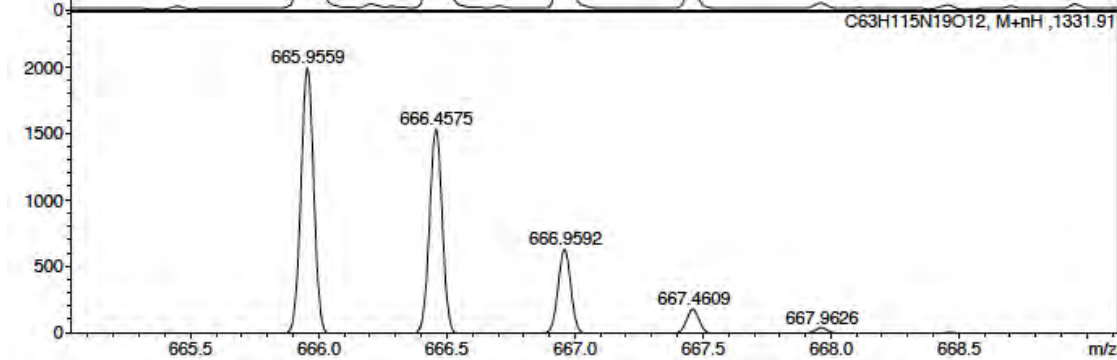
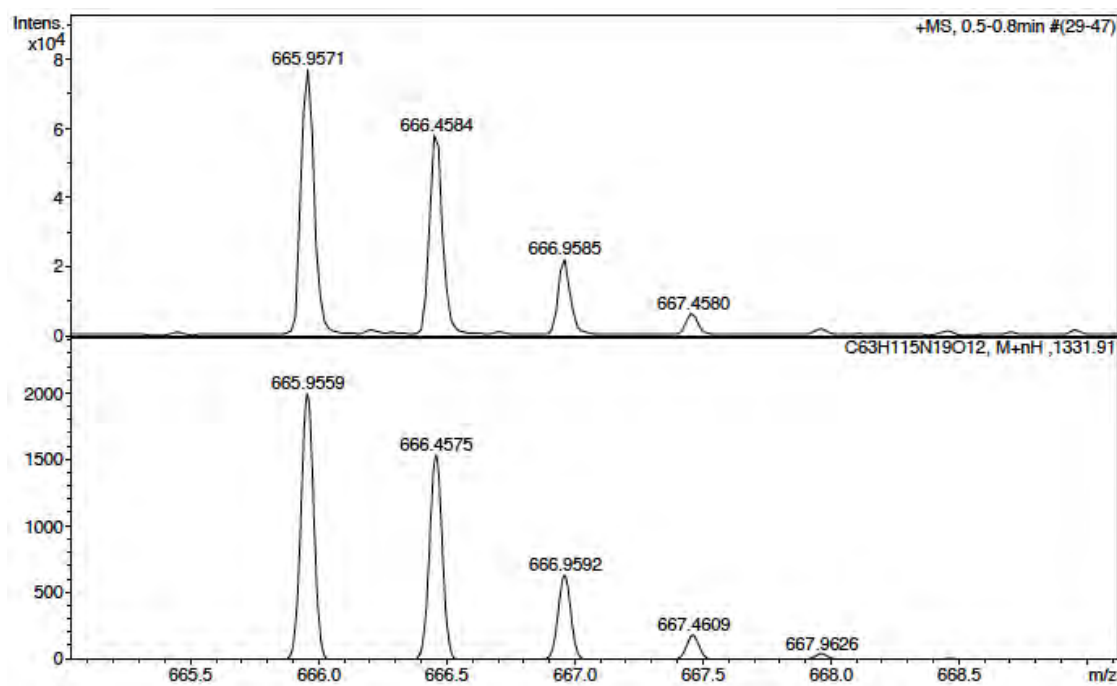
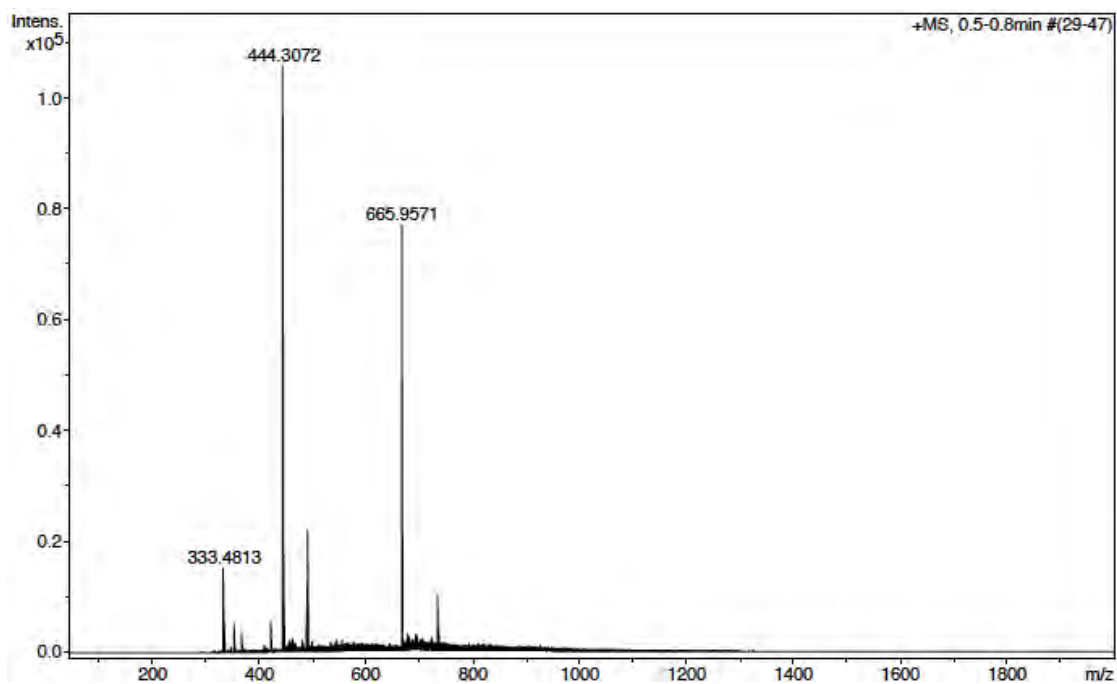
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,68	149,502	13,326	8,64
2	6,03	283,818	134,986	87,56
3	6,15	36,763	2,316	1,50
4	6,59	31,735	3,542	2,30
Total:		501,818	154,170	100,00

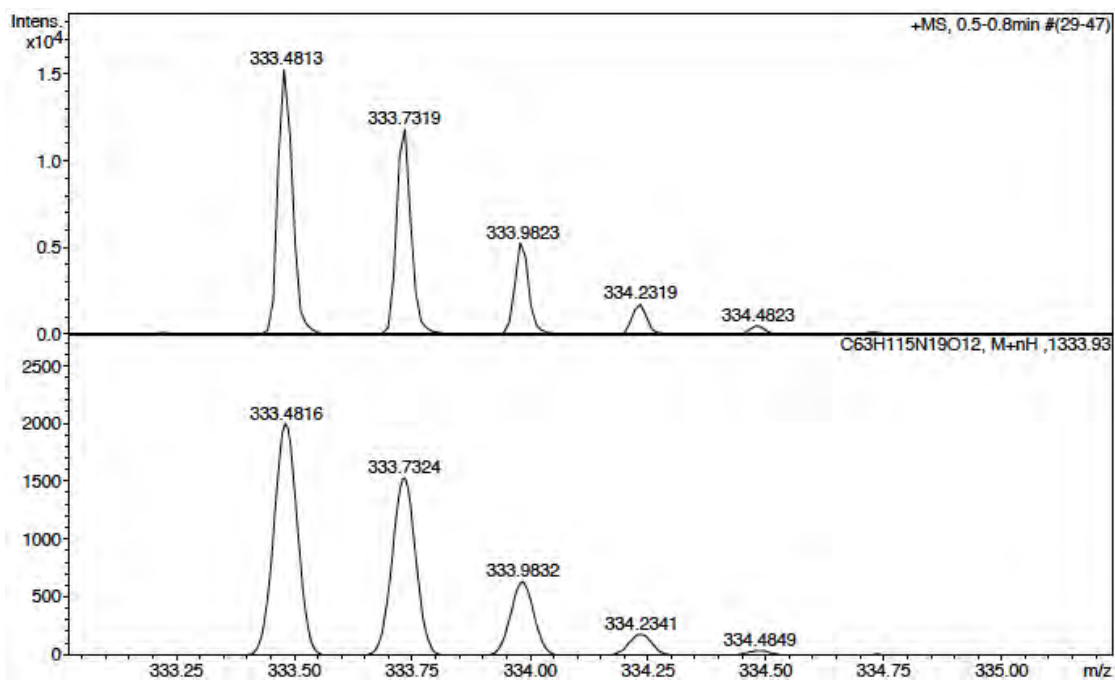
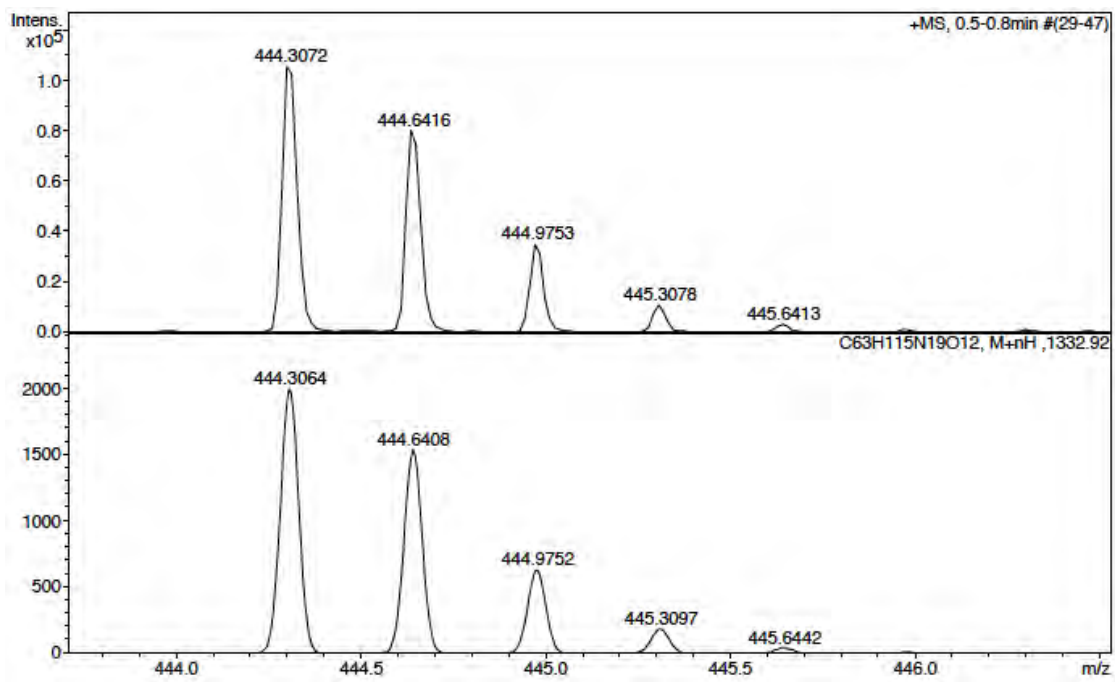
ESI-MS ( $m/z$ )





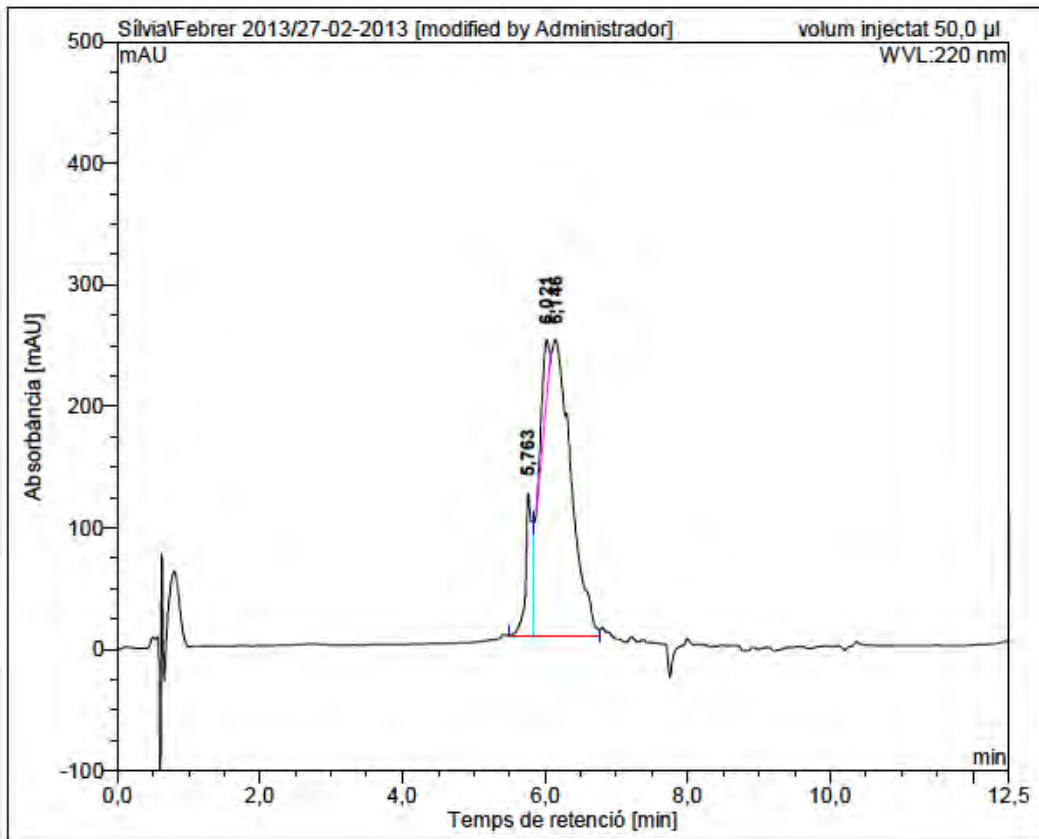
HRMS (ESI)  $m/z$





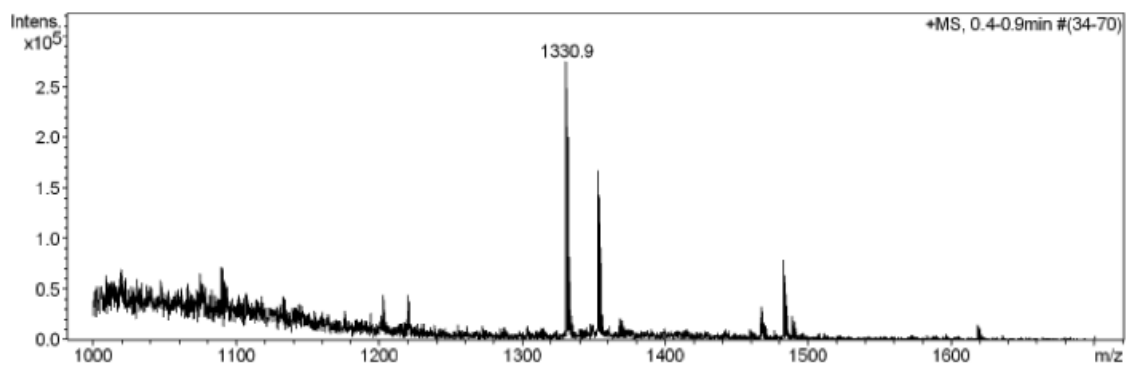
c(Lys-Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC720)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

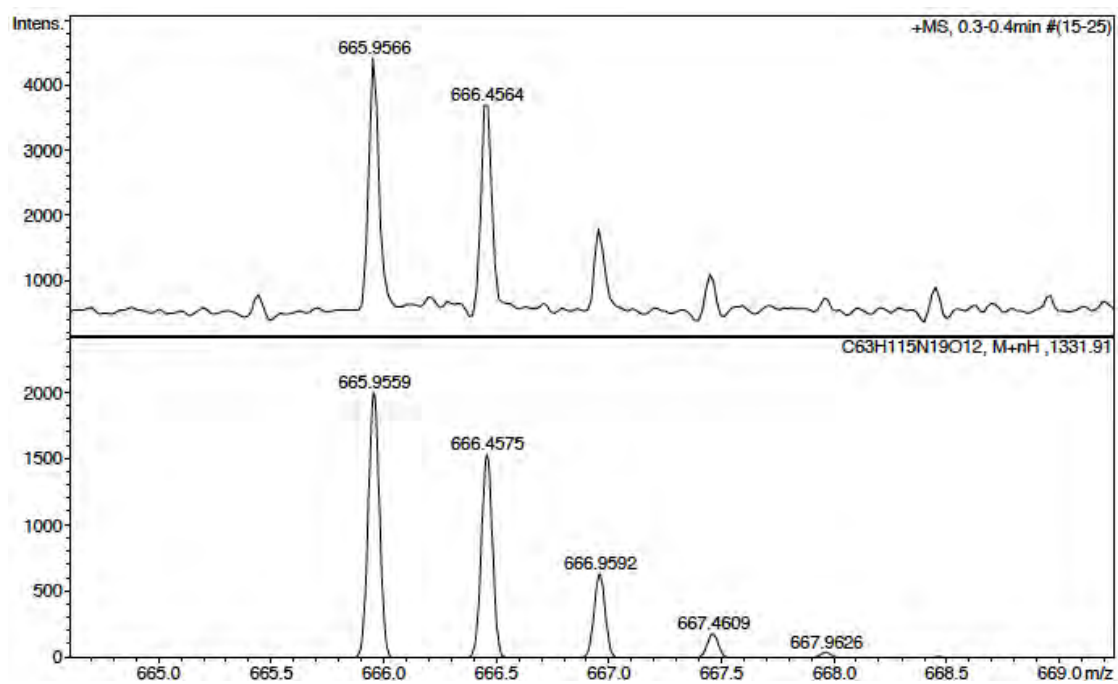
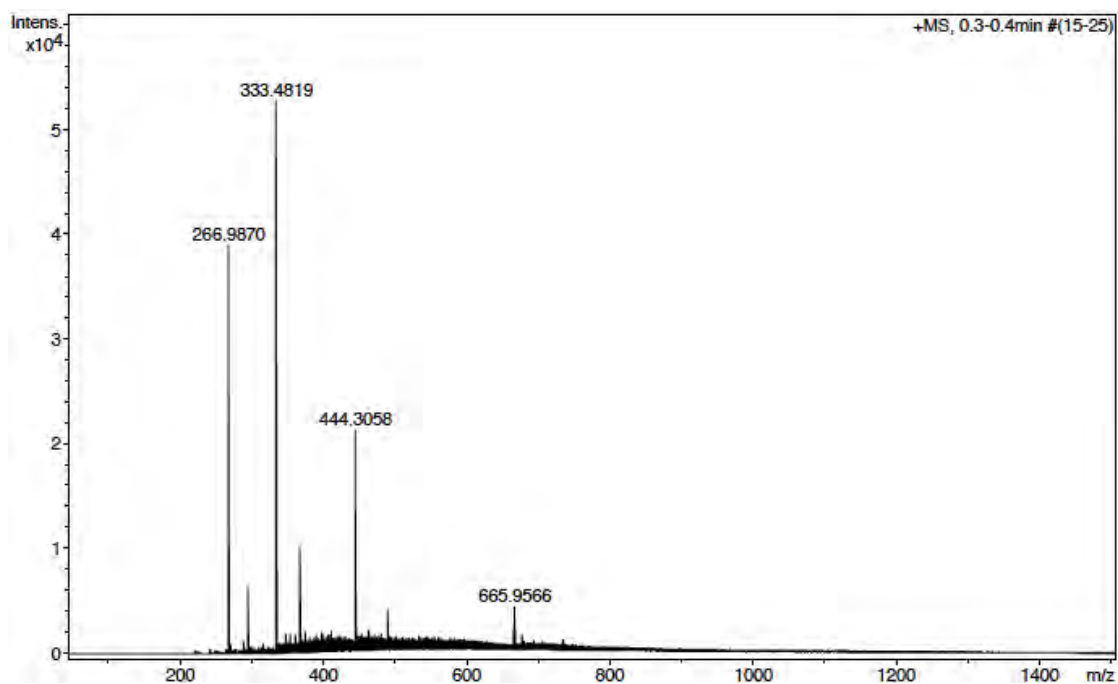


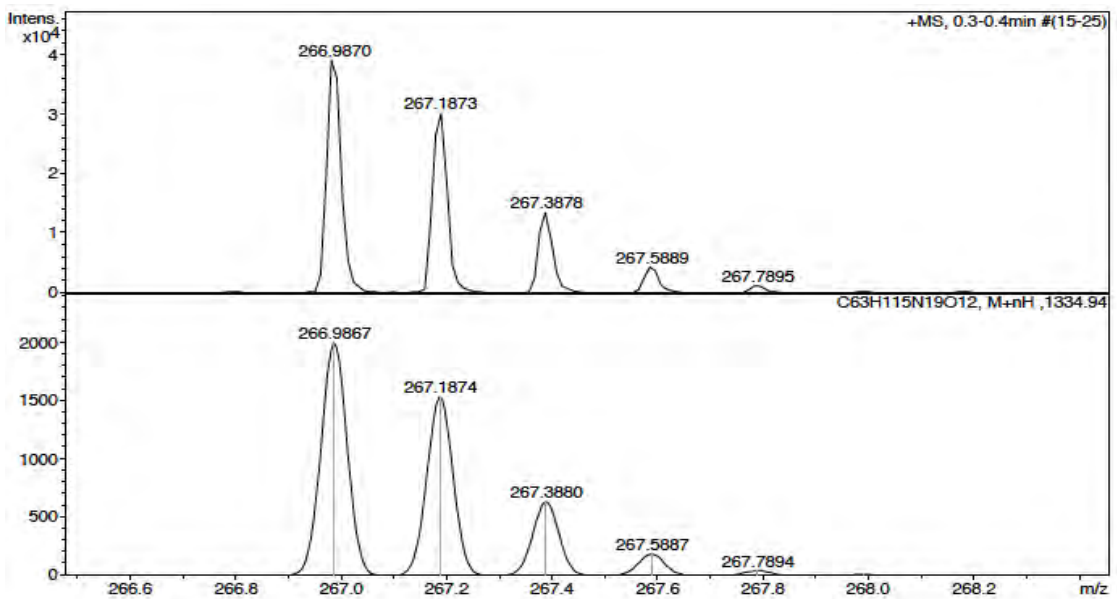
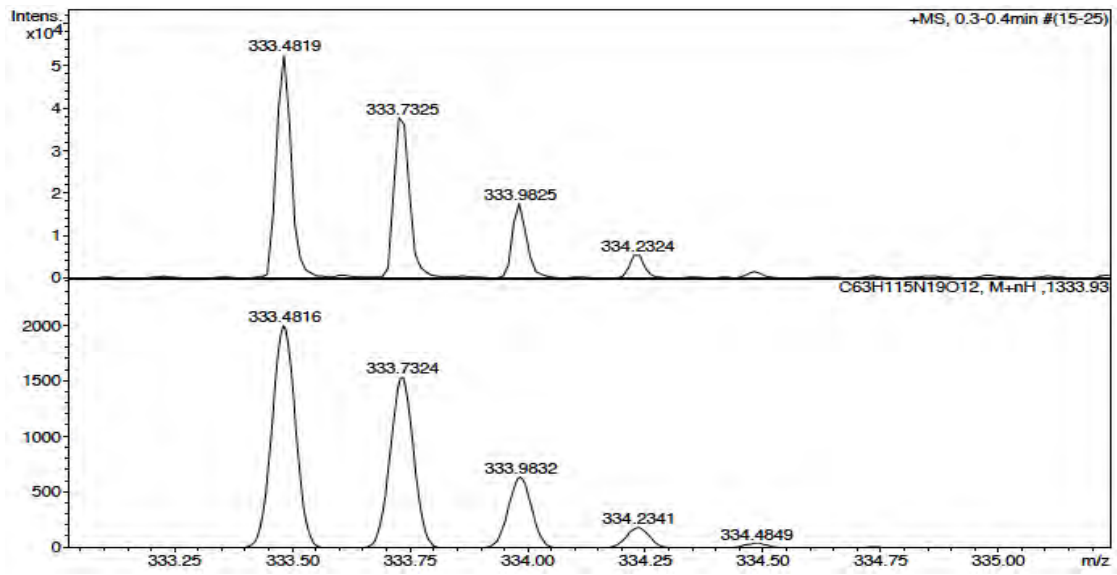
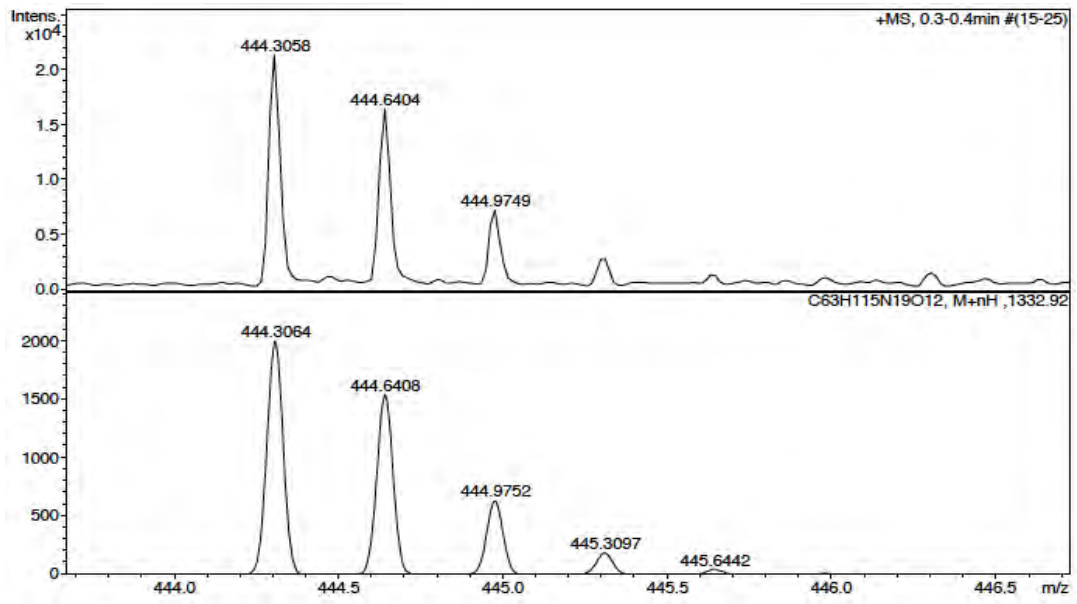
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,76	117,287	13,559	10,15
2	6,02	47,603	5,848	4,38
3	6,15	243,399	114,237	85,48
Total:		408,290	133,644	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



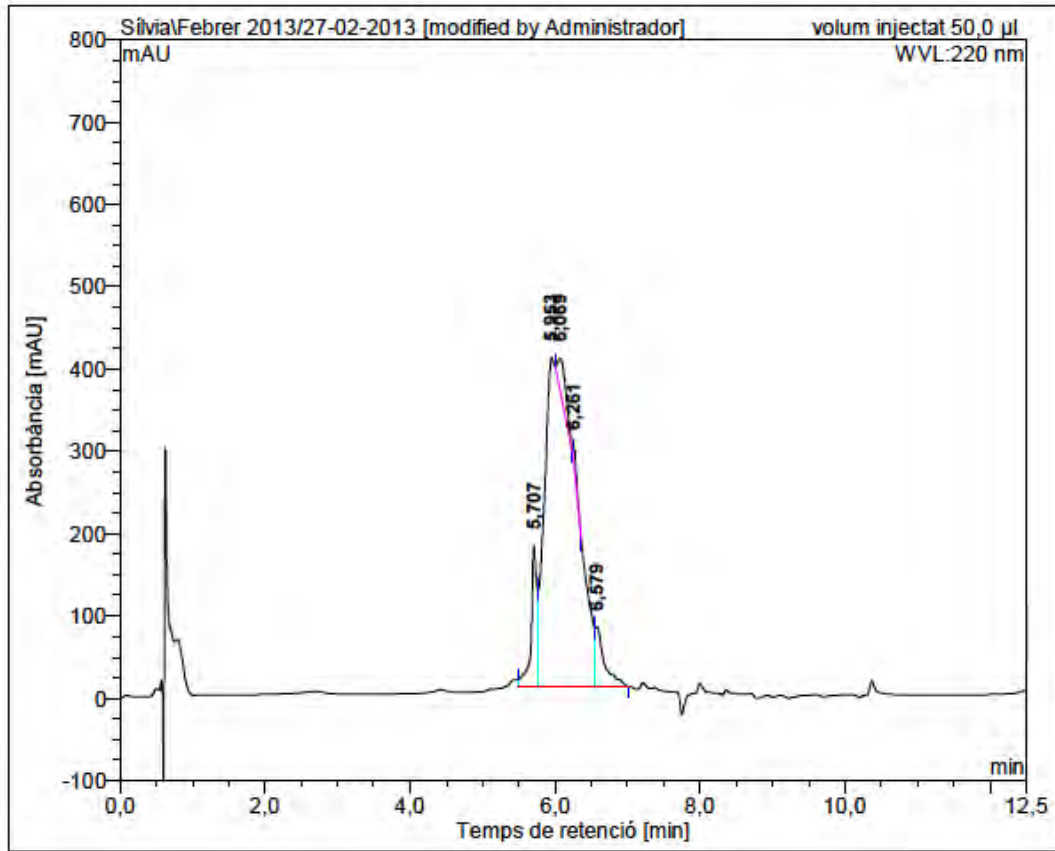
HRMS (ESI)  $m/z$





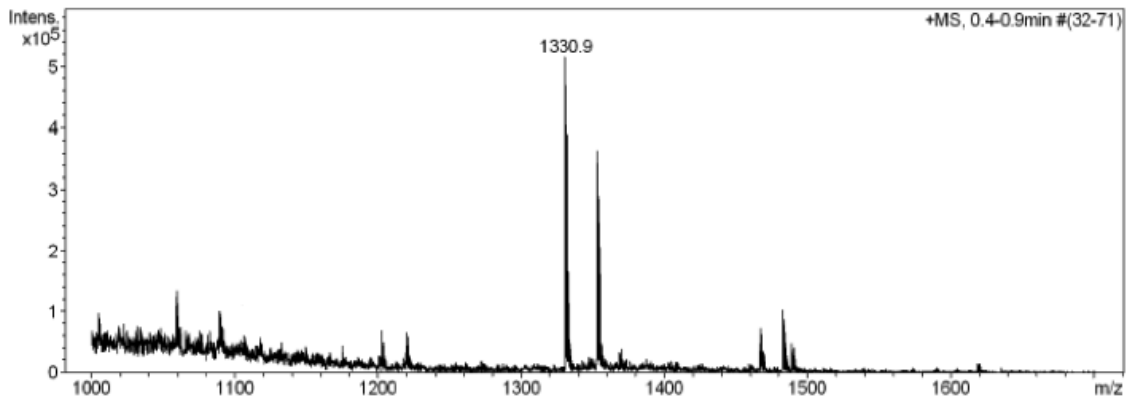
c(Lys(CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Lys-Leu-Lys-Lys-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC722)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

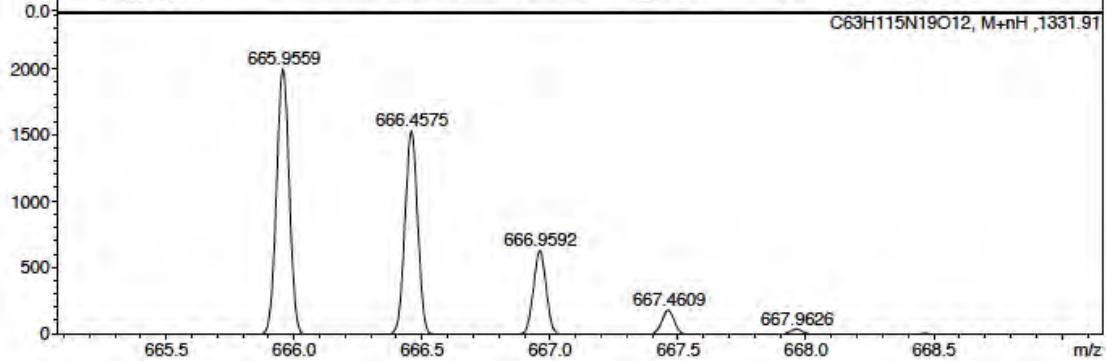
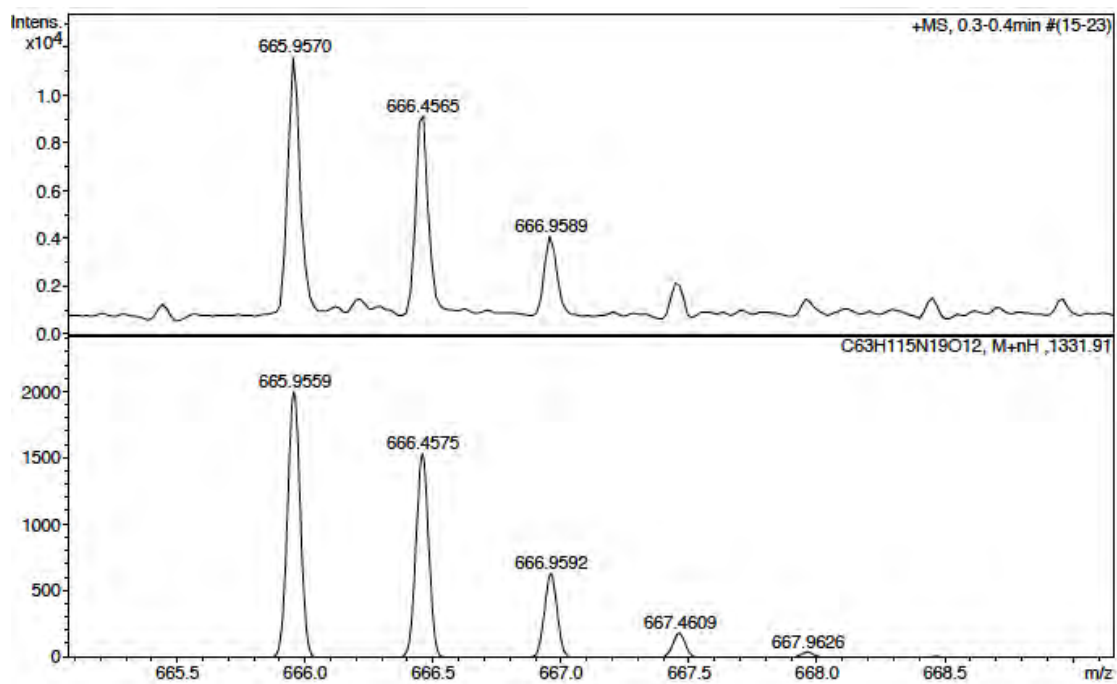
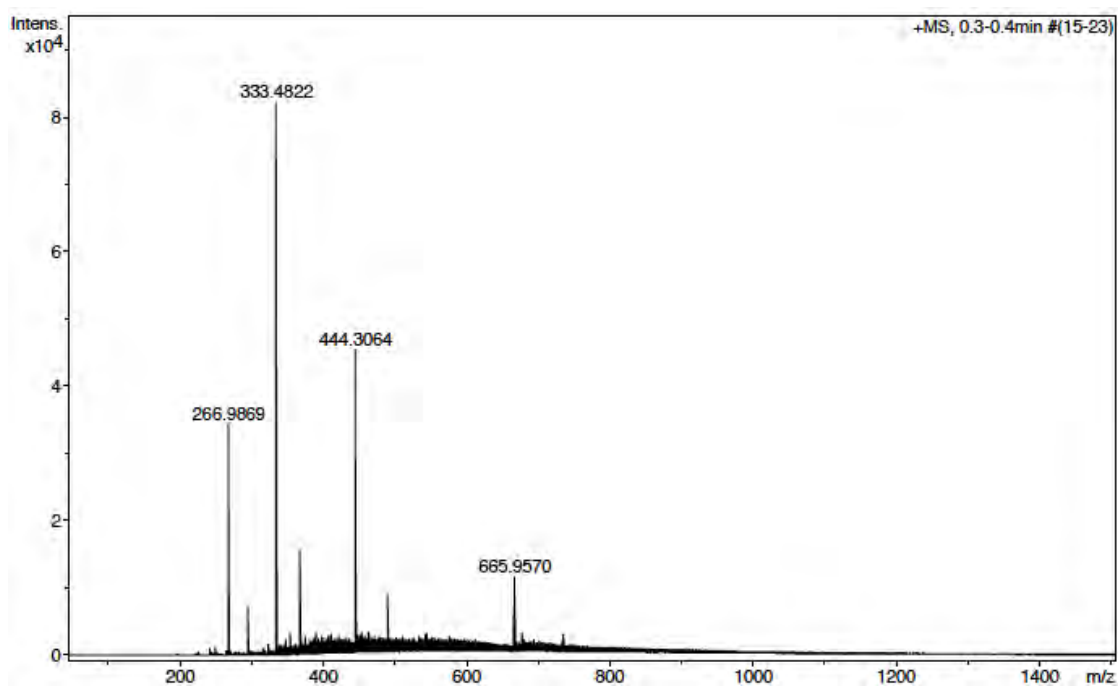


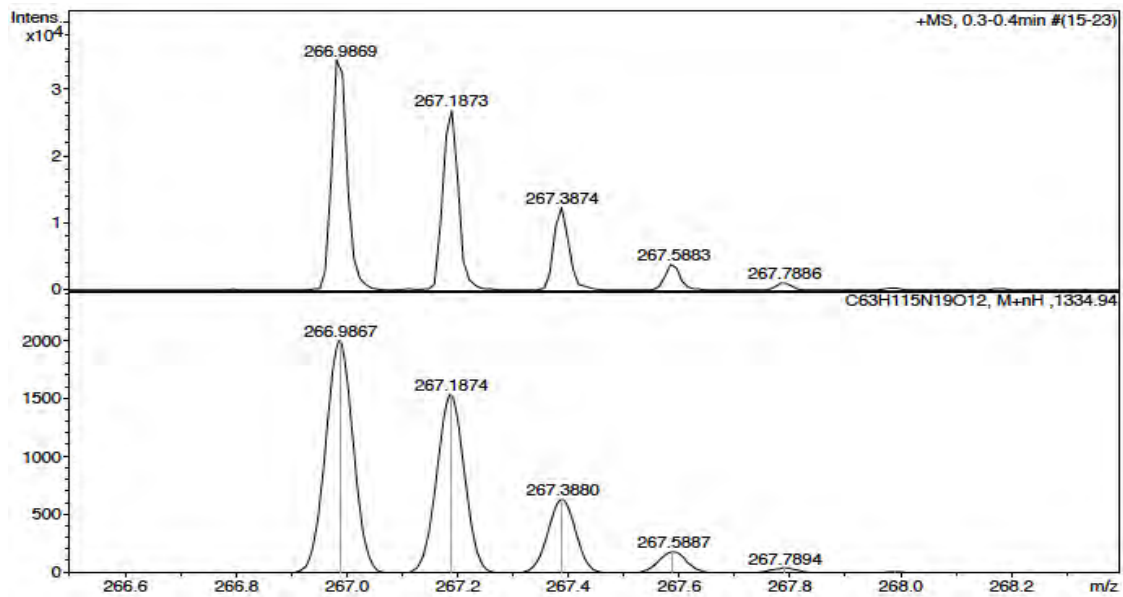
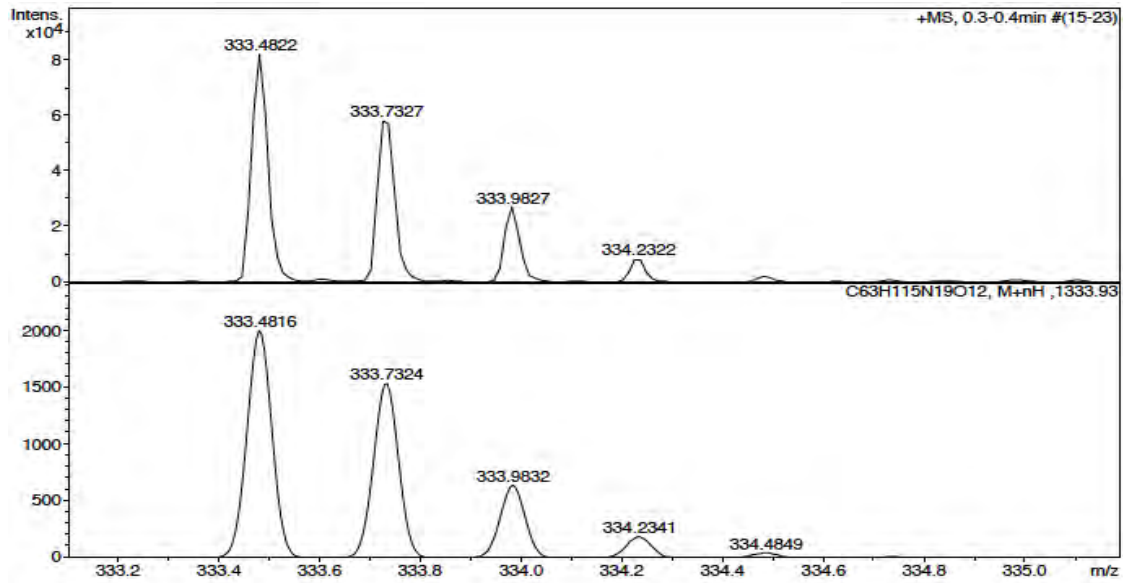
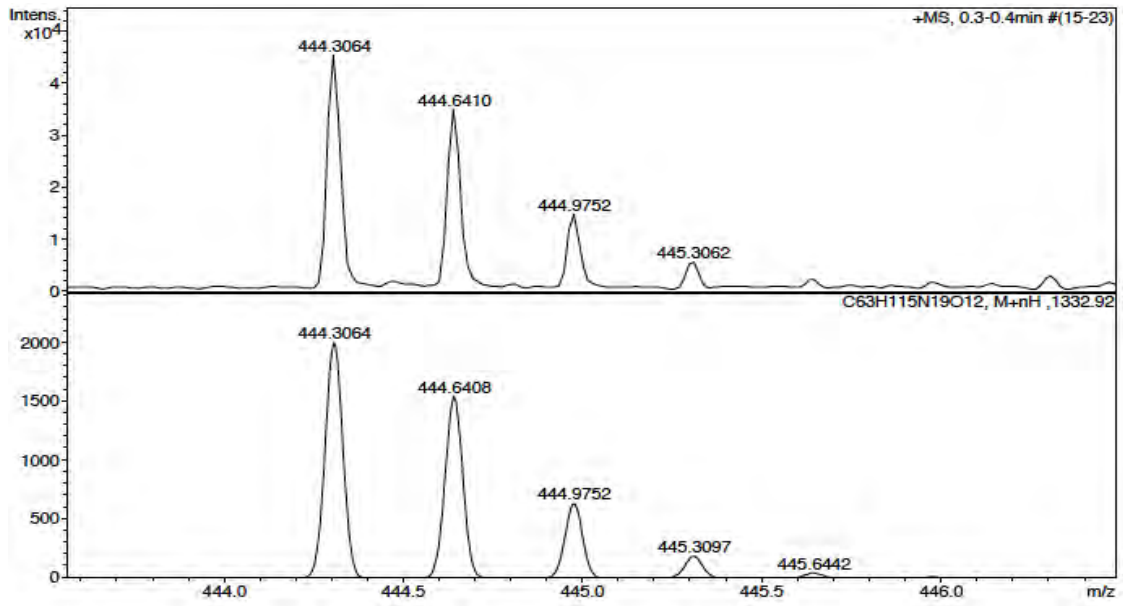
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,71	171,985	16,048	6,95
2	5,95	399,627	197,262	85,40
3	6,07	37,406	5,751	2,49
4	6,26	22,036	1,332	0,58
5	6,58	72,555	10,580	4,58
Total:		703,609	230,973	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

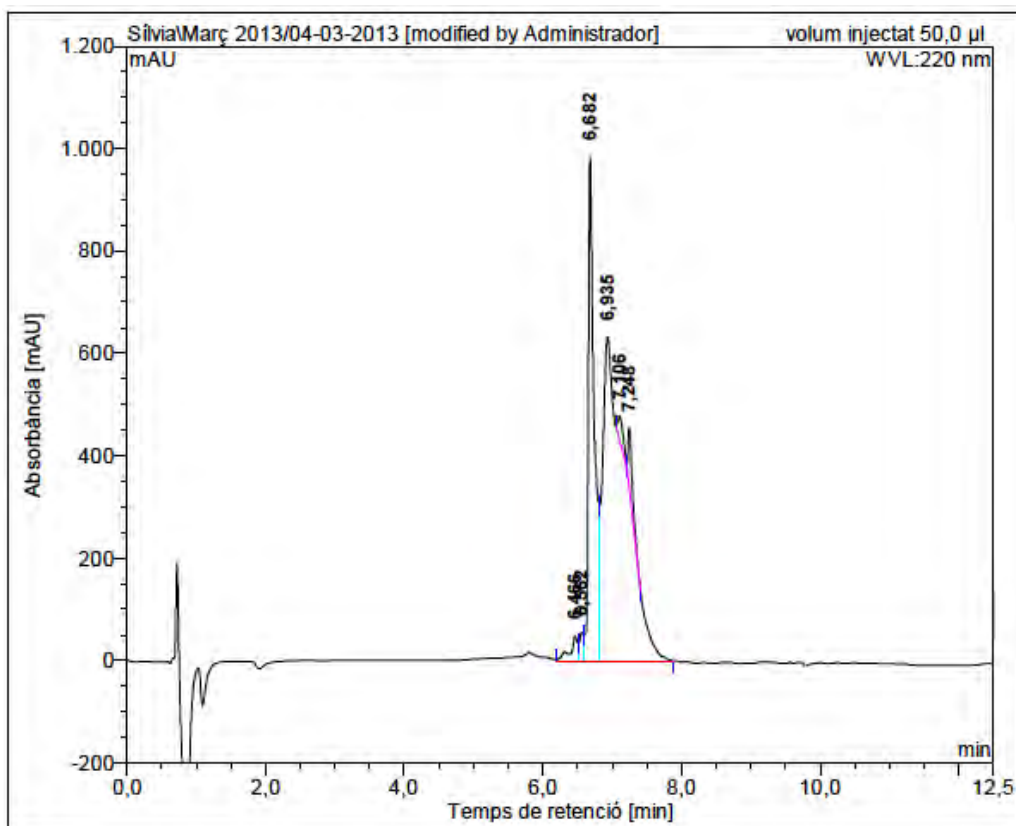






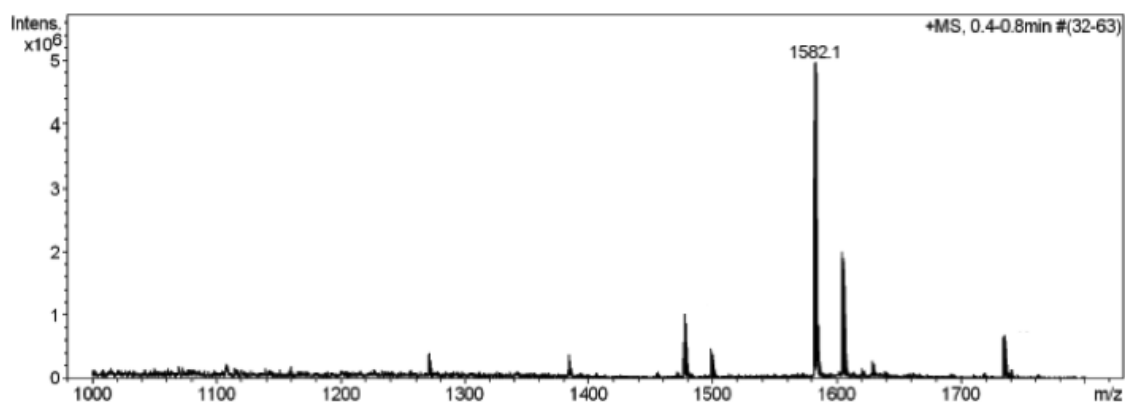
c(Lys-Lys-Leu-Lys-D-Lys(Leu-Lys-CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC724)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

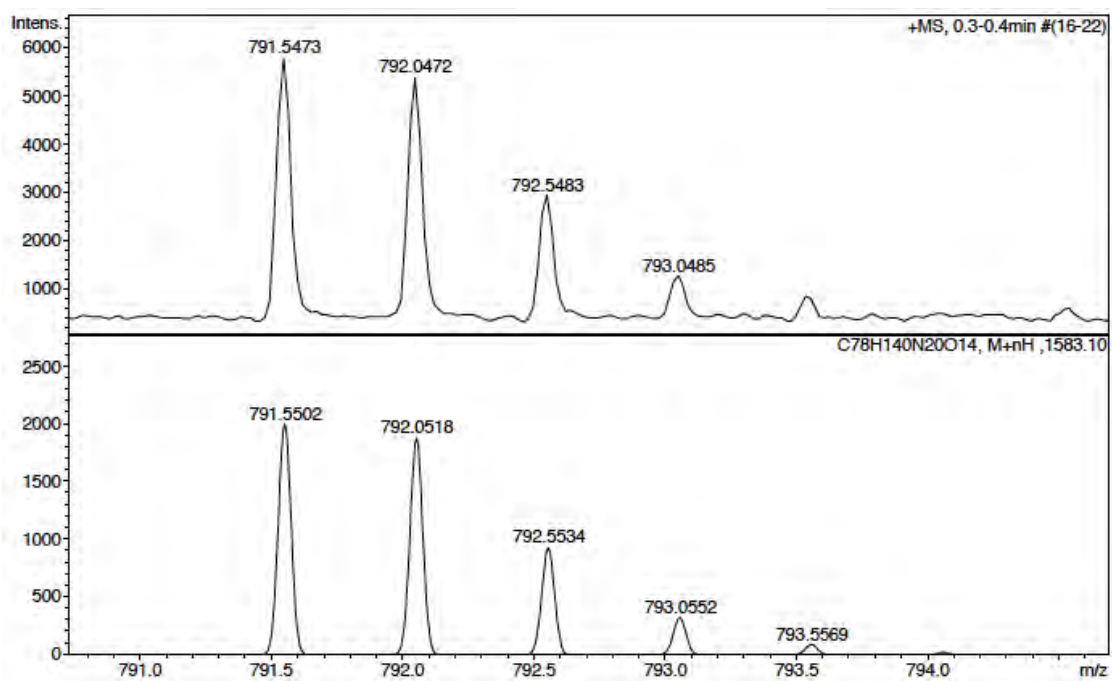
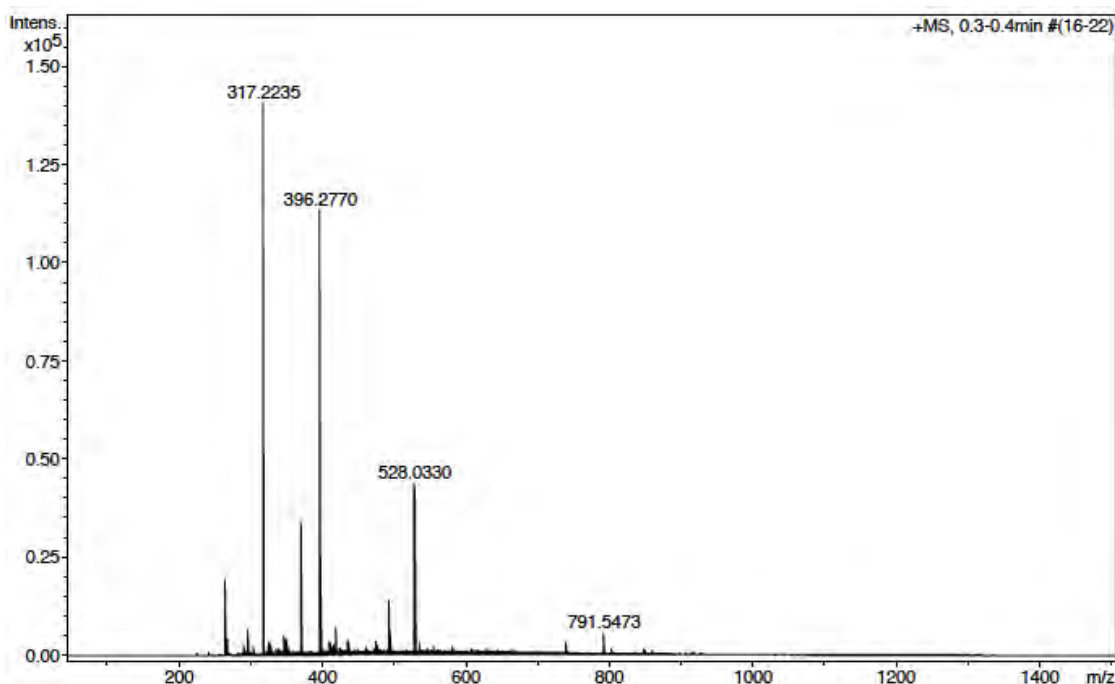


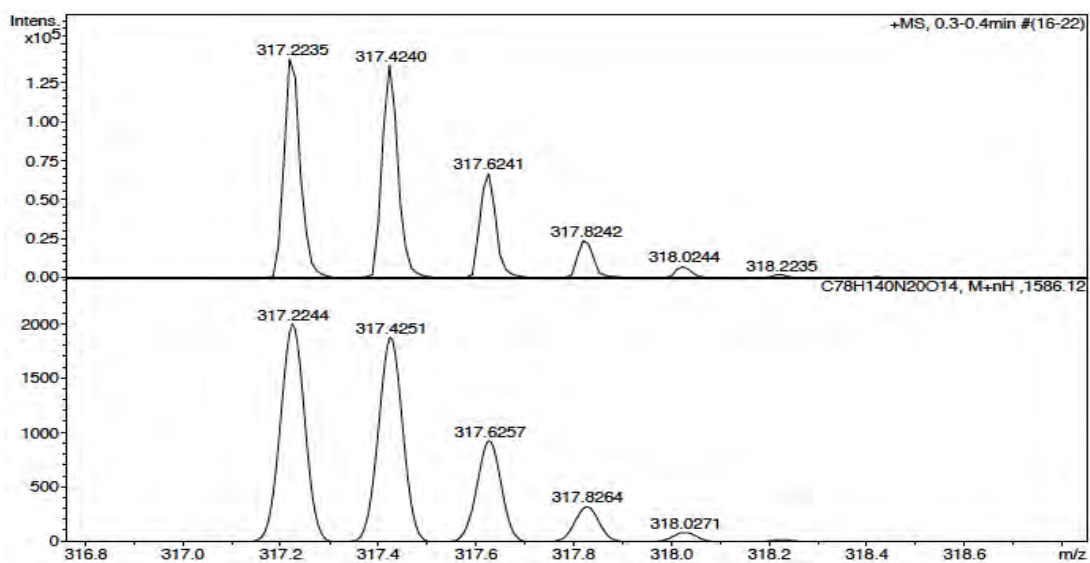
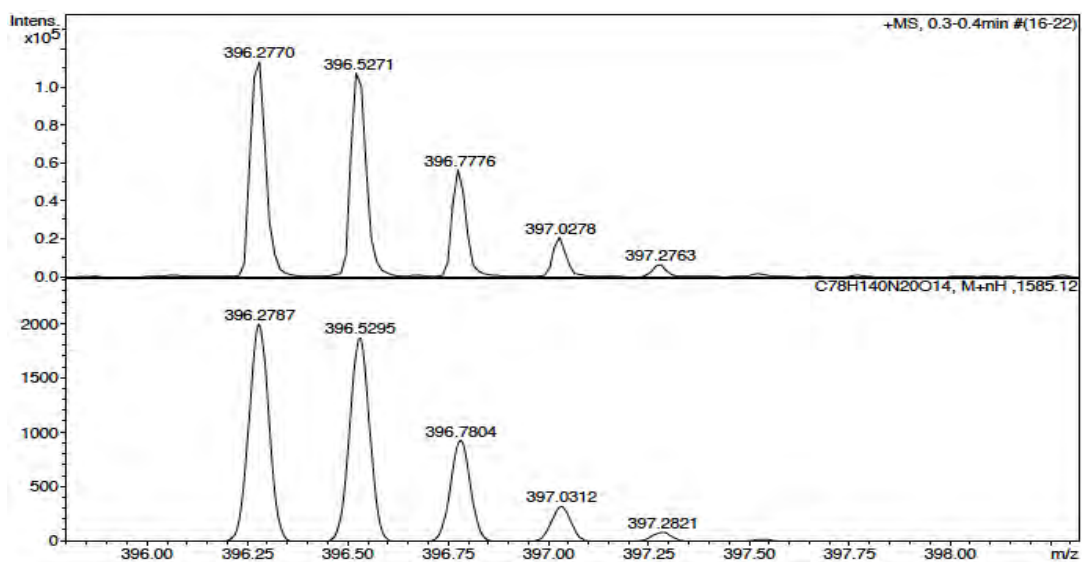
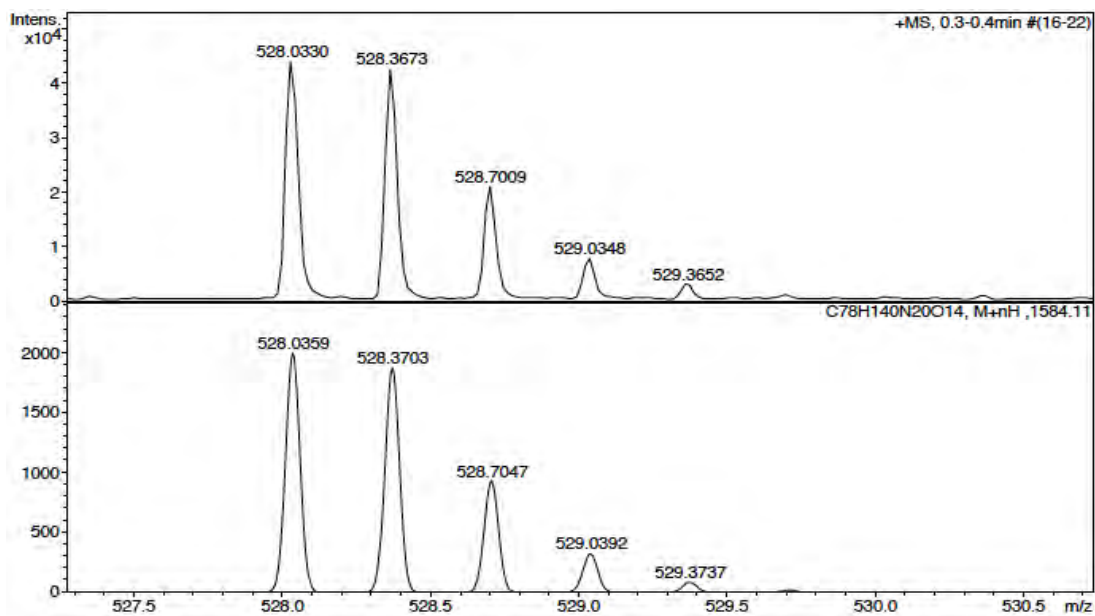
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,47	48,175	6,255	1,68
2	6,56	56,025	3,673	0,98
3	6,68	986,433	100,172	26,86
4	6,94	632,867	249,470	66,89
5	7,11	45,332	4,412	1,18
6	7,25	121,562	8,973	2,41
Total:		1890,393	372,954	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



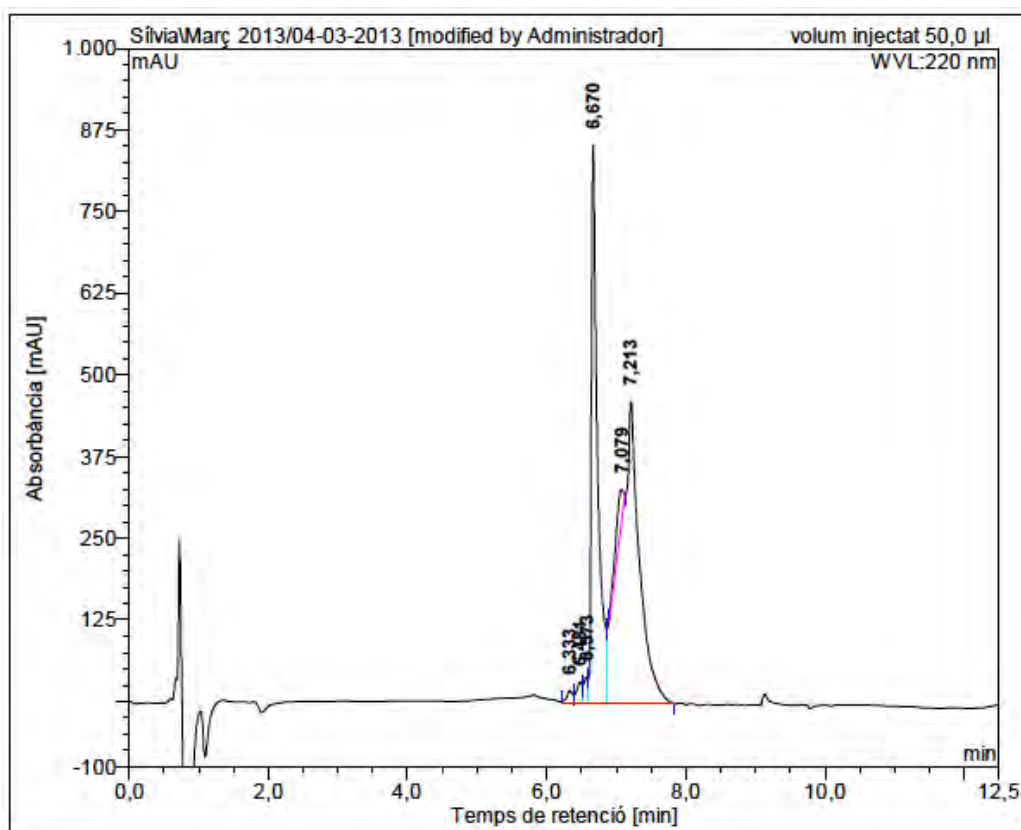
HRMS (ESI)  $m/z$





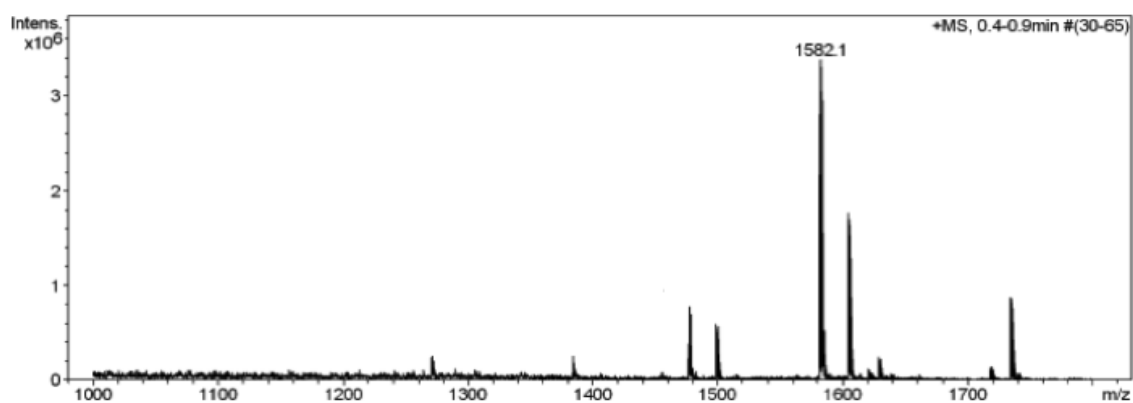
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(Lys-Leu-Lys-CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-D-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC726)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

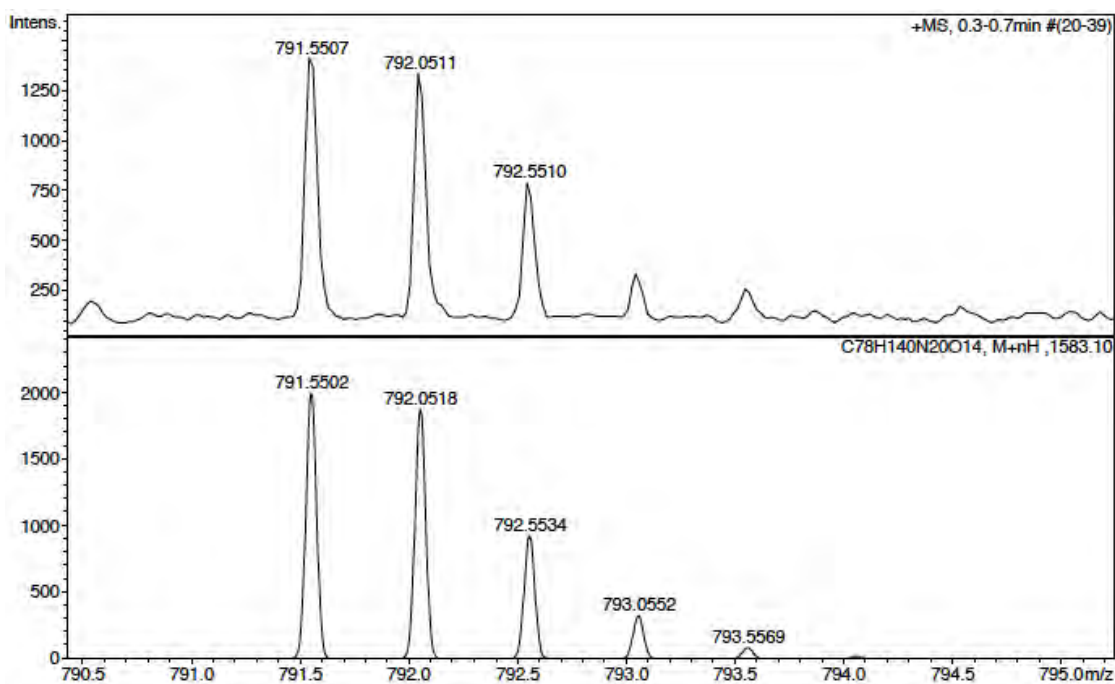
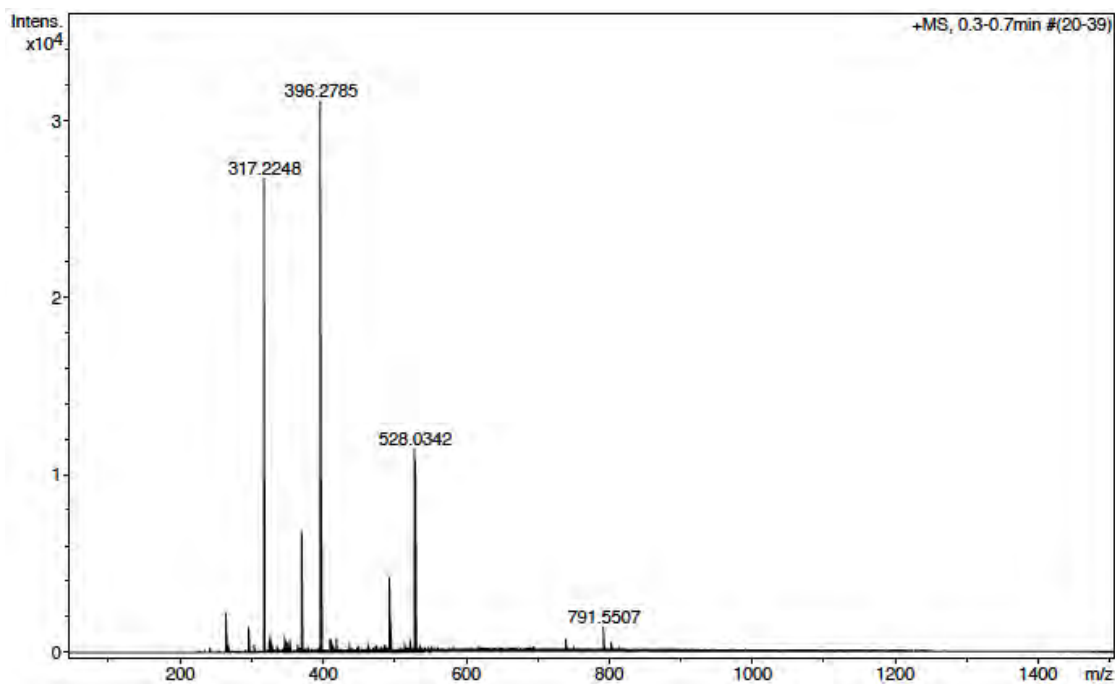


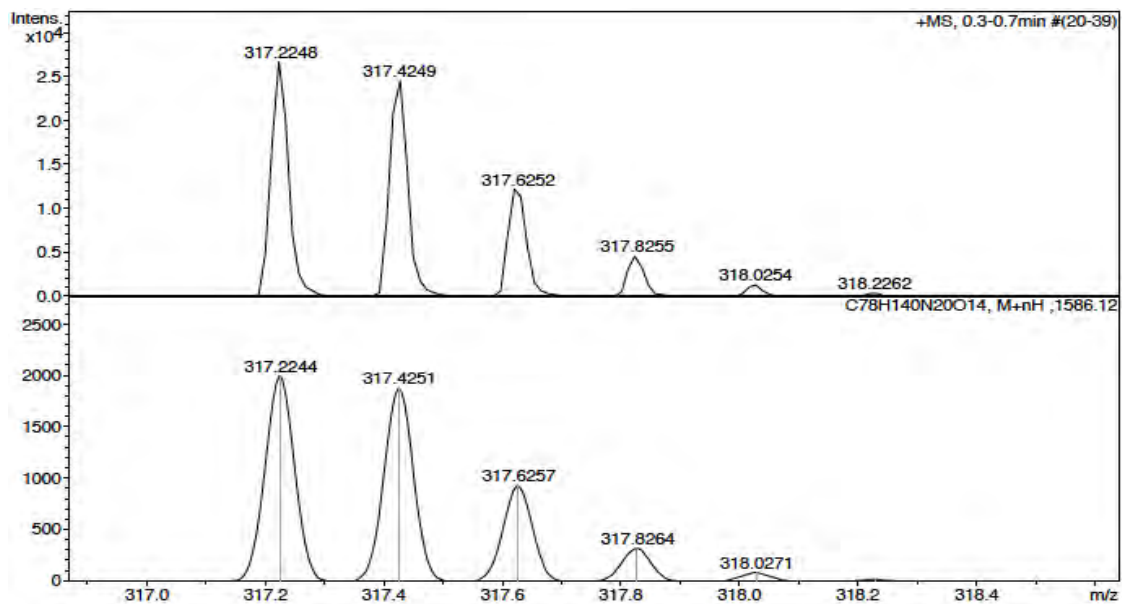
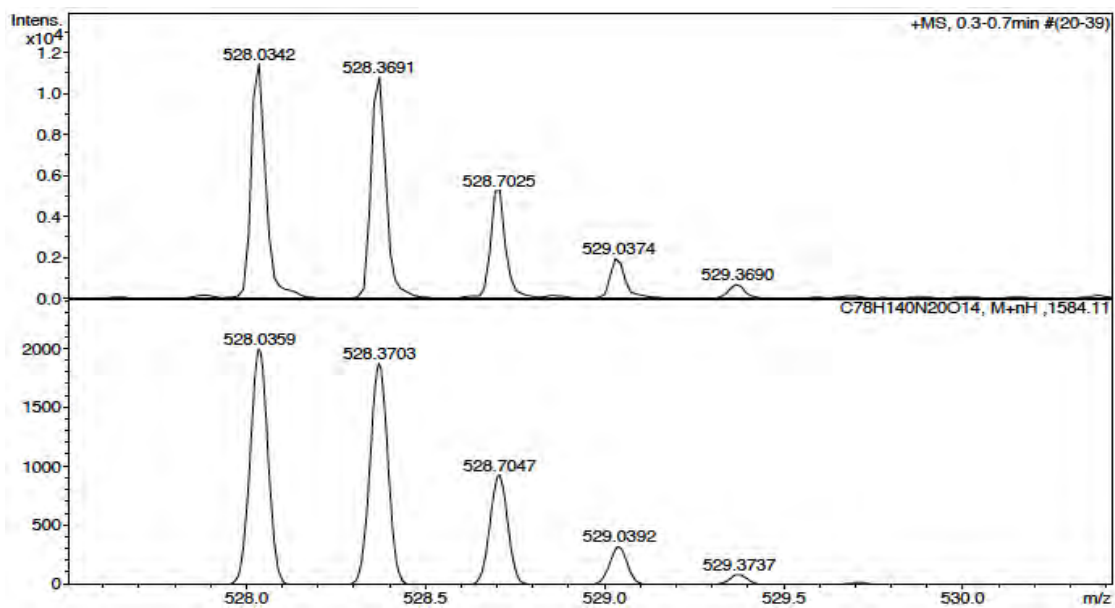
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,33	19,586	2,141	0,83
2	6,48	33,118	2,985	1,16
3	6,57	40,077	3,080	1,19
4	6,67	854,456	87,820	34,01
5	7,08	47,246	7,598	2,94
6	7,21	461,576	154,620	59,87
Total:		1456,060	258,243	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



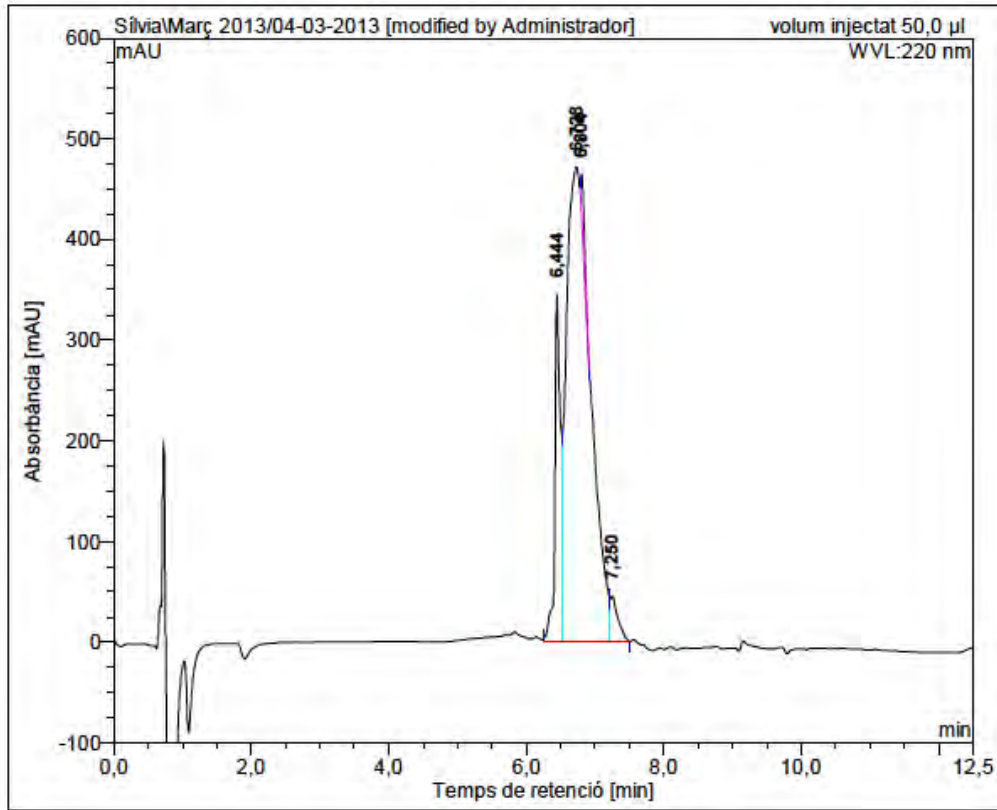
HRMS (ESI)  $m/z$





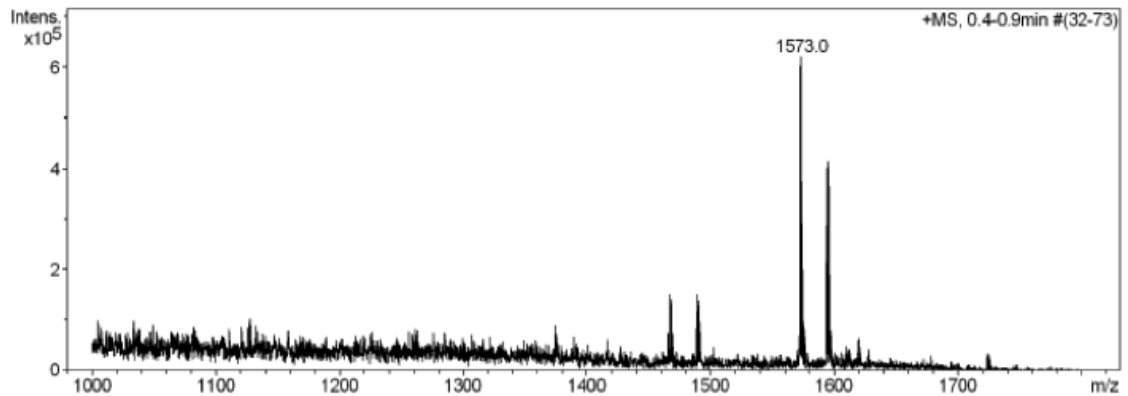
c(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys(Leu-Lys-CO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-His-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC728)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

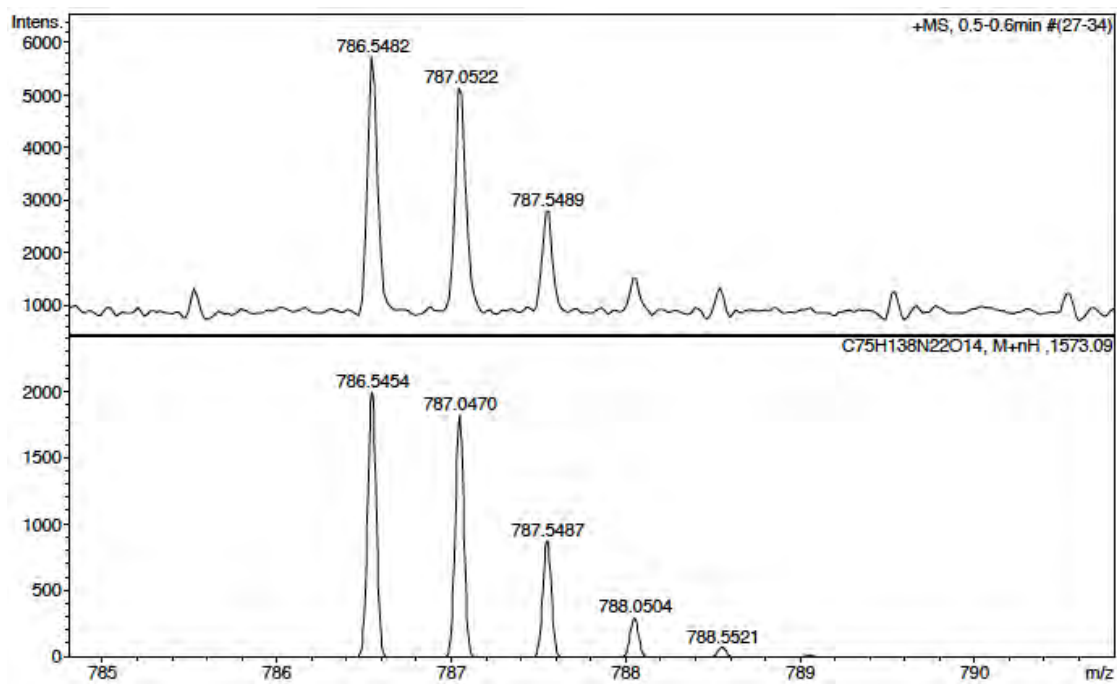
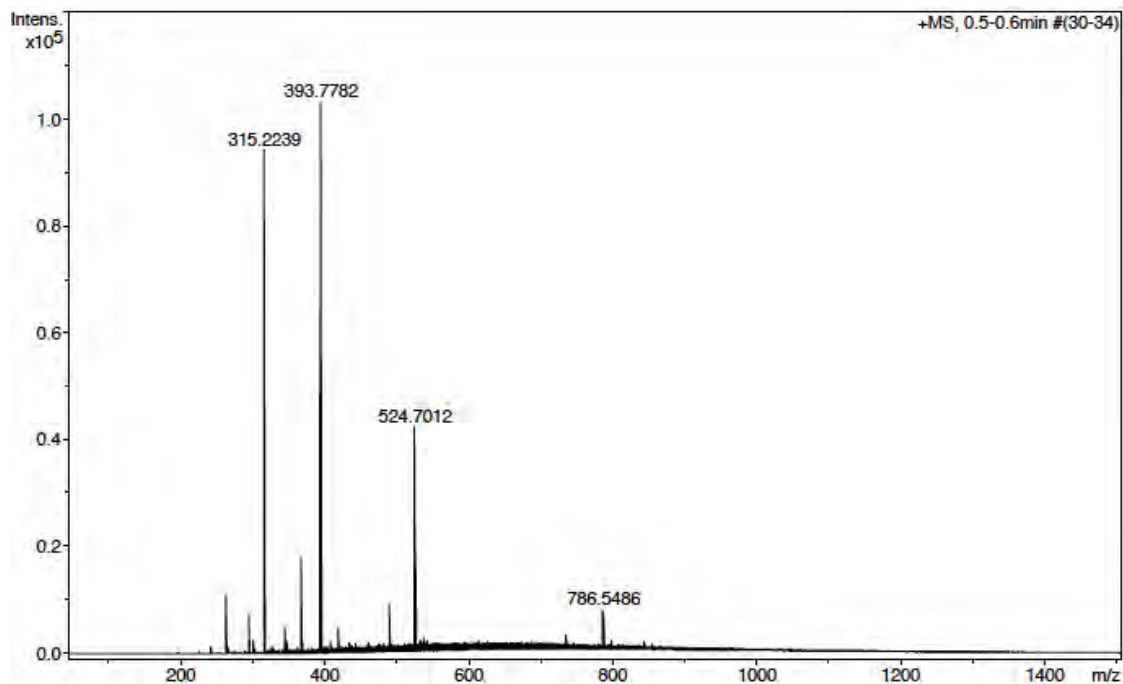


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,44	345,112	31,707	13,70
2	6,73	471,883	190,123	82,16
3	6,80	45,980	3,570	1,54
4	7,25	45,552	6,010	2,60
Total:		908,527	231,410	100,00

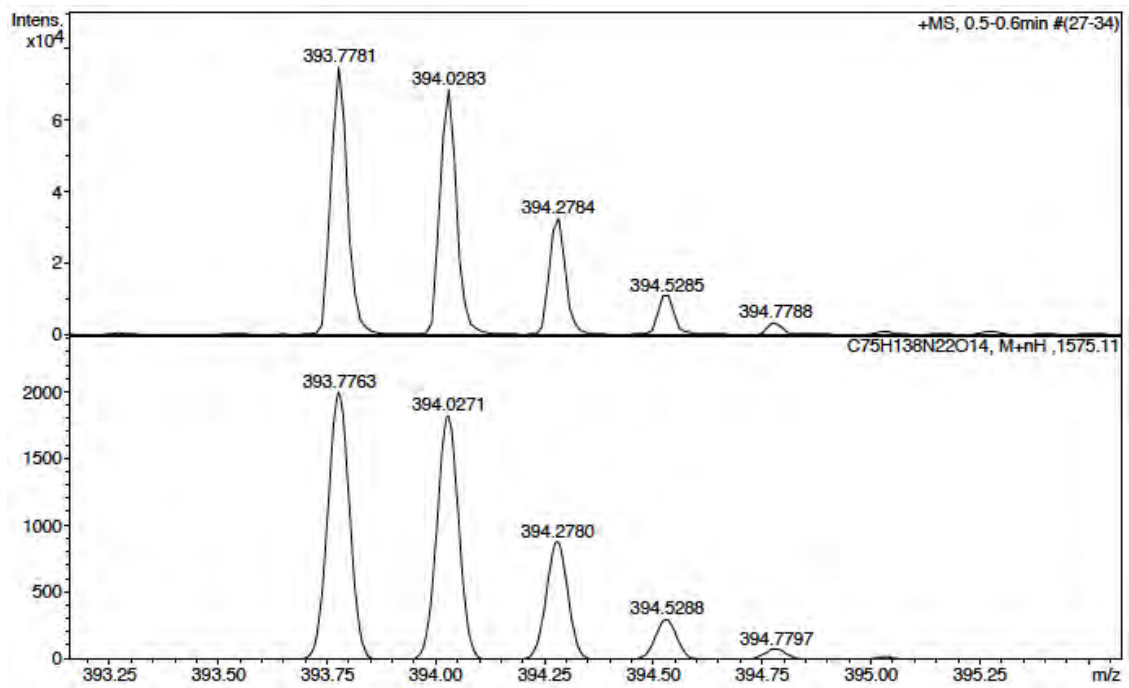
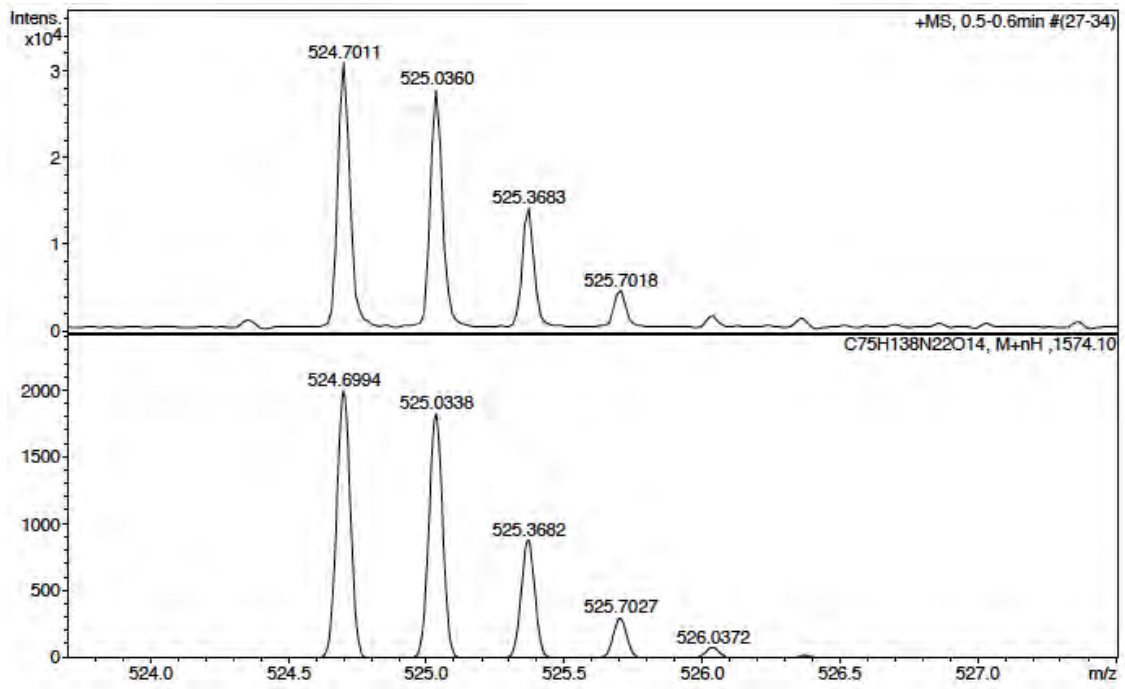
ESI-MS ( $m/z$ )

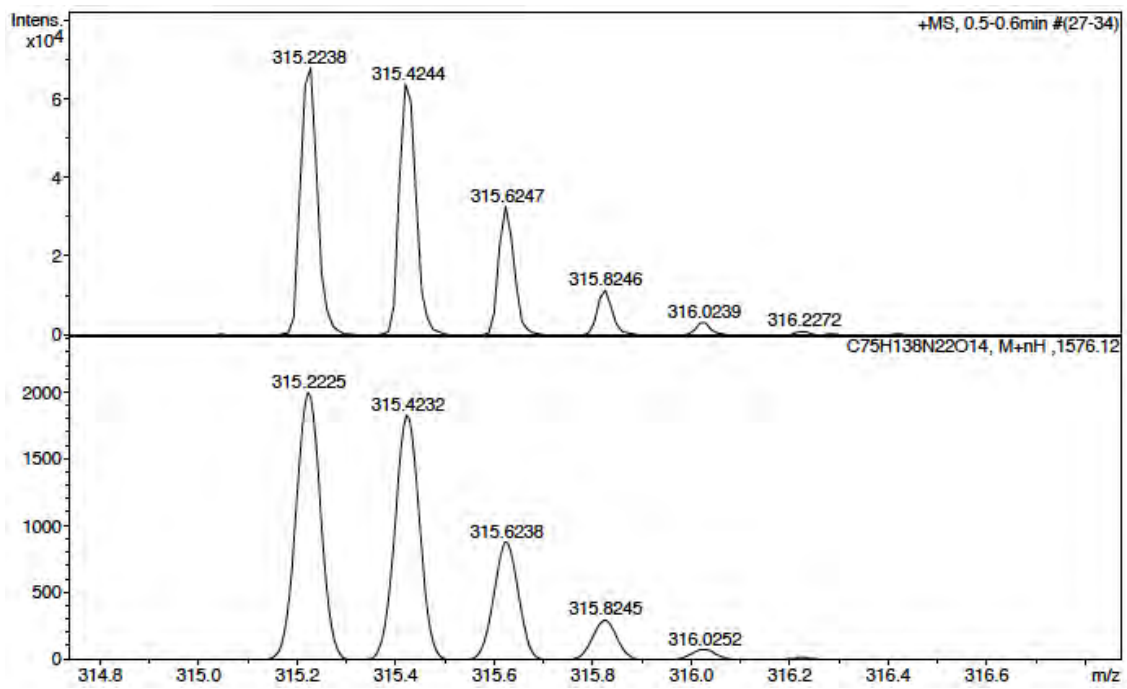


HRMS (ESI)  $m/z$









### **A3. Solid-phase synthesis of cyclic lipopeptidotriazoles**

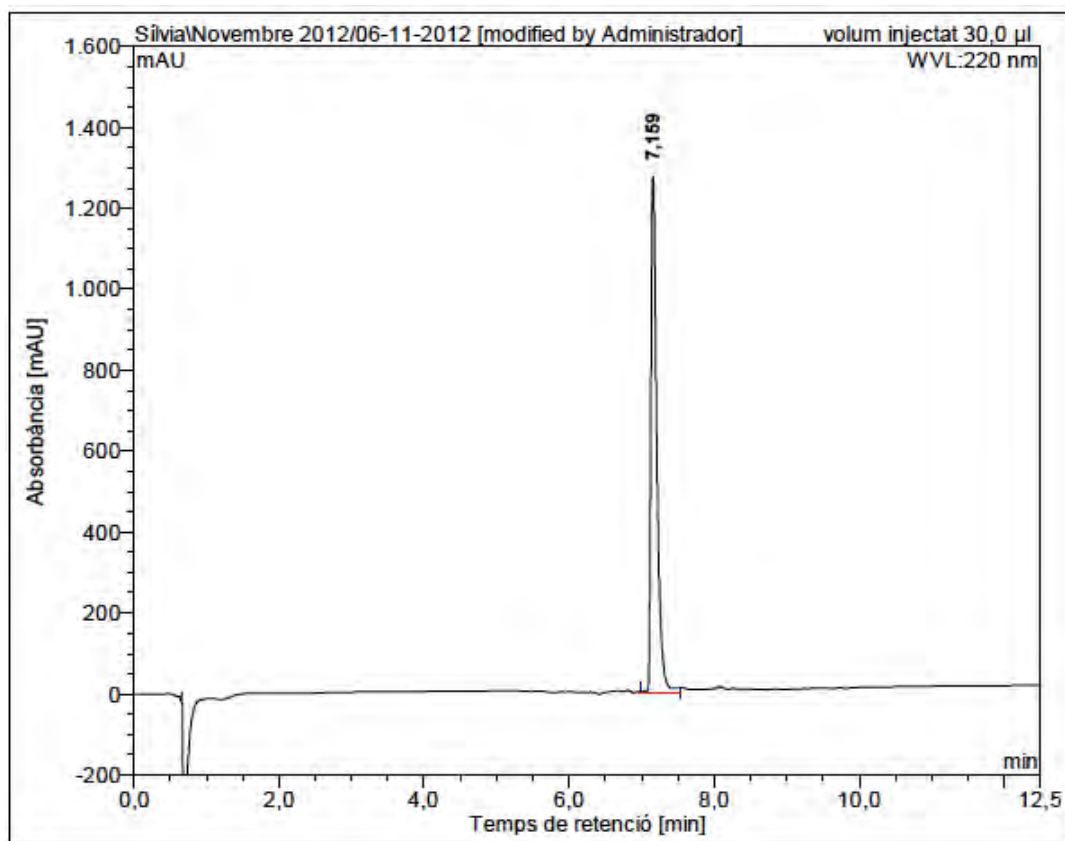
Sílvia Vilà, Crisitina Camó, Eduard Figueras, Esther Badosa, Emilio Montesinos, Marta Planas,\* and Lidia Feliu\*

#### **Table of contents**

1. Fmoc-Lys-OH.....	201
2. Fmoc-Lys(pNZ)-OH.....	204
3. Linear peptidyl resins.....	206
4. Cyclic peptidyl resins.....	214
5. Cyclic lipopeptidotriazoles.....	229

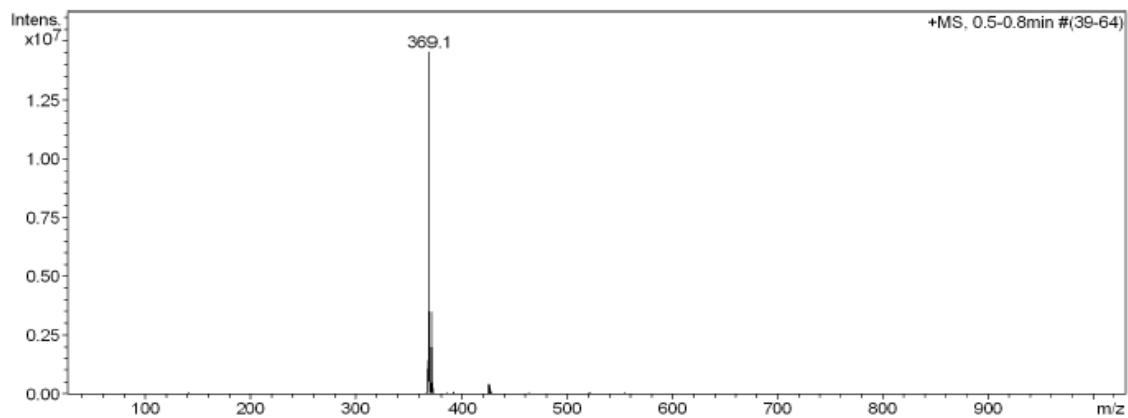
# 1. Fmoc-Lys-OH

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

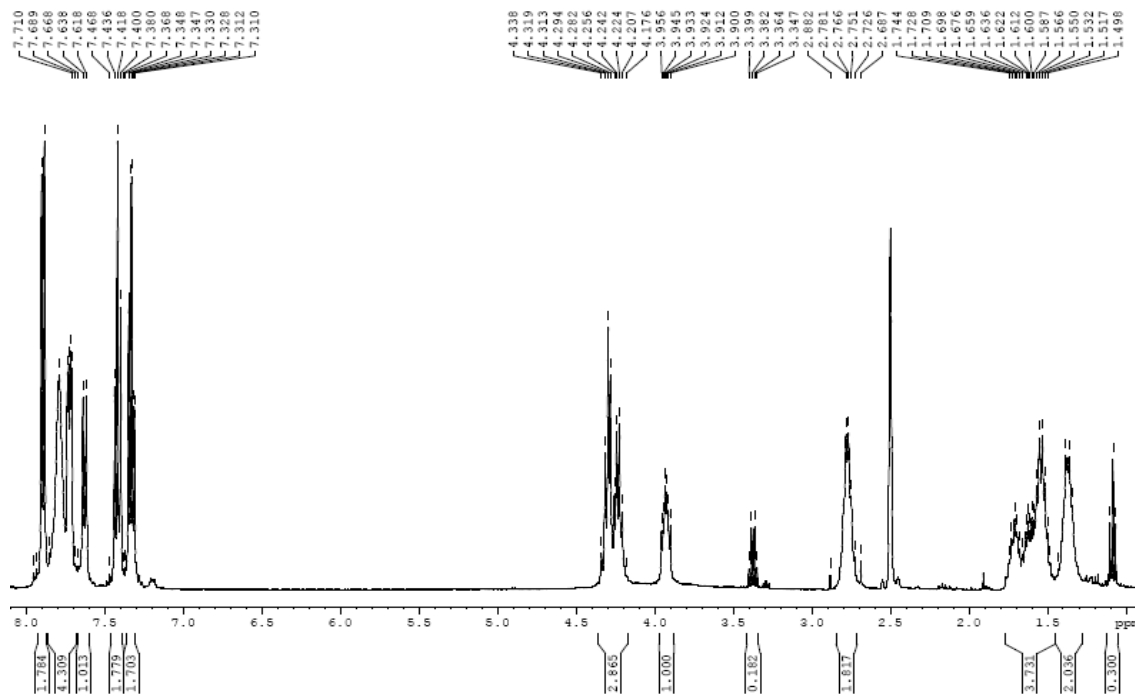


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,16	1274,487	121,162	100,00
Total:		1274,487	121,162	100,00

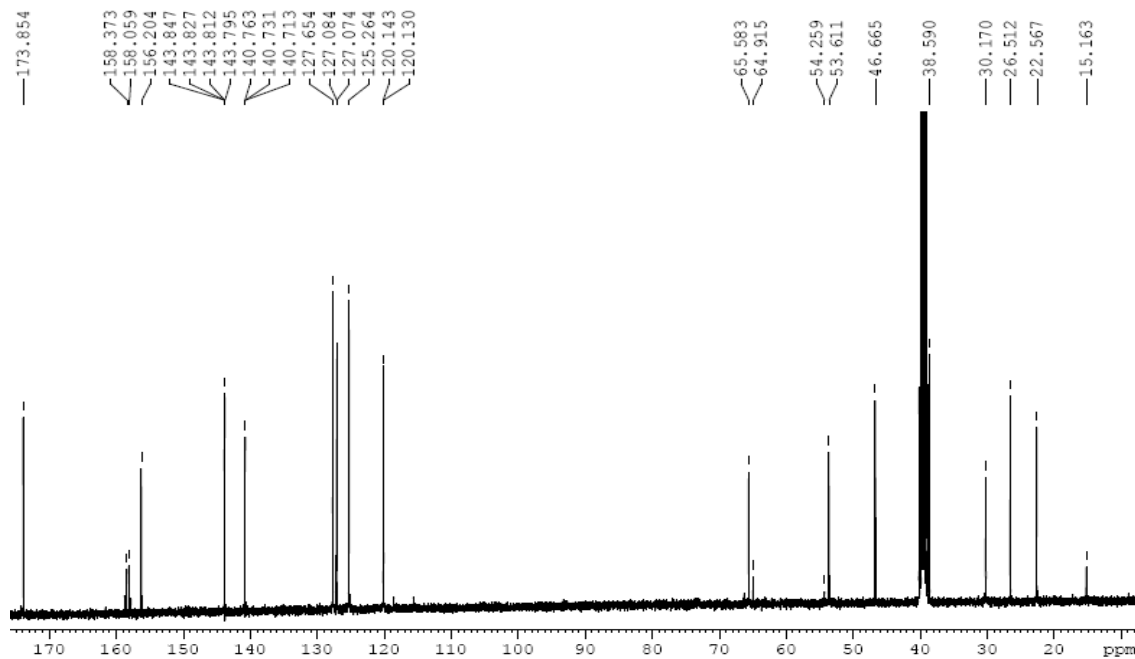
ESI-MS ( $m/z$ )



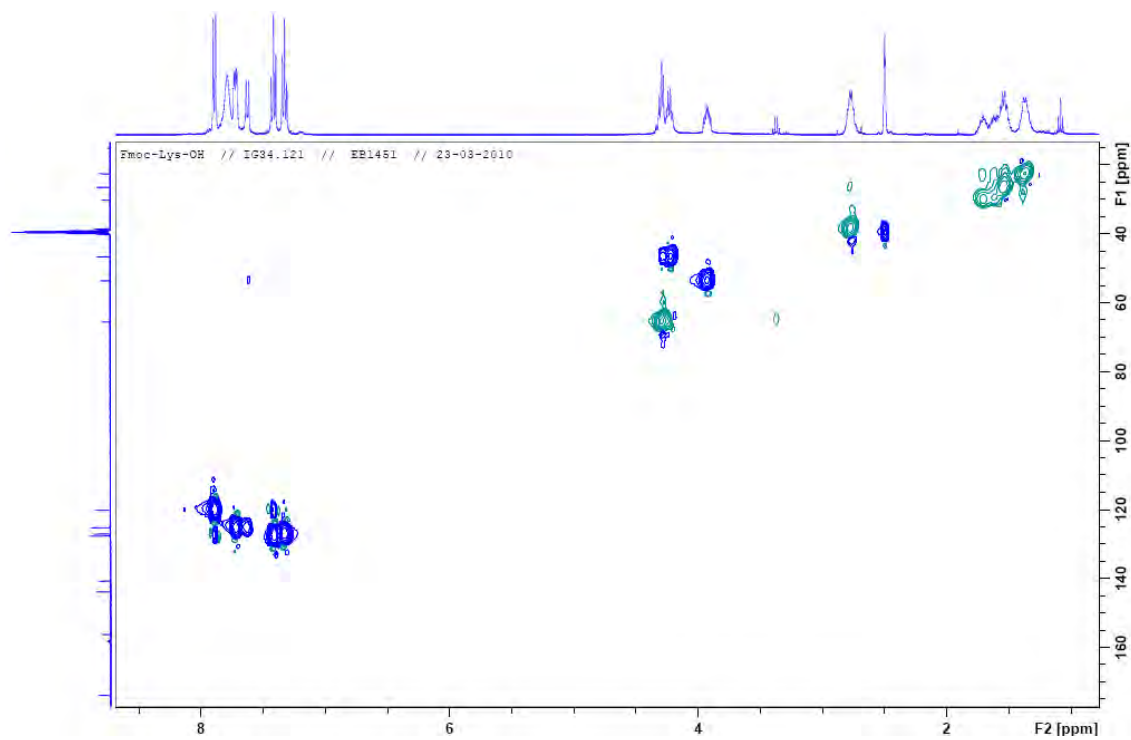
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)



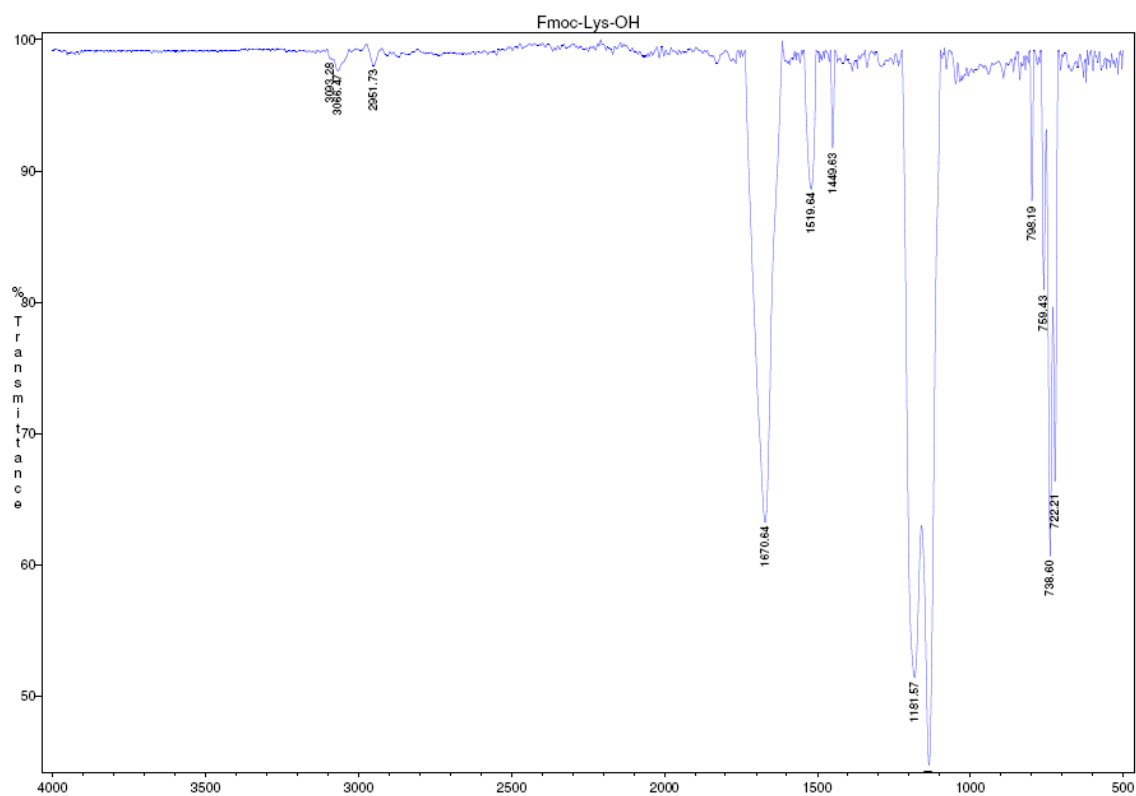
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)



HSQC edited (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)

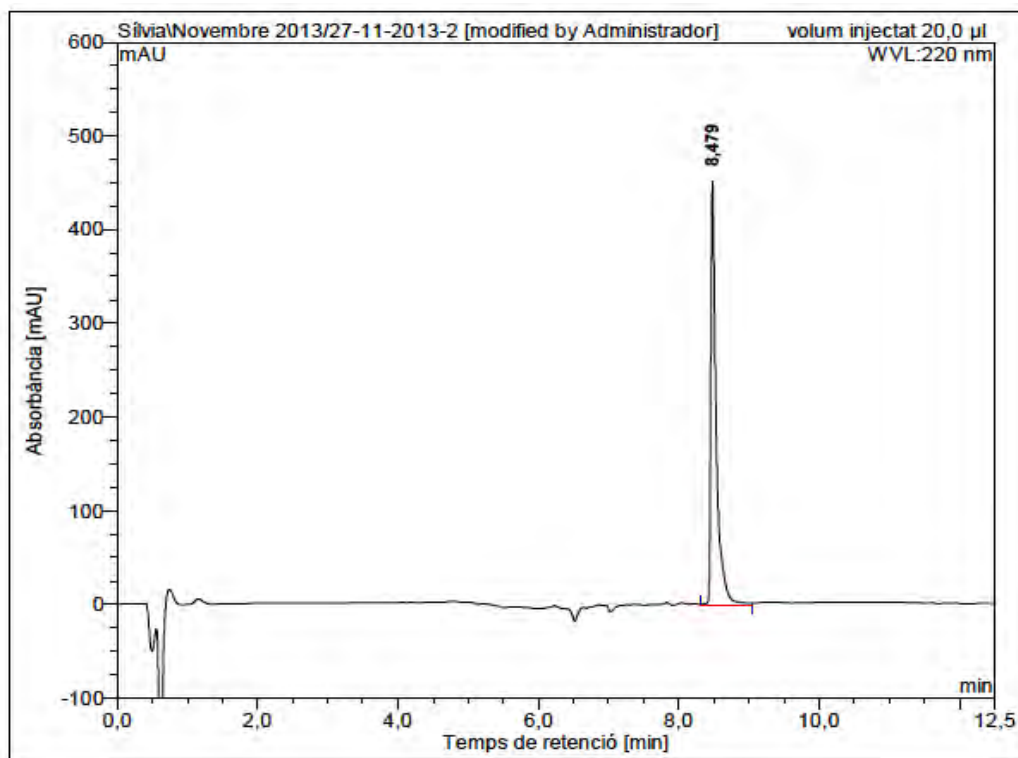


IR (neat)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)



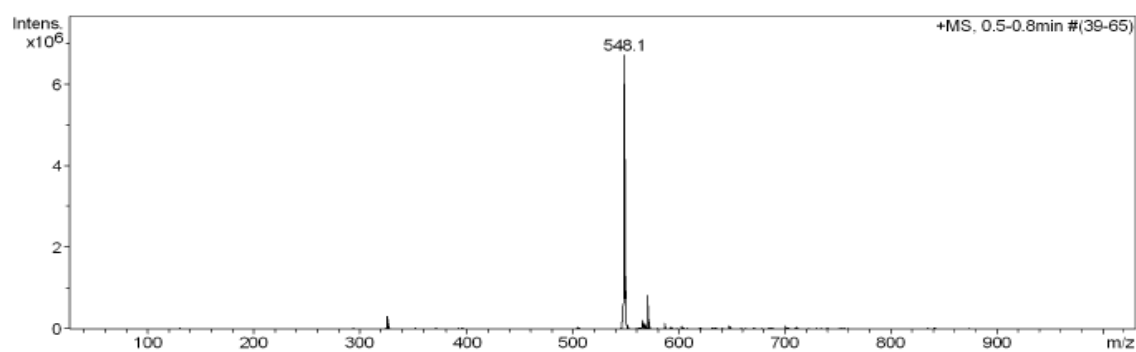
## 2. Fmoc-Lys(pNZ)-OH

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

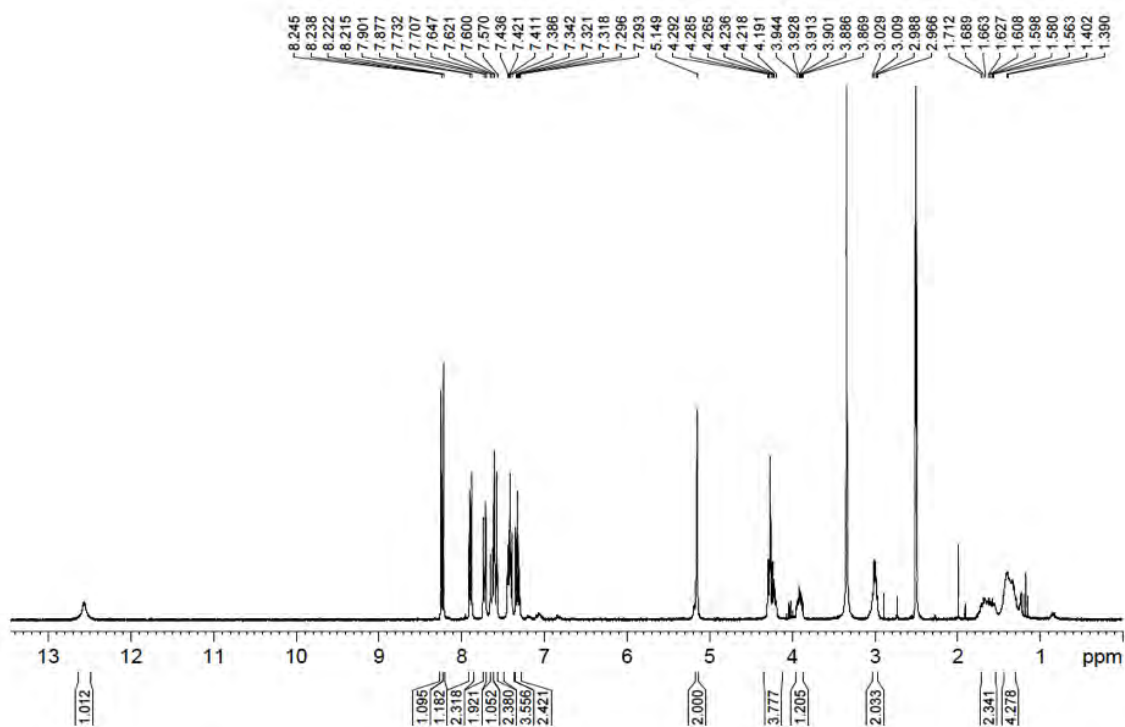


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,48	452,407	40,355	100,00
Total:		452,407	40,355	100,00

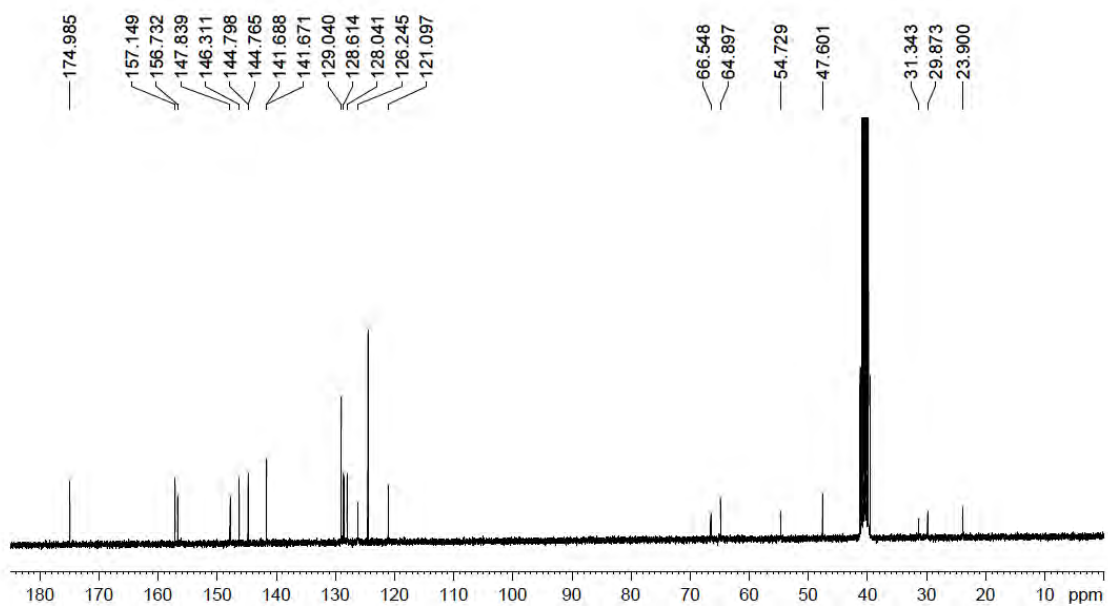
ESI-MS ( $m/z$ )



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



$^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



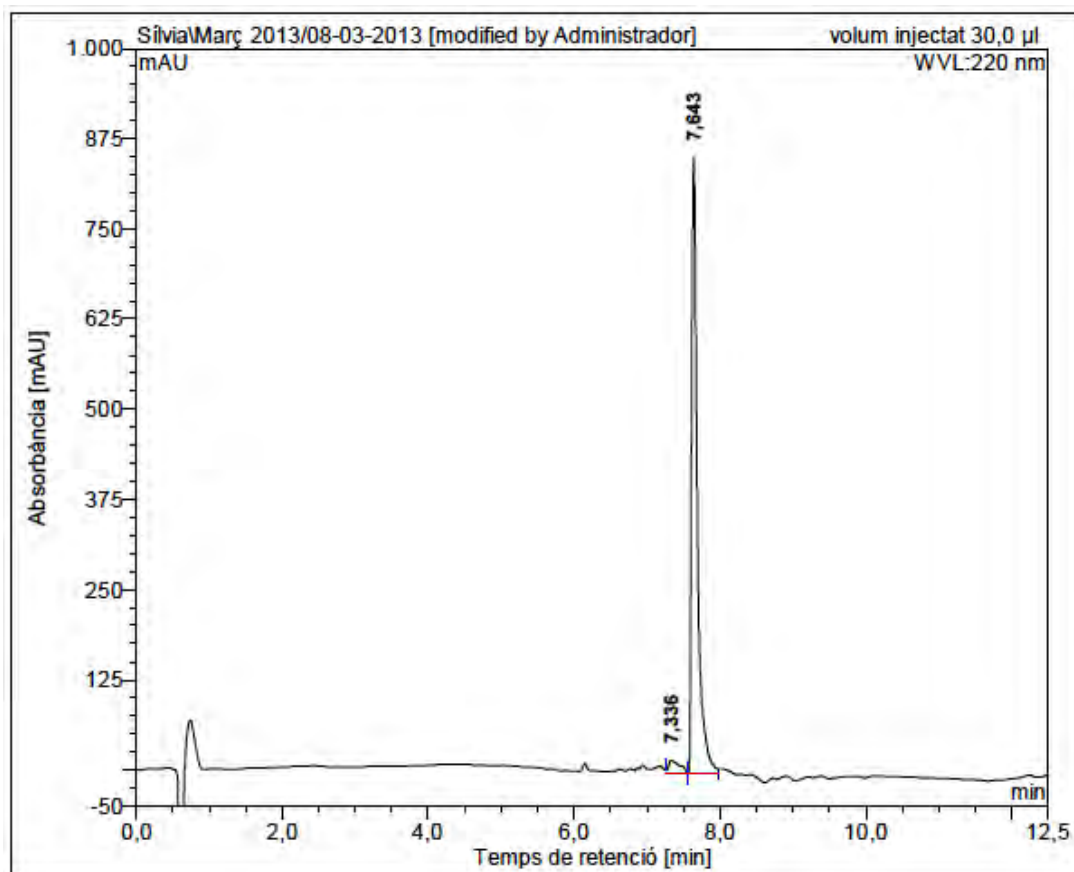


### 3. Linear peptidyl resins

#### Fmoc-Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys(pNZ)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

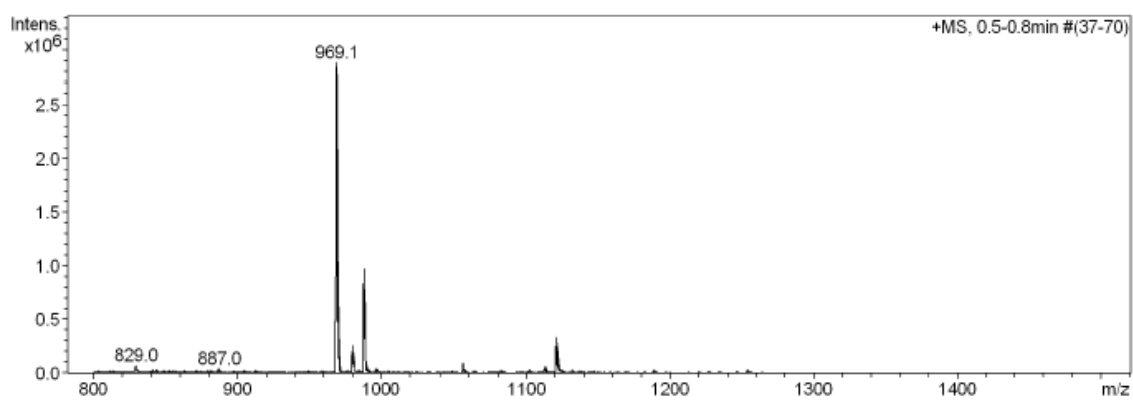
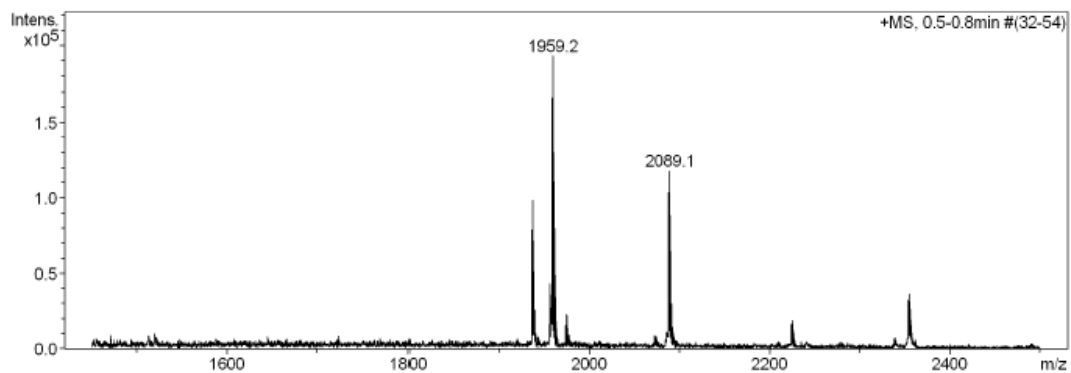
(Obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (3))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

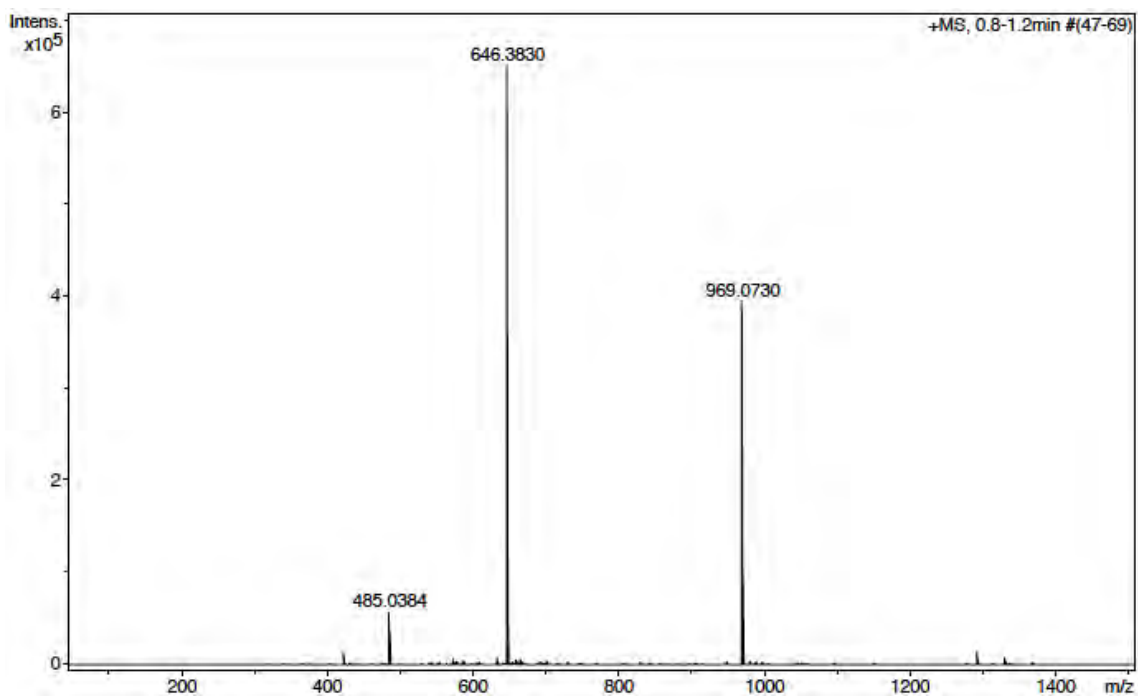


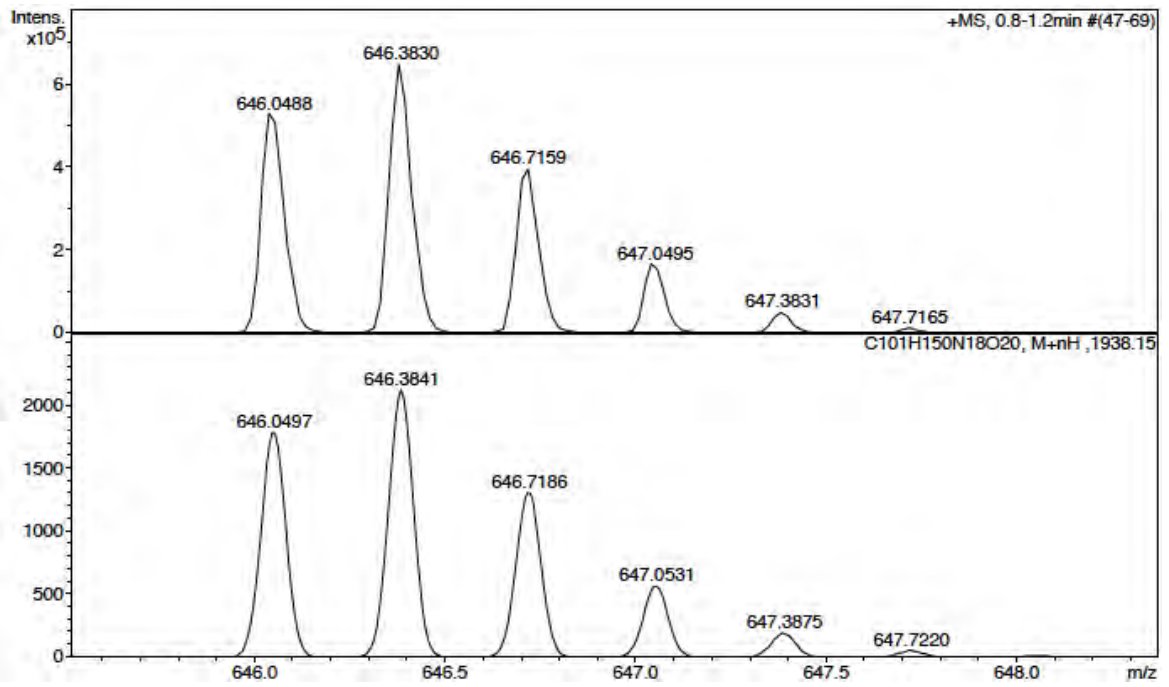
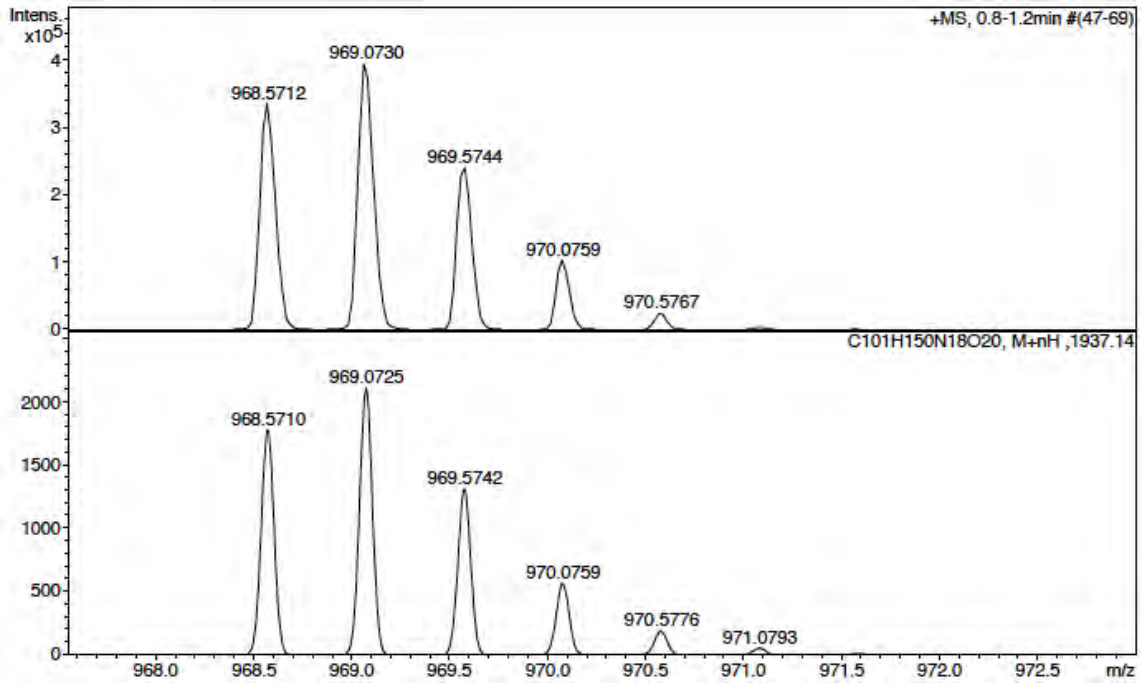
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,34	17,870	3,282	4,00
2	7,64	852,638	78,824	96,00
Total:		870,508	82,107	100,00

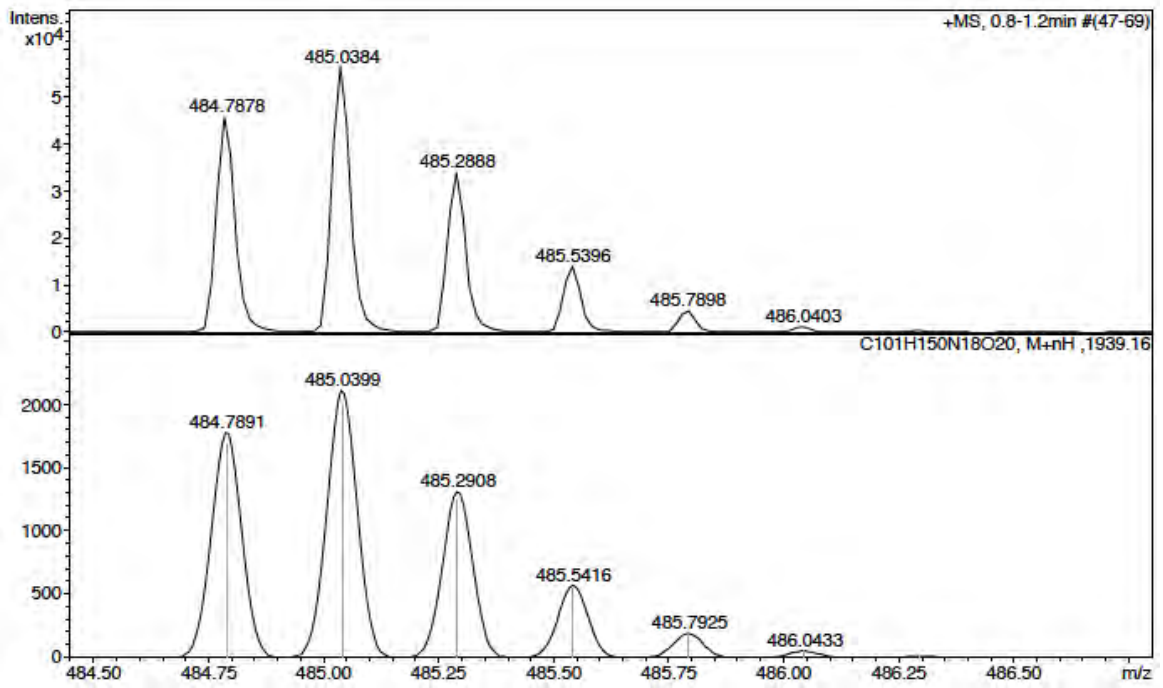
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$



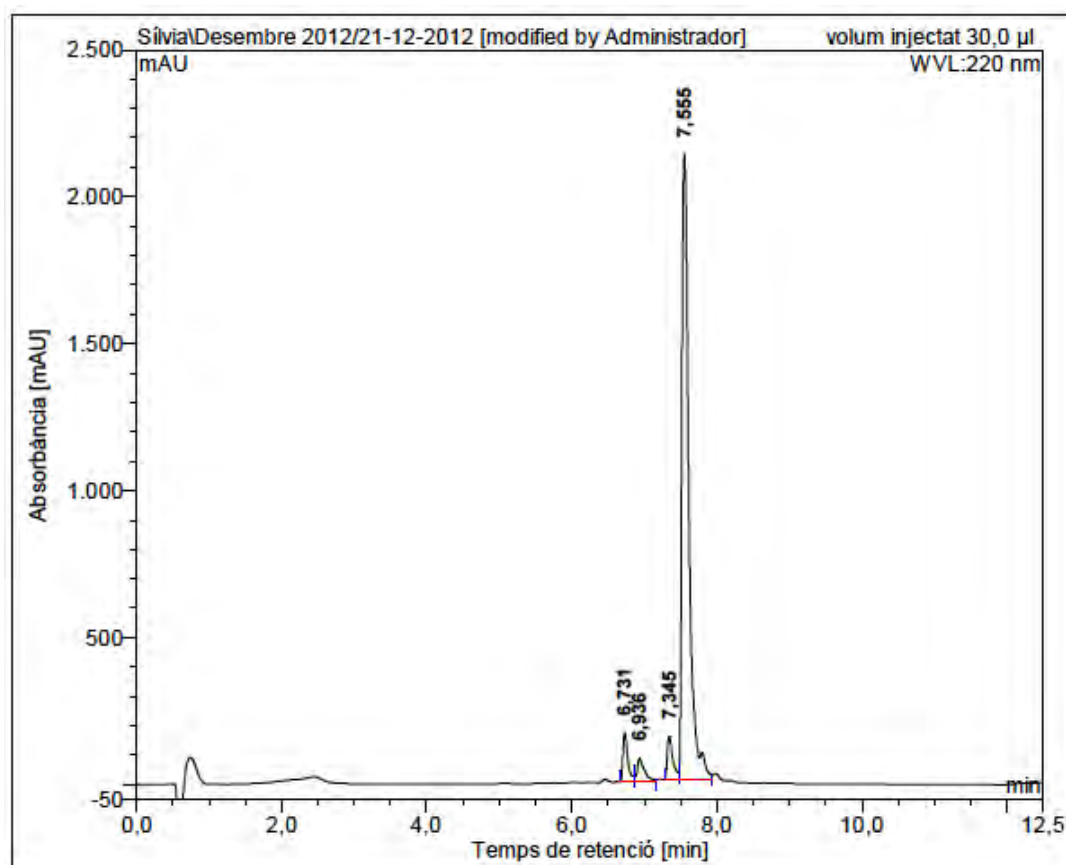




### Fmoc-Lys-Lys(pNZ)-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

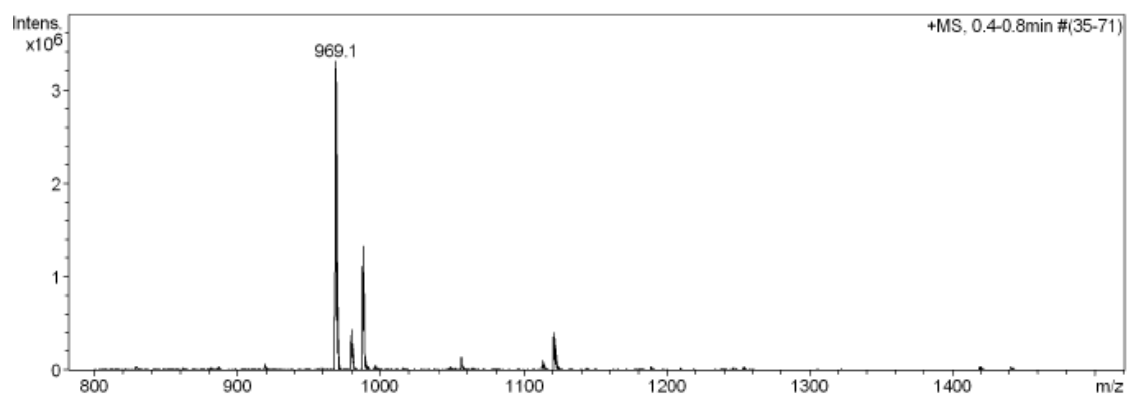
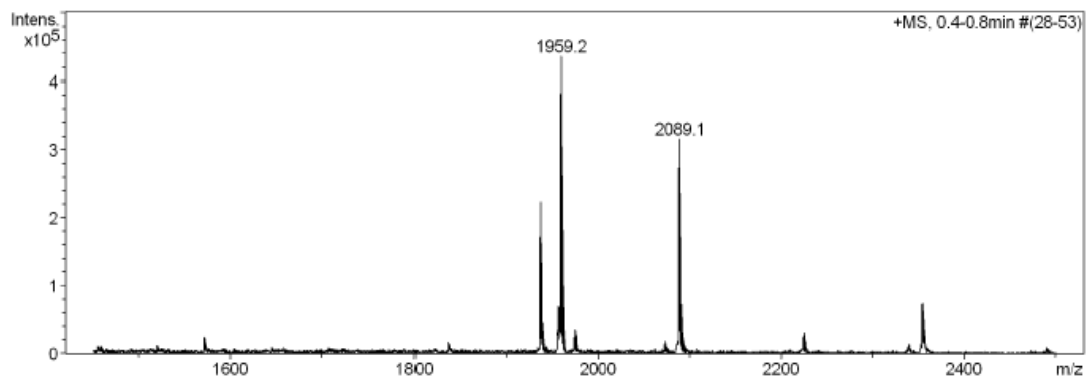
(Obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (**8**))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

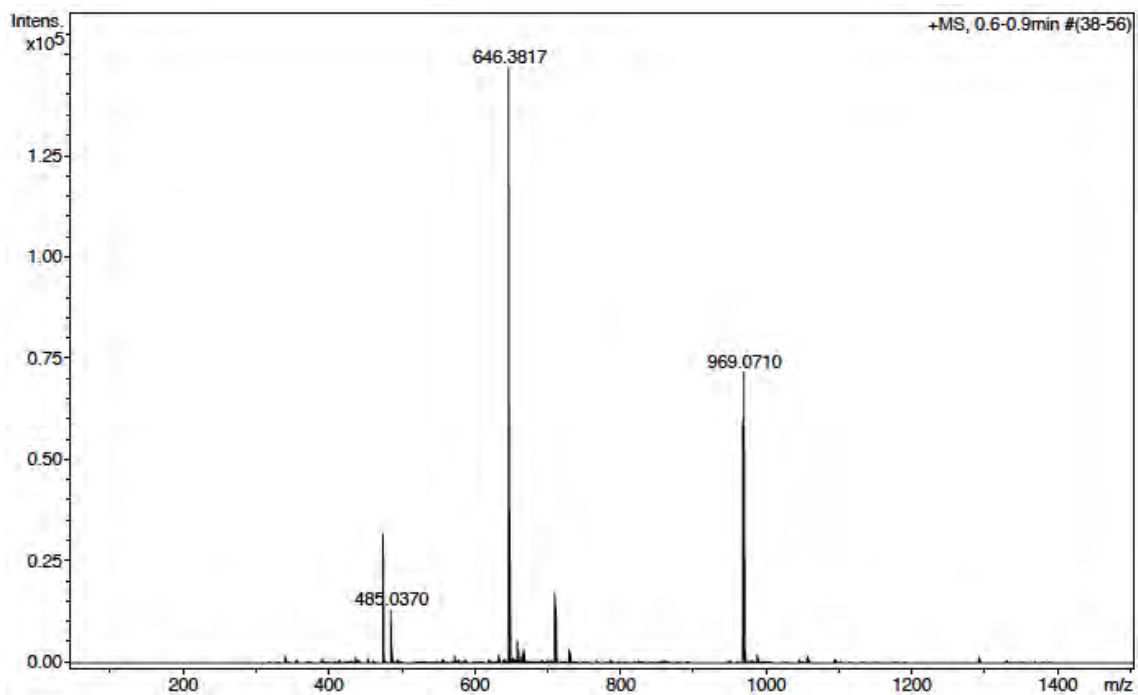


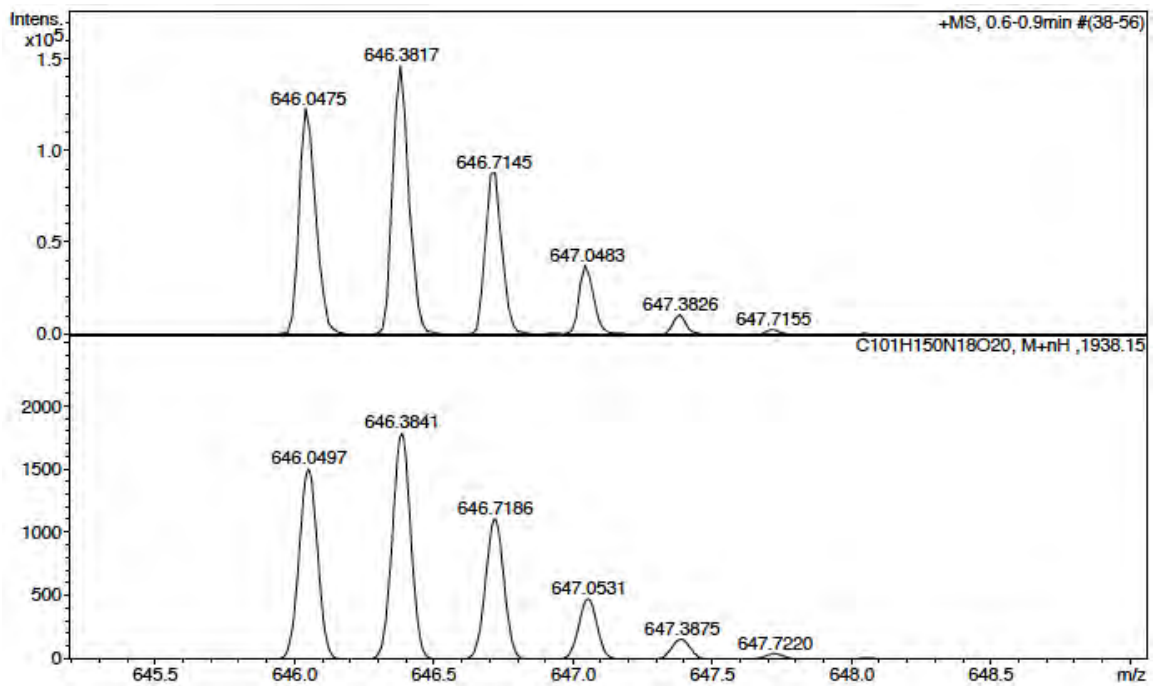
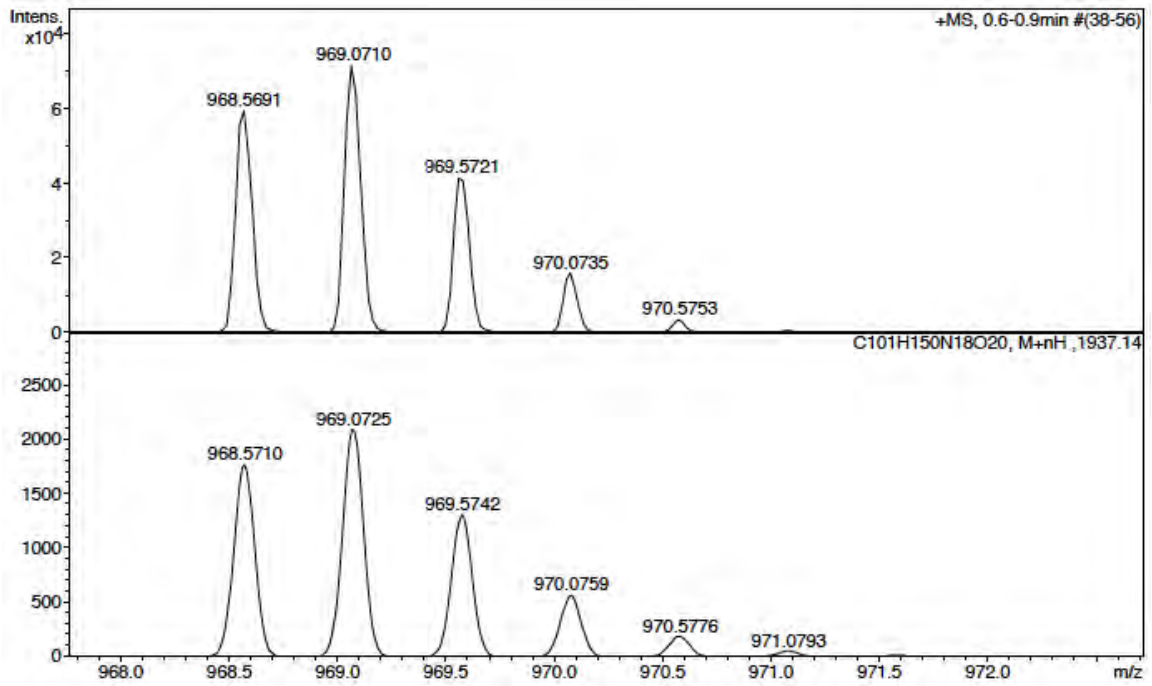
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,73	169,011	13,332	4,85
2	6,94	81,248	9,442	3,44
3	7,35	147,064	12,974	4,72
4	7,56	2128,754	238,898	86,98
Total:		2526,078	274,645	100,00

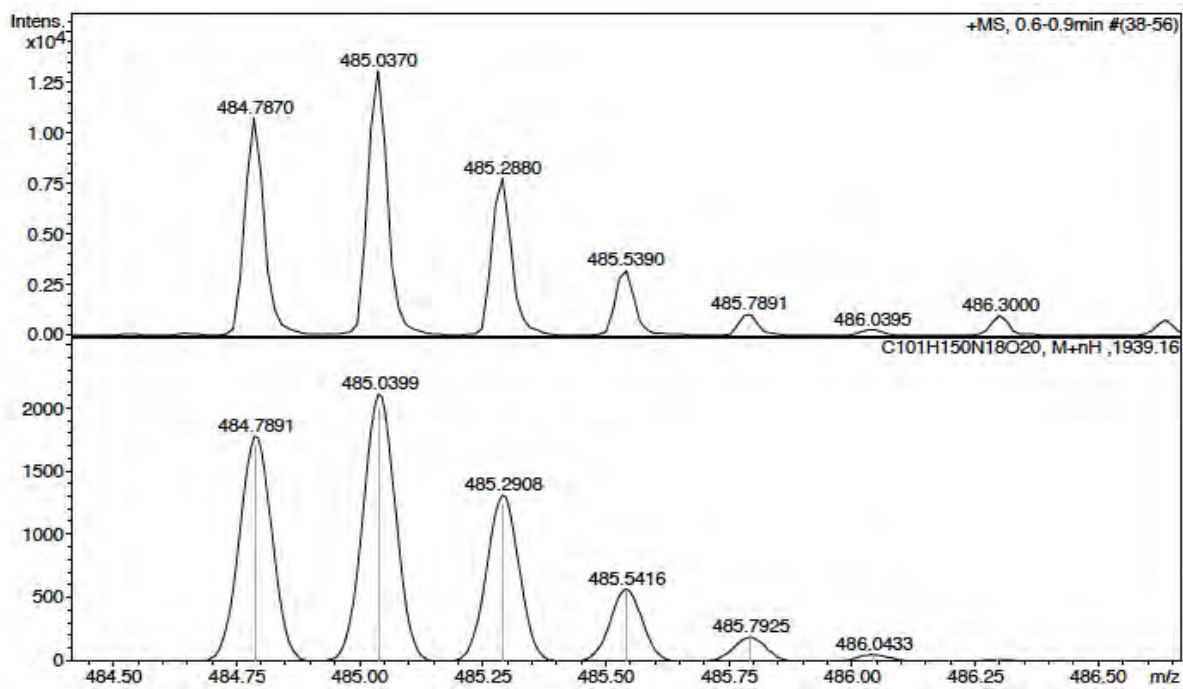
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$







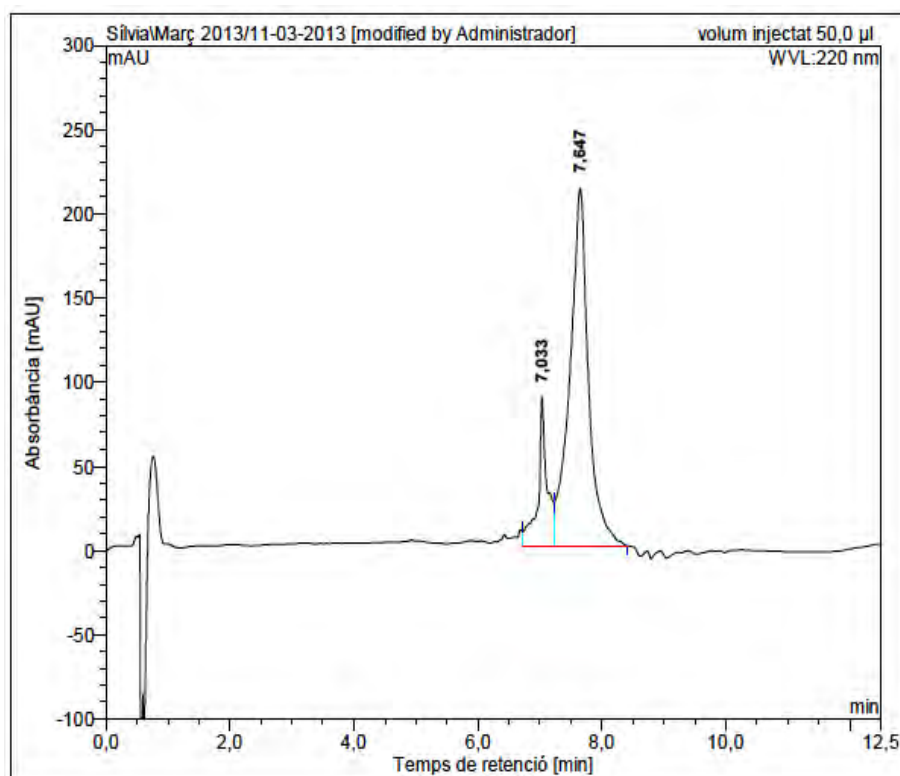


#### 4. Cyclic peptidyl resins

##### c(Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys(pNZ)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)

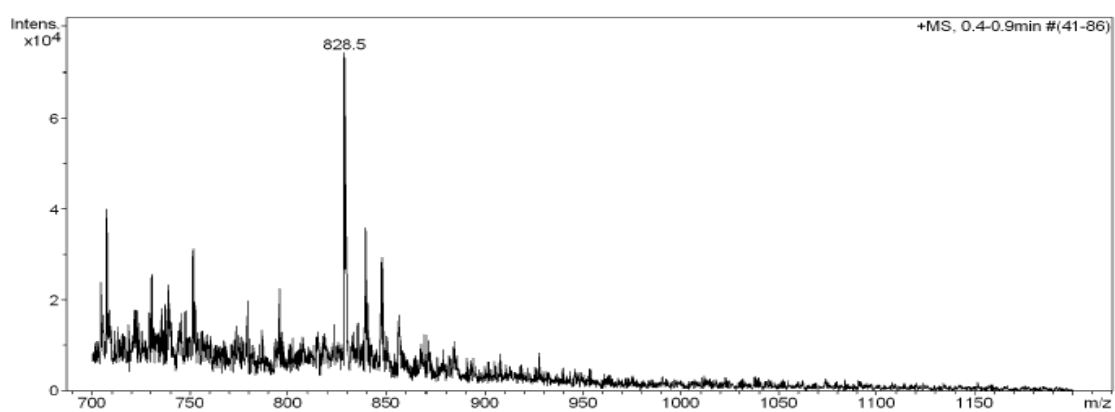
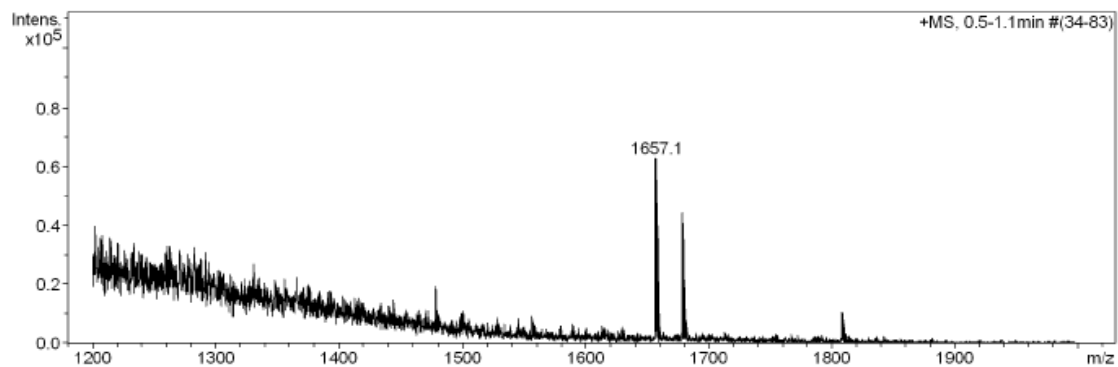
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (1))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

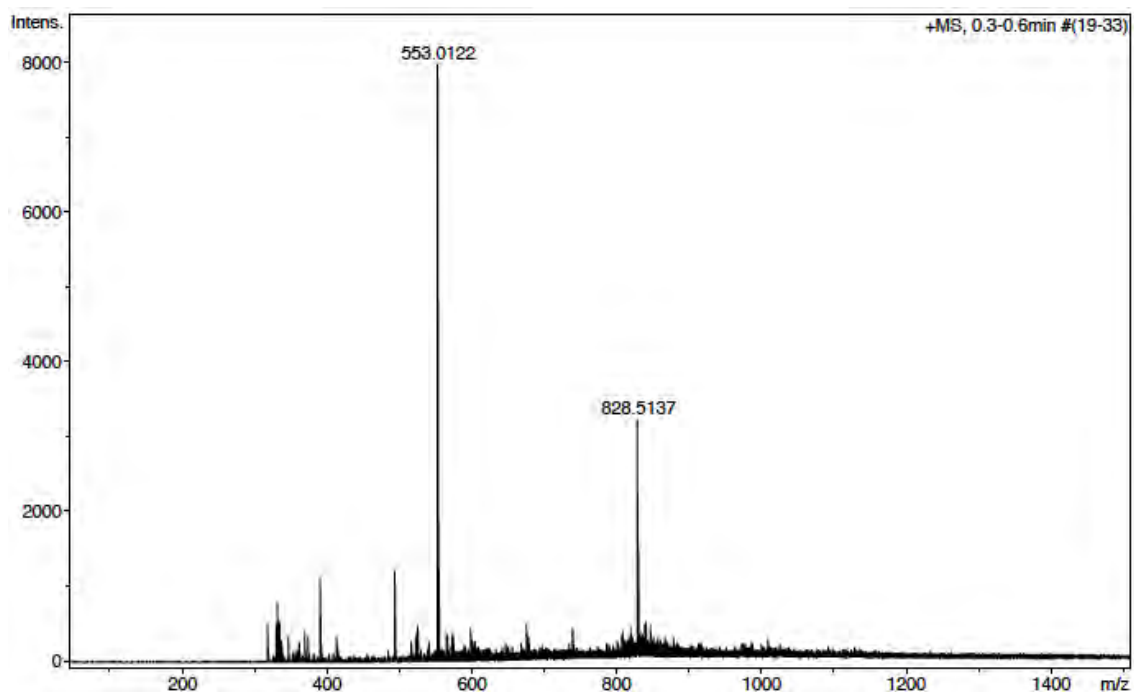


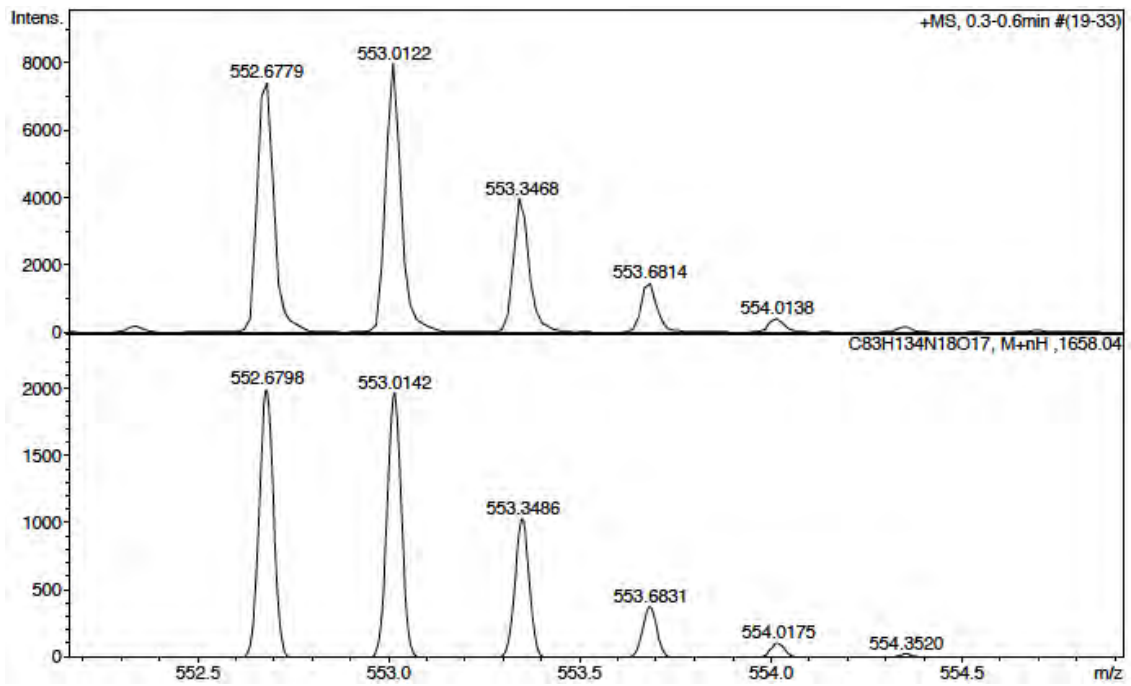
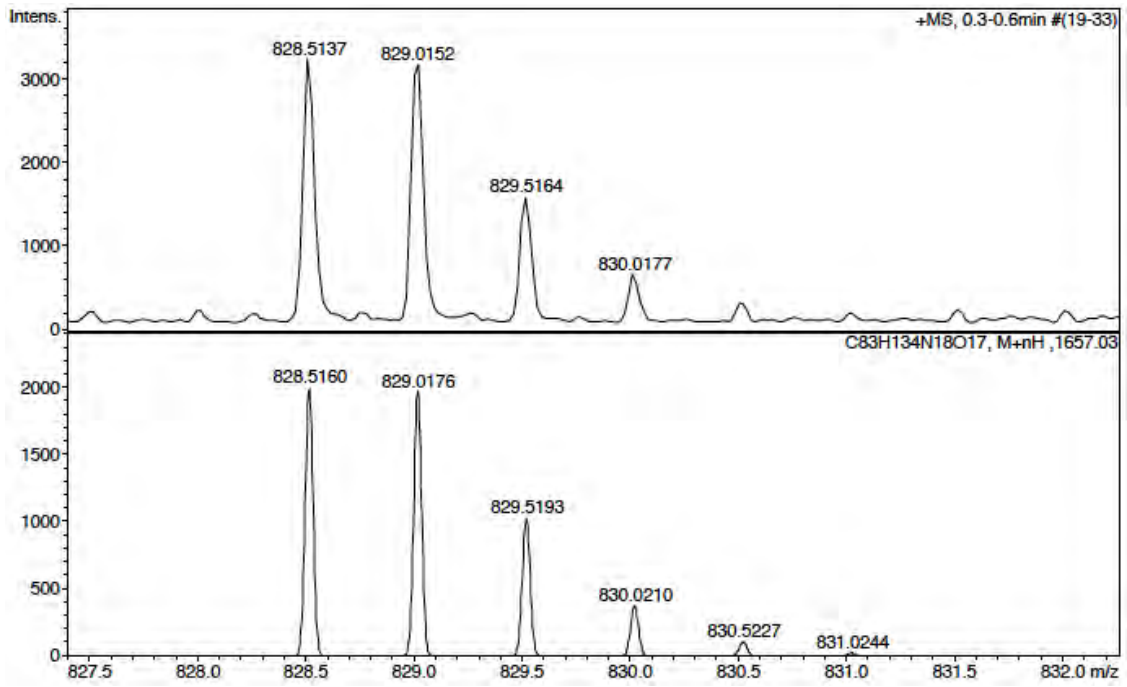
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,03	88,253	14,540	16,36
2	7,65	212,372	74,352	83,64
Total:		300,624	88,892	100,00

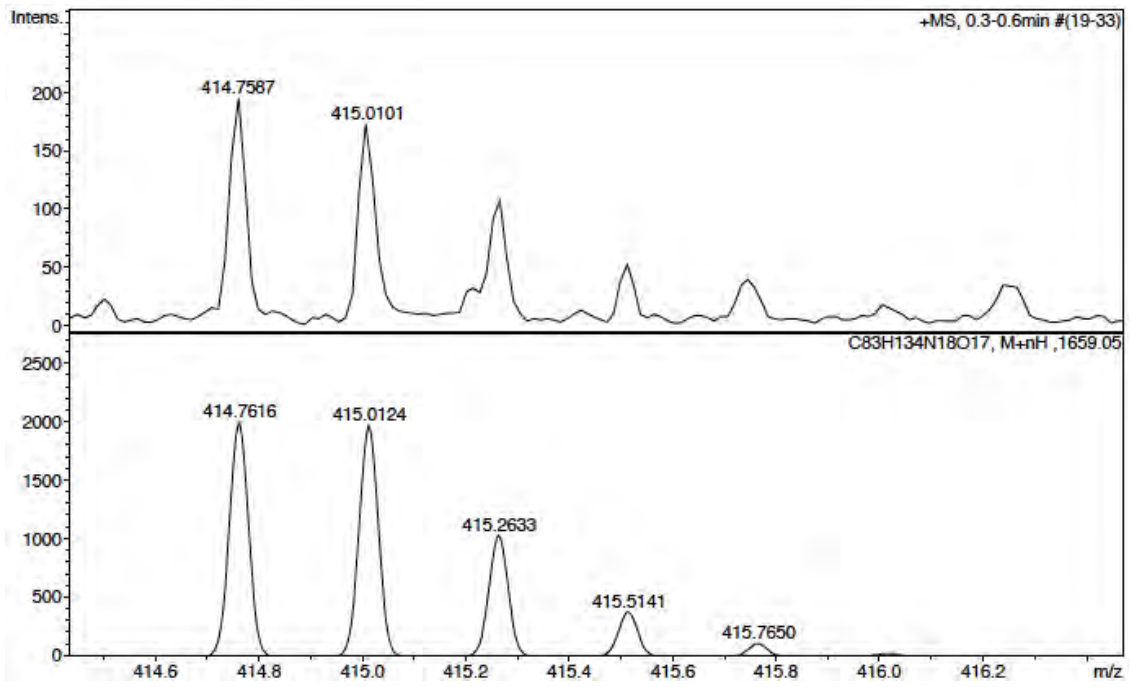
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$



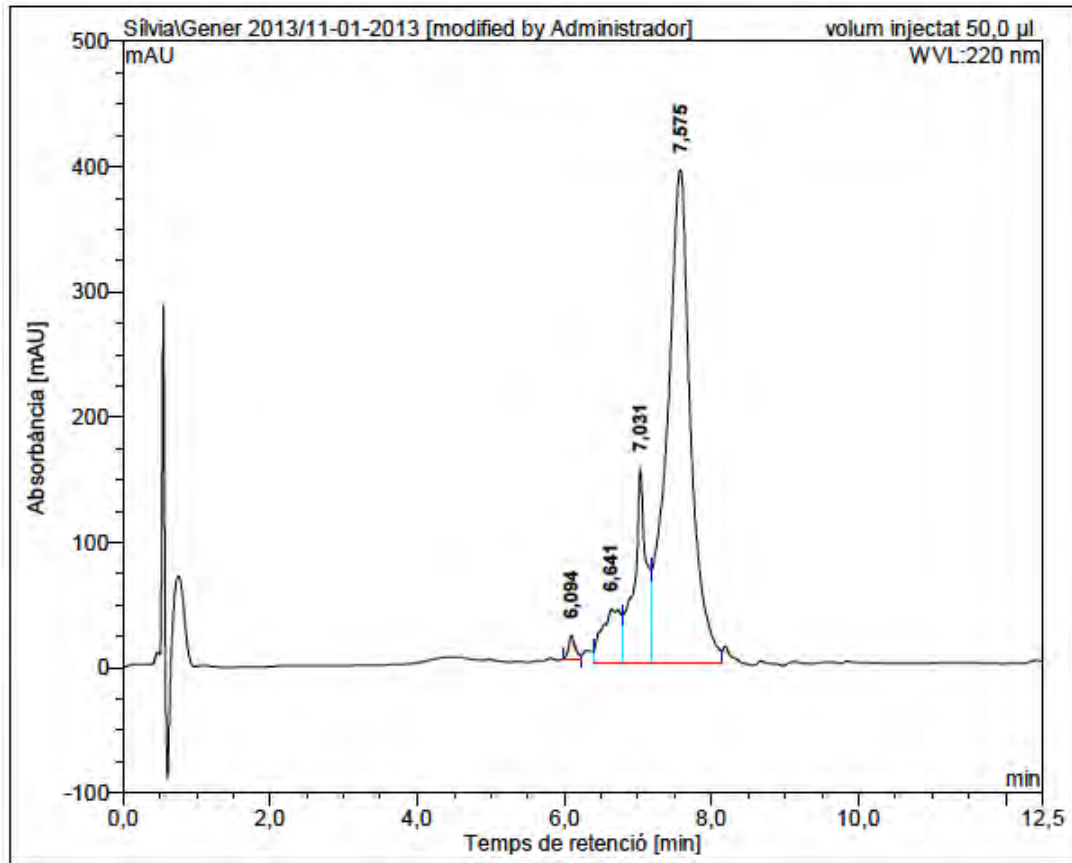




**c(Lys-Lys(pNZ)-Leu-Lys-Lys(ivDde)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

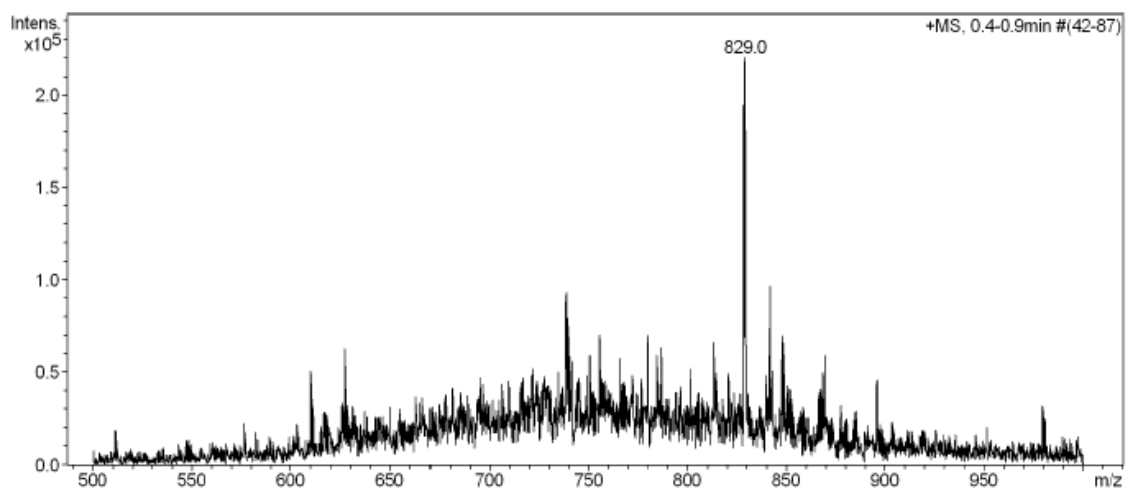
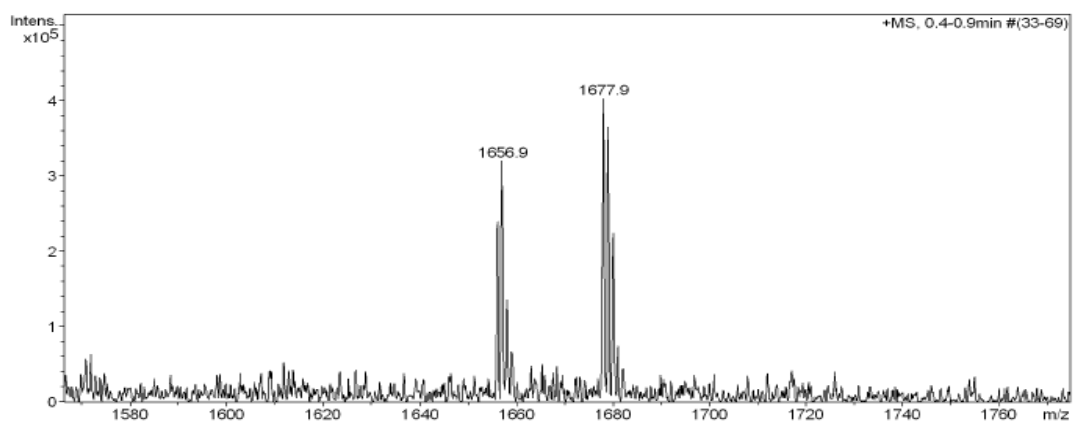
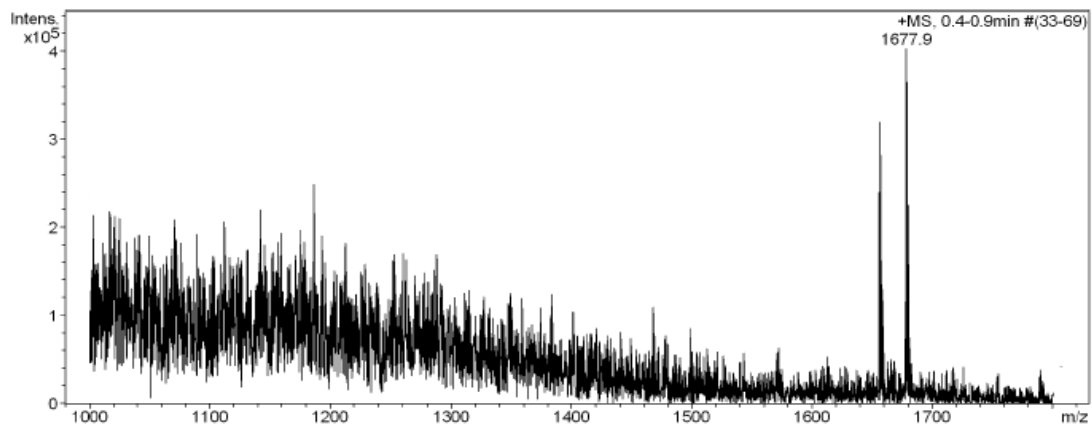
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Leu-Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (2))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

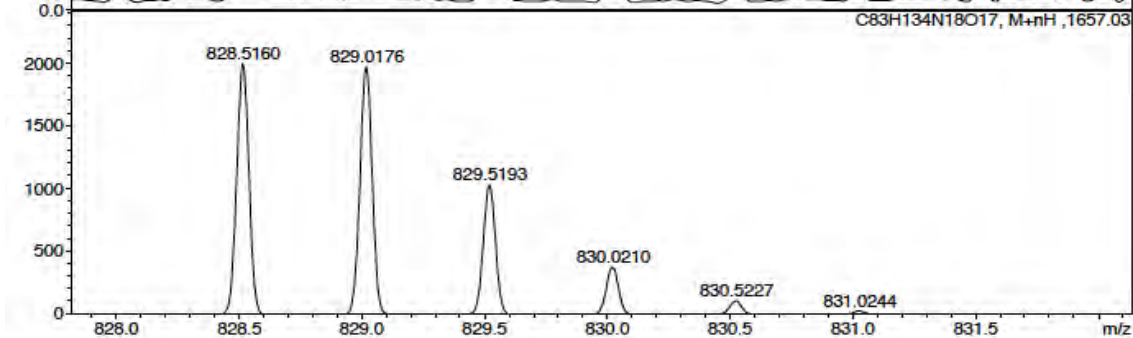
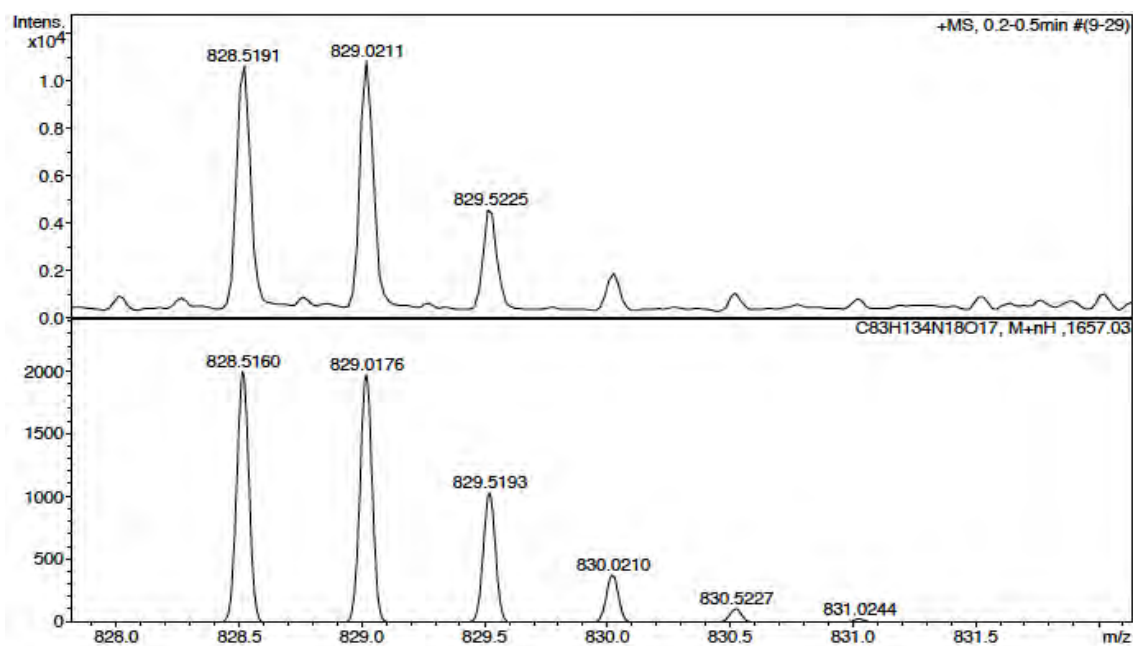
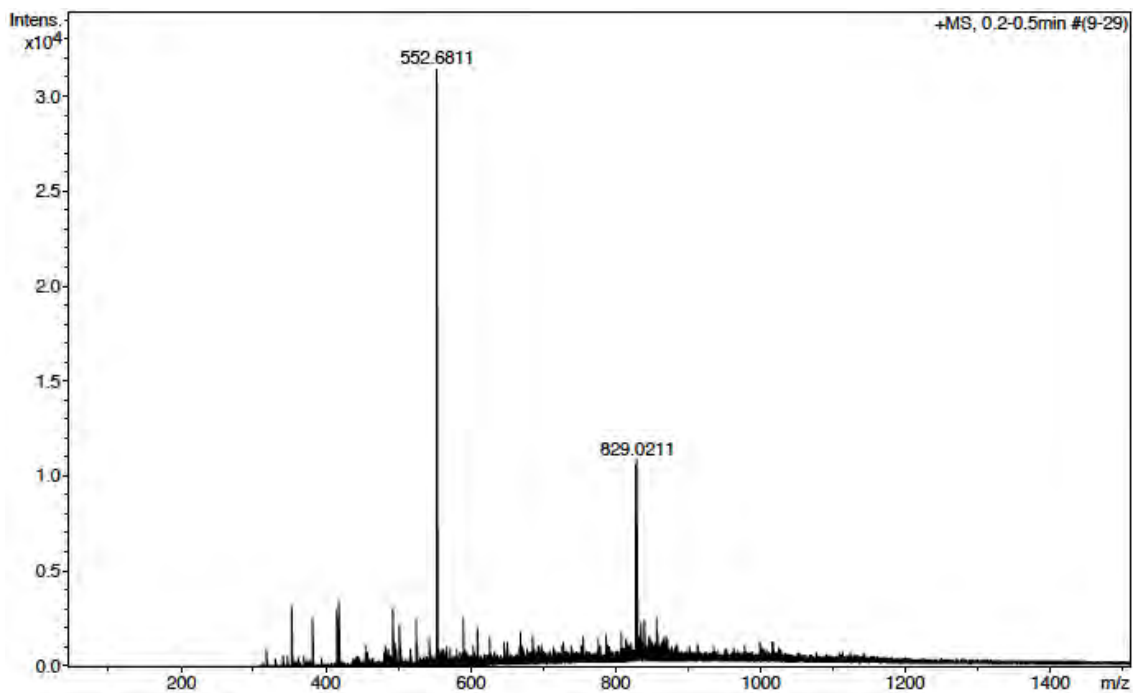


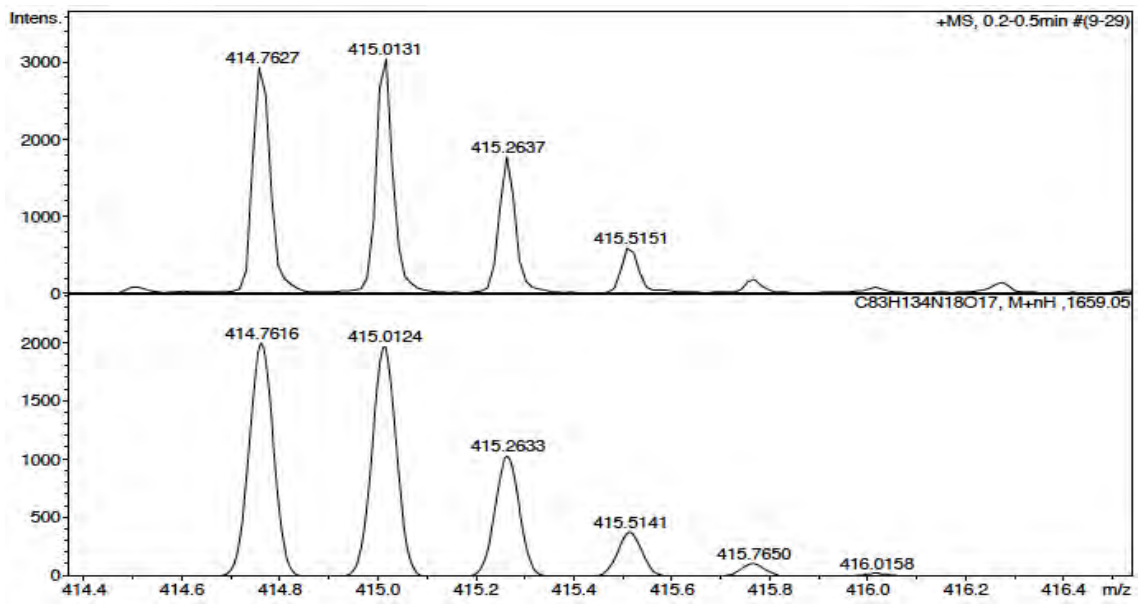
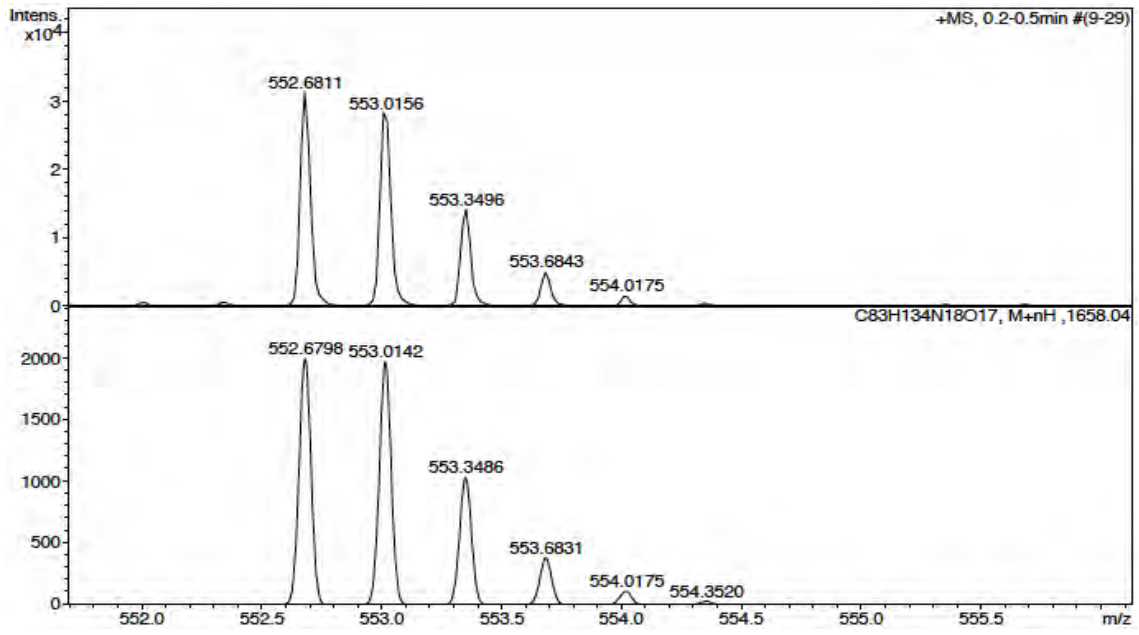
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,09	19,438	2,071	1,08
2	6,64	43,164	12,952	6,75
3	7,03	155,453	30,465	15,87
4	7,58	394,149	146,525	76,31
Total:		612,204	192,013	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$



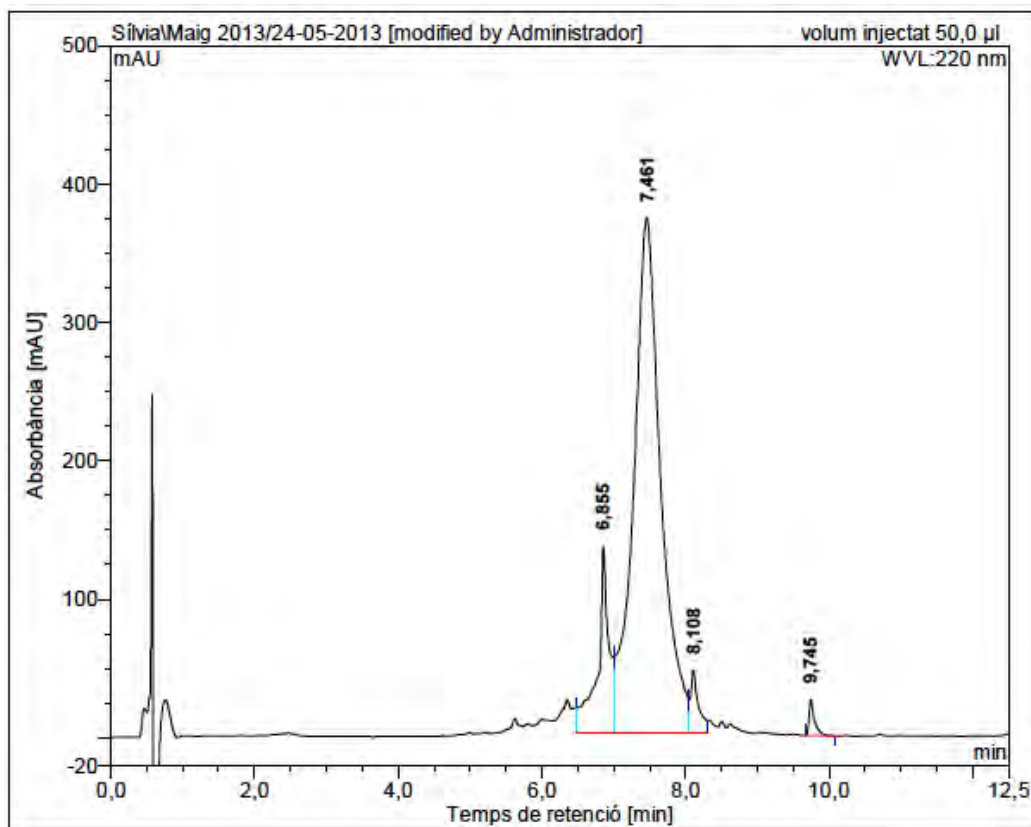




**c(Lys-Lys(ivDde)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

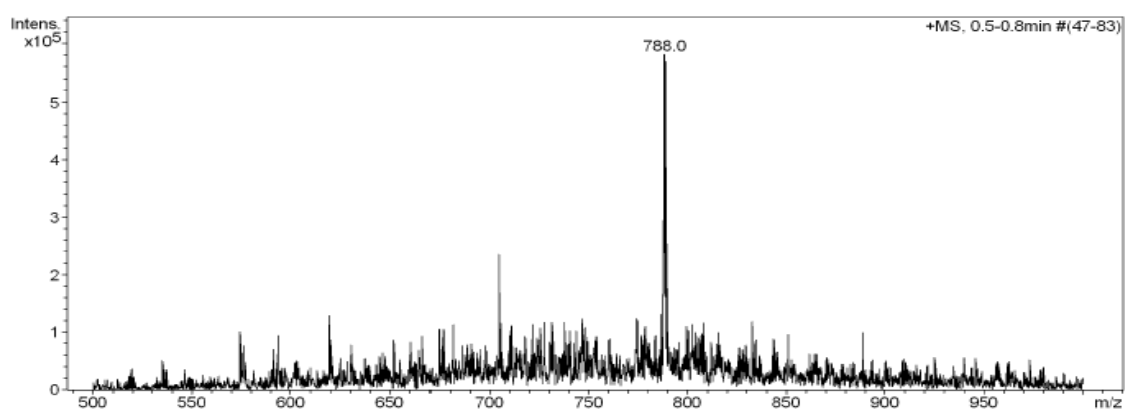
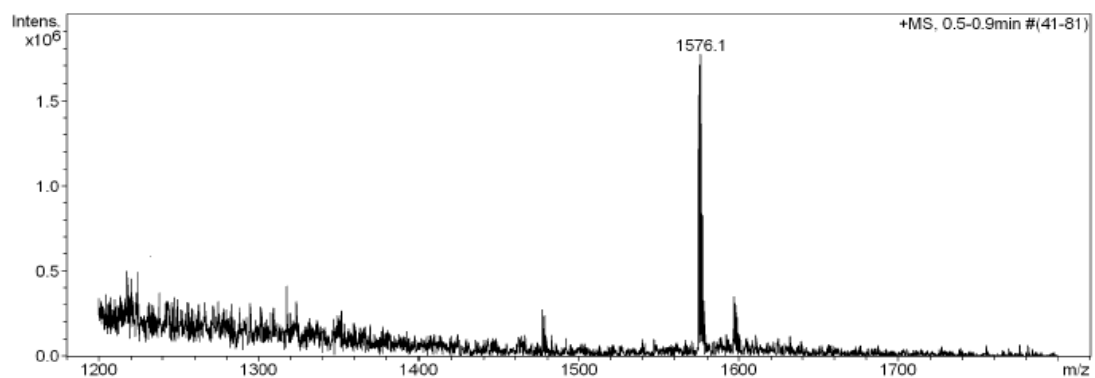
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(ivDde)-Leu-Lys(Boc)-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (4))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

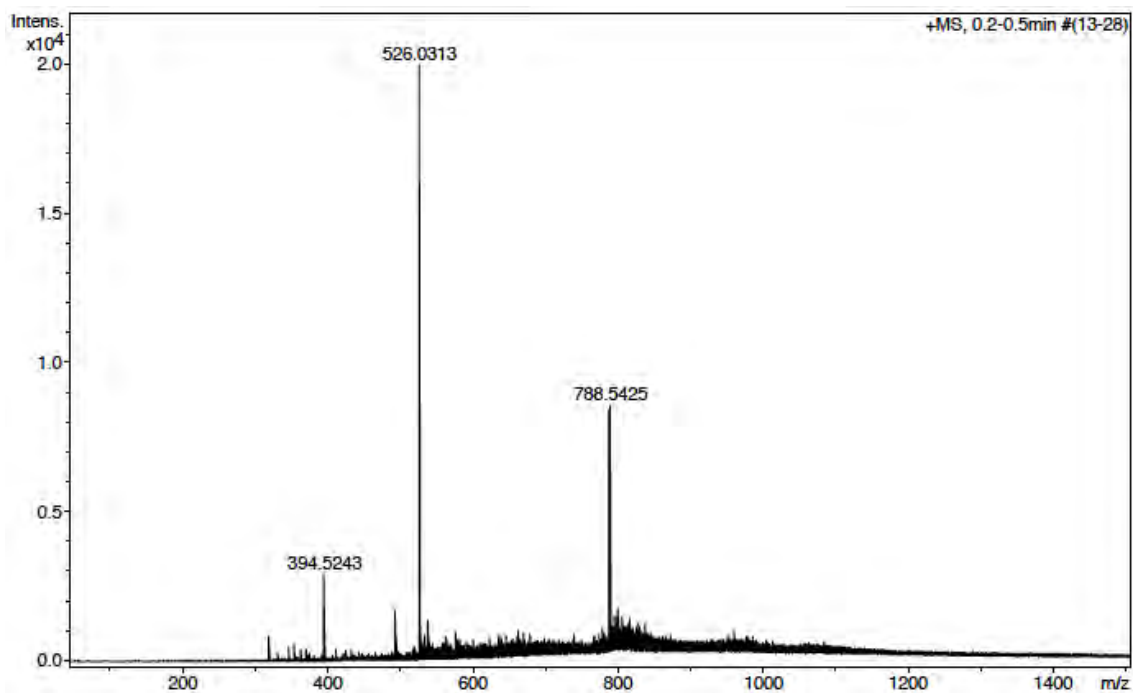


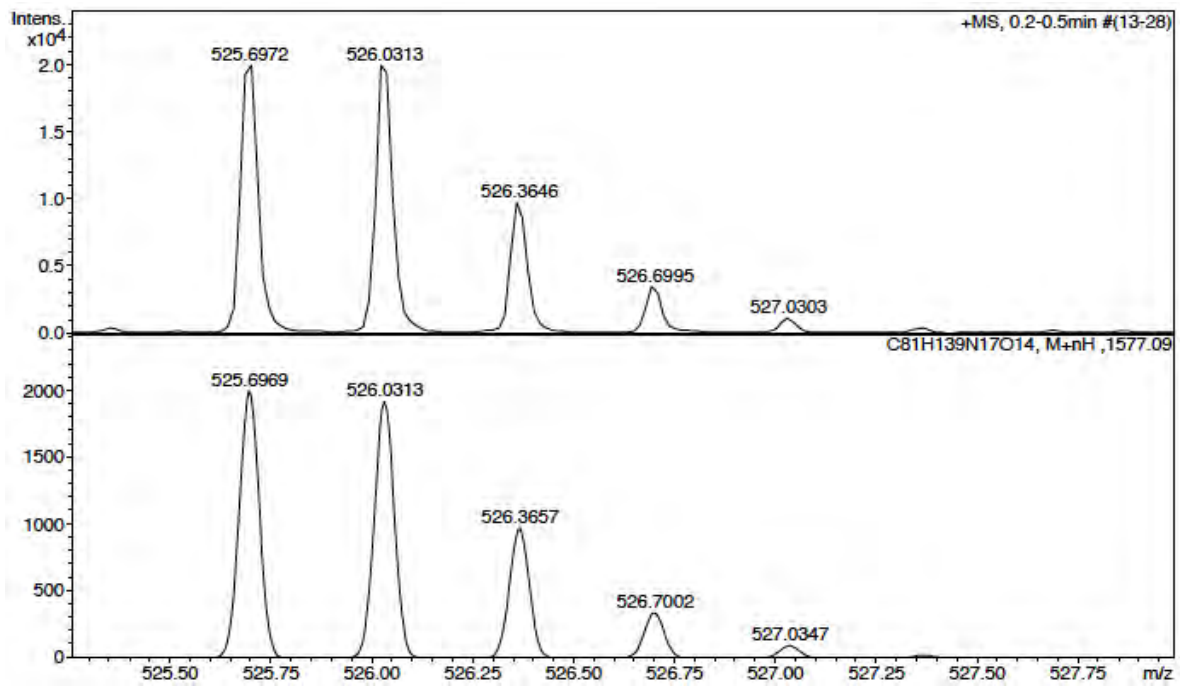
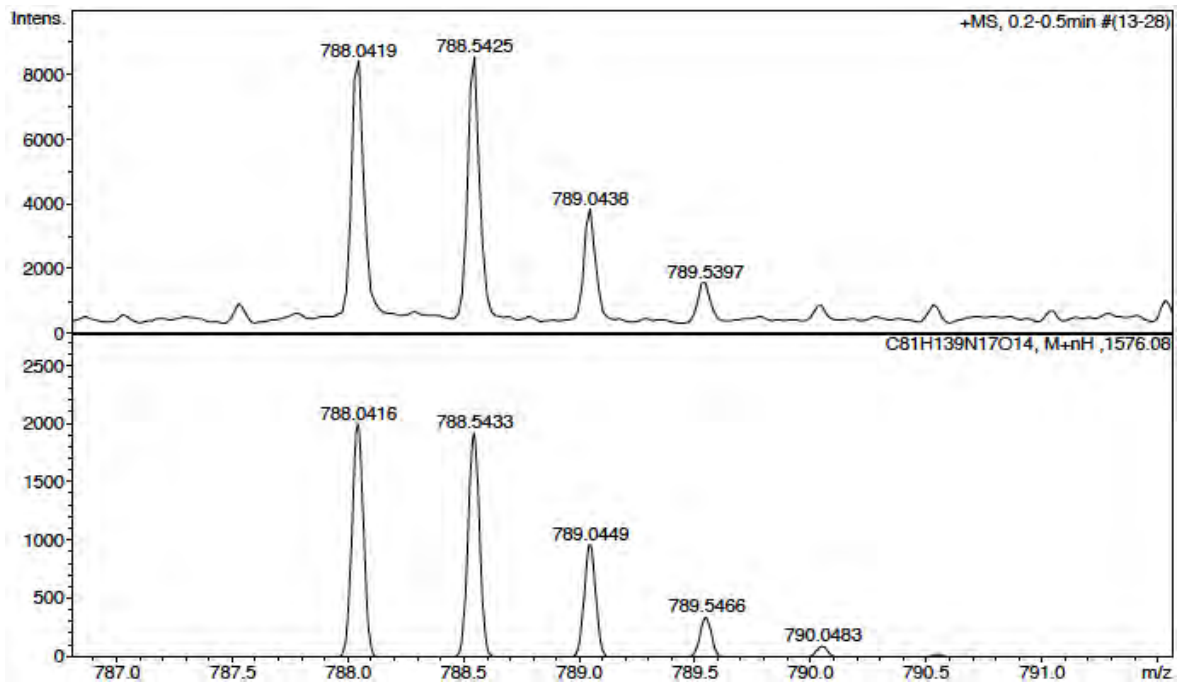
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,85	134,341	24,027	12,30
2	7,46	371,903	163,596	83,73
3	8,11	45,167	5,543	2,84
4	9,74	25,557	2,219	1,14
Total:		576,969	195,385	100,00

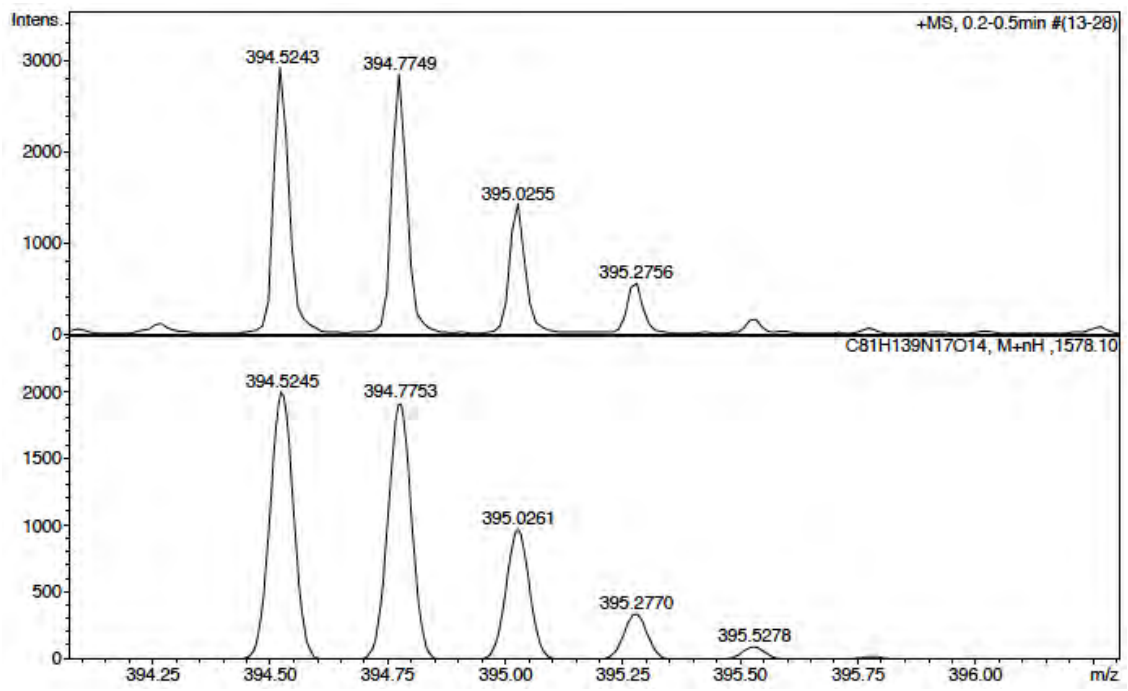
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$



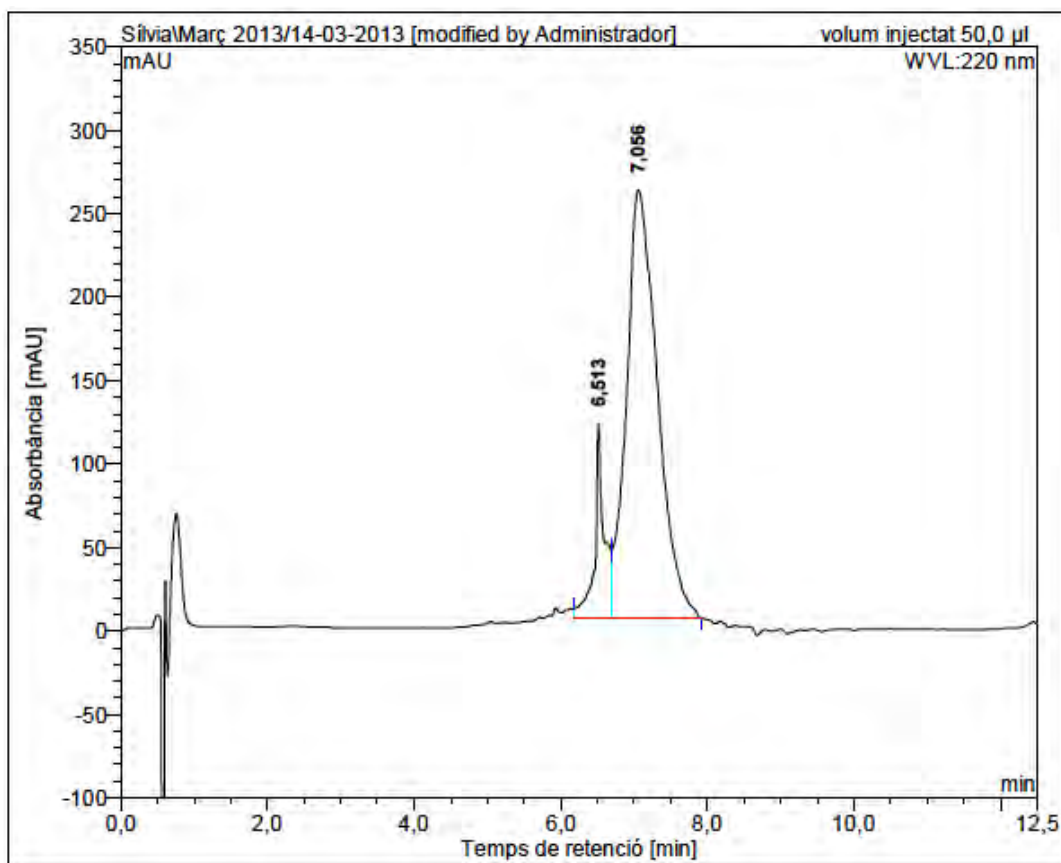




**c(Lys-Lys(CO-C≡CH)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

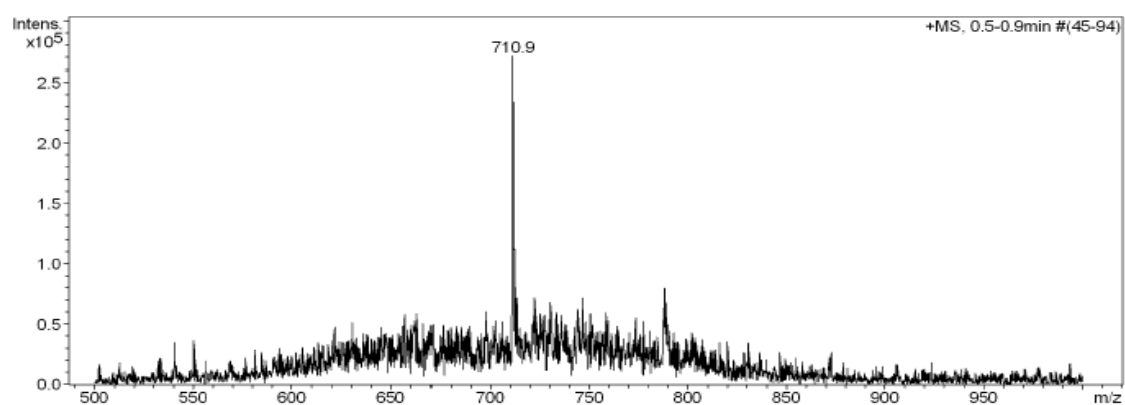
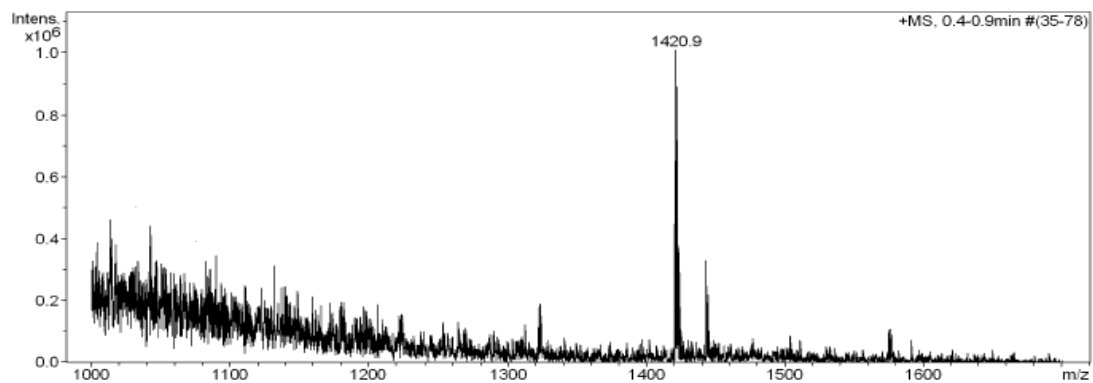
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(CO-C≡CH)-Leu-Lys(Boc)-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)) (5))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

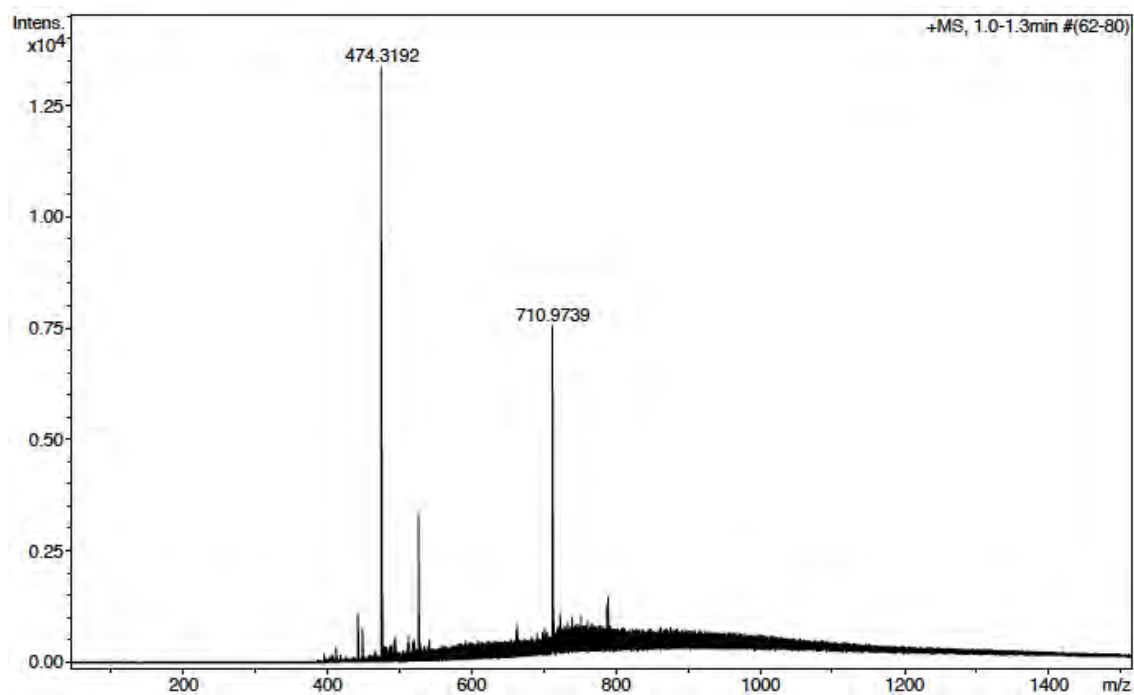


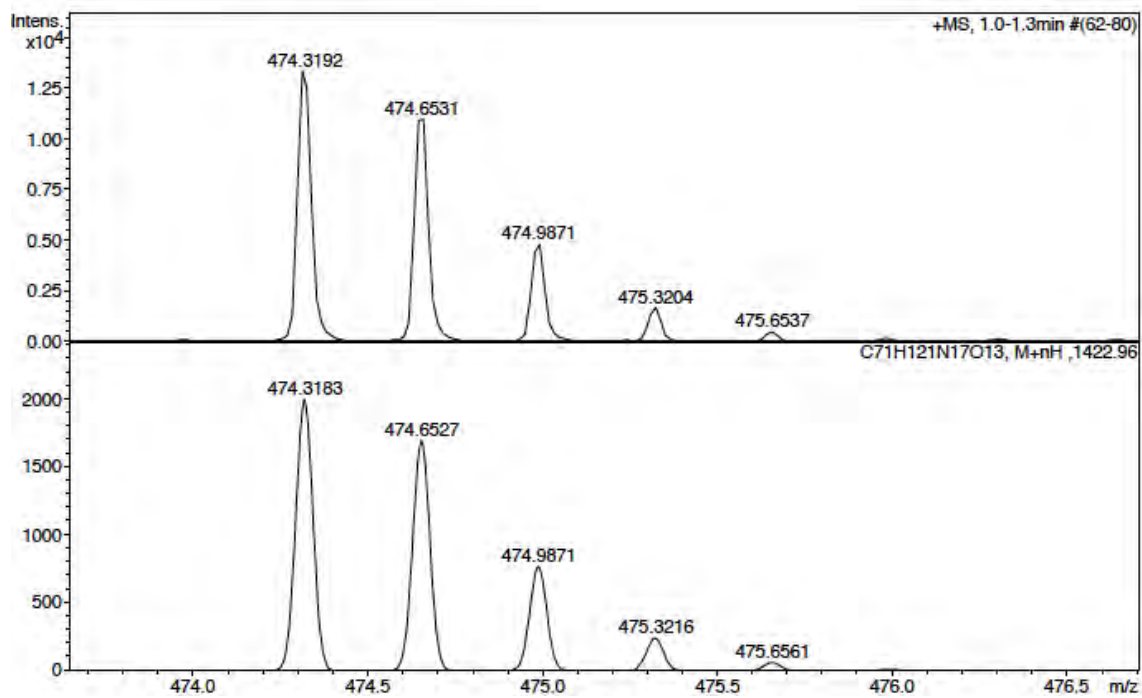
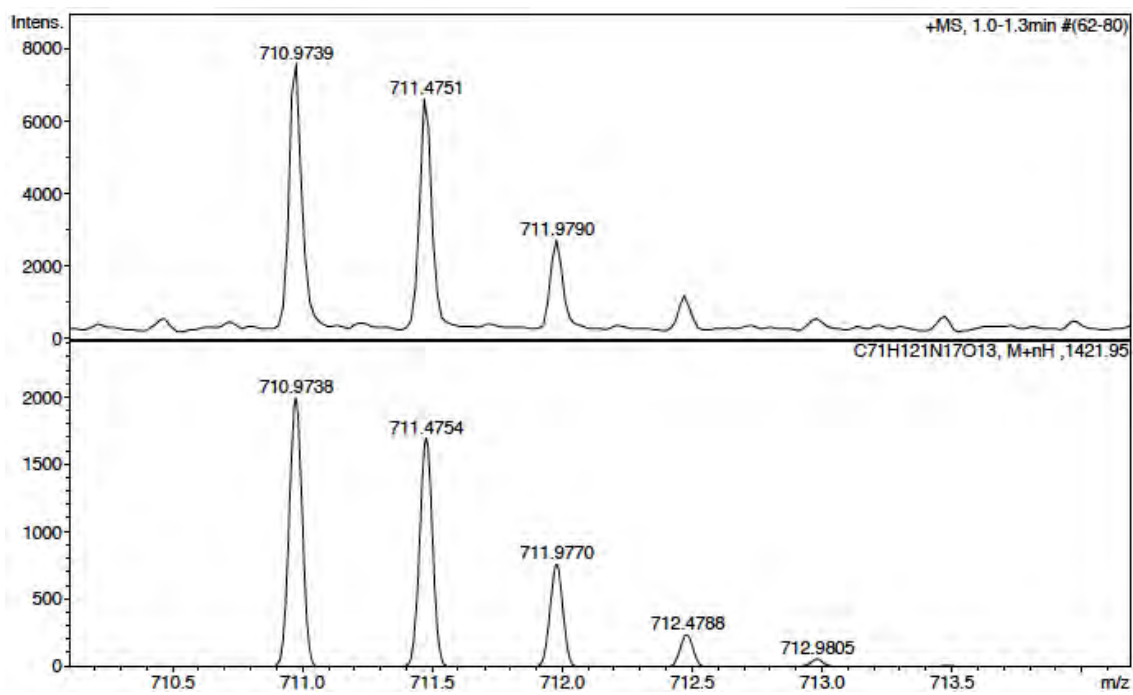
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,51	116,371	17,123	11,97
2	7,06	256,722	125,898	88,03
Total:		373,093	143,021	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

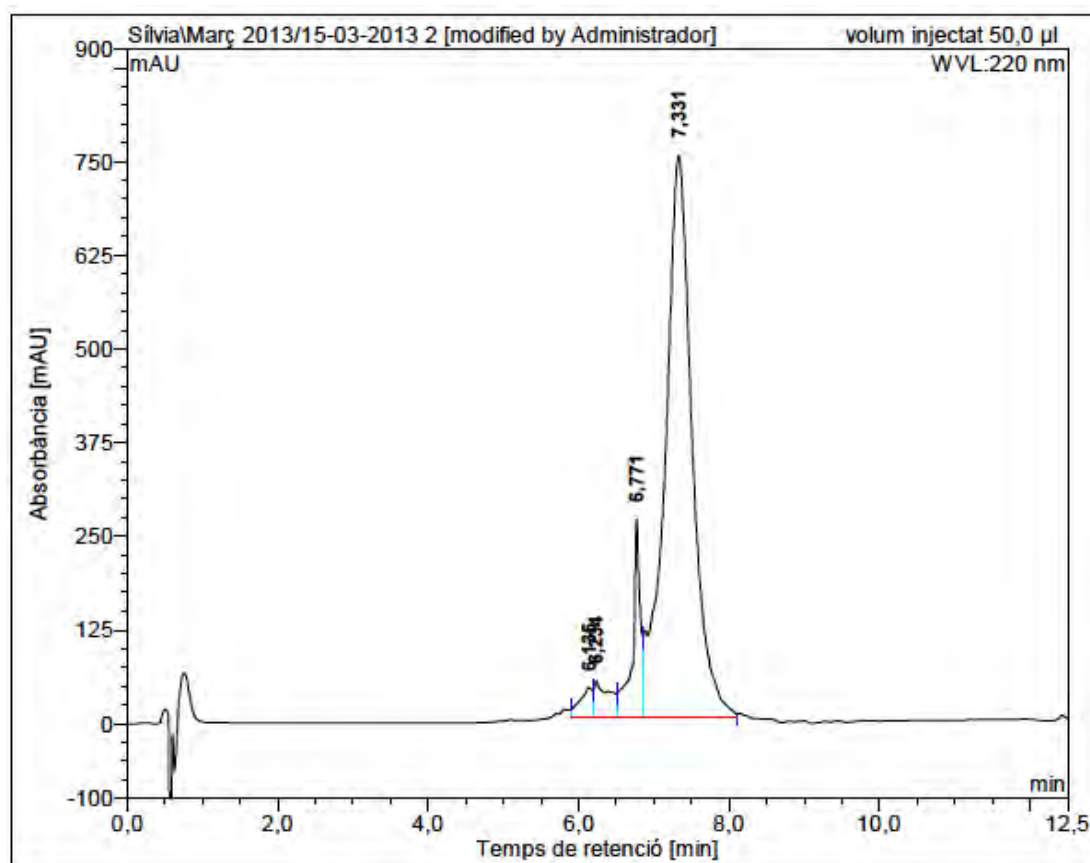




## 5. Cyclic lipopeptidotriazoles

c(Lys-Lys(CO-Tr-Bn)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC730)

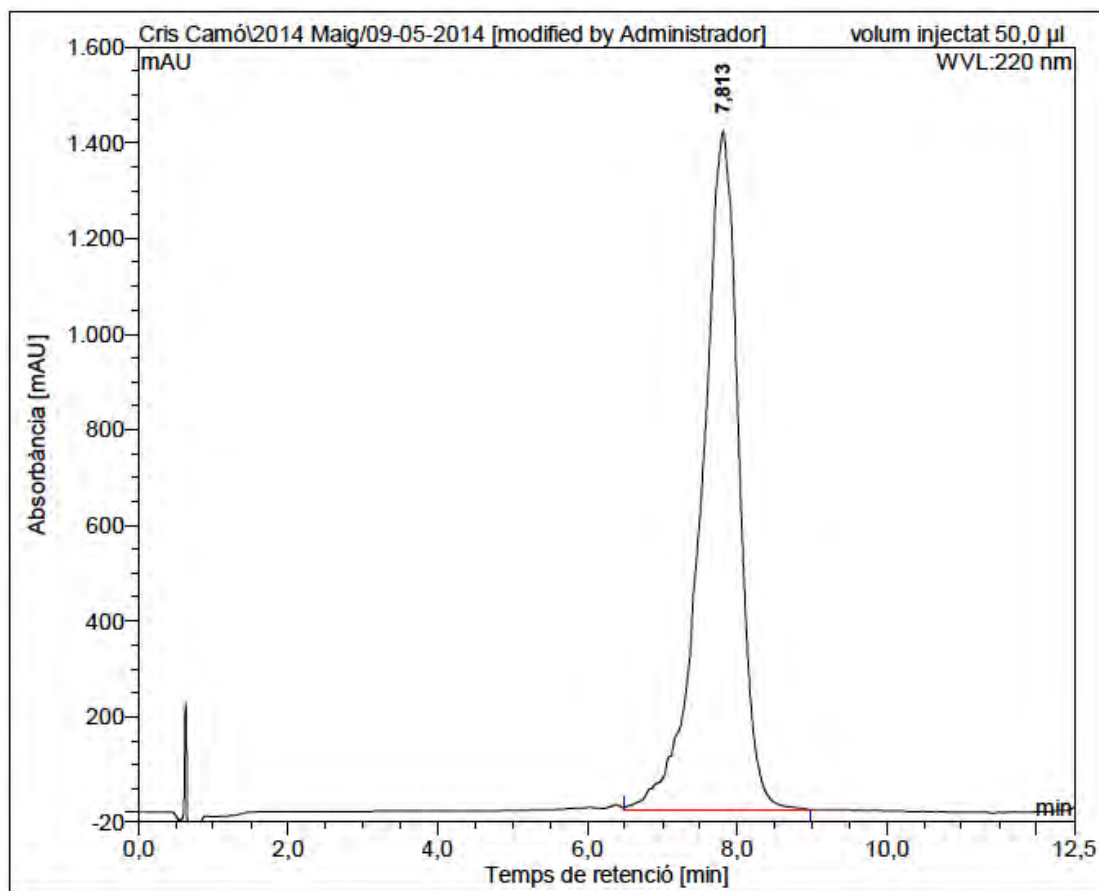
HPLC ( $\lambda=220$  nm) (before purification)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,13	39,400	7,343	2,03
2	6,23	48,238	11,538	3,19
3	6,77	263,648	31,292	8,64
4	7,33	748,709	311,934	86,14
Total:		1099,995	362,106	100,00

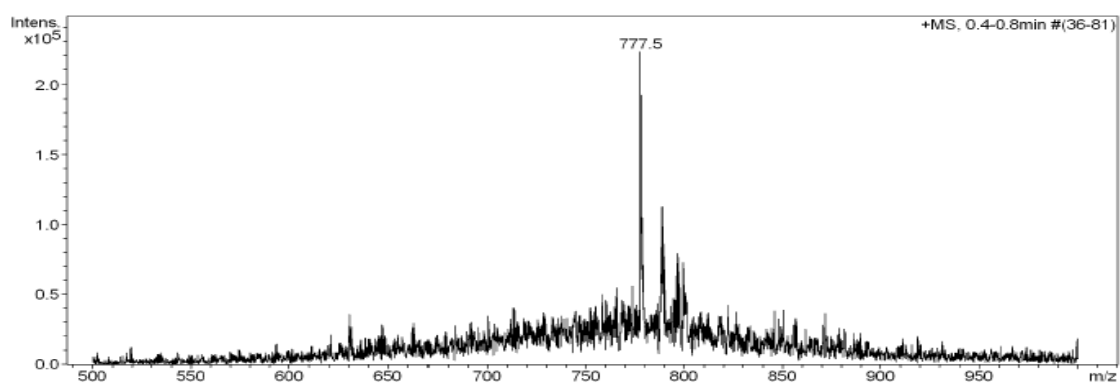
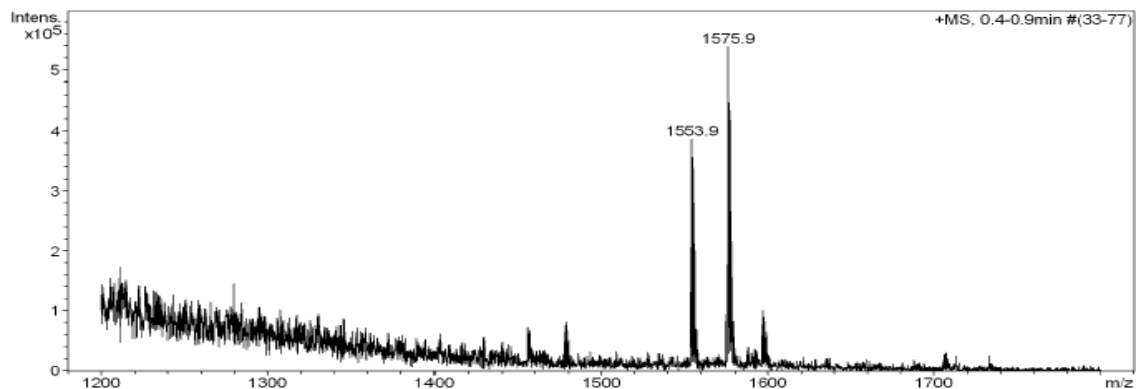


HPLC ( $\lambda=220$  nm) (after purification)

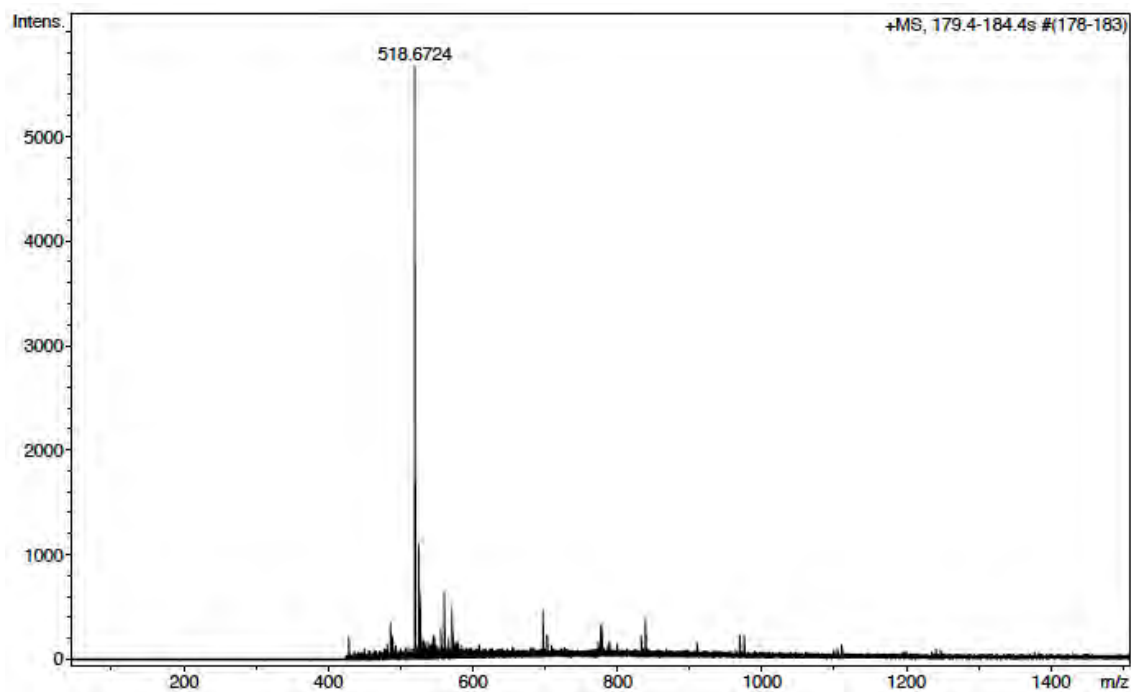


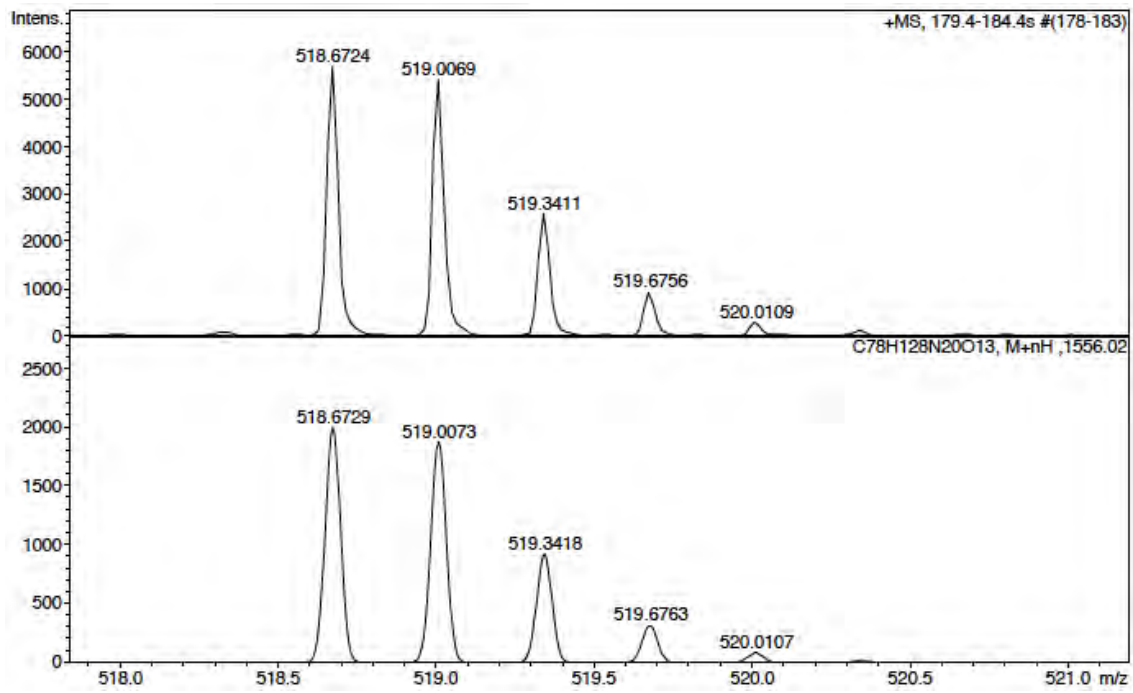
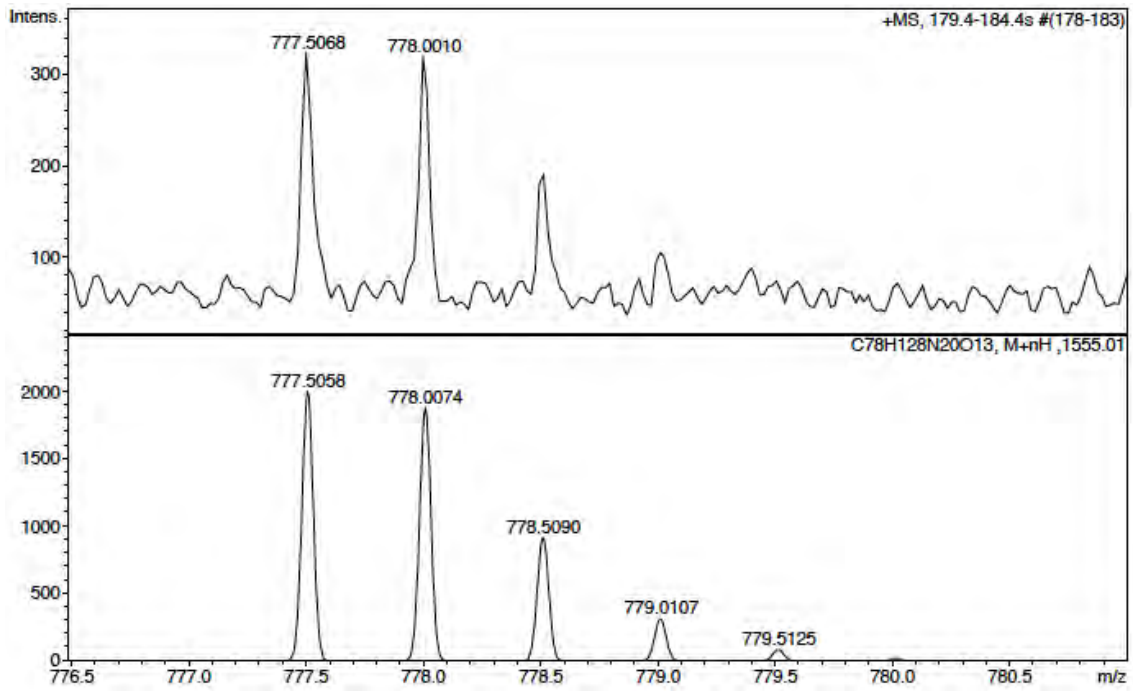
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,81	1418,418	813,014	100,00
Total:		1418,418	813,014	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )

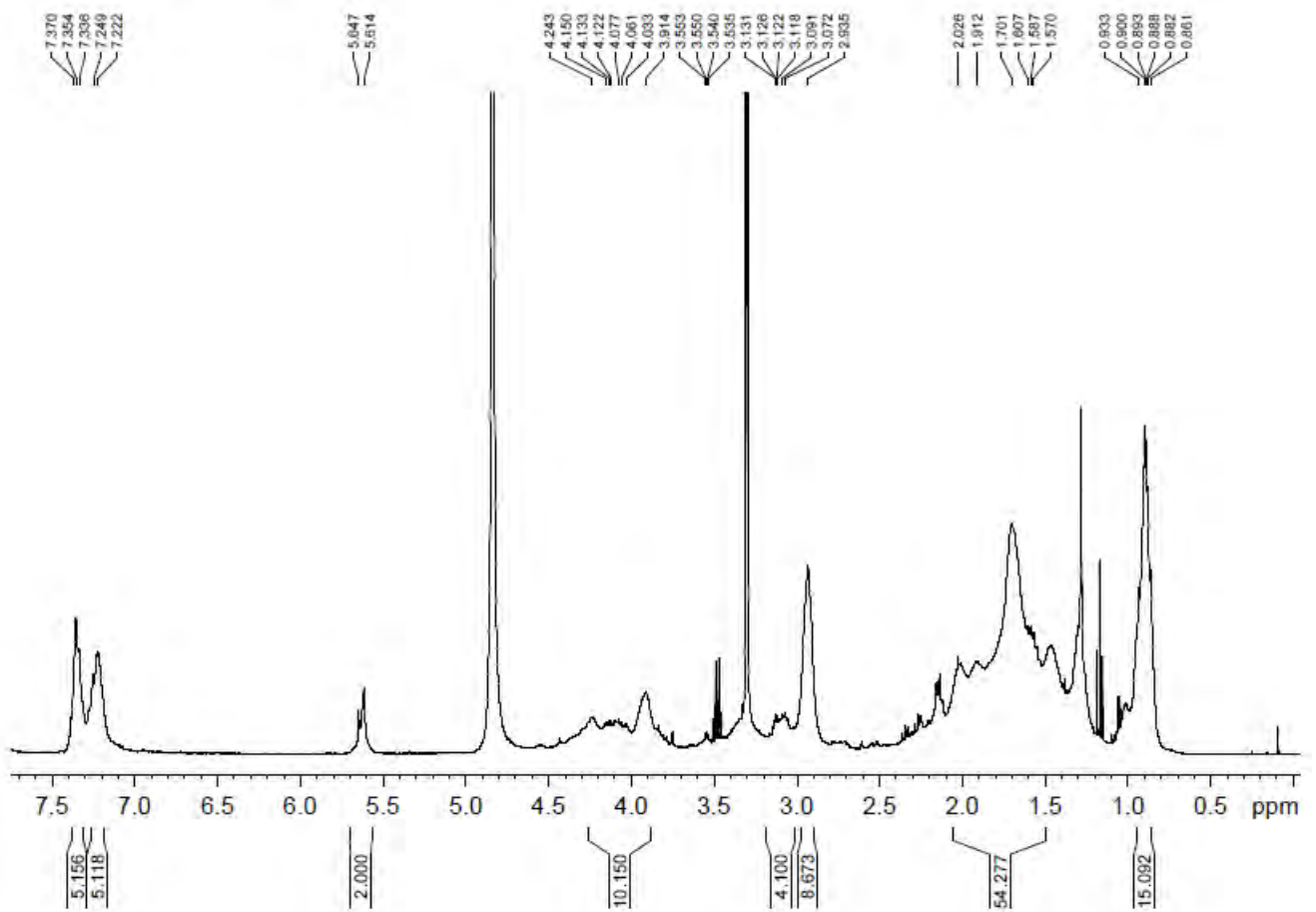


HRMS (ESI)  $m/z$



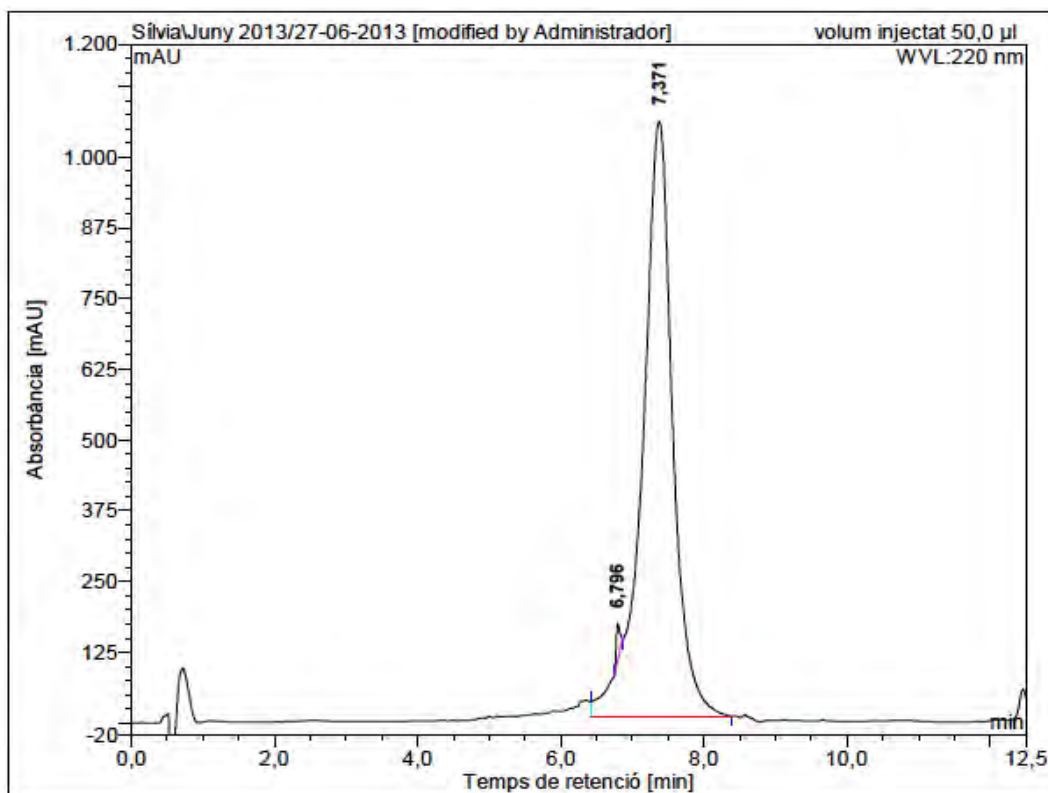


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm)



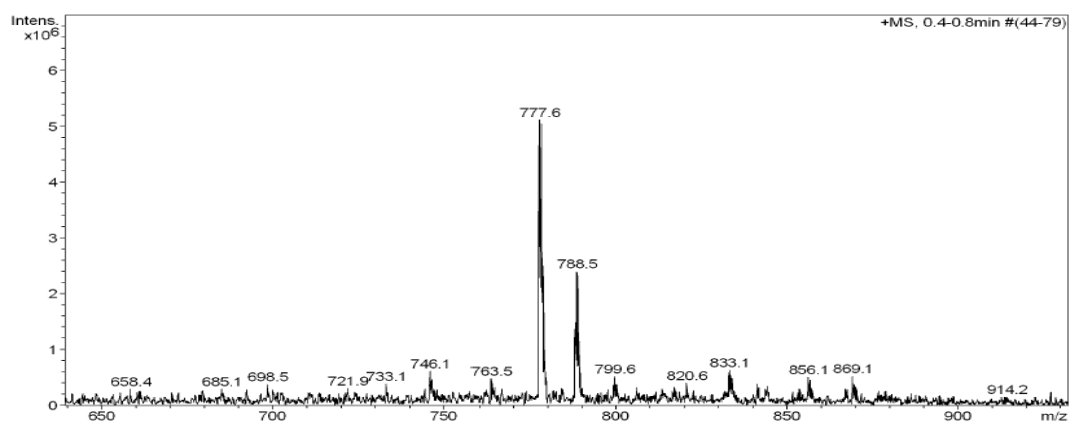
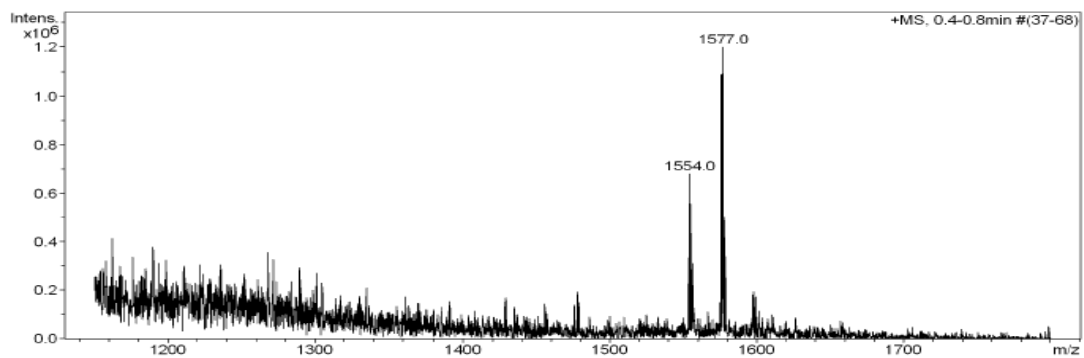
c(Lys-Lys(CO-Tr-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Me)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC740)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

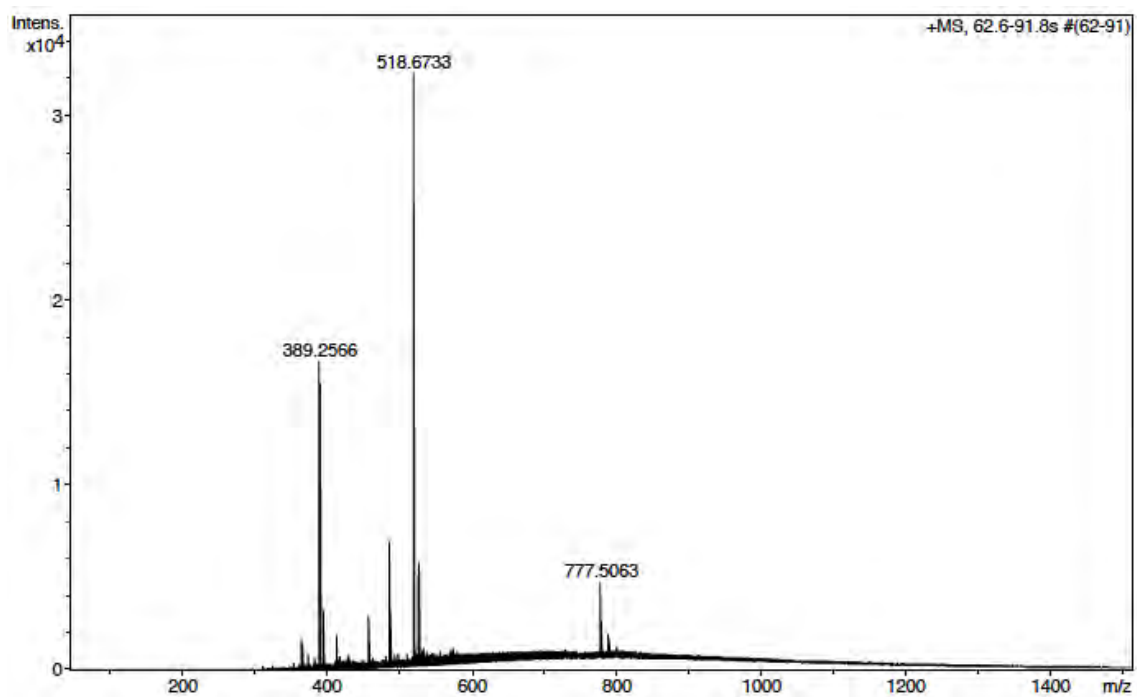


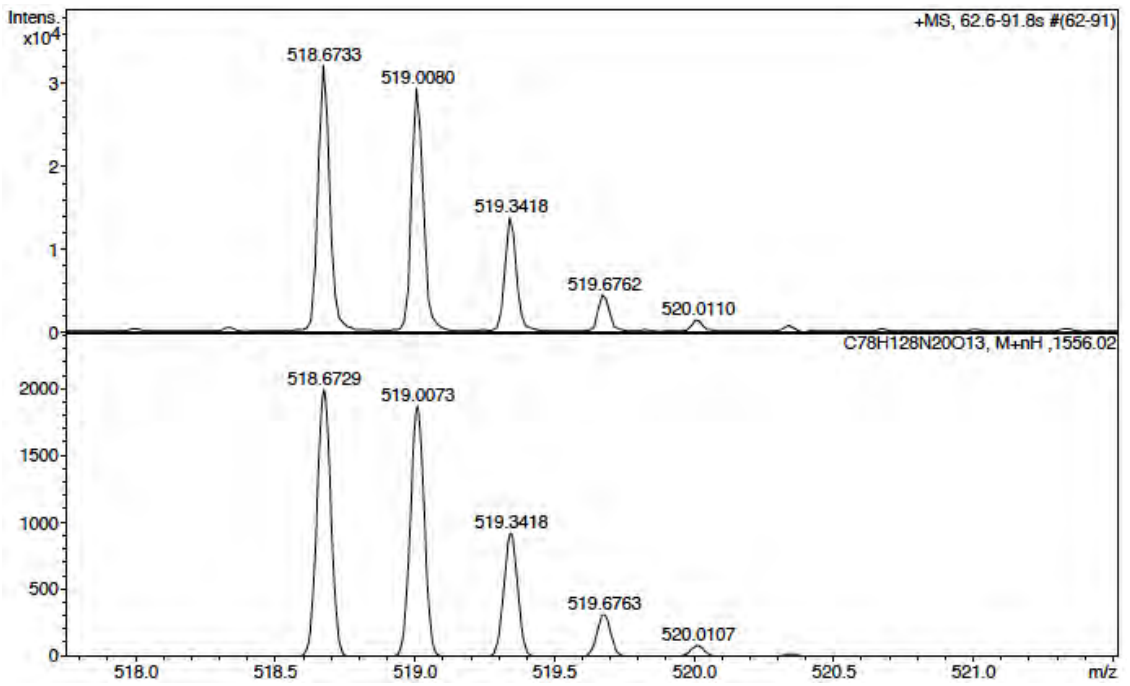
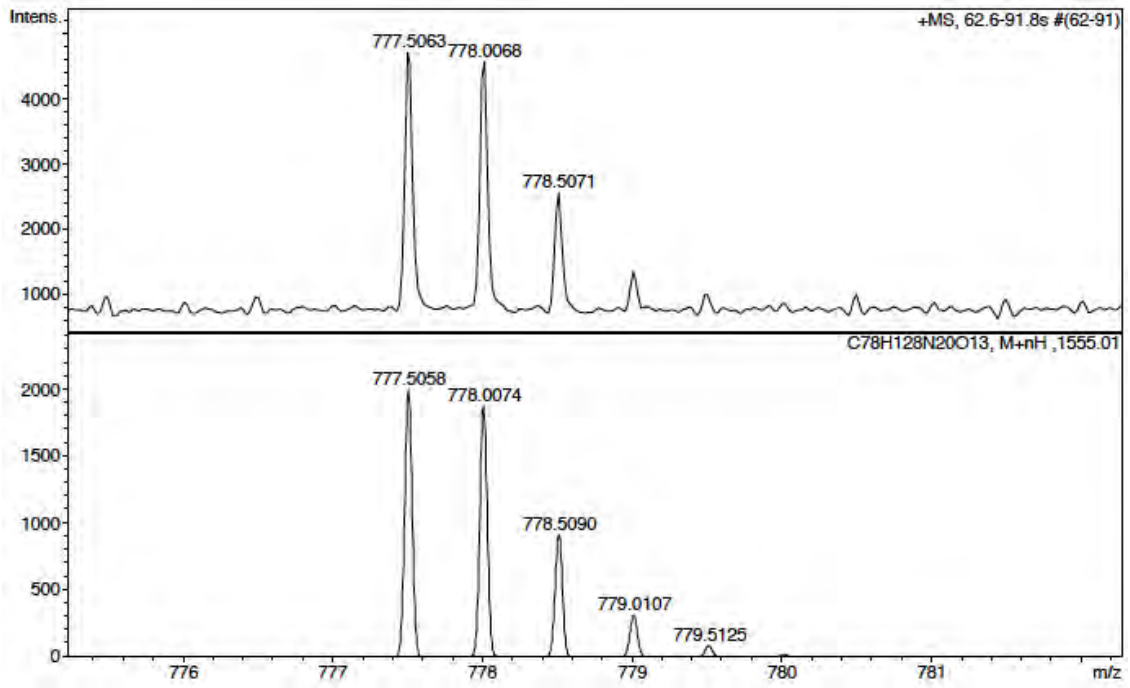
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,80	65,287	3,652	0,70
2	7,37	1050,982	515,388	99,30
Total:		1116,269	519,040	100,00

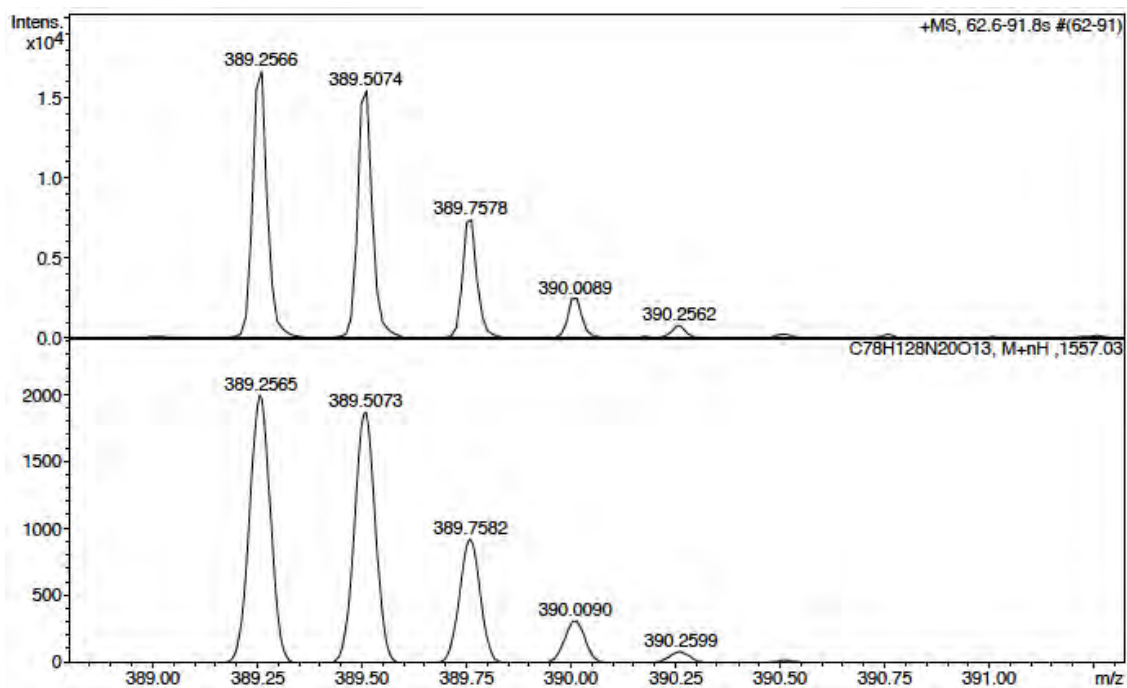
### ESI-MS ( $m/z$ )



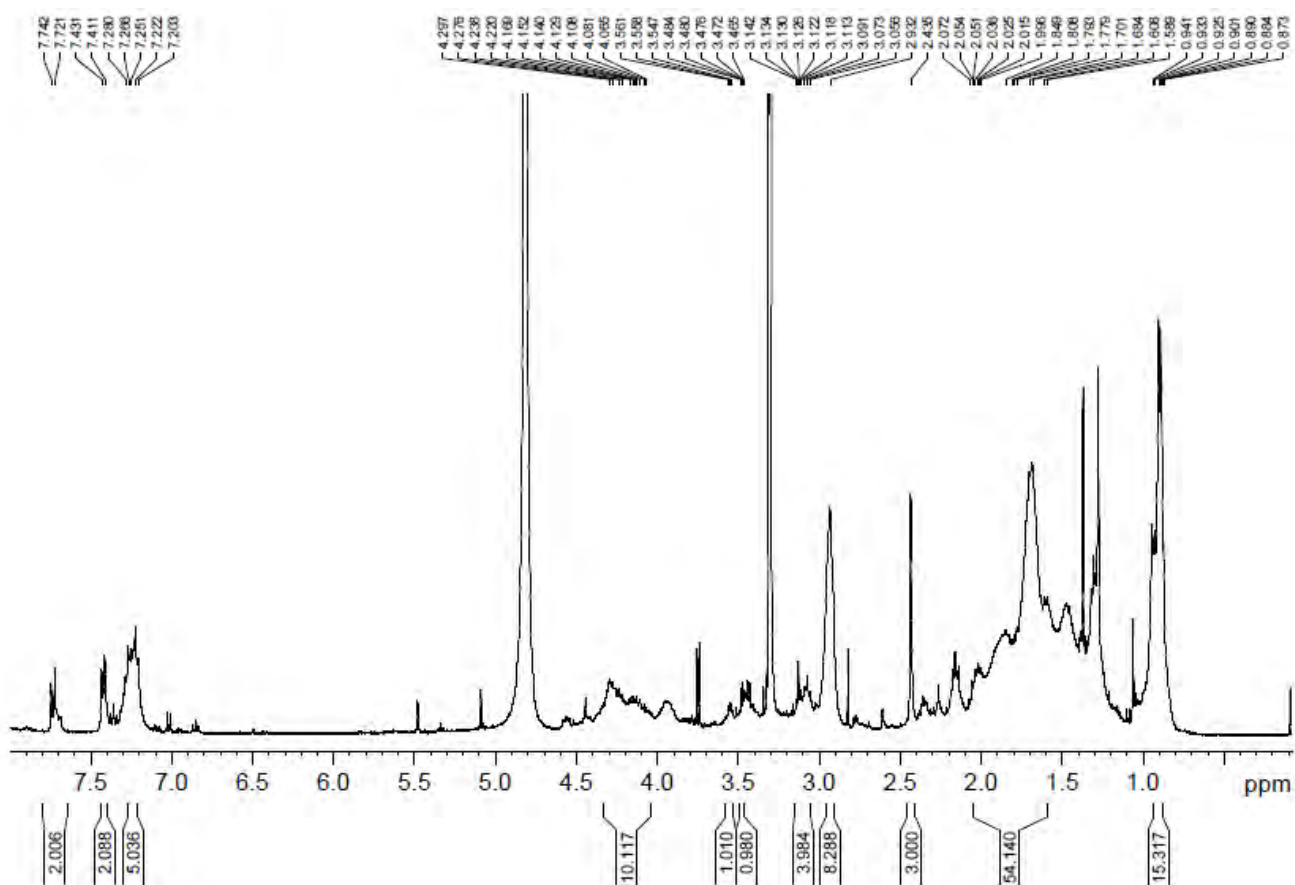
### HRMS (ESI) $m/z$







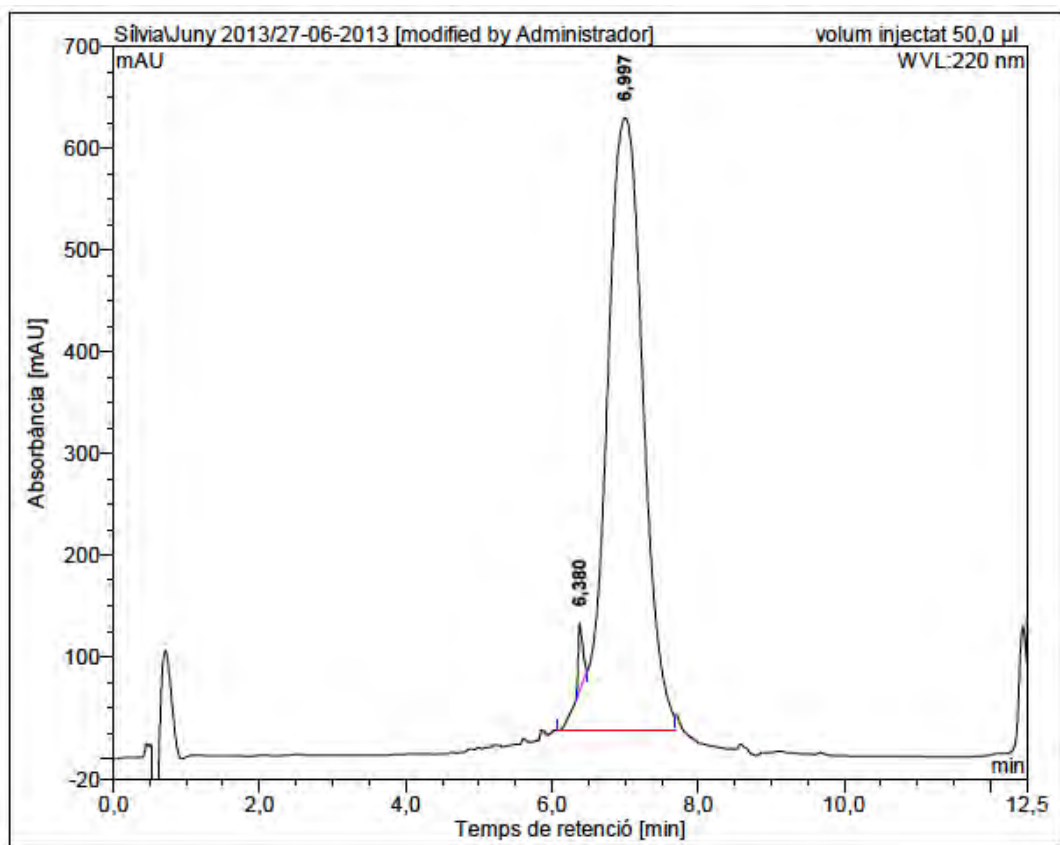
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm)





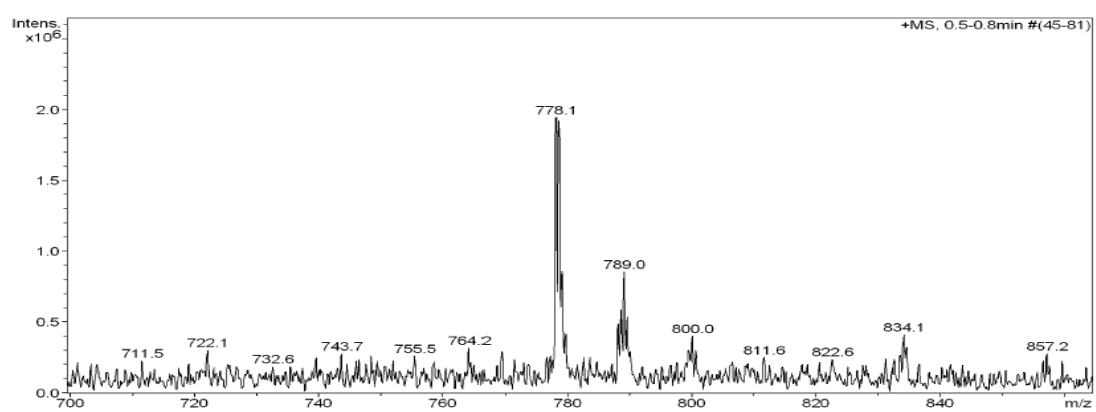
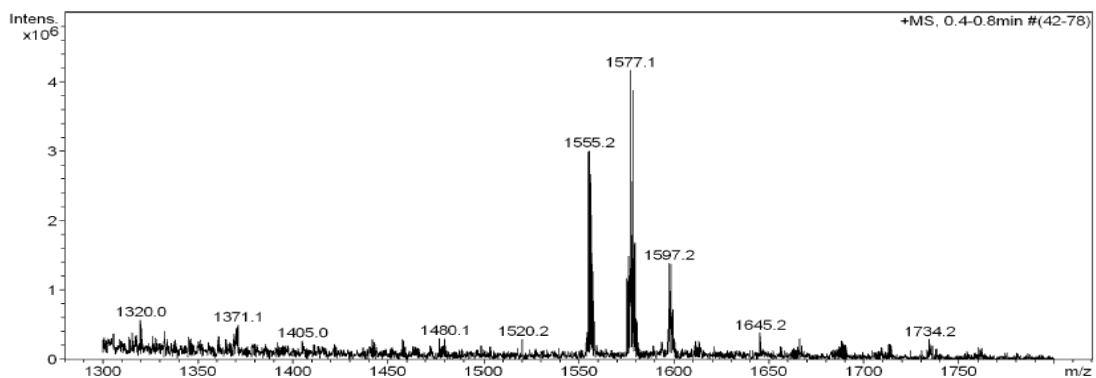
c(Lys-Lys(CO-Tr-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC742)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

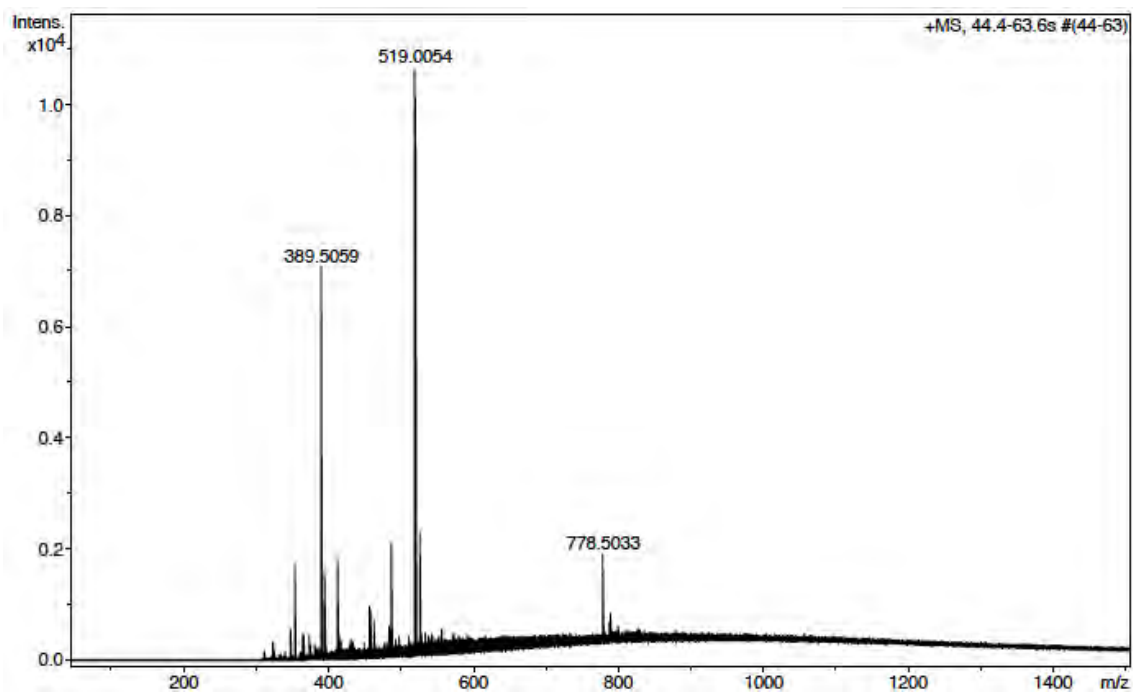


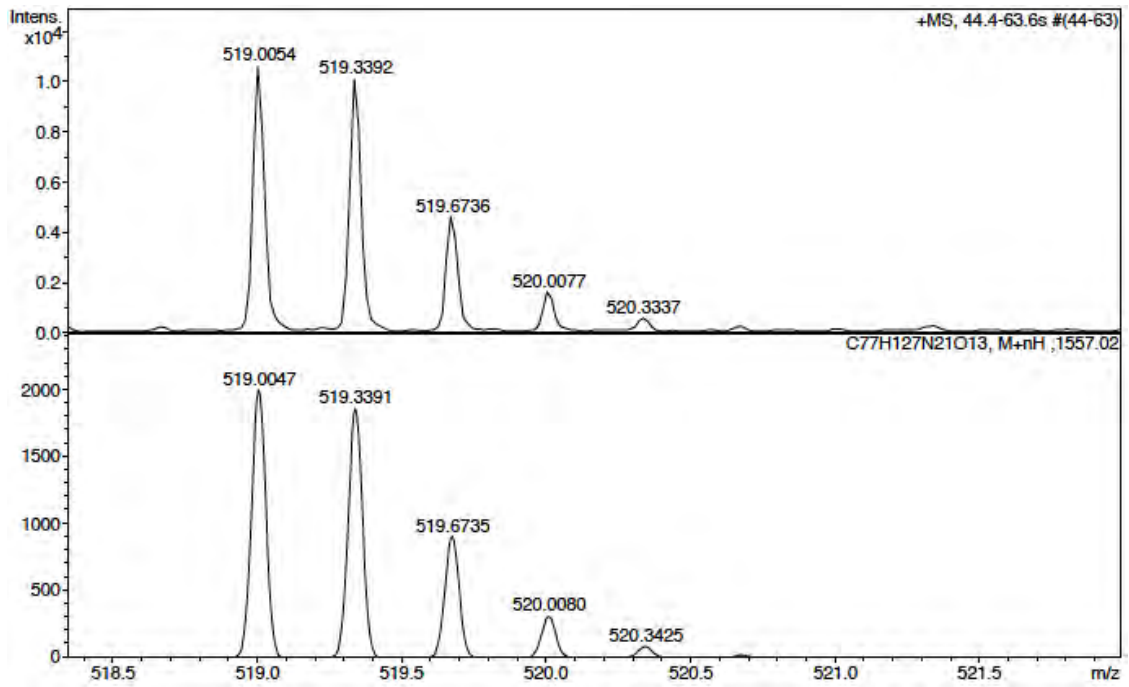
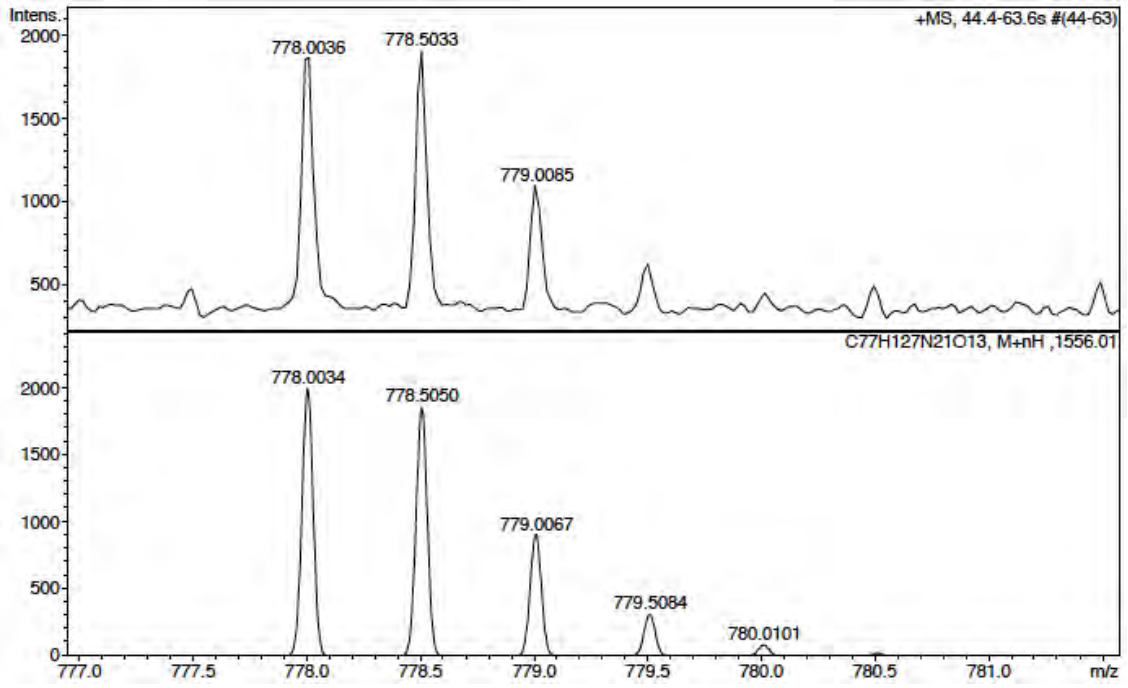
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,38	65,449	4,417	1,25
2	7,00	602,669	349,154	98,75
Total:		668,118	353,571	100,00

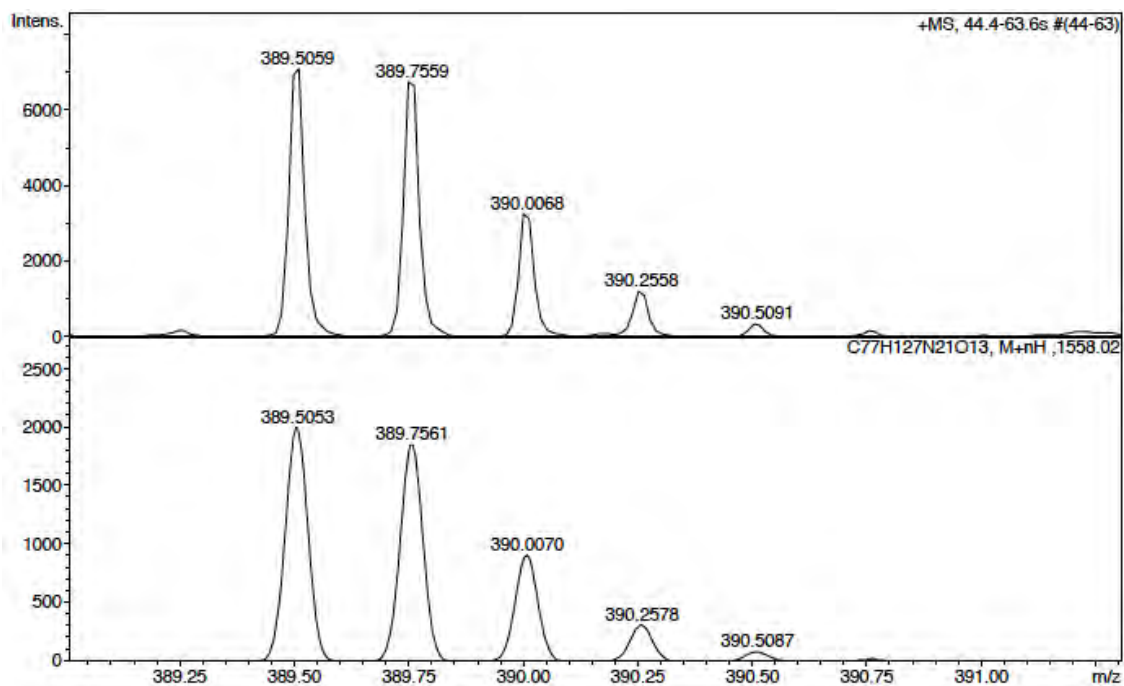
### ESI-MS ( $m/z$ )



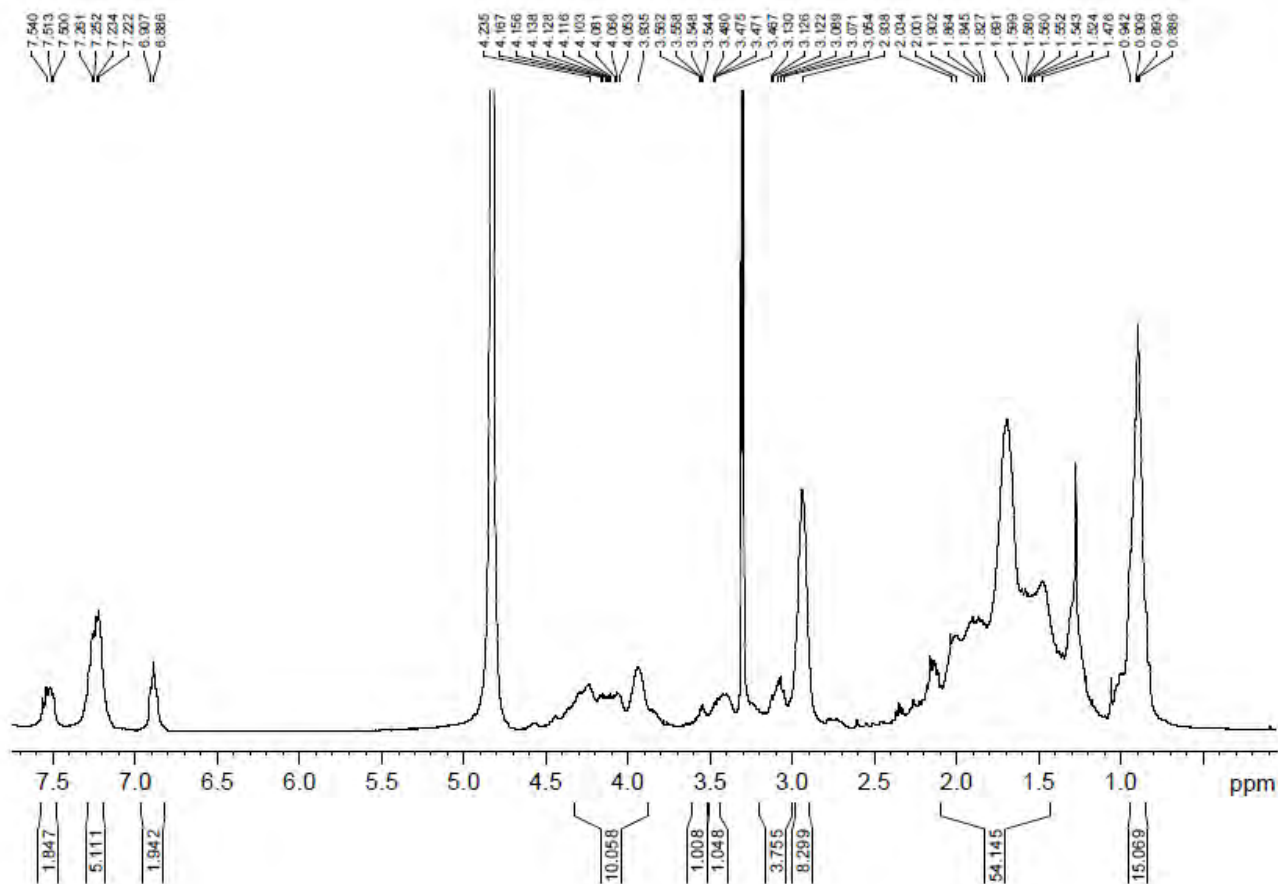
### HRMS (ESI) $m/z$





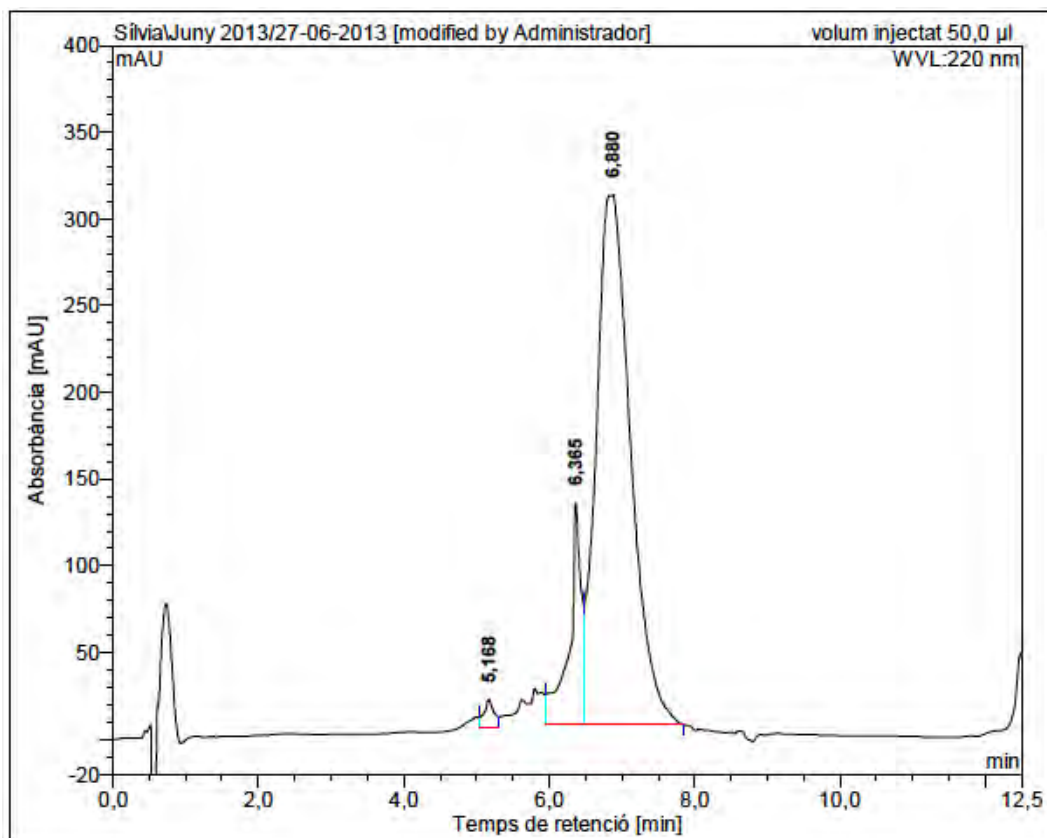


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm)



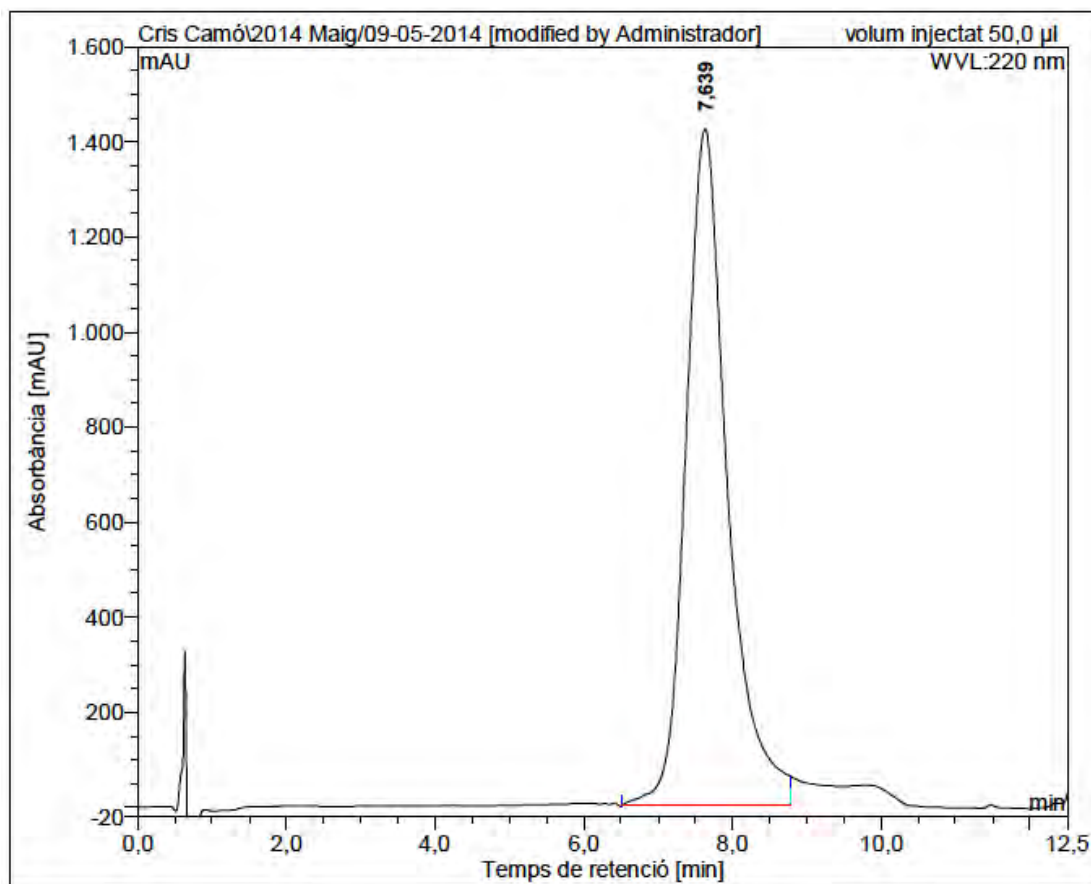
c(Lys-Lys(CO-Tr)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC744)

HPLC ( $\lambda=220$  nm) (before purification)



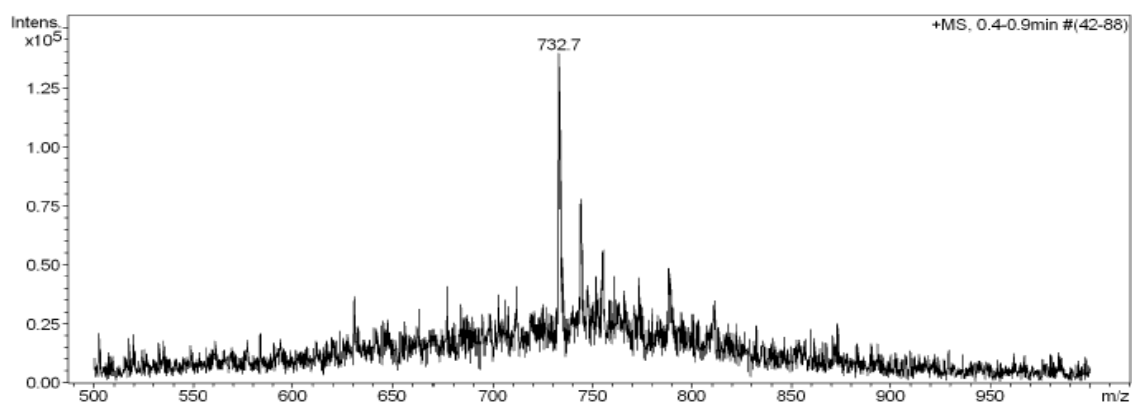
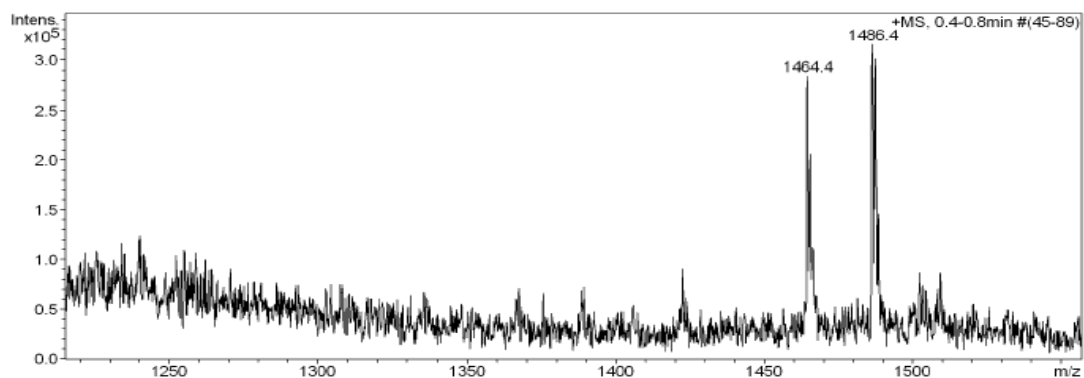
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,17	15,752	2,554	1,32
2	6,36	128,005	24,677	12,71
3	6,88	305,632	166,860	85,97
Total:		449,389	194,091	100,00

HPLC ( $\lambda=220$  nm) (after purification)

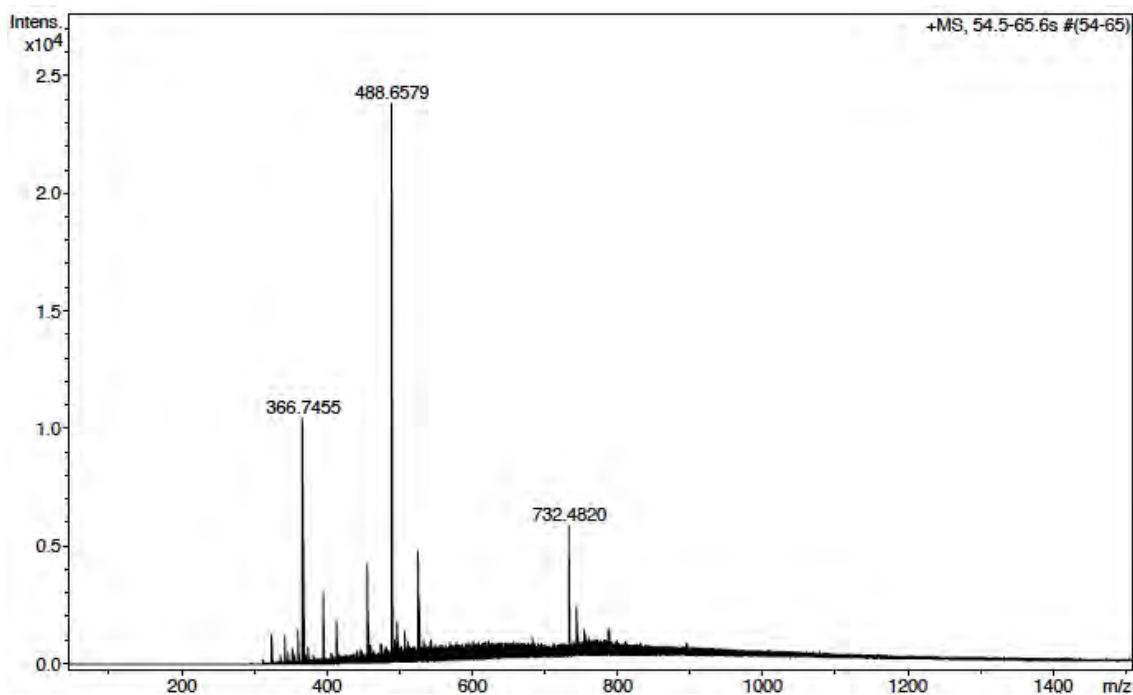


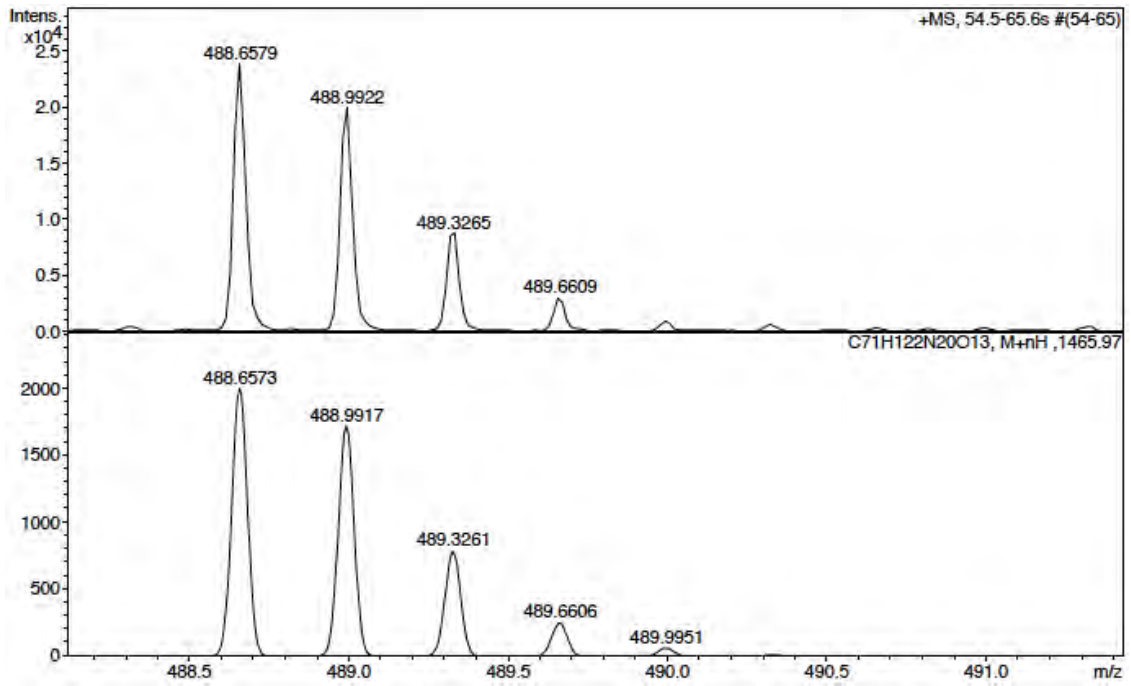
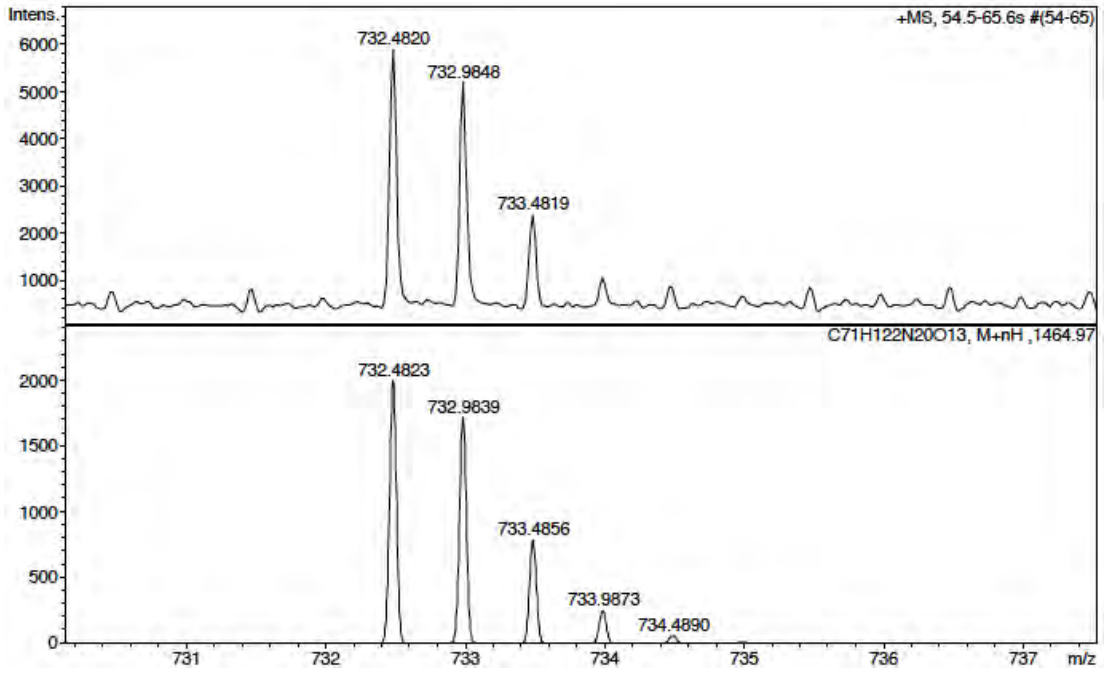
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,64	1422,782	924,916	100,00
Total:		1422,782	924,916	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )

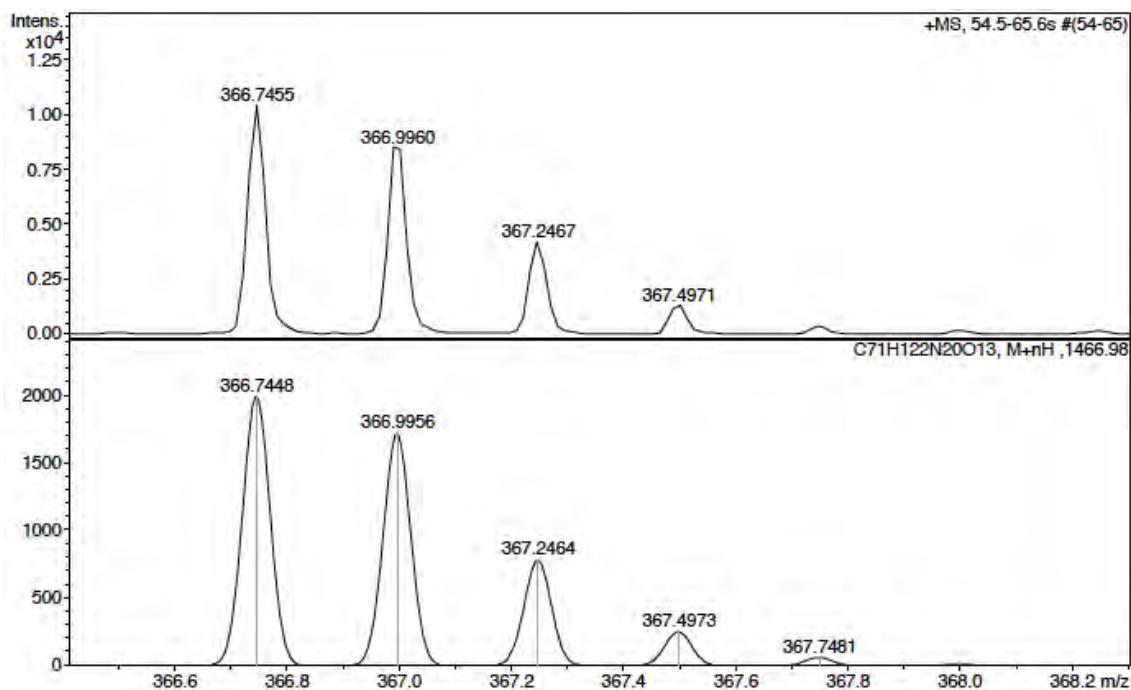


HRMS (ESI)  $m/z$

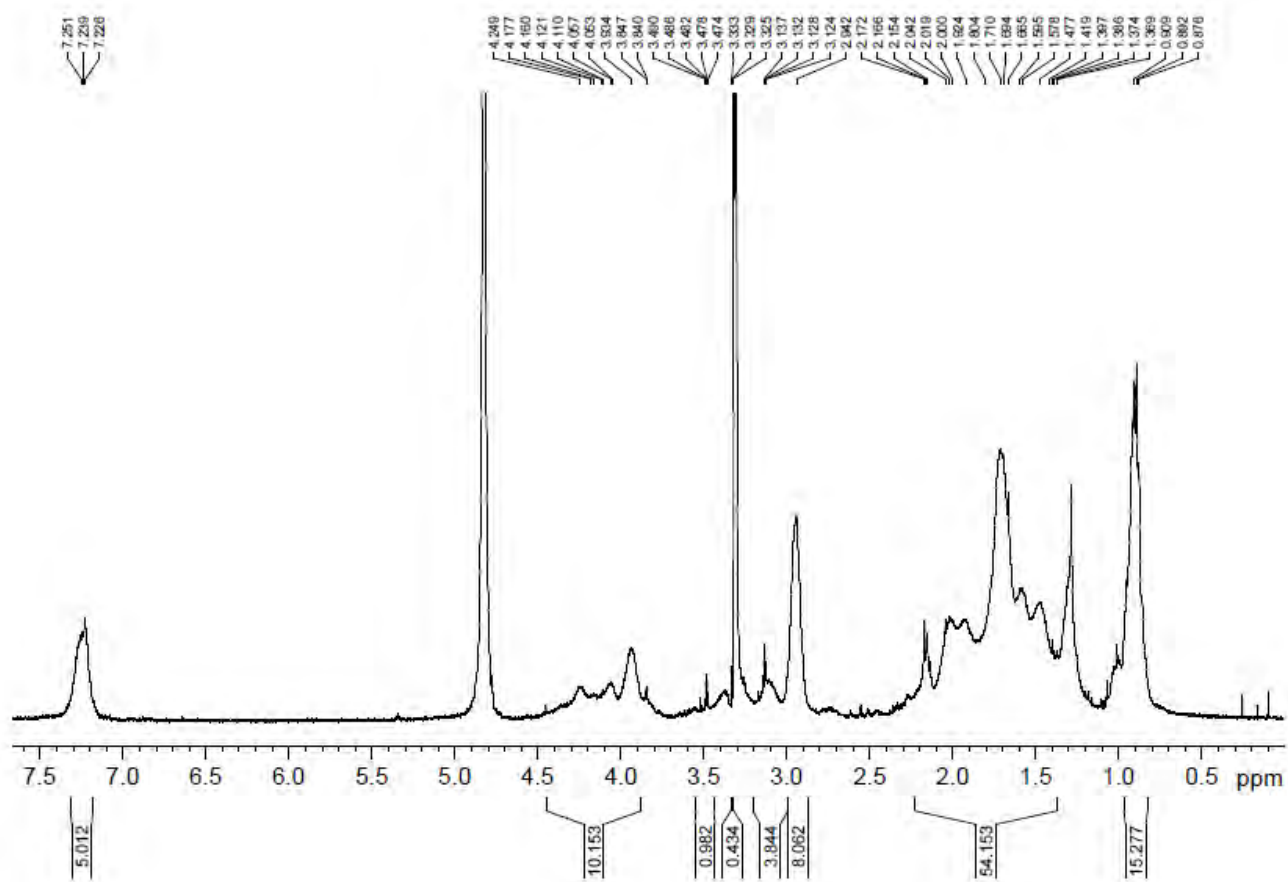






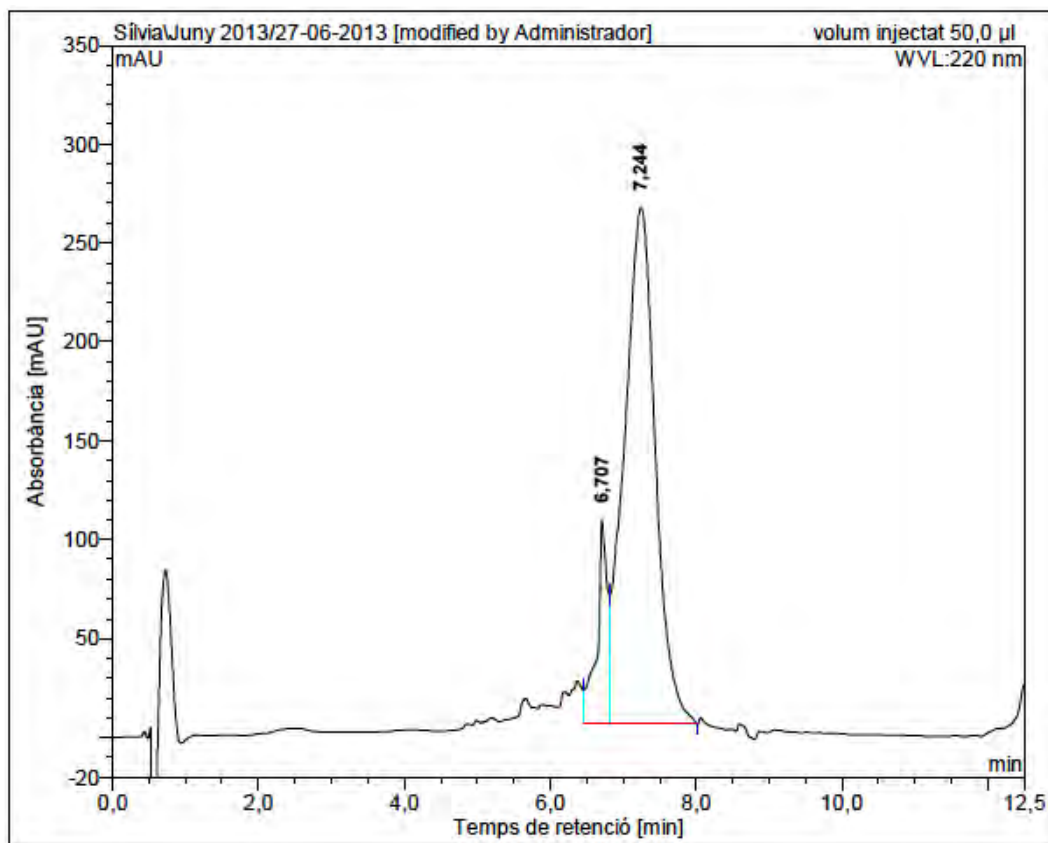


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm)



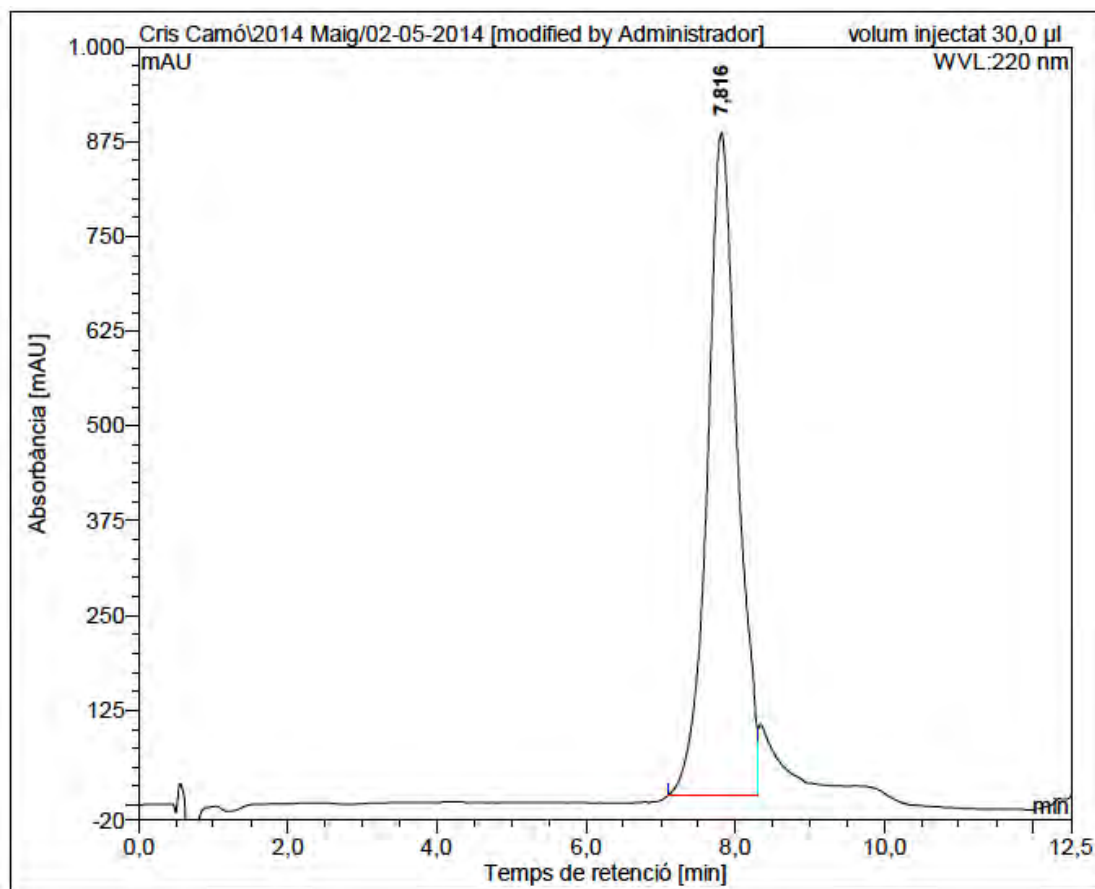
c(Lys-Lys(CO-Tr-Ph)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC746)

HPLC ( $\lambda=220$  nm) (before purification)



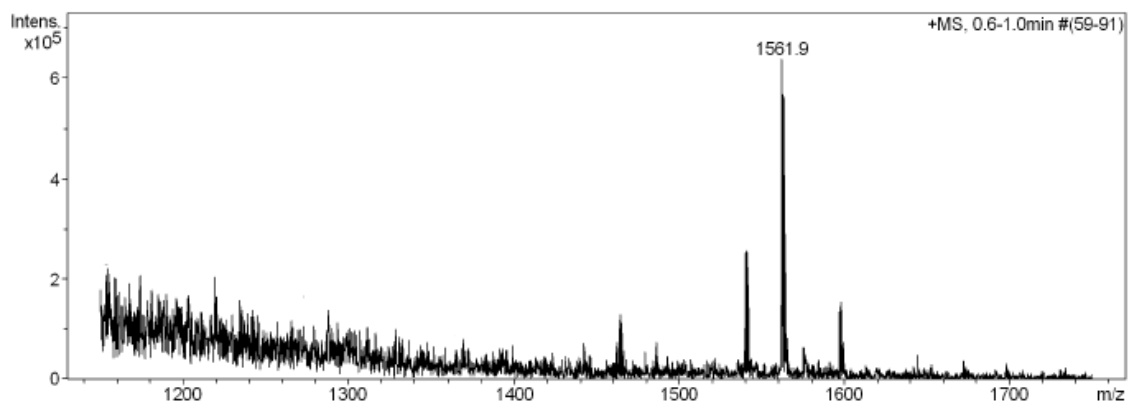
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,71	103,293	17,503	11,98
2	7,24	260,945	128,598	88,02
Total:		364,239	146,100	100,00

HPLC ( $\lambda=220$  nm) (after purification)

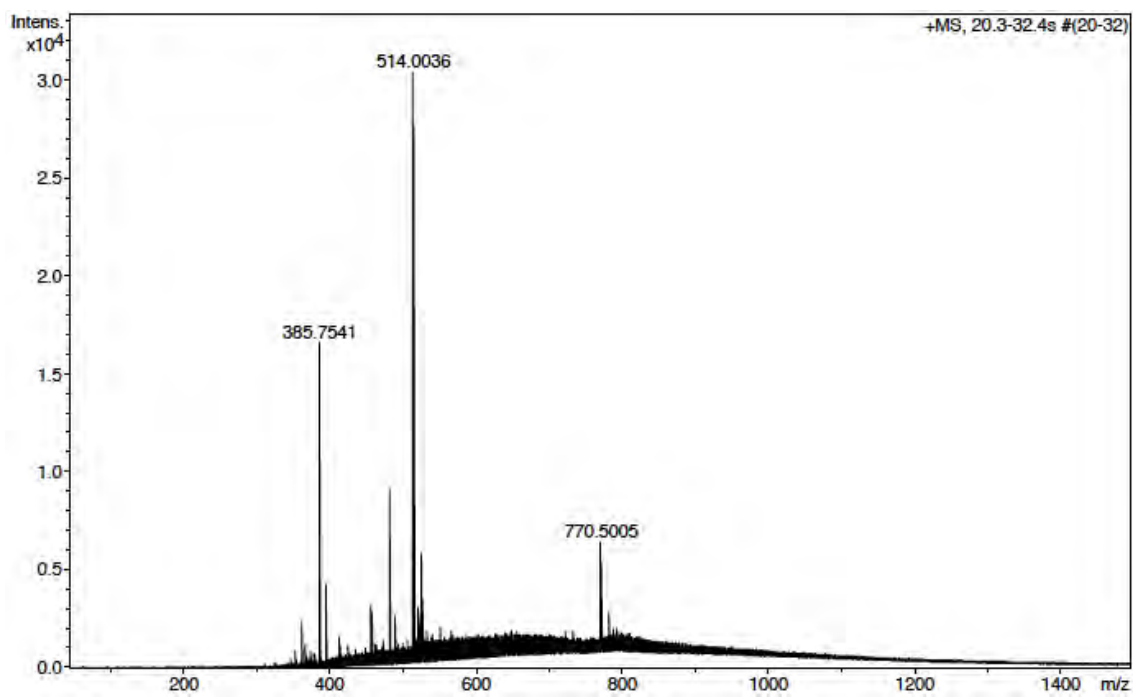


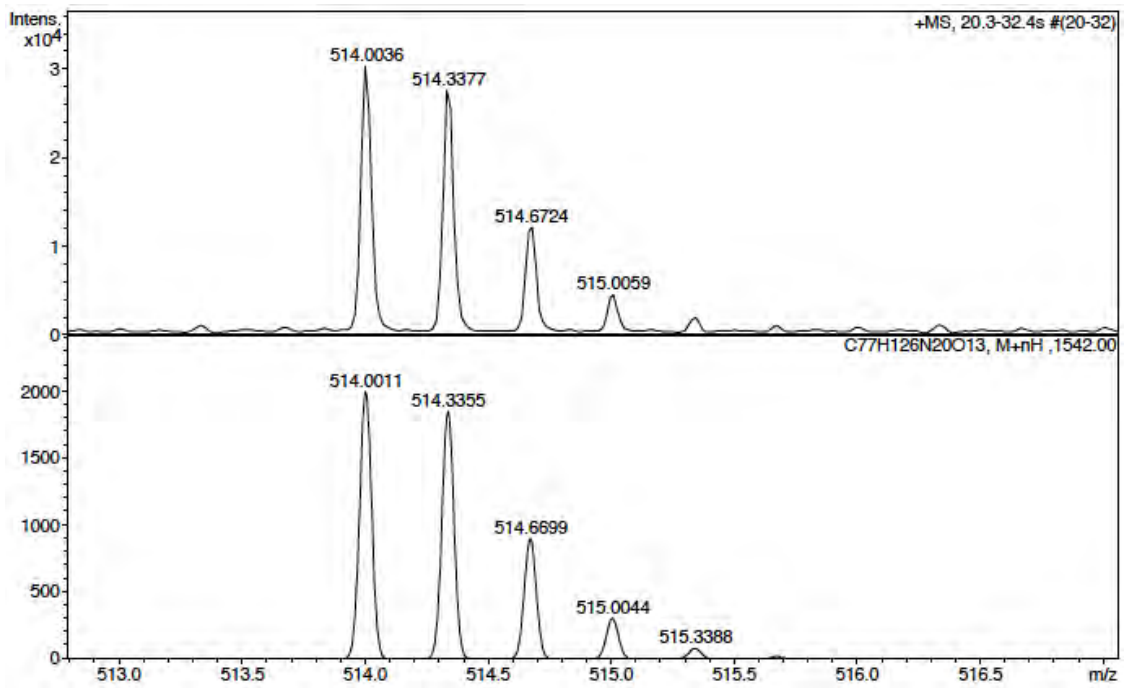
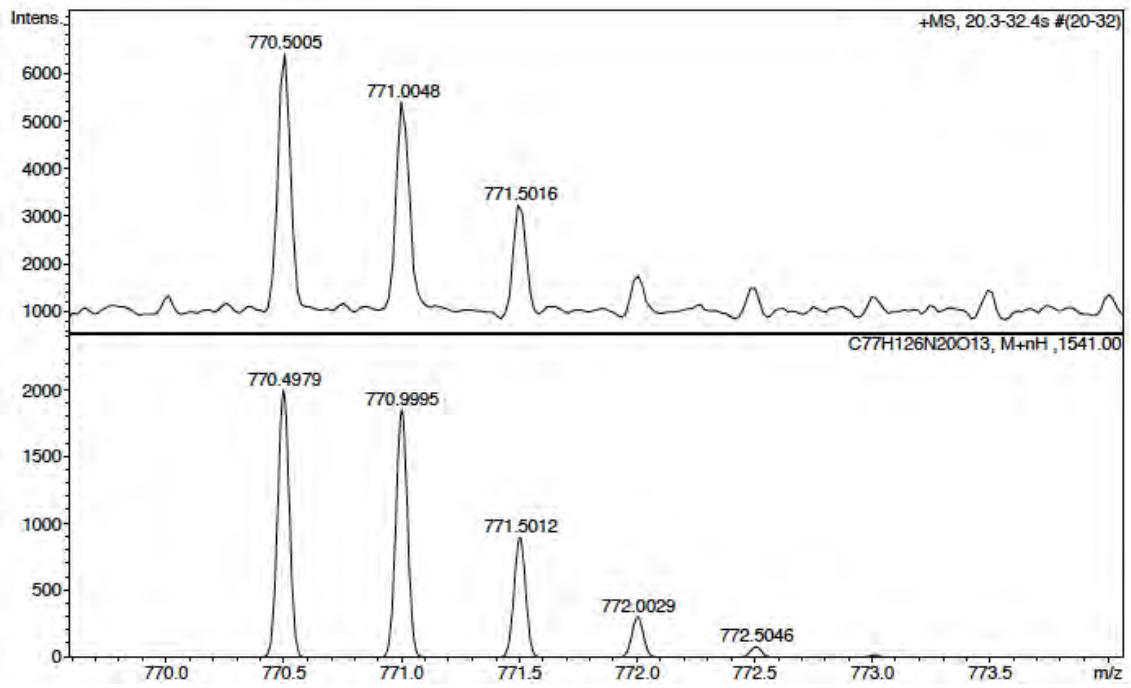
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,82	874,892	405,105	100,00
Total:		874,892	405,105	100,00

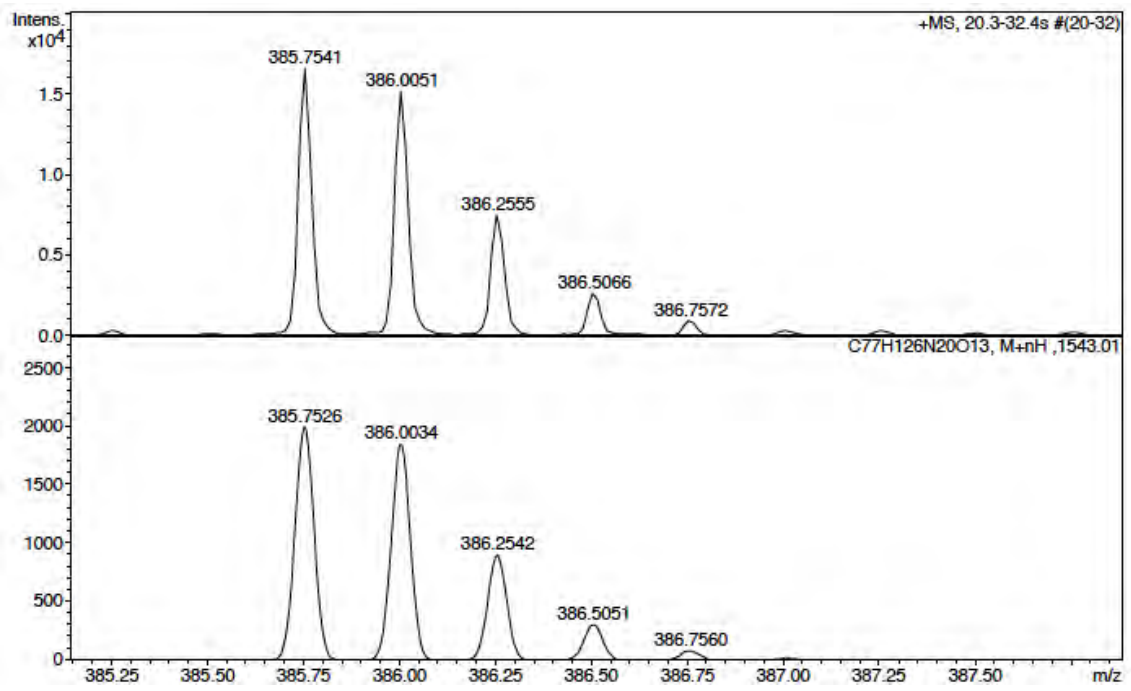
ESI-MS ( $m/z$ )



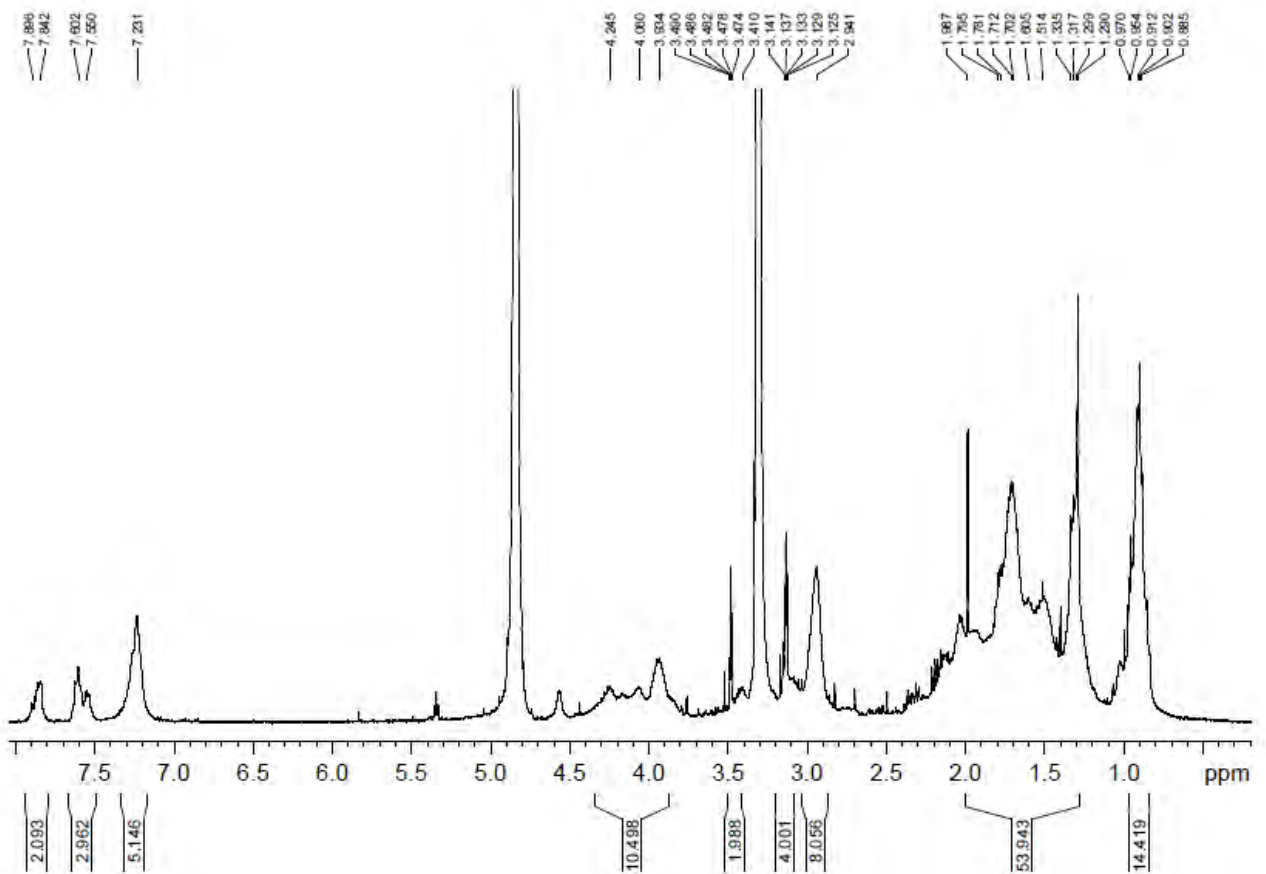
HRMS (ESI)  $m/z$





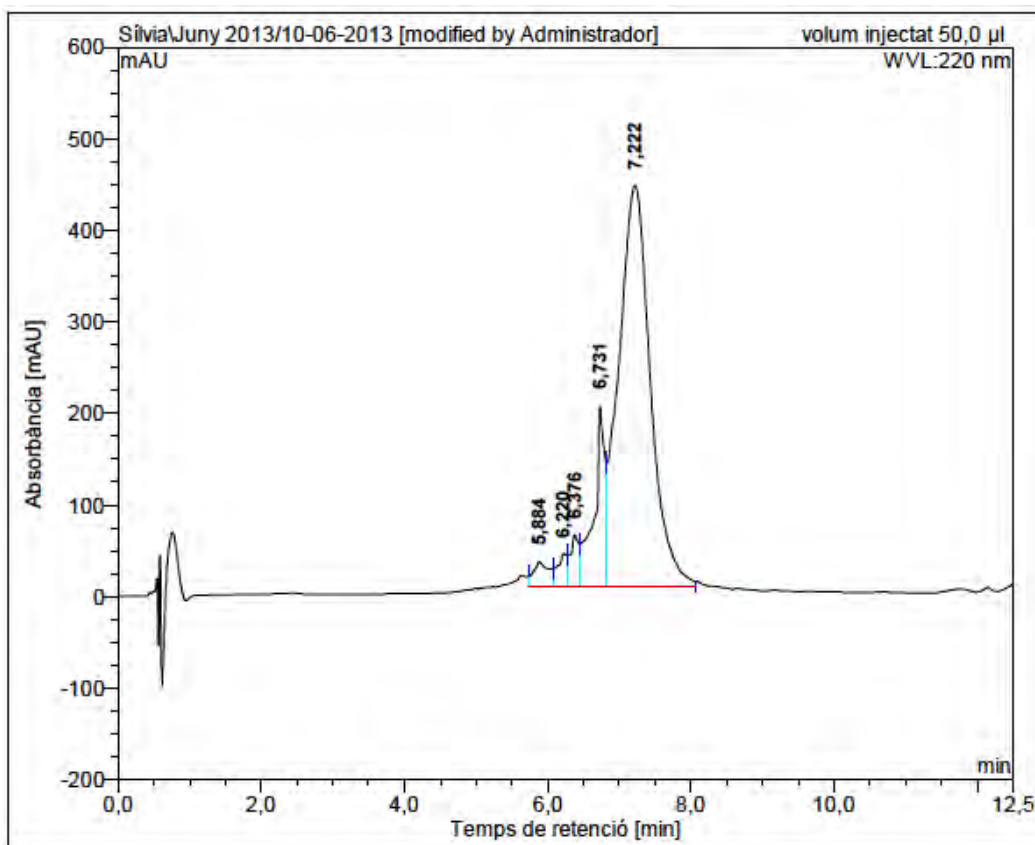


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm)



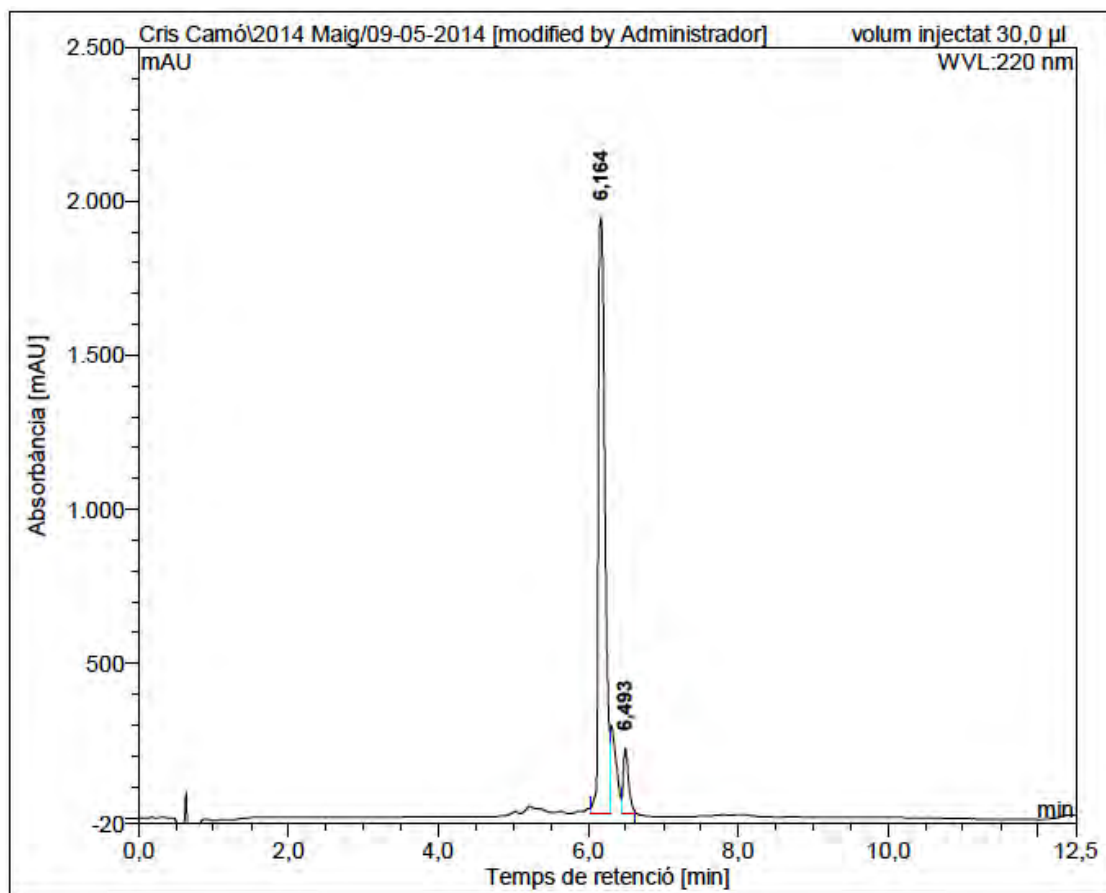
c(Lys-Lys(CO-Tr-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OMe)-Leu-Lys-Lys(CO-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) (BPC748)

HPLC ( $\lambda=220$  nm) (before purification)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,88	27,339	6,781	2,43
2	6,22	36,589	5,526	1,98
3	6,38	56,839	8,191	2,93
4	6,73	197,642	34,854	12,48
5	7,22	438,410	223,956	80,18
Total:		756,818	279,308	100,00

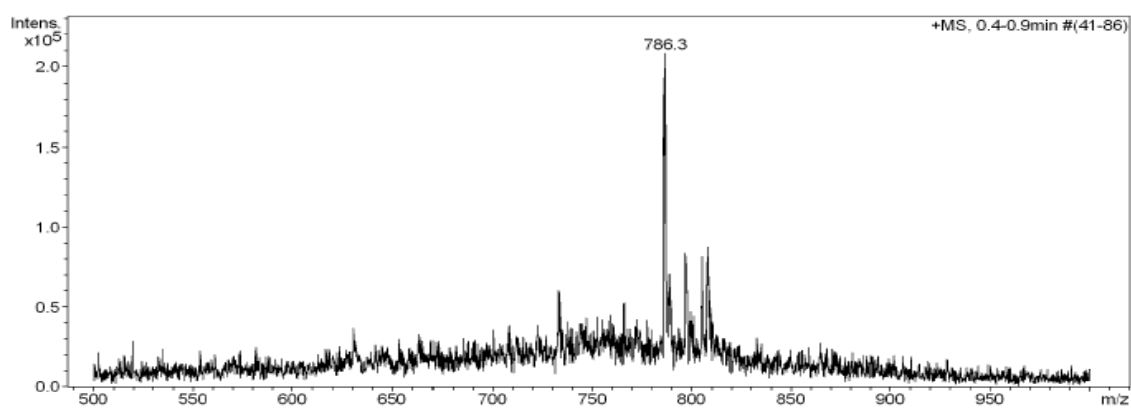
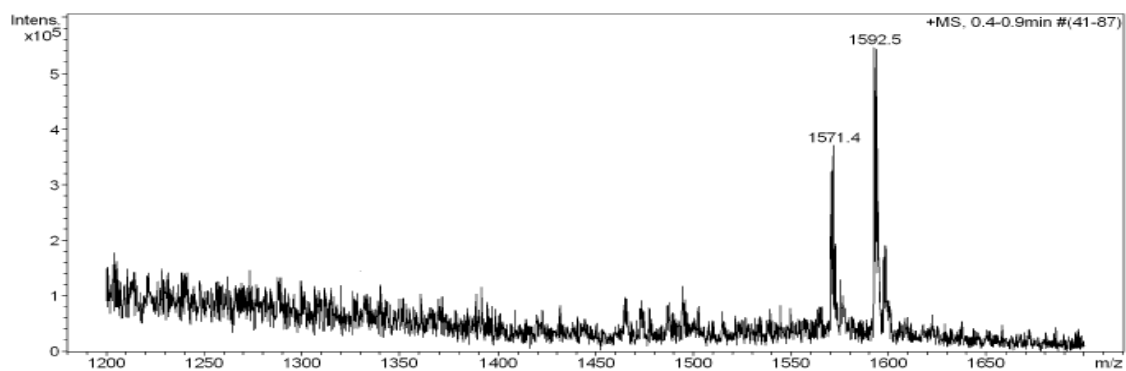
HPLC ( $\lambda=220$  nm) (after purification)



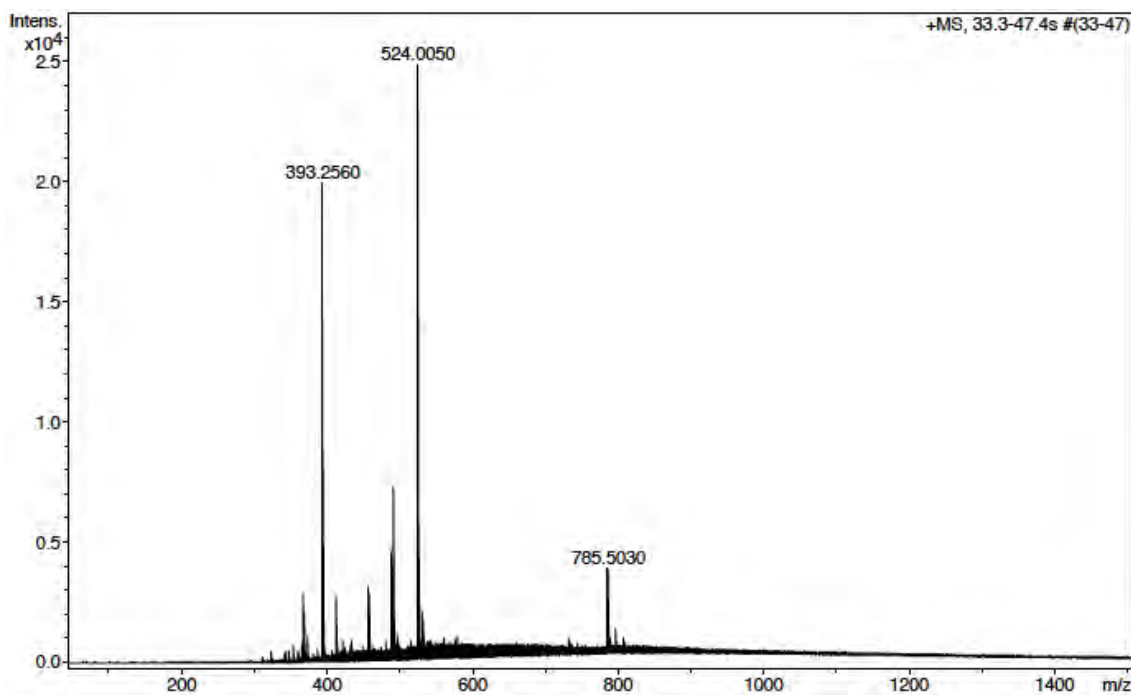
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,16	1934,083	199,089	91,94
2	6,49	212,649	17,452	8,06
Total:		2146,732	216,541	100,00

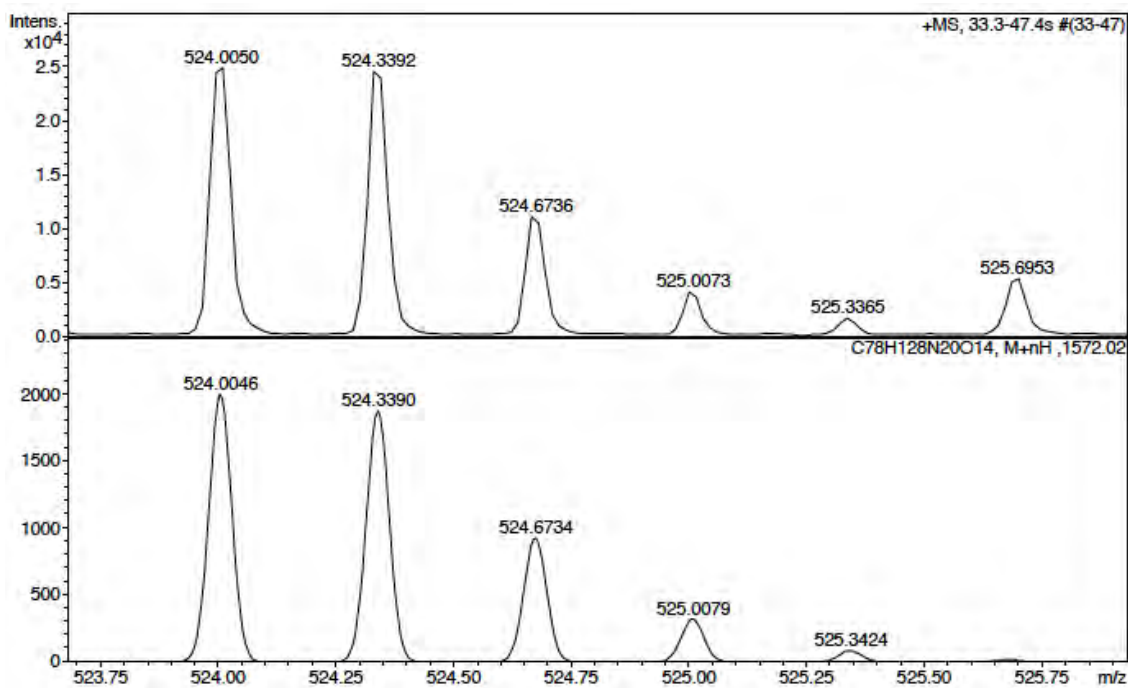
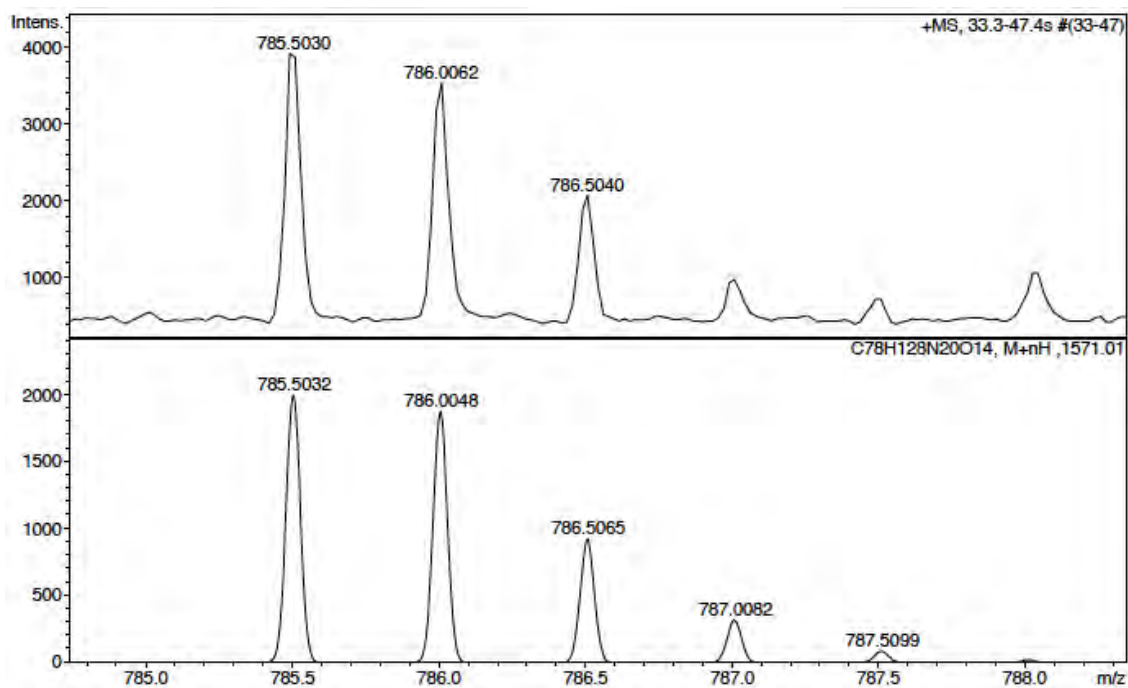


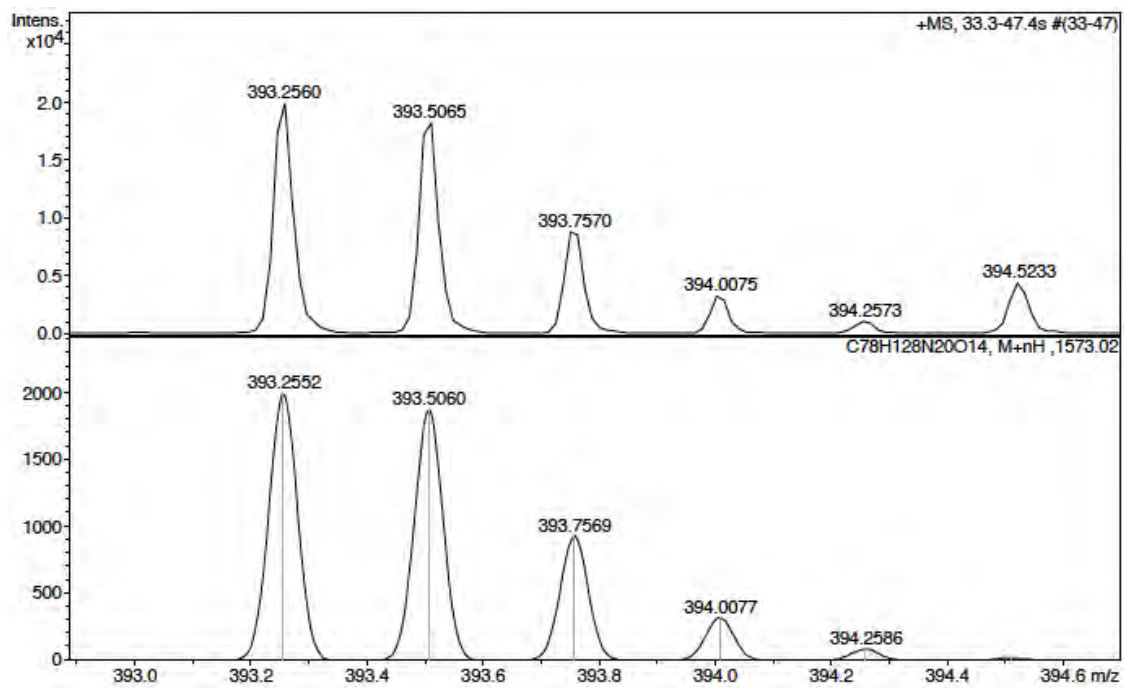
ESI-MS ( $m/z$ )



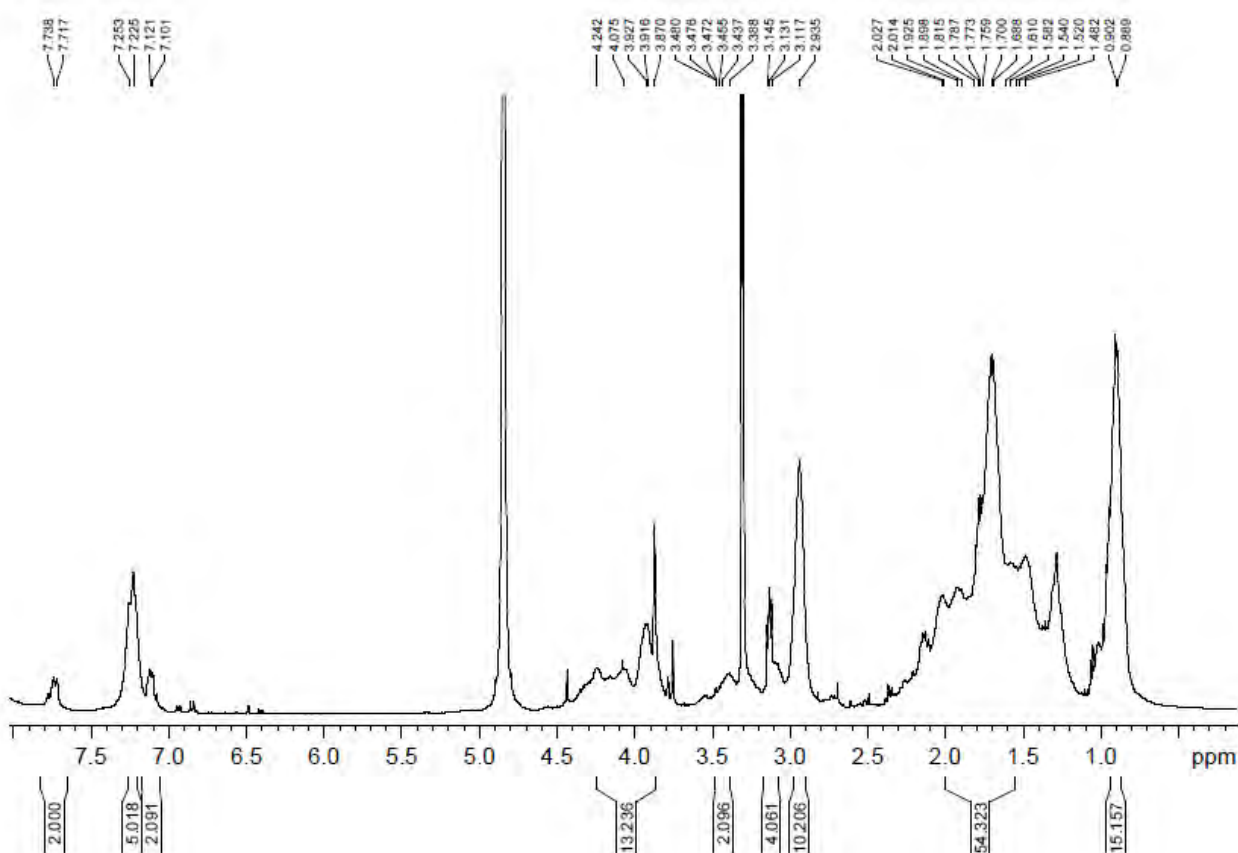
HRMS (ESI)  $m/z$







<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm)



## **A4. Solid-phase synthesis of peptide conjugates derived from the antimicrobial cyclic decapeptide BPC194**

Sílvia Vilà, Esther Badosa, Emilio Montesinos, Lidia Feliu\*, and Marta Planas\*

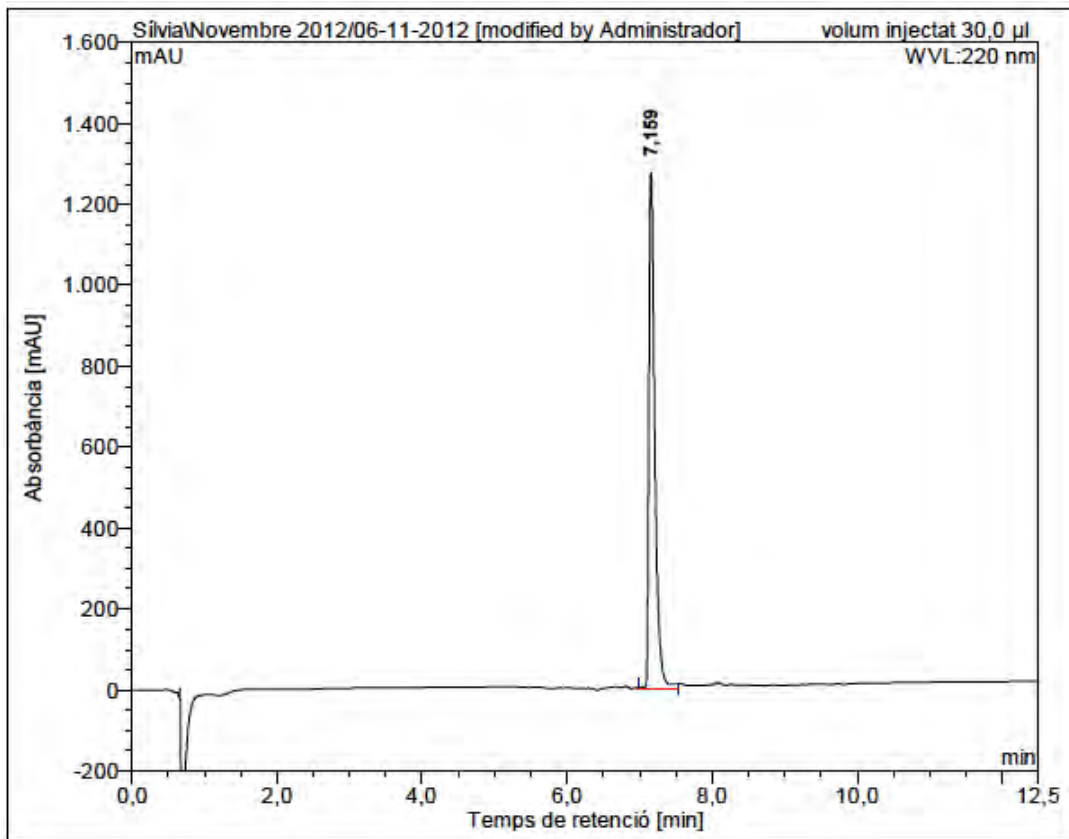
### **Table of contents**

1. Synthesis of amino acid derivatives.....	258
2. Synthesis of azidopeptides .....	275
3. Synthesis of linear peptidyl resins .....	293
4. Synthesis of cyclic peptidyl resins.....	299
5. Peptide conjugates .....	309

## 1. Synthesis of amino acid derivatives

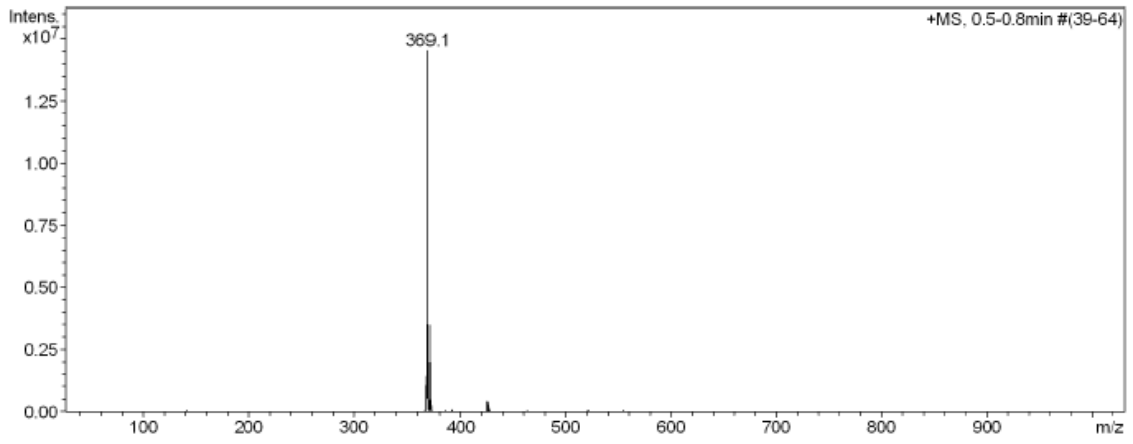
Fmoc-Lys-OH

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

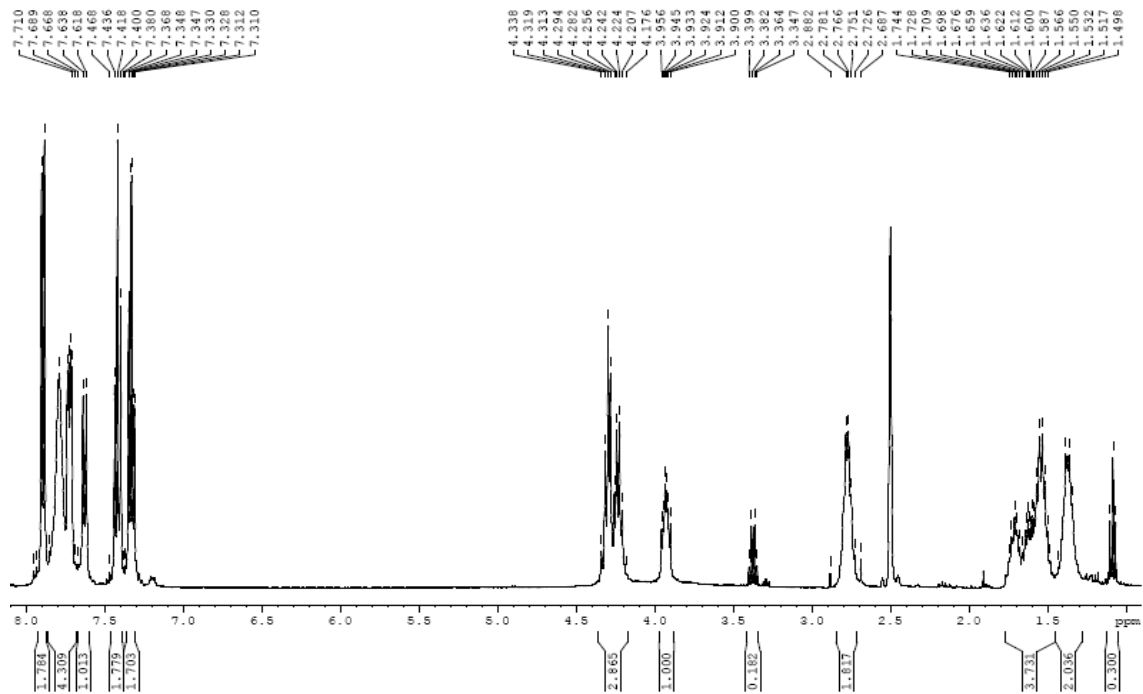


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,16	1274,487	121,162	100,00
Total:		1274,487	121,162	100,00

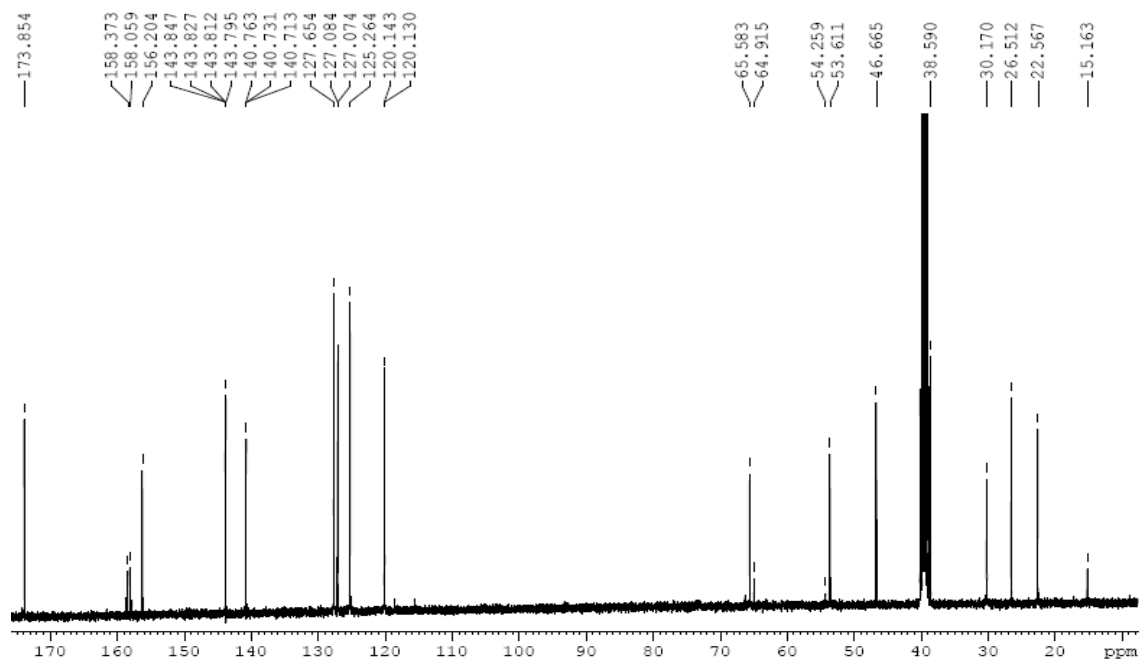
ESI-MS ( $m/z$ )



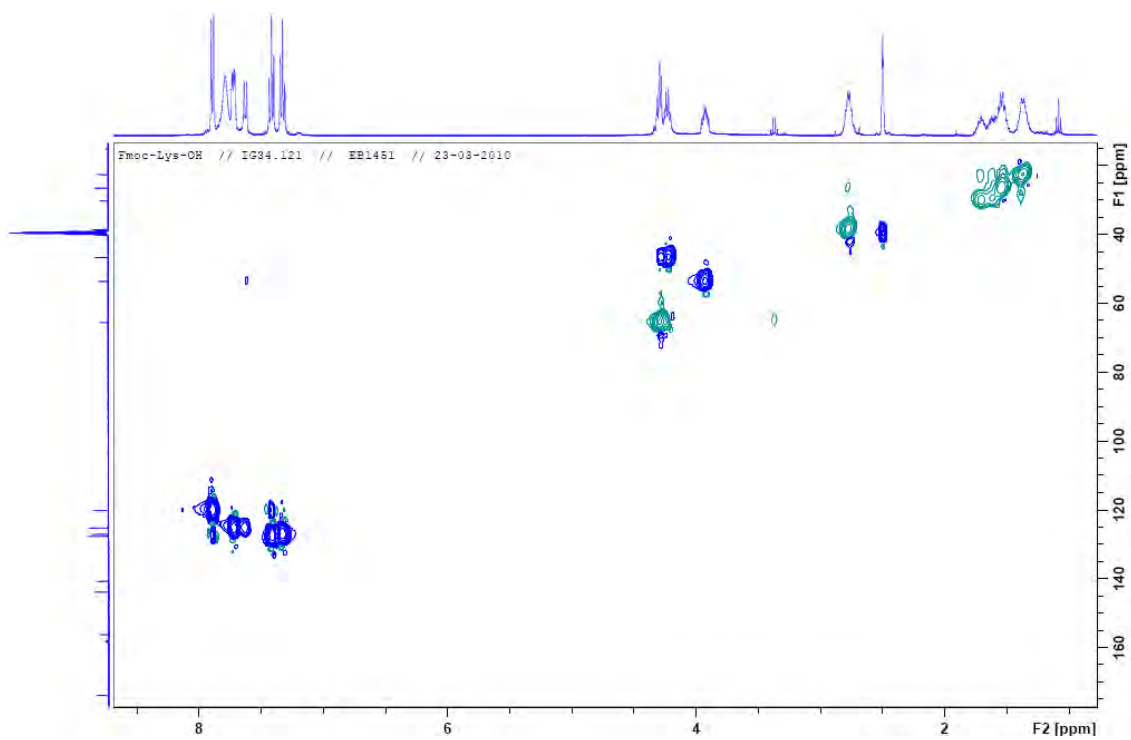
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)



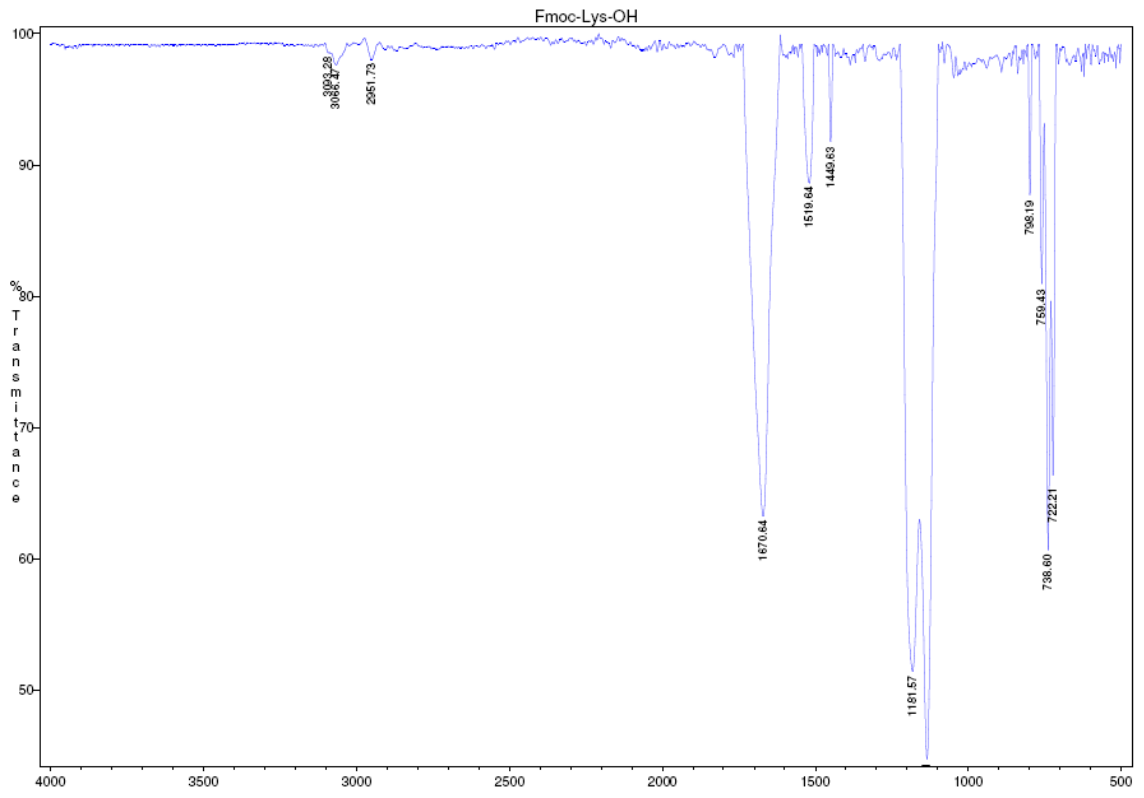
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)



HSQC edited (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ (ppm)



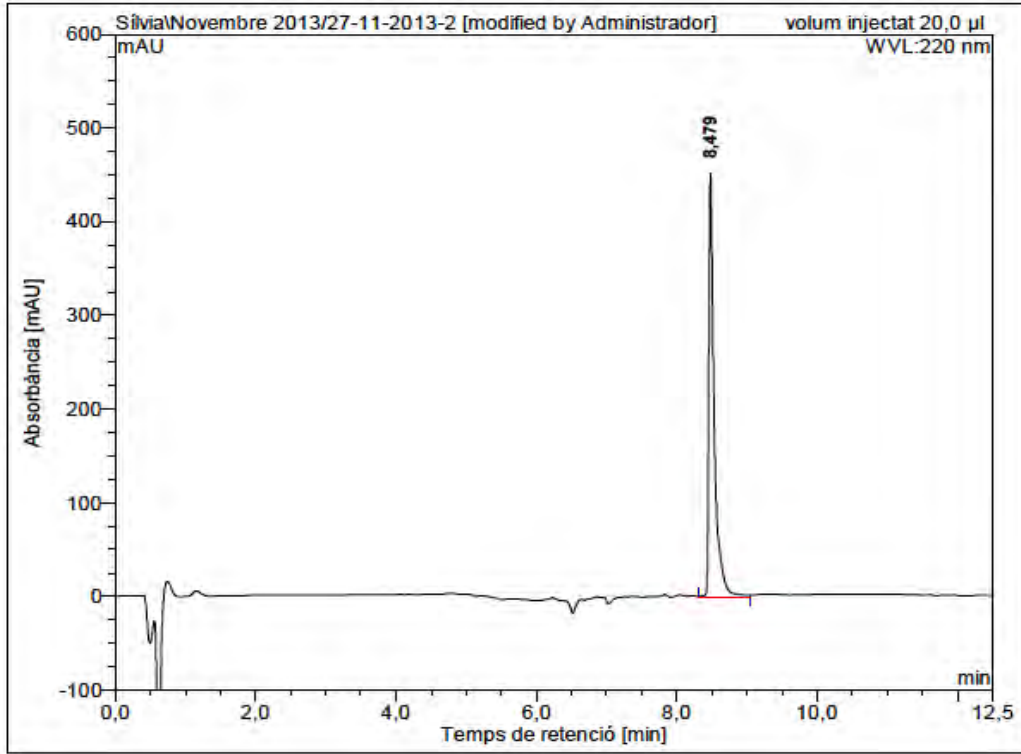
IR (neat)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)





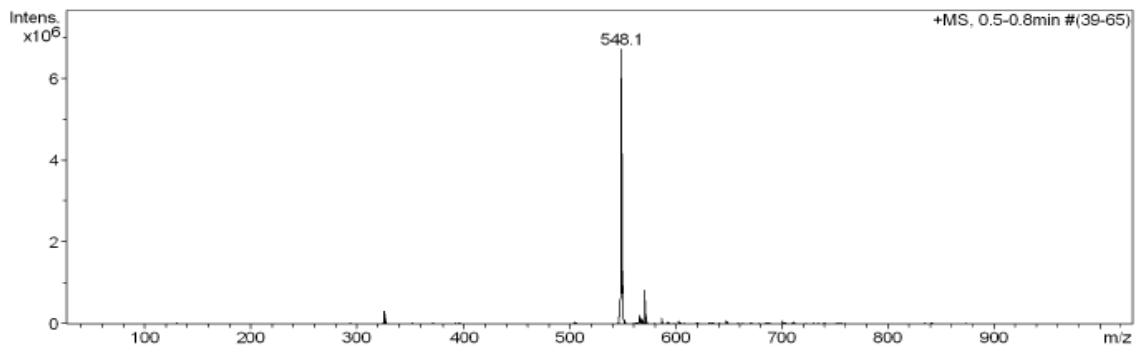
# Fmoc-Lys(pNZ)-OH

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

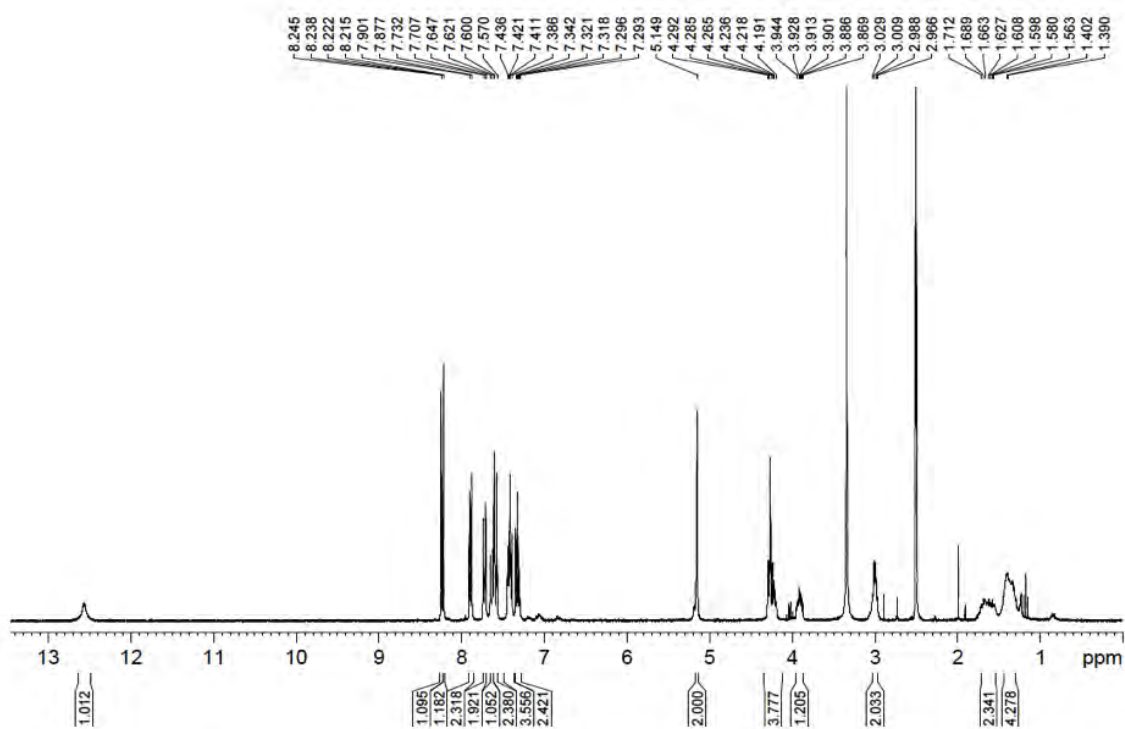


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,48	452,407	40,355	100,00
Total:		452,407	40,355	100,00

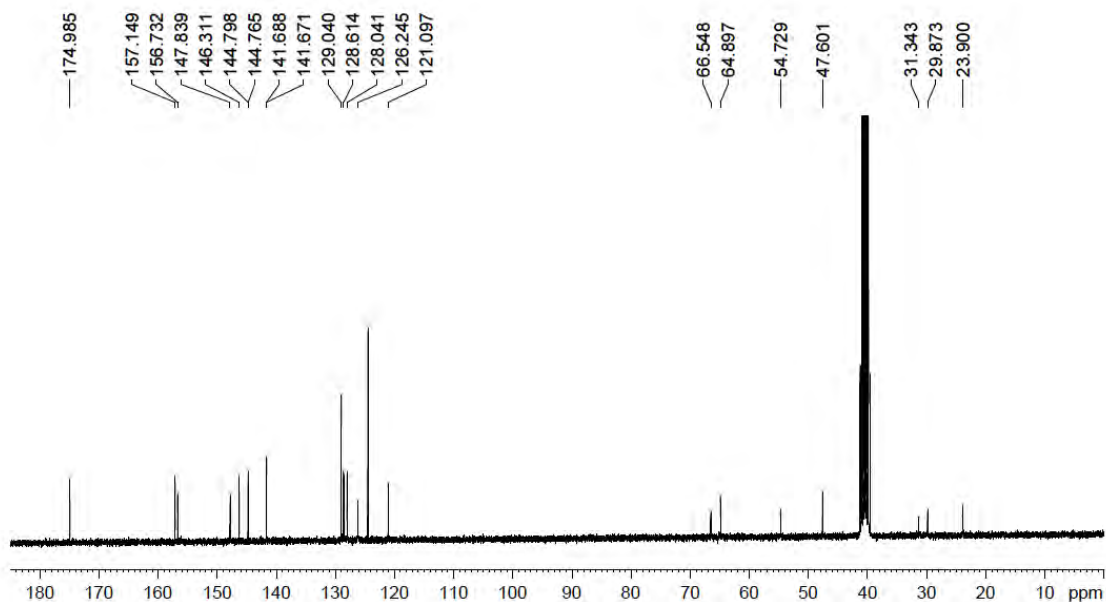
## ESI-MS ( $m/z$ )



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)

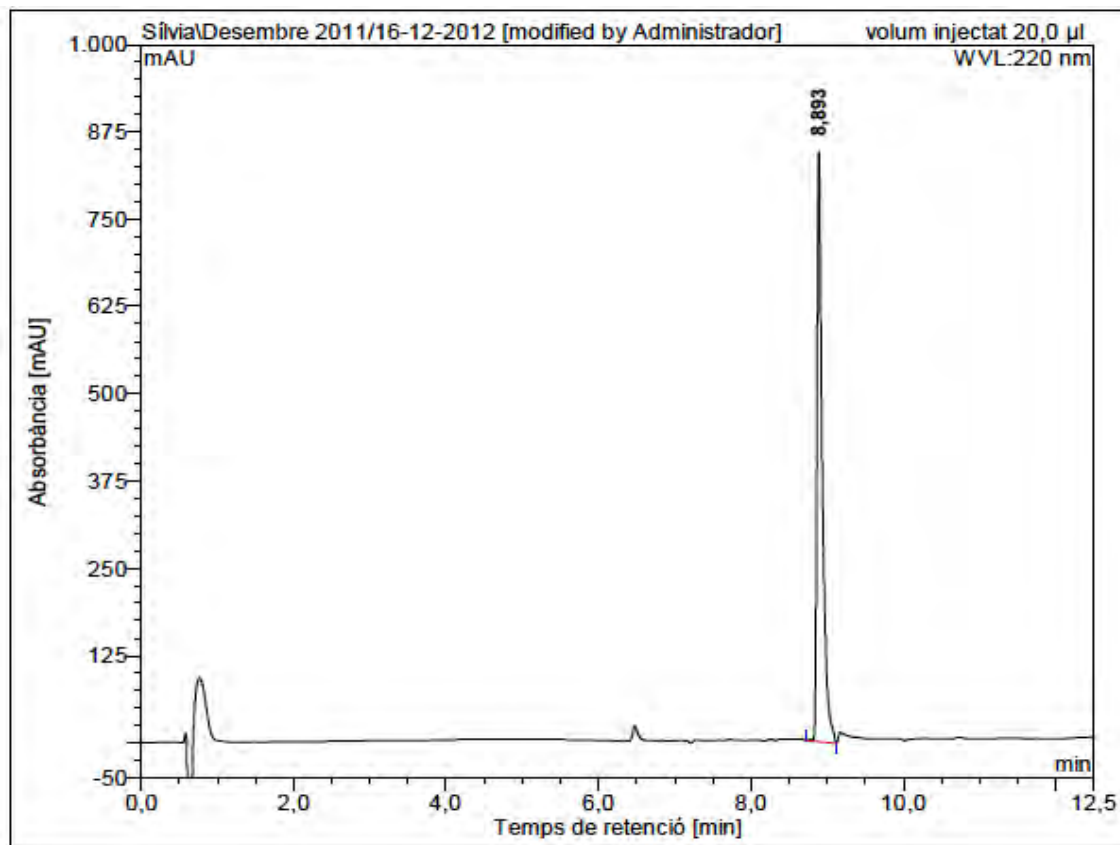


$^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



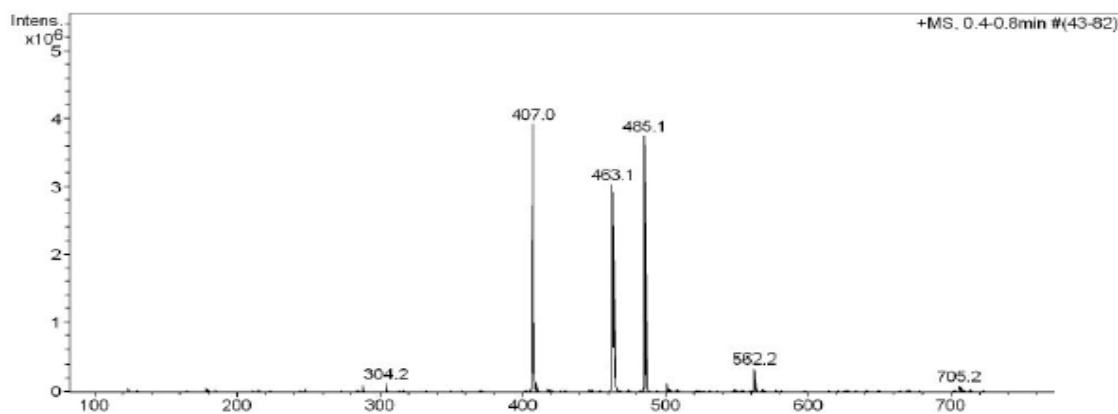
# Fmoc-Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-O<sup>t</sup>Bu

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

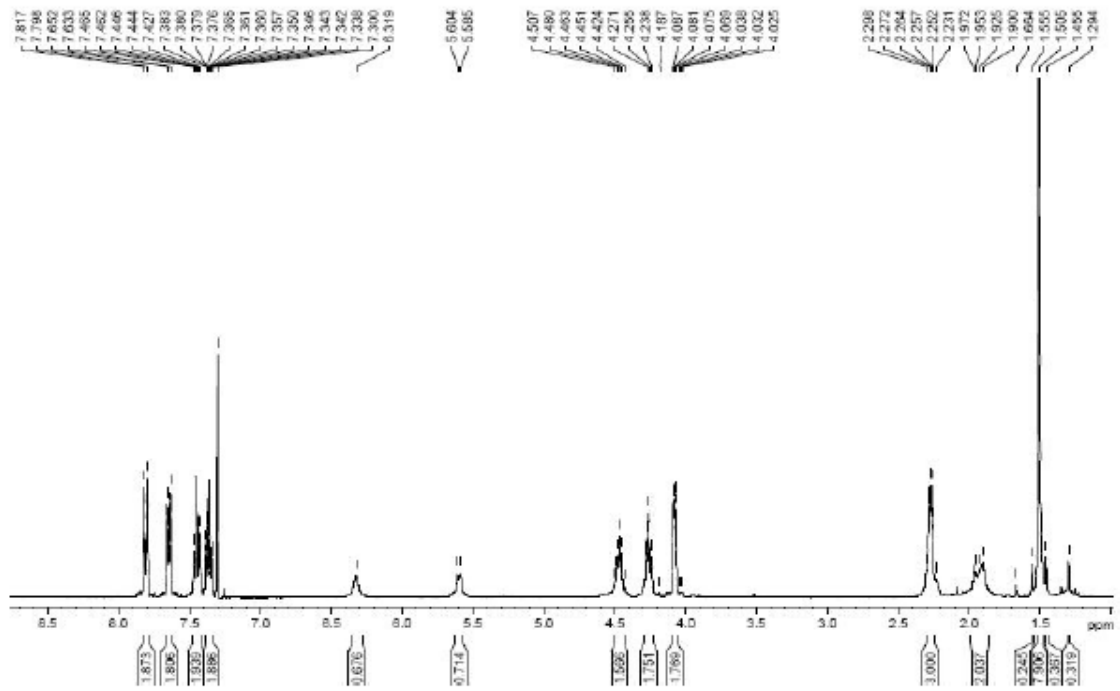


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,89	844,002	67,815	100,00
Total:		844,002	67,815	100,00

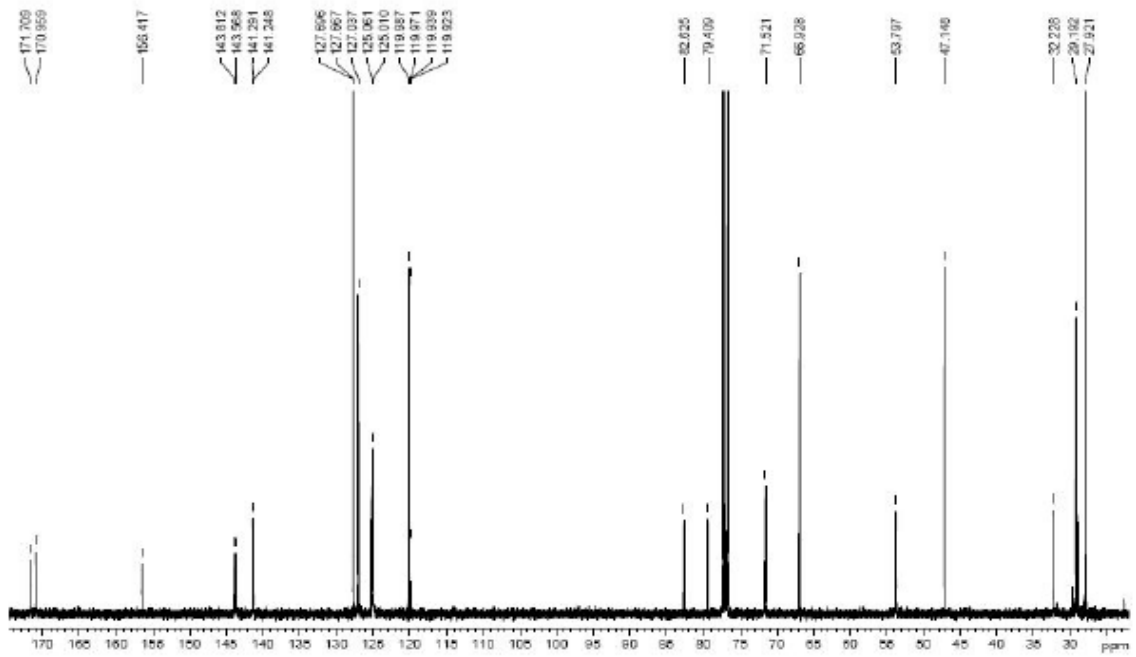
## ESI/MS ( $m/z$ )



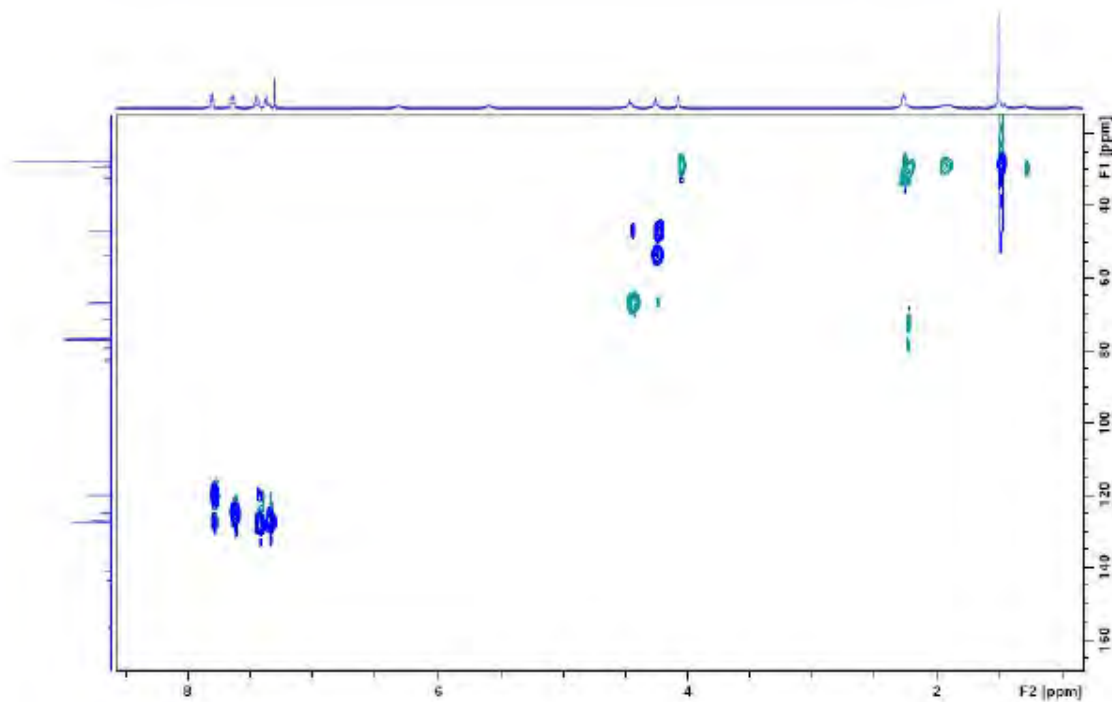
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)



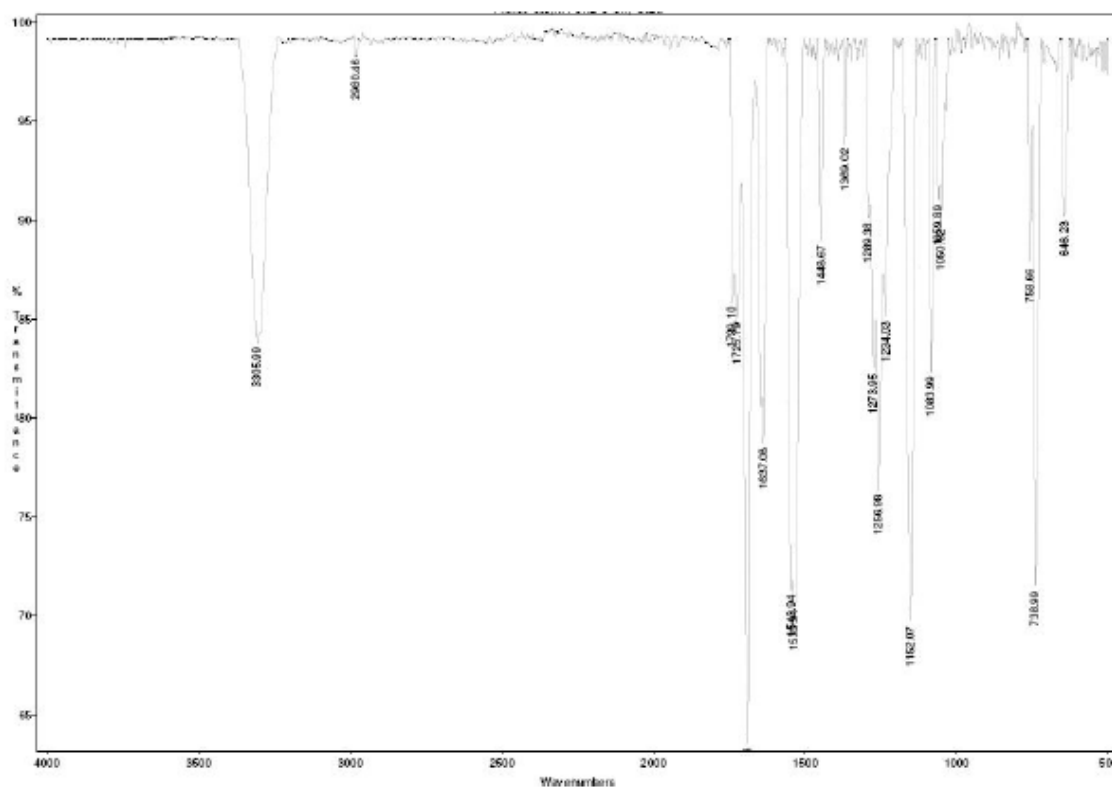
$^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)



HSQC edited (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)

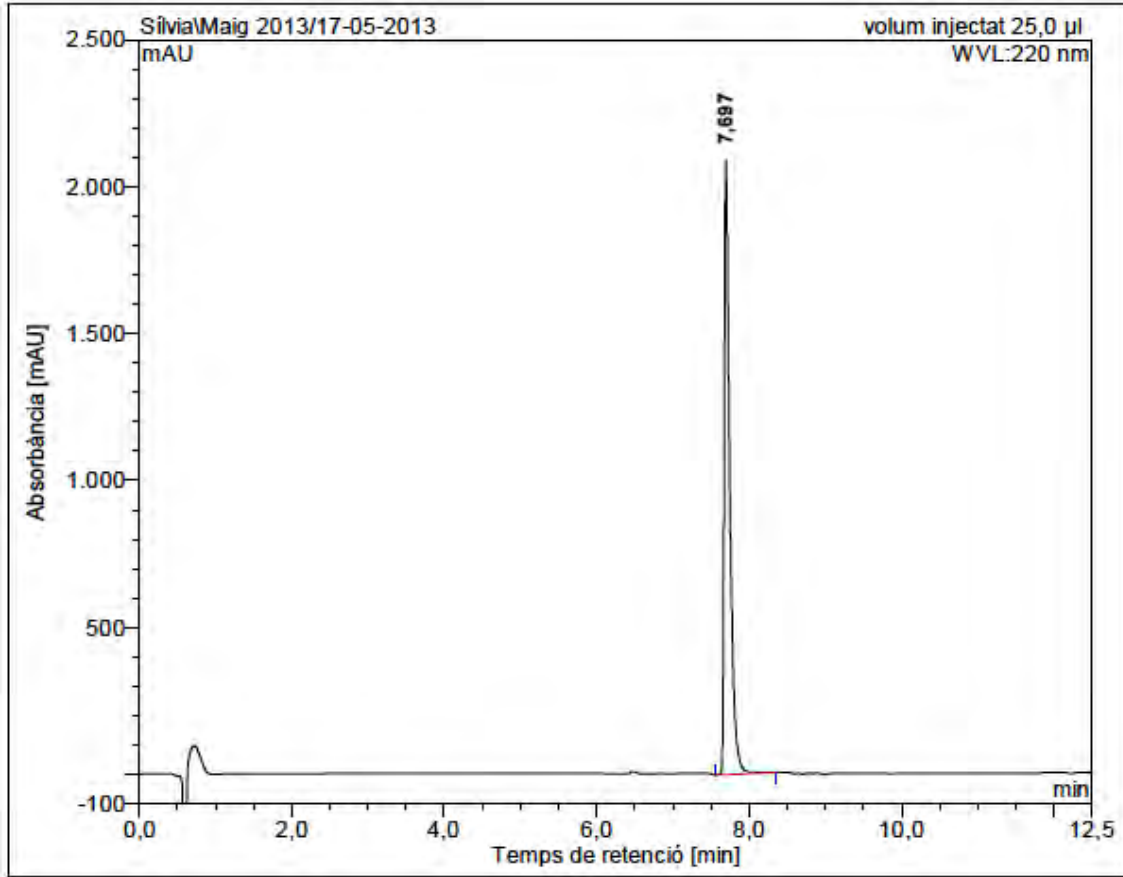


IR (neat) ν (cm<sup>-1</sup>)



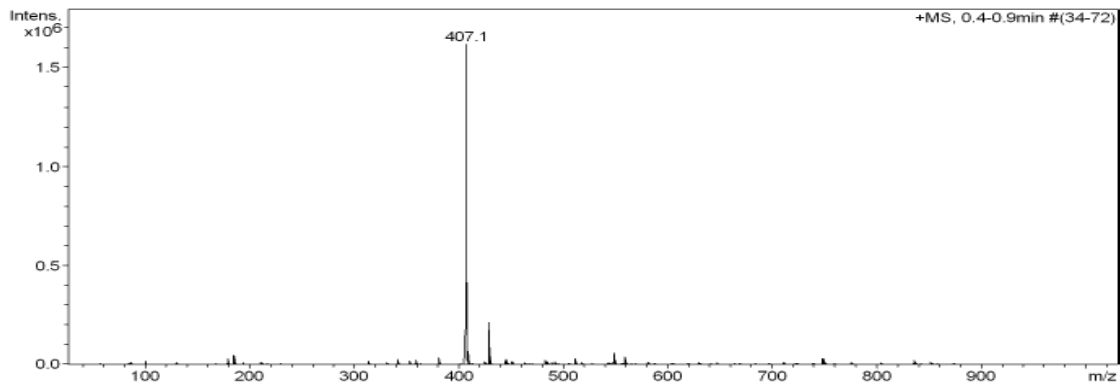
Fmoc- Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-OH

HPLC (λ=220 nm)

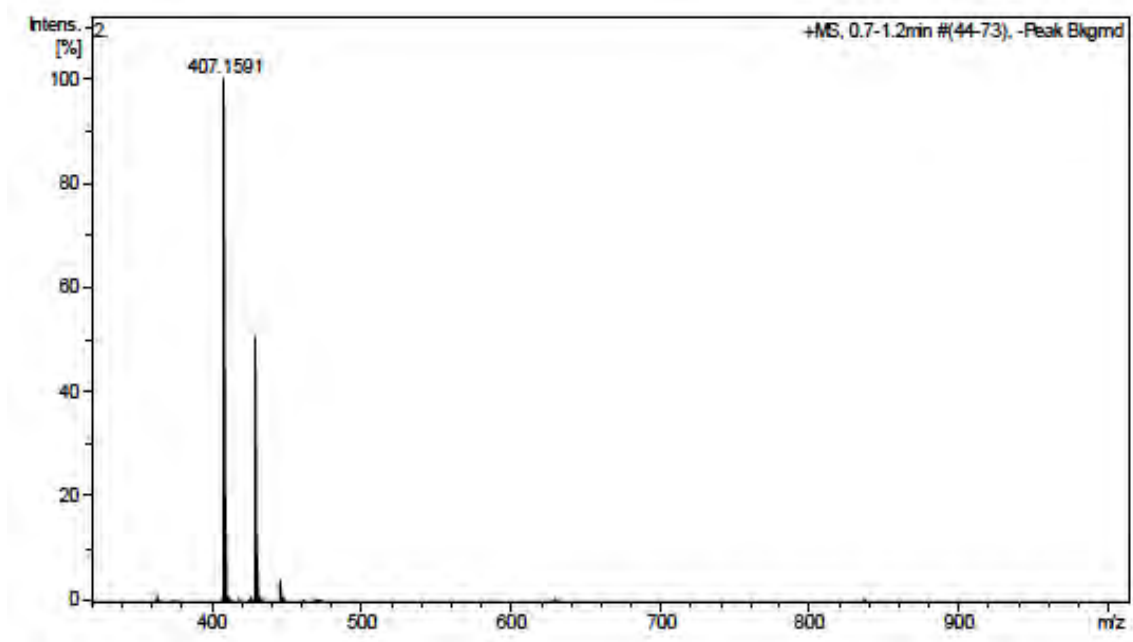


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,70	2091,221	176,855	100,00
Total:		2091,221	176,855	100,00

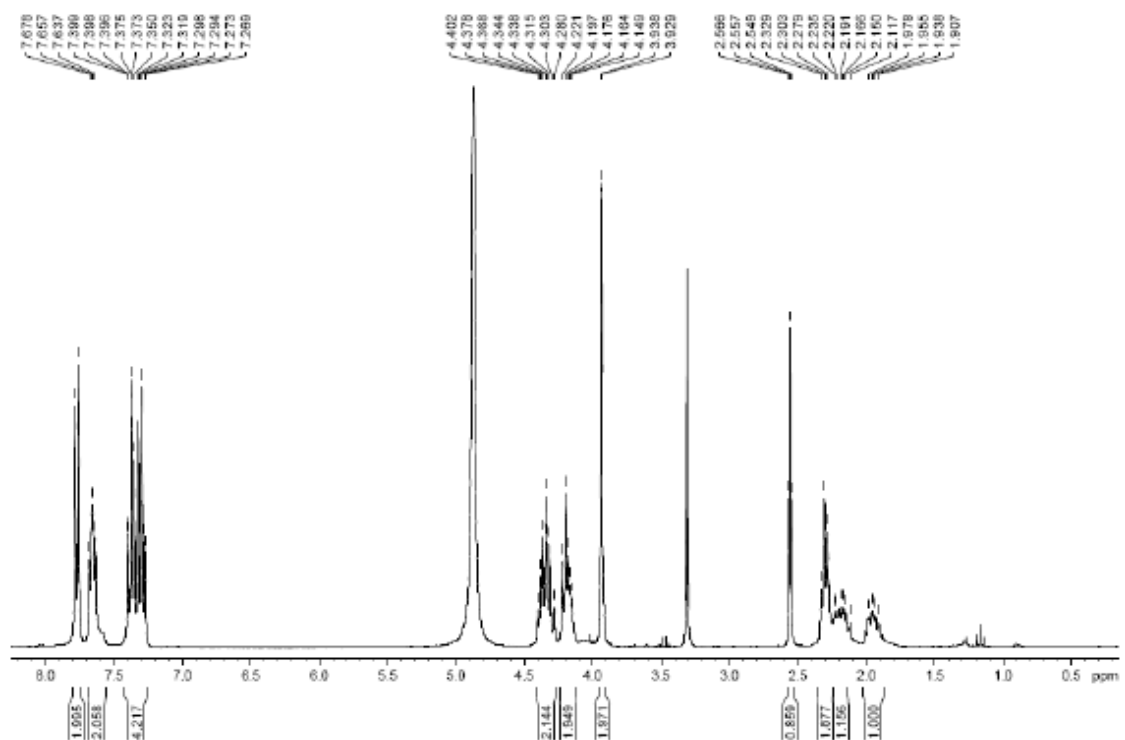
ESI-MS (m/z)



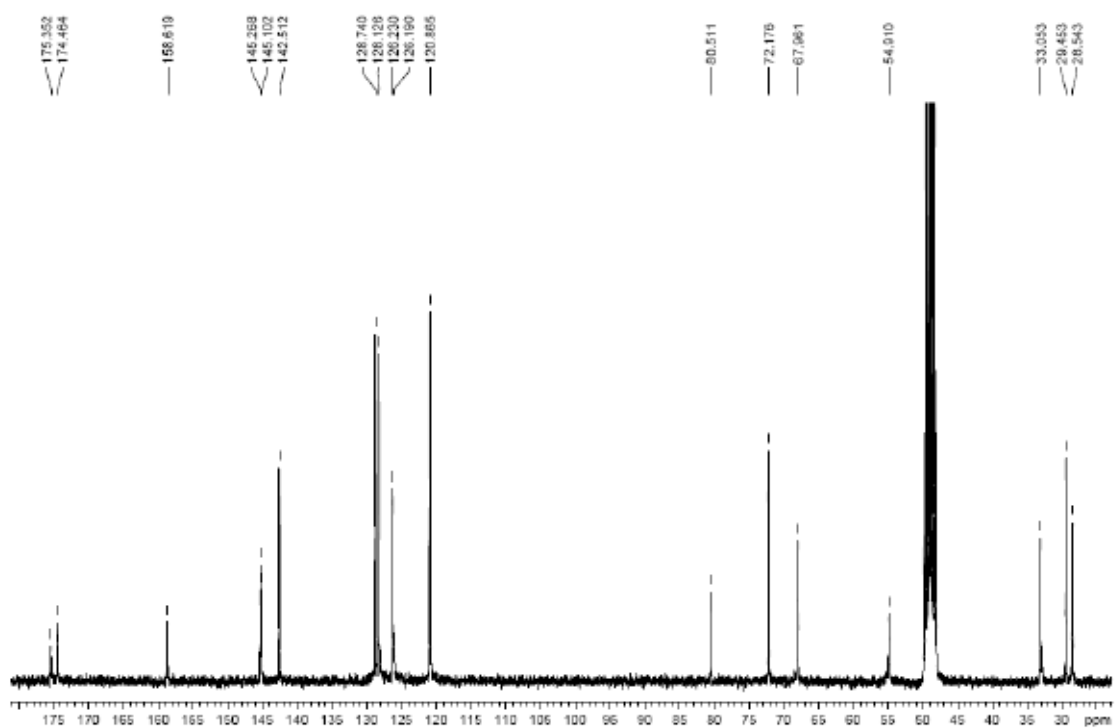
HRMS (ESI)  $m/z$



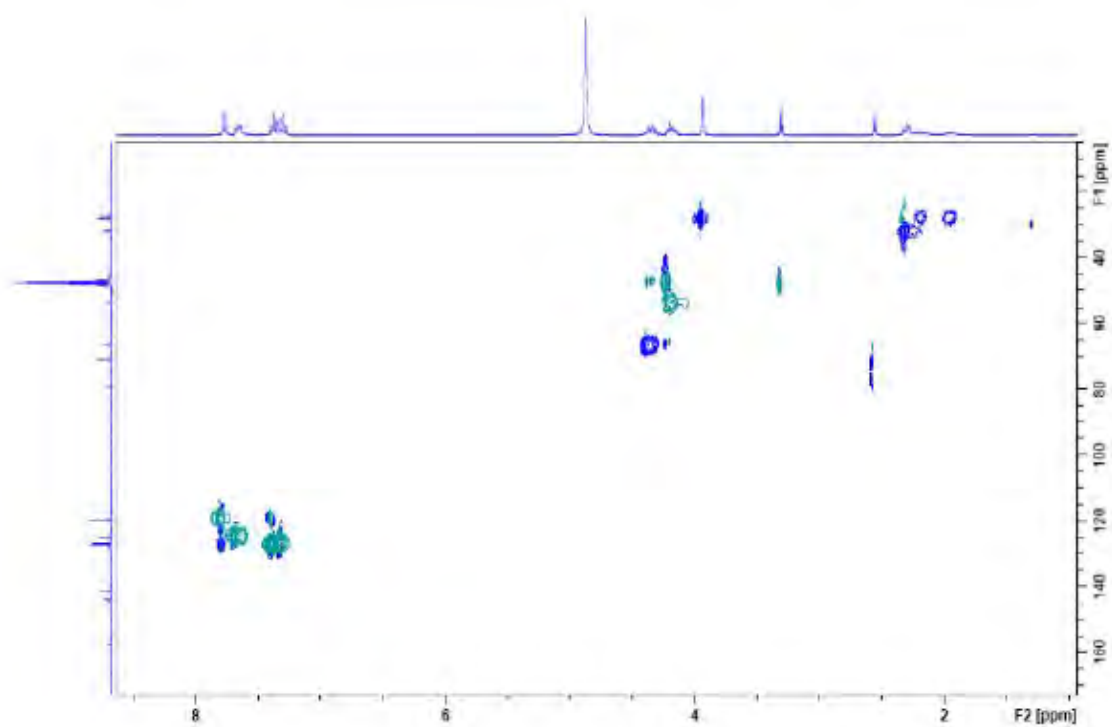
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



$^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)

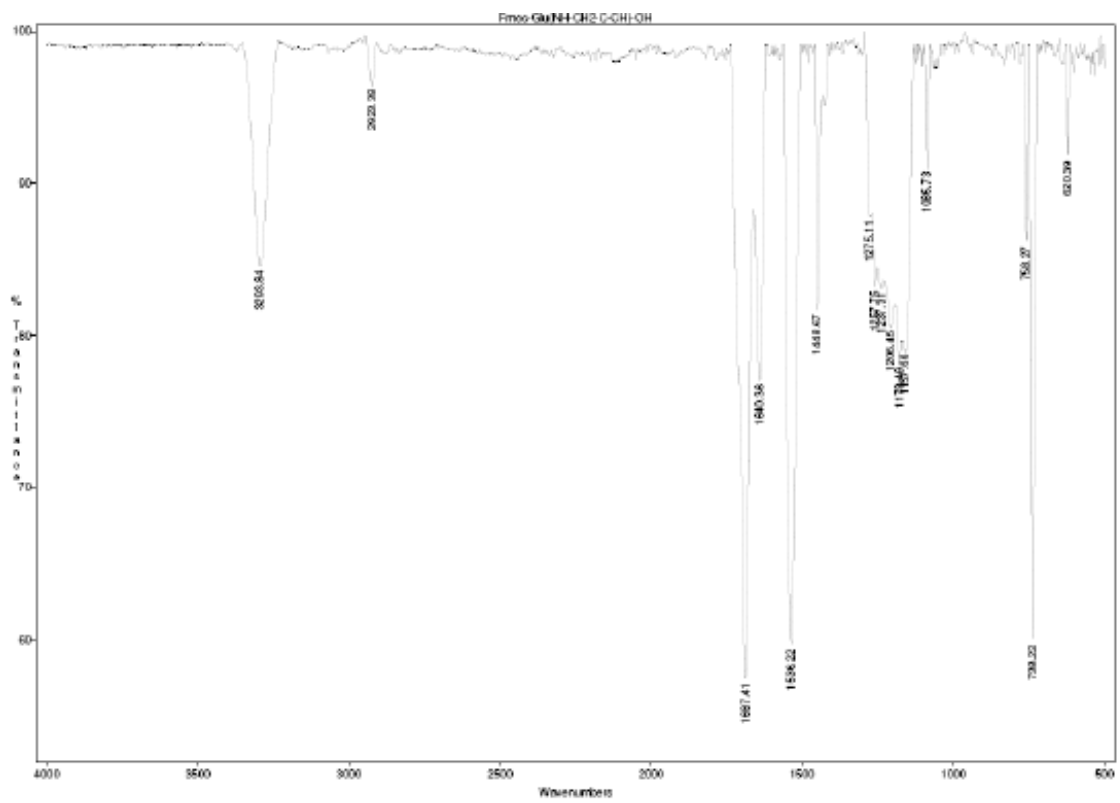


HSQC edited (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



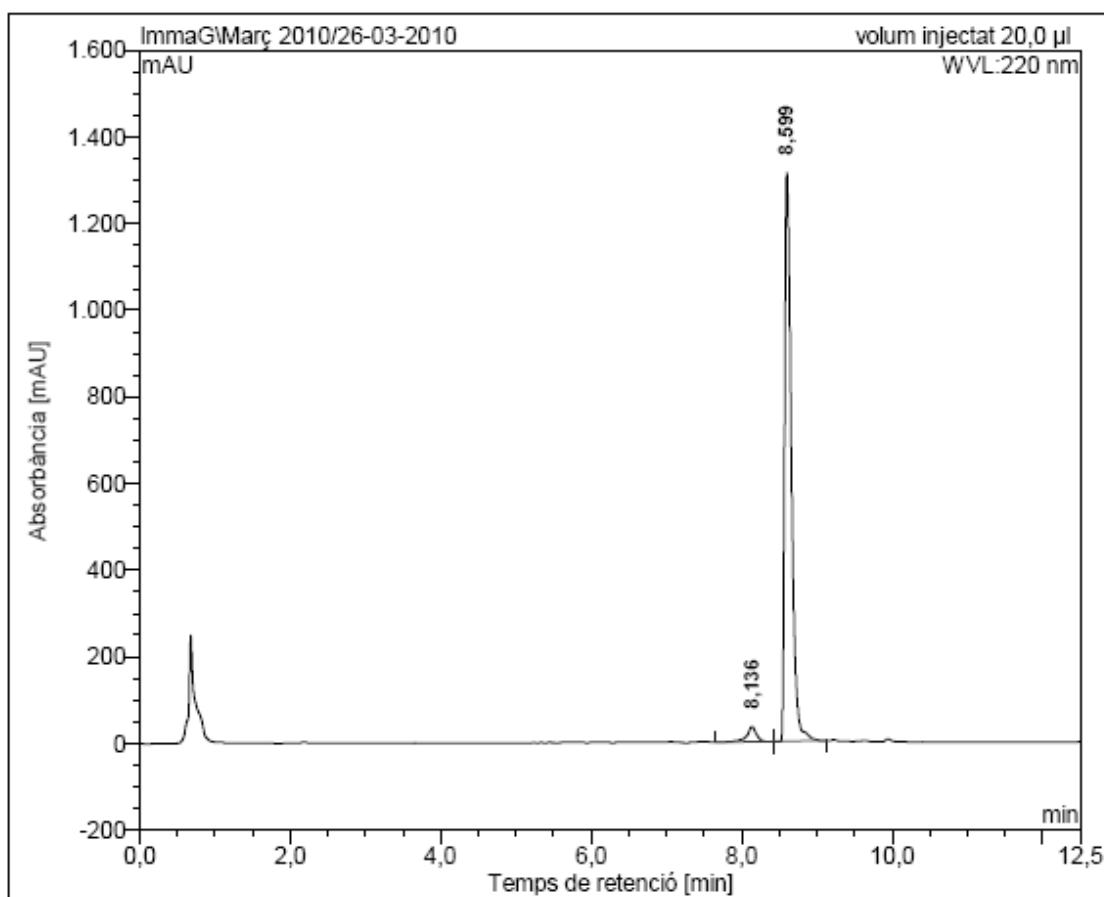


IR (neat)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )

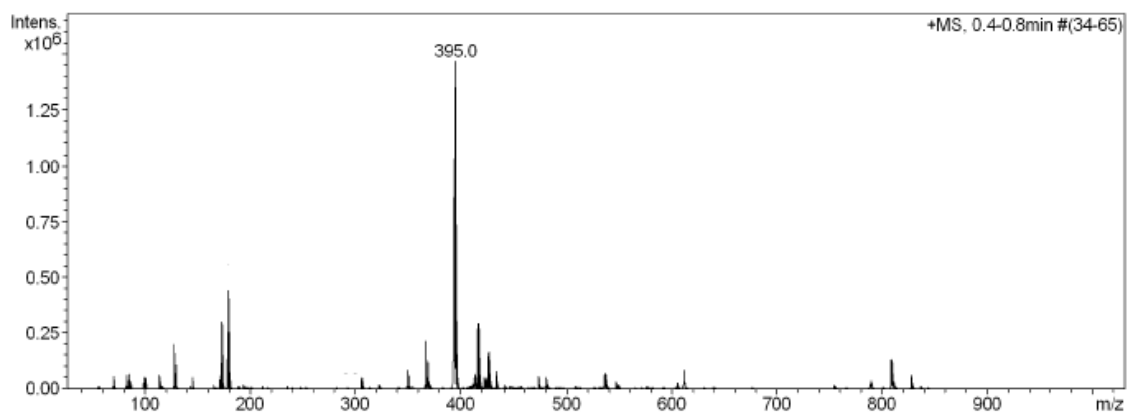


Fmoc-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-OH

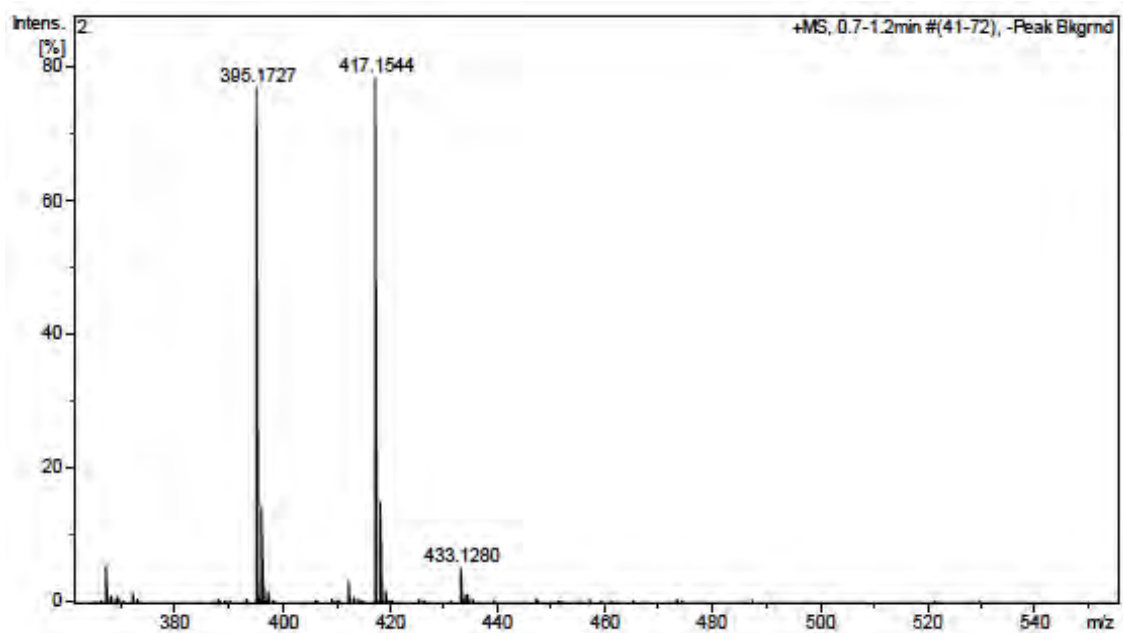
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



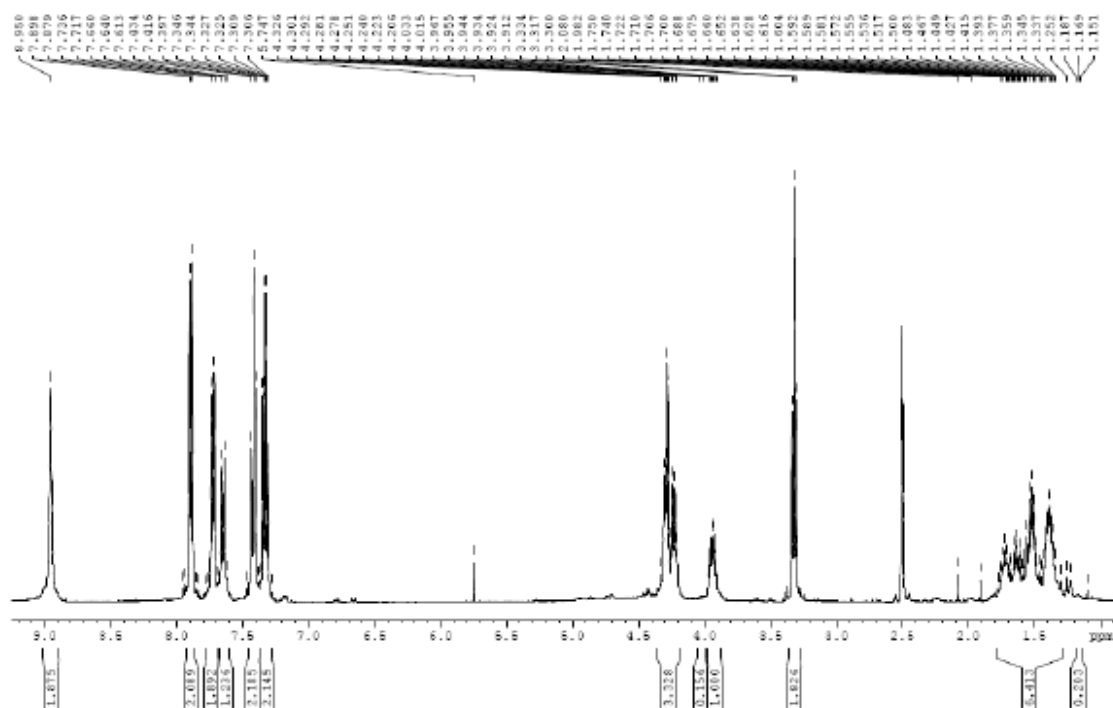
ESI-MS ( $m/z$ )



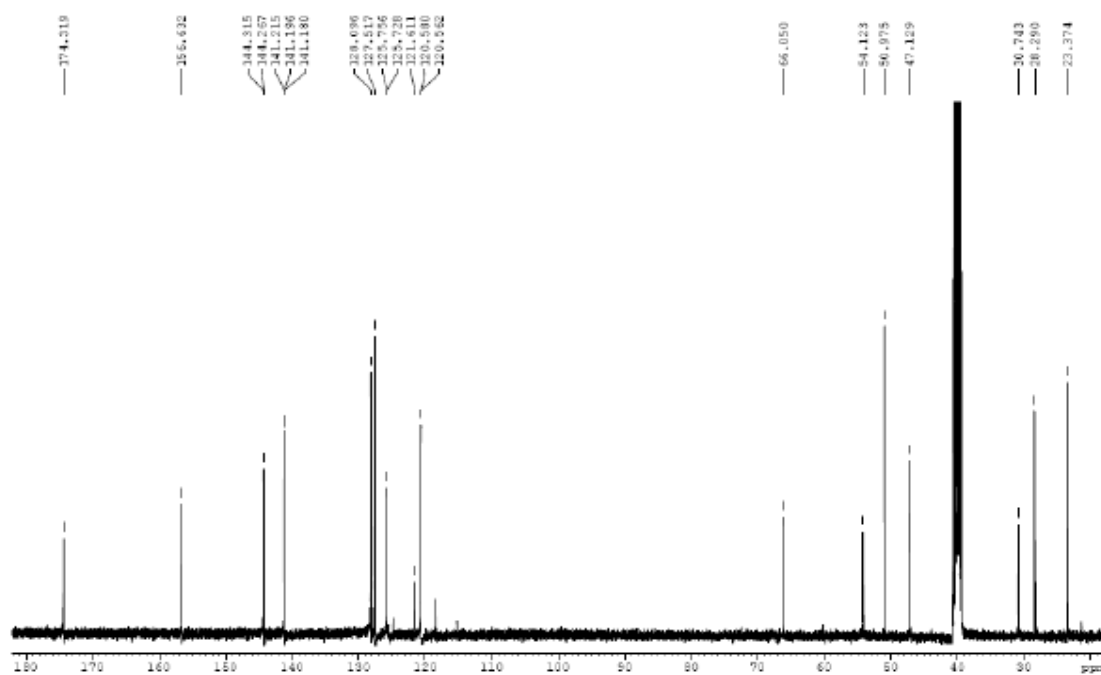
HRMS (ESI)  $m/z$



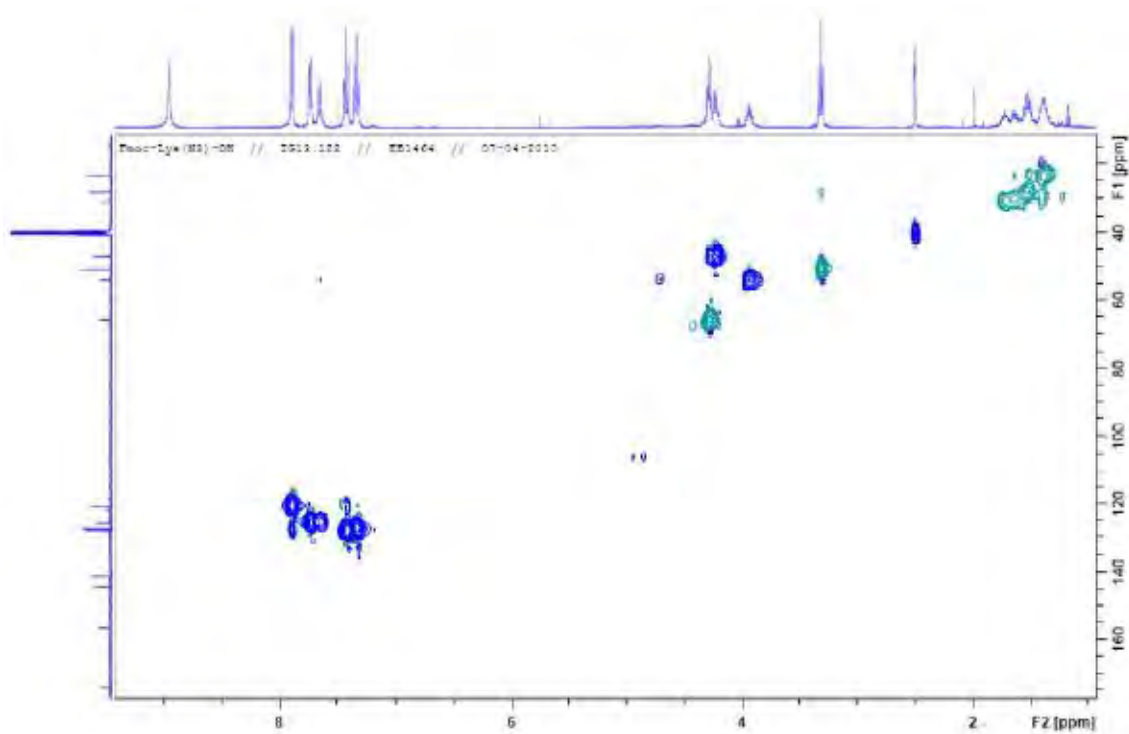
$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)  $\delta$  (ppm)



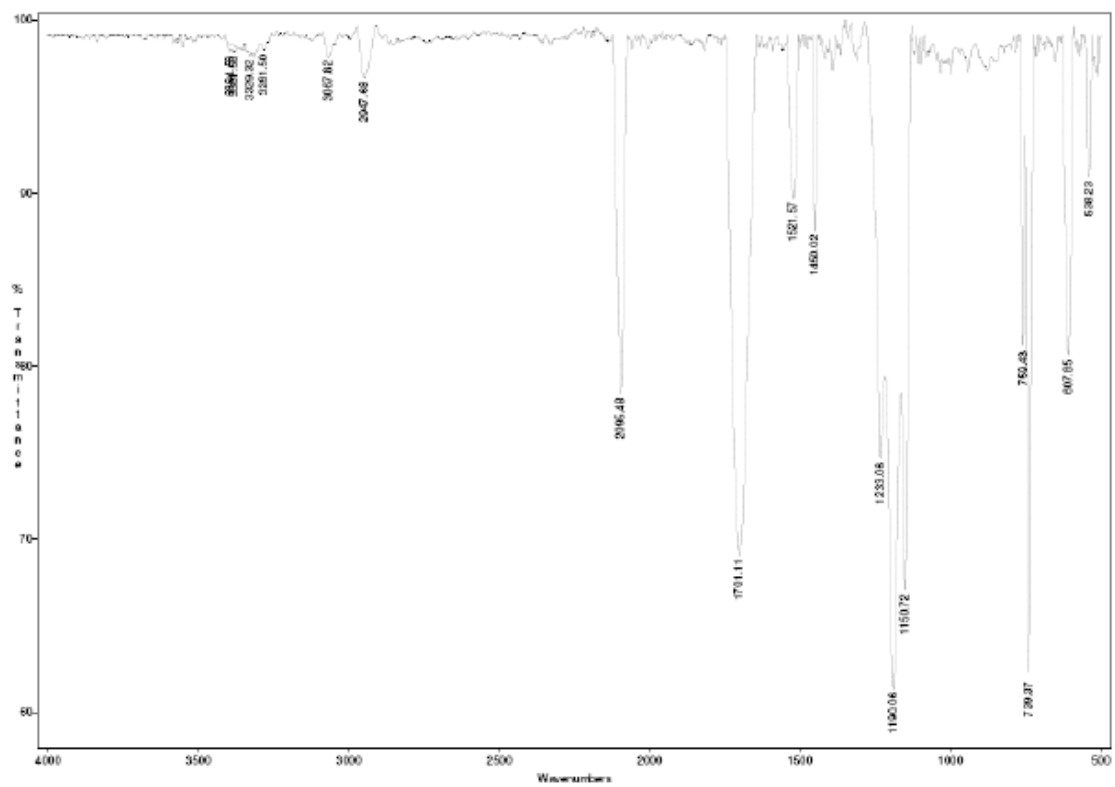
$^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



HSQC edited (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  (ppm)



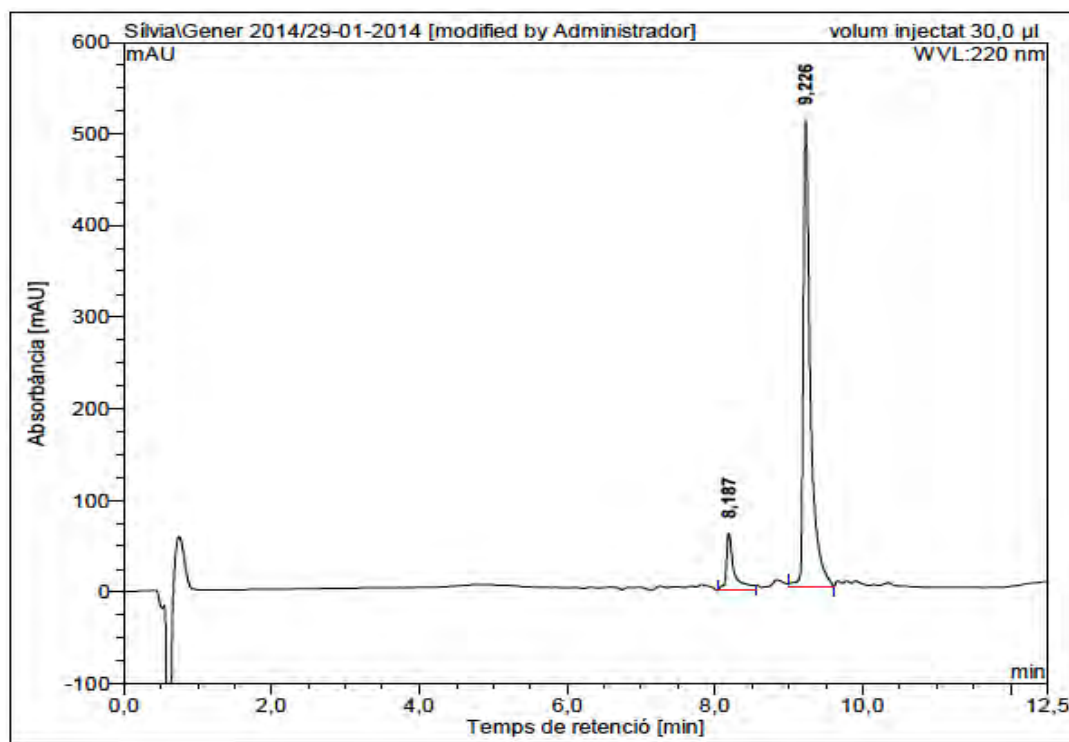
IR (neat)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )



## 2. Synthesis of azidopeptides

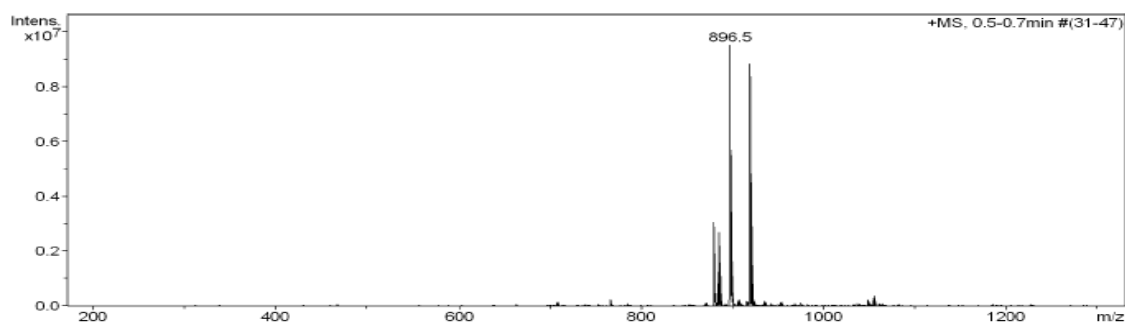
### Fmoc-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (4)

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



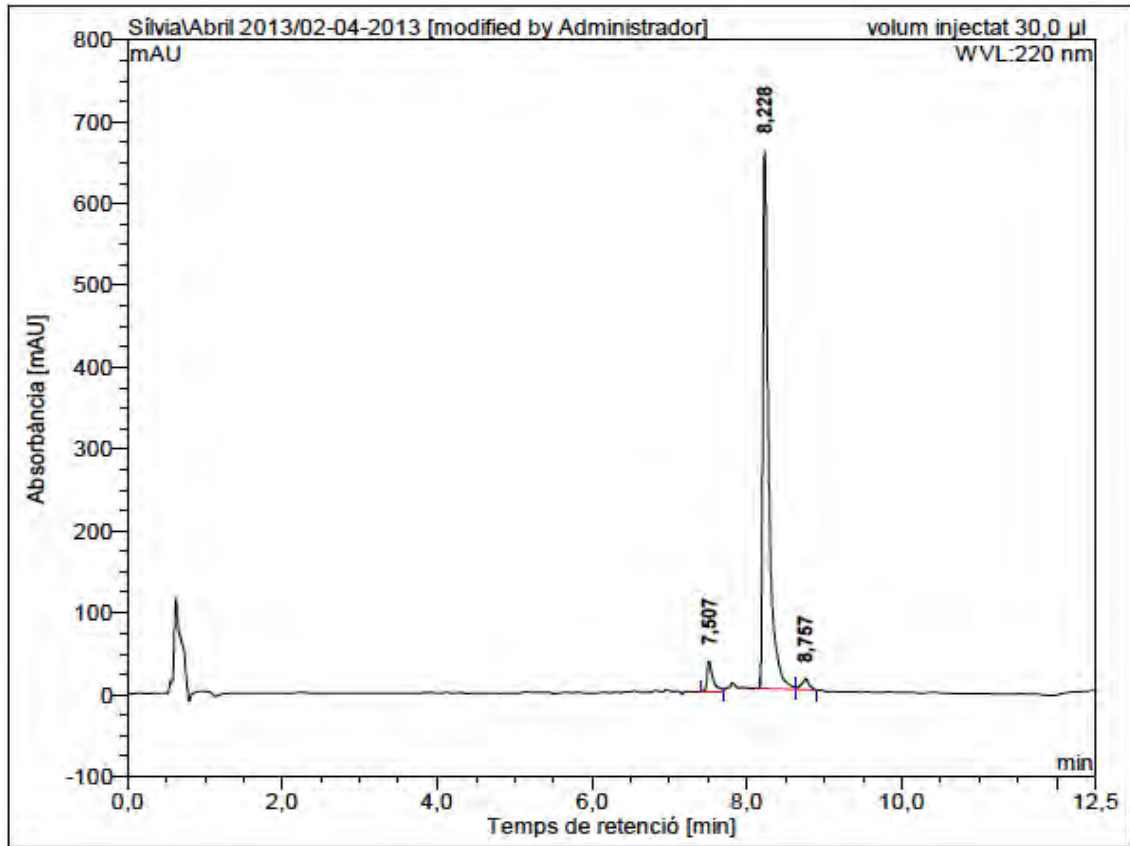
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,19	62,523	7,908	12,22
2	9,23	509,500	56,819	87,78
Total:		572,023	64,727	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



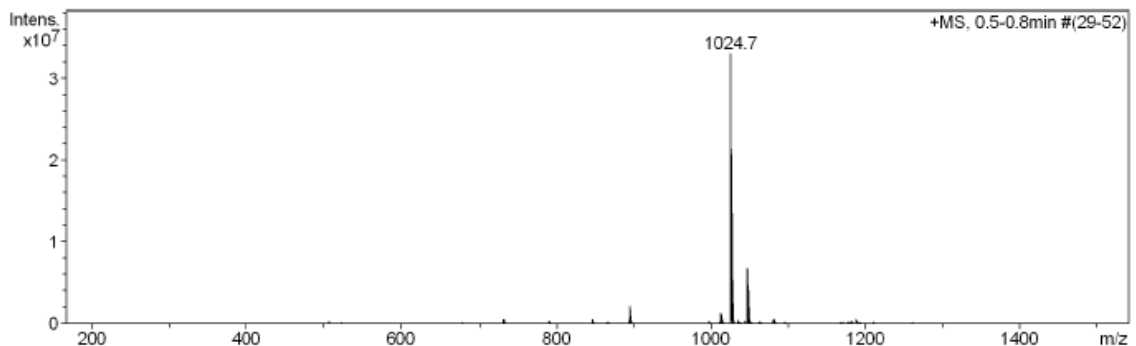
Fmoc-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (5)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



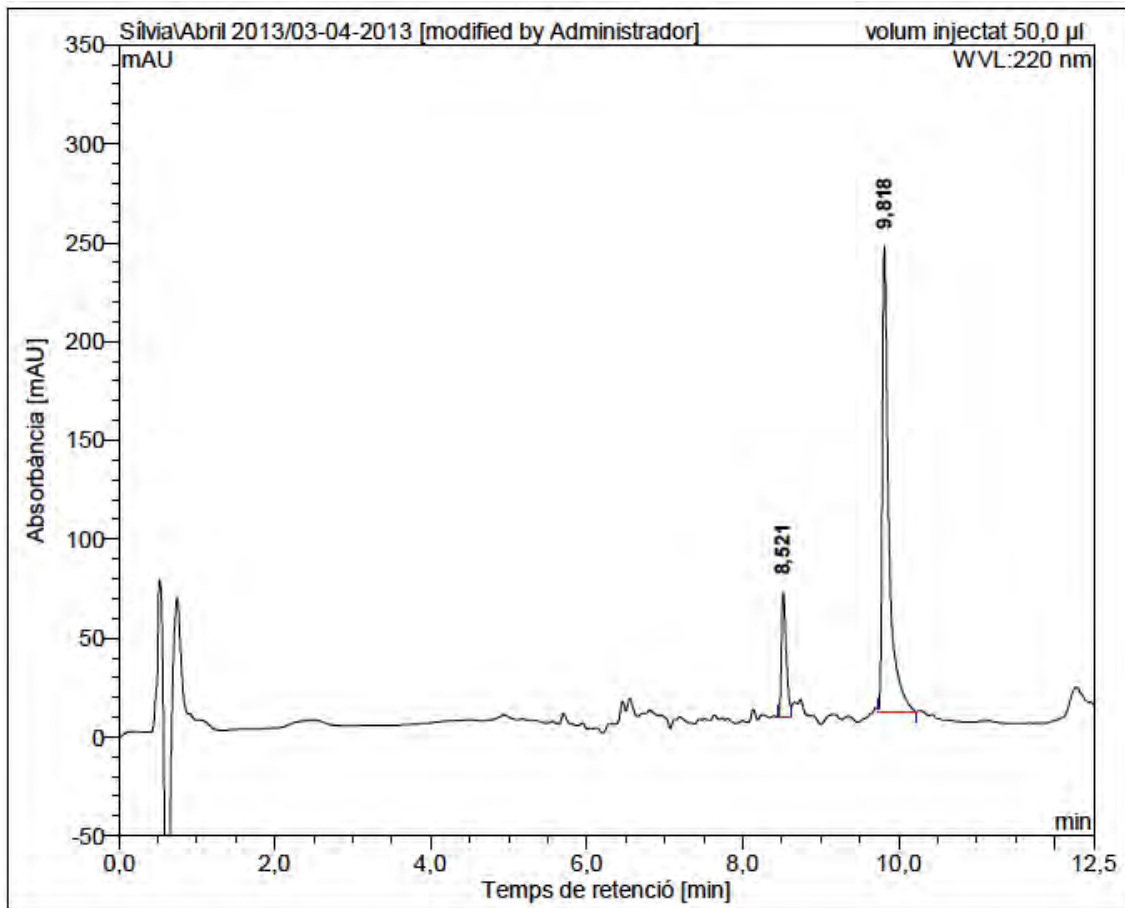
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,51	36,773	3,294	5,30
2	8,23	657,284	57,477	92,39
3	8,76	13,030	1,439	2,31
<b>Total:</b>		<b>707,087</b>	<b>62,210</b>	<b>100,00</b>

ESI-MS ( $m/z$ )



Fmoc-Leu-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (6)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)

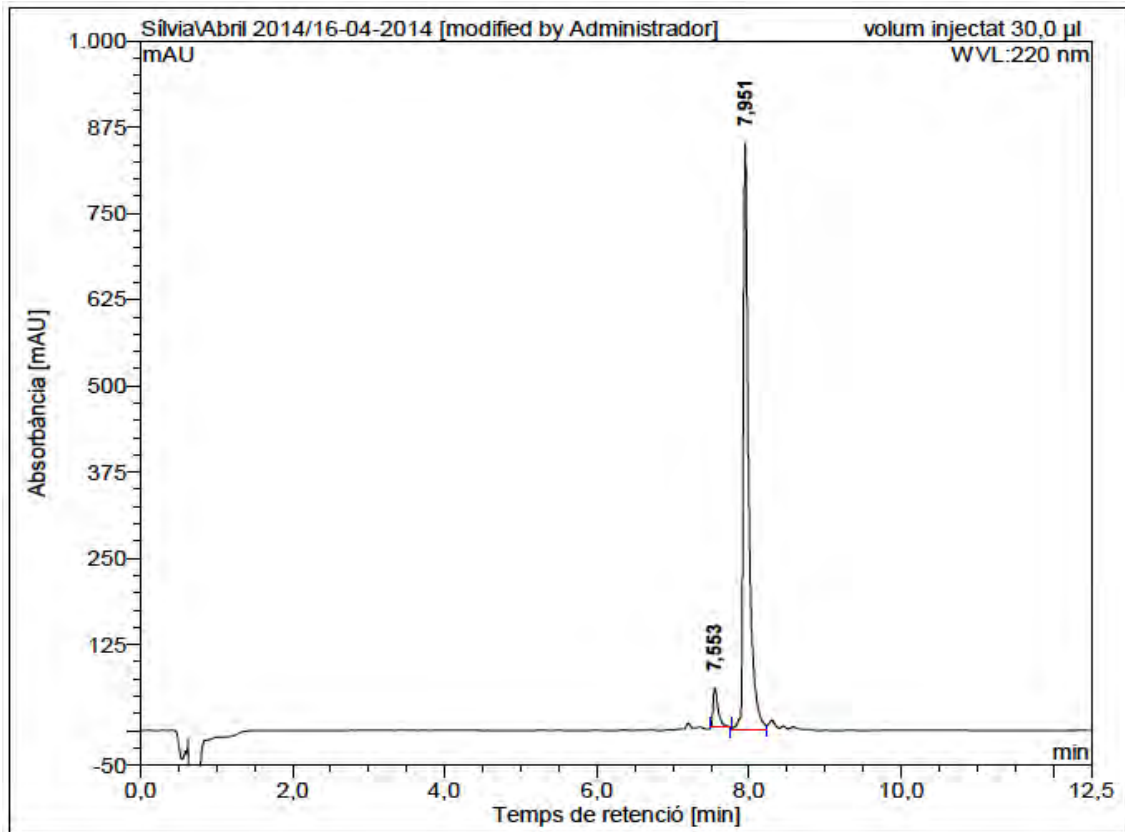


No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,52	62,274	4,402	16,25
2	9,82	235,040	22,696	83,75
Total:		297,314	27,098	100,00



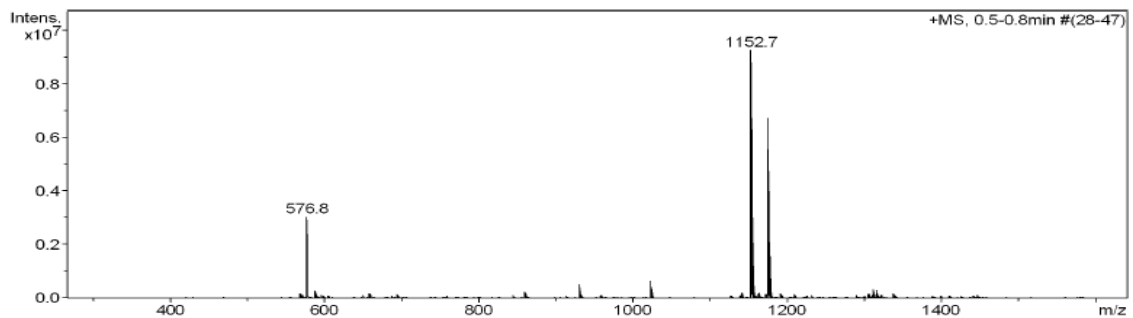
Fmoc-Lys-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (7)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



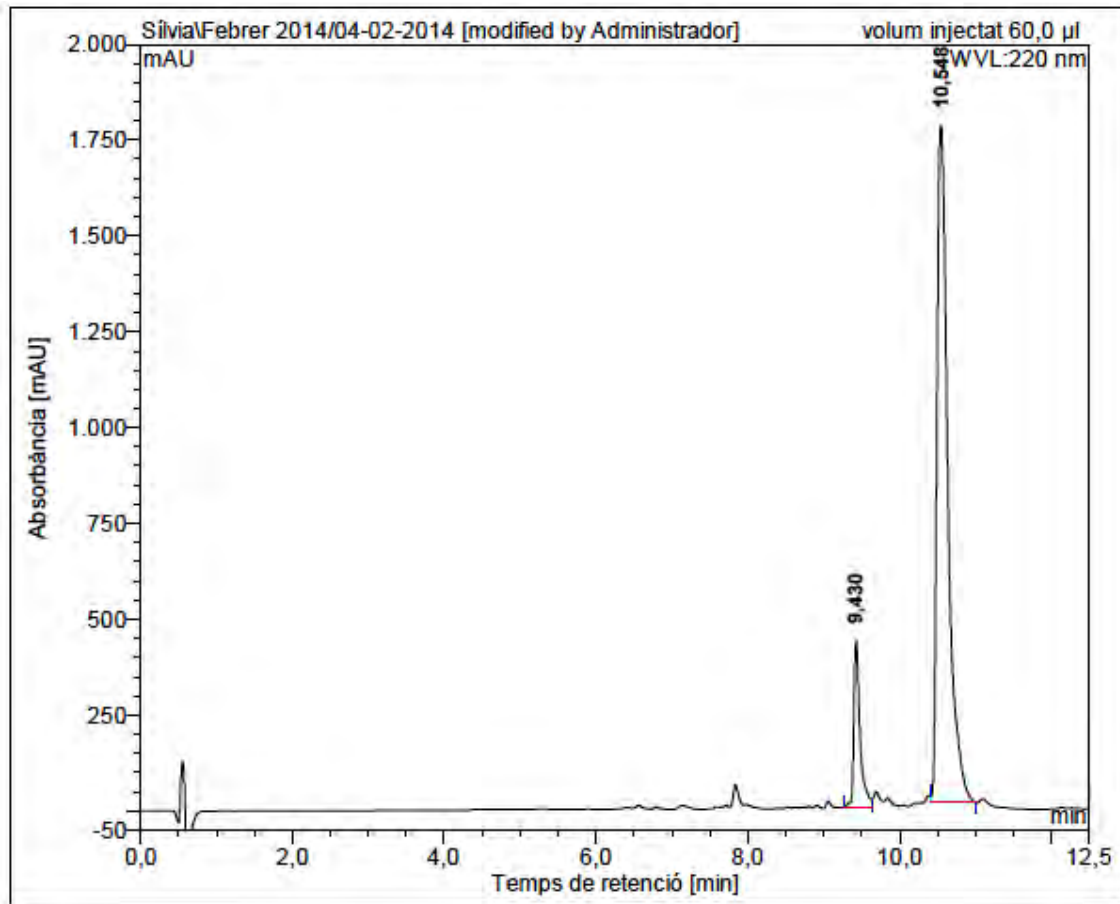
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,55	56,939	4,215	5,61
2	7,95	851,428	70,958	94,39
Total:		908,367	75,174	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



Fmoc-Leu-Leu-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (8)

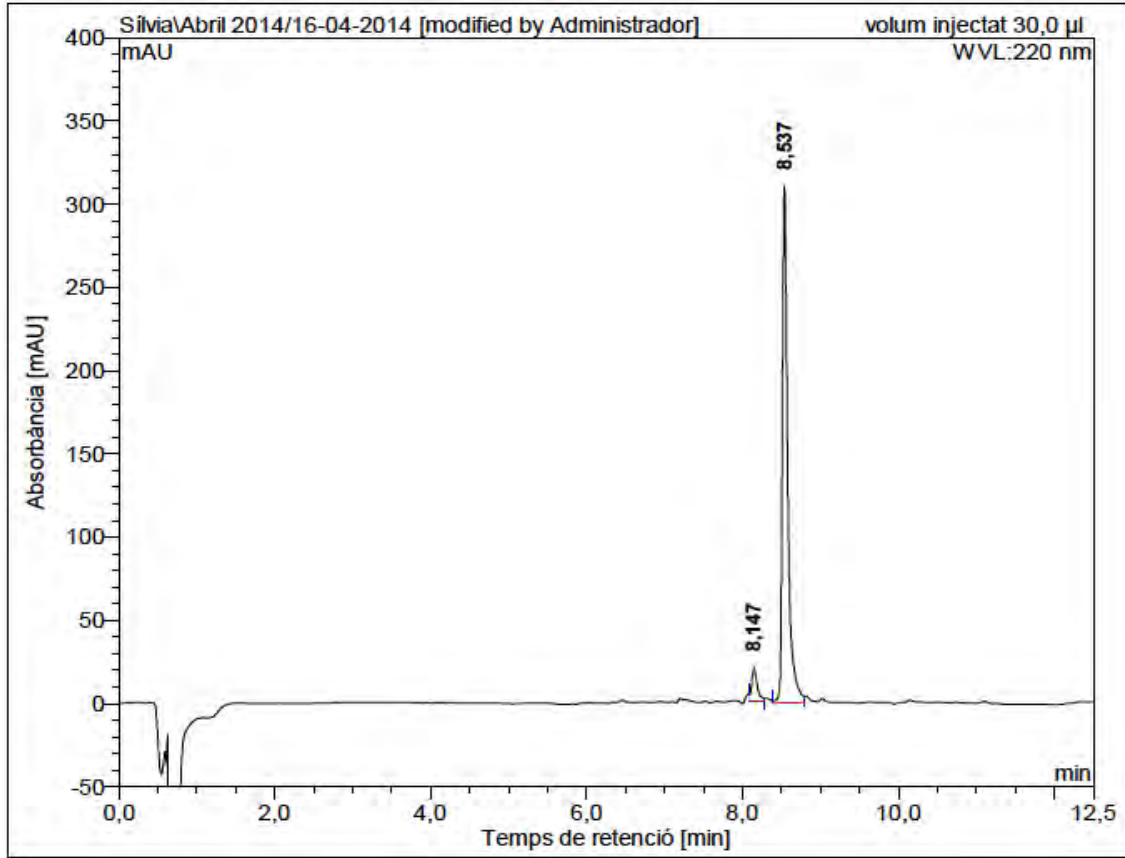
HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	9,43	435,157	41,623	12,33
2	10,55	1766,823	295,961	87,67
Total:		2201,980	337,584	100,00

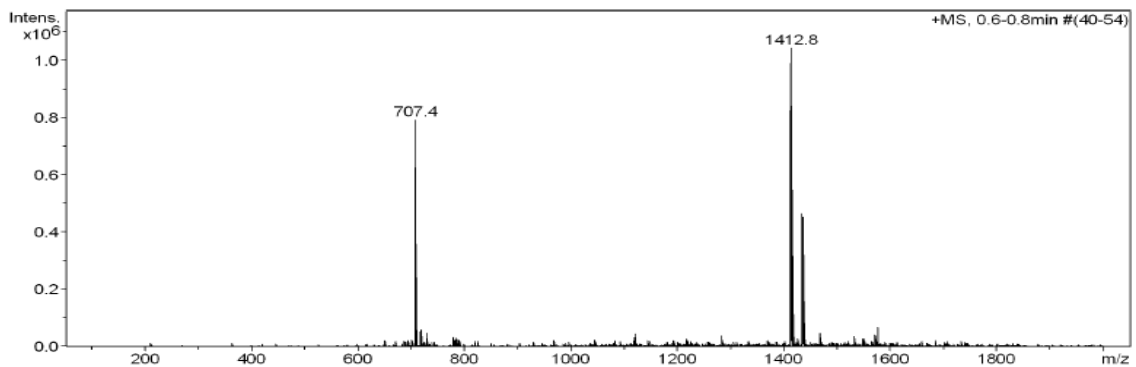
Fmoc-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (9)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



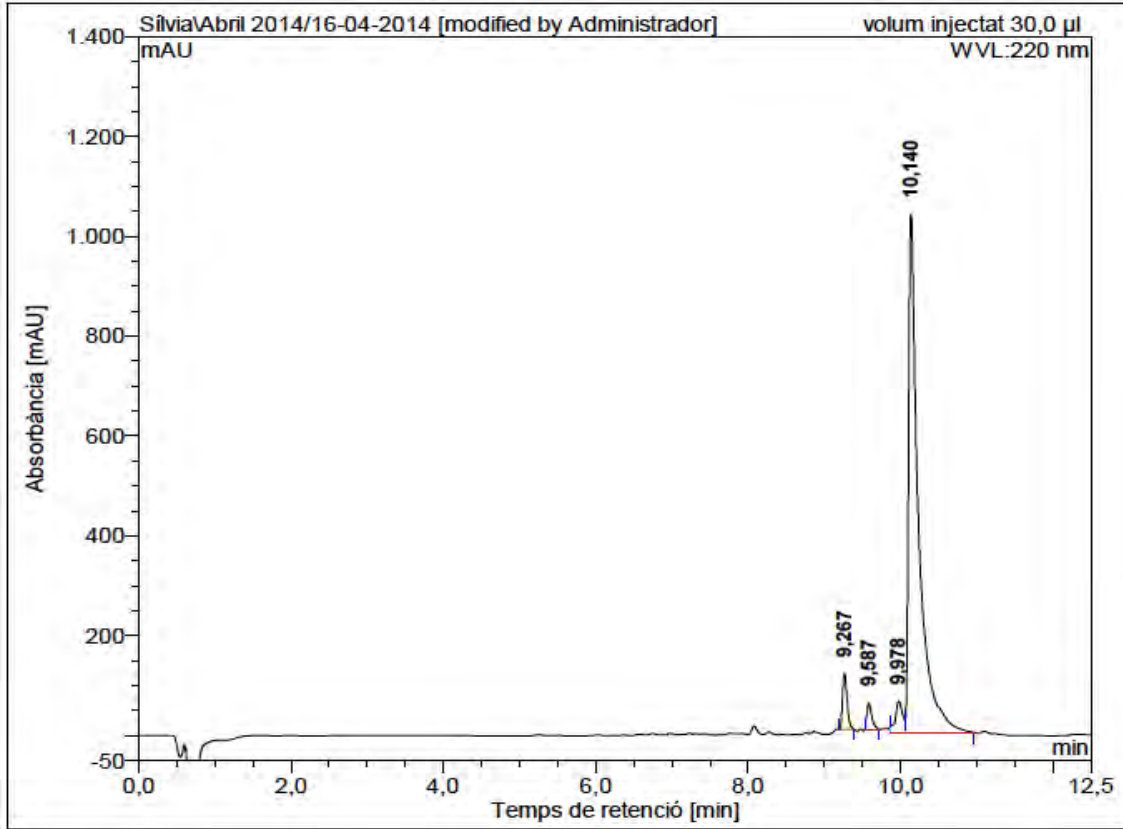
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,15	19,729	1,618	6,08
2	8,54	310,308	25,005	93,92
Total:		330,037	26,623	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



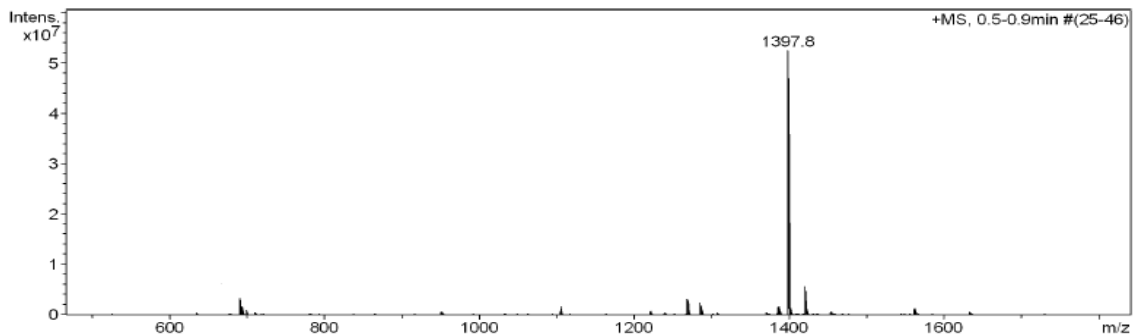
Fmoc-Leu-Phe-Leu-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (10)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



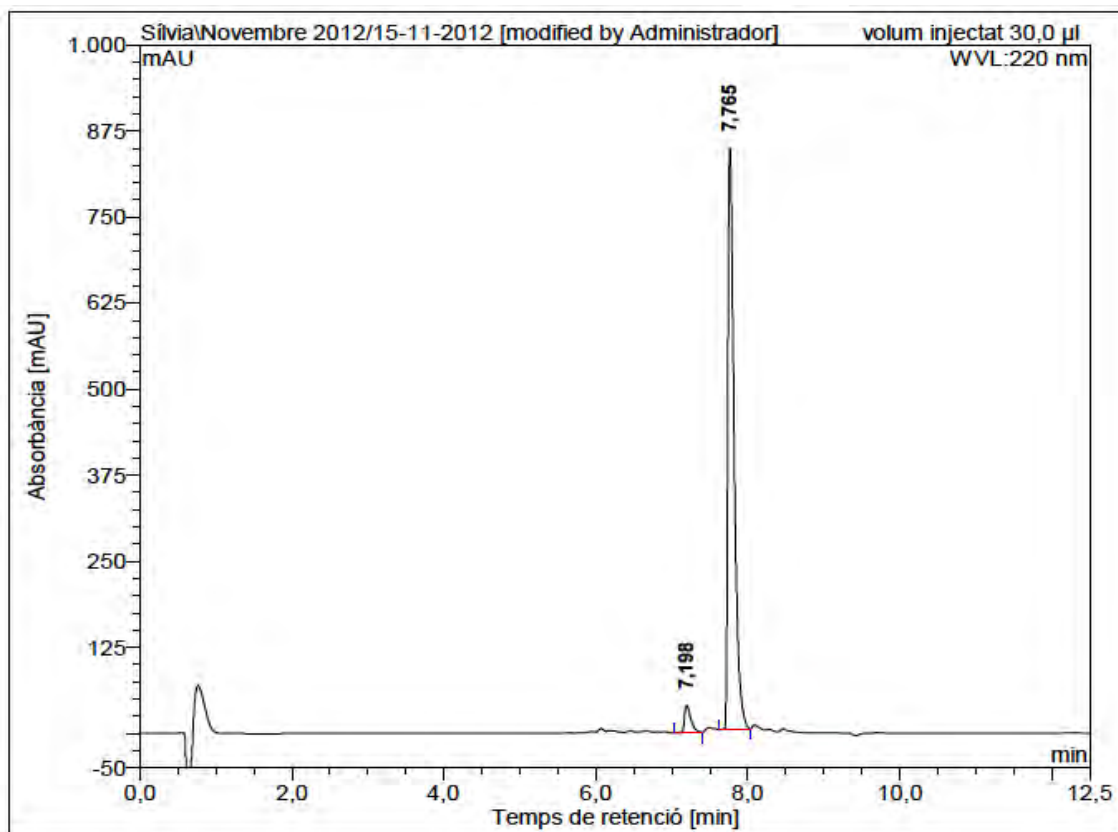
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	9,27	112,205	7,809	4,43
2	9,59	52,512	3,839	2,18
3	9,98	62,358	6,526	3,70
4	10,14	1038,499	158,002	89,68
Total:		1265,574	176,175	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



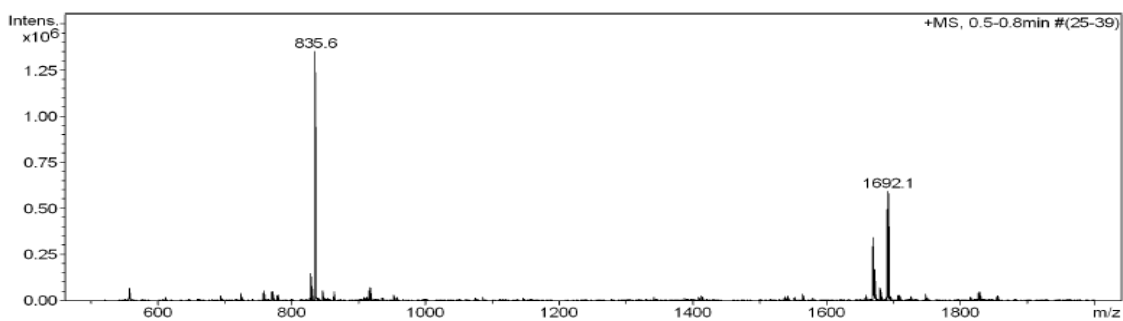
Fmoc-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (11)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



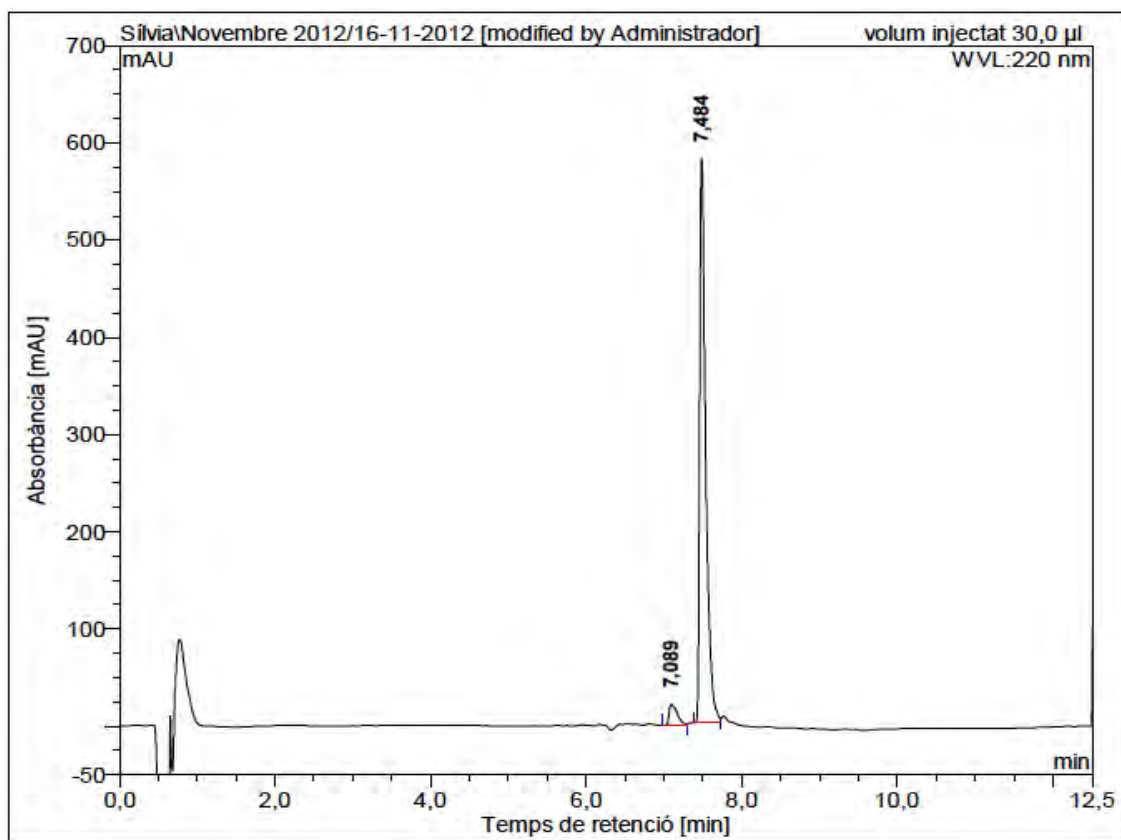
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,20	39,697	3,856	4,54
2	7,77	844,695	80,980	95,46
Total:		884,392	84,836	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



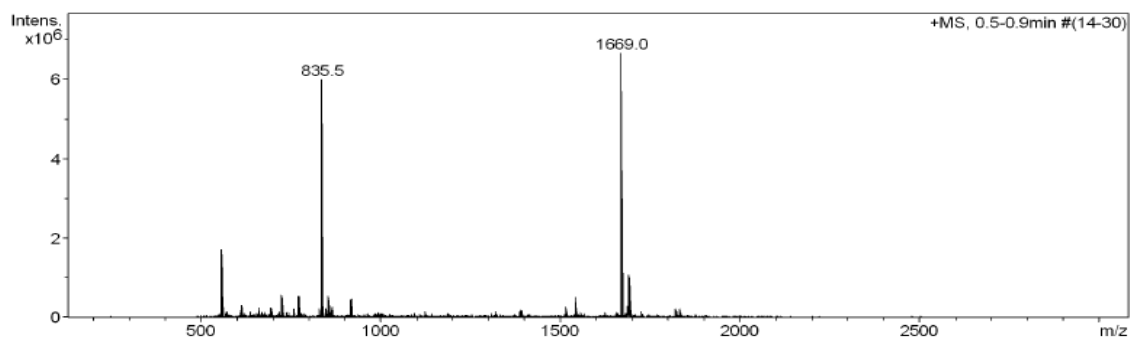
Fmoc-Lys-Nle( $\epsilon$ -N<sub>3</sub>)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH<sub>2</sub> (12)

HPLC ( $\lambda$ =220 nm)



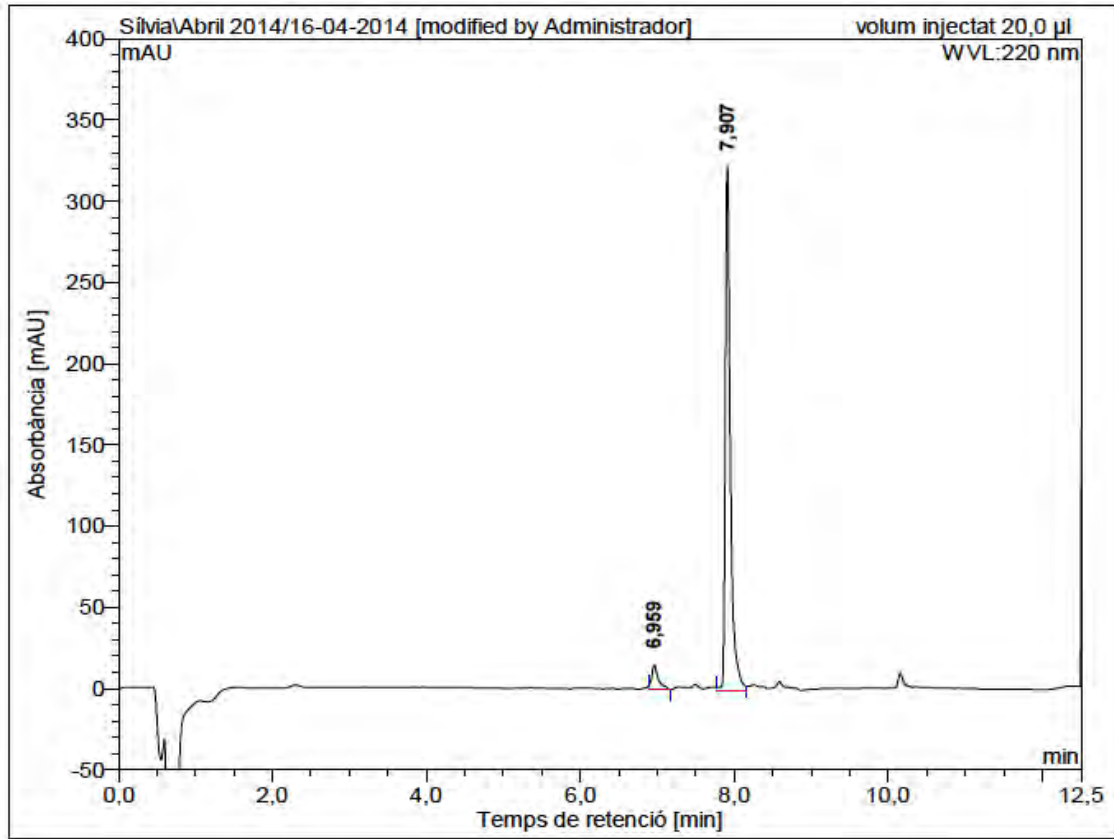
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,09	21,861	2,722	4,97
2	7,48	580,429	52,009	95,03
Total:		602,290	54,732	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



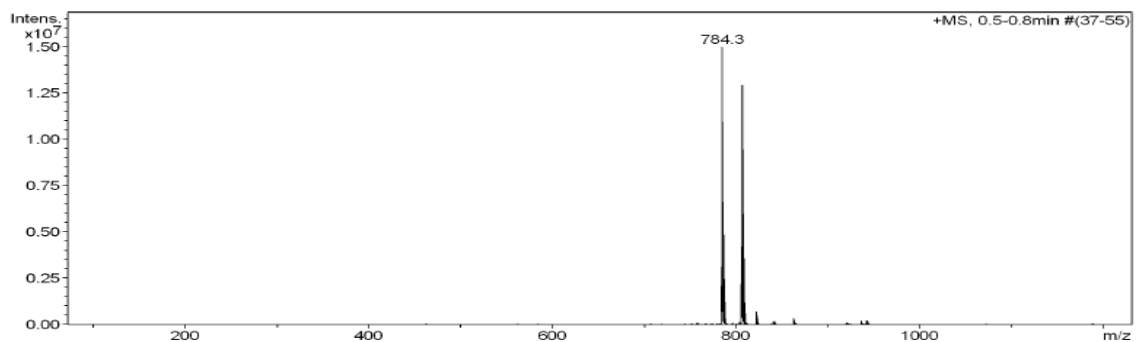
**N<sub>3</sub>-D-Dap(Fmoc)-Asn-D-Tyr-D-Asn-OAll (13)**

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



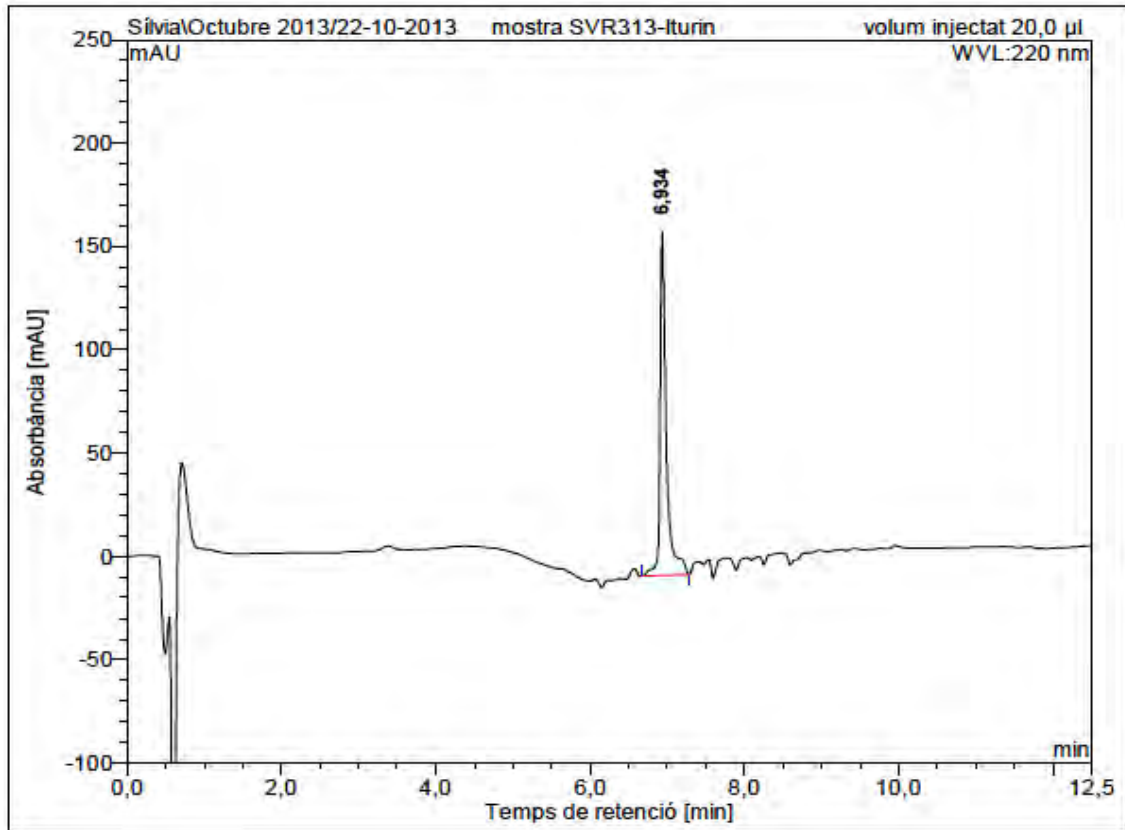
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,96	14,829	1,458	5,61
2	7,91	322,357	24,528	94,39
Total:		337,186	25,987	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



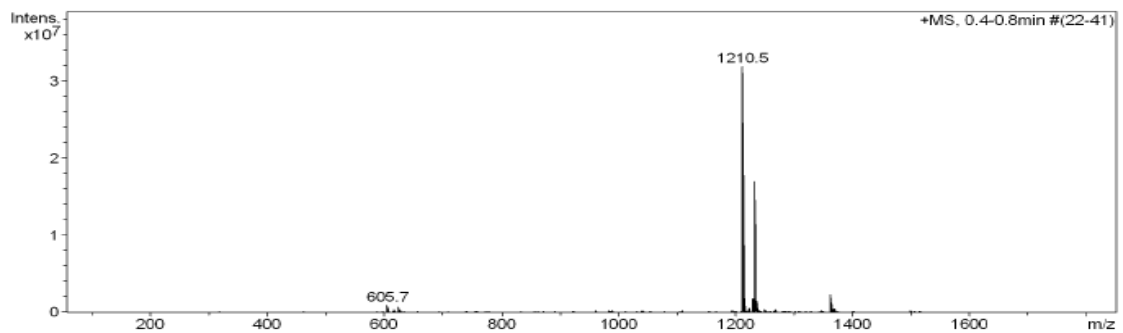
### Azidopeptide obtained from peptidyl resin 20

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,93	166,342	15,645	100,00
Total:		166,342	15,645	100,00

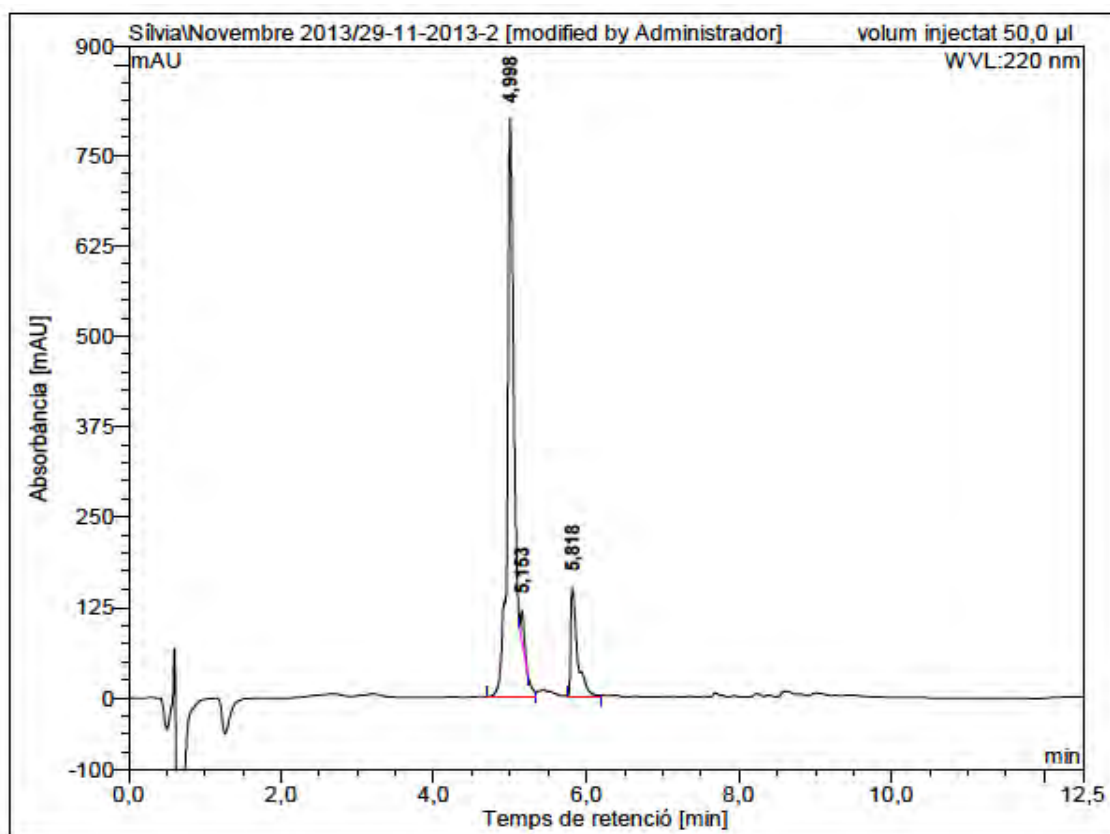
ESI-MS ( $m/z$ )





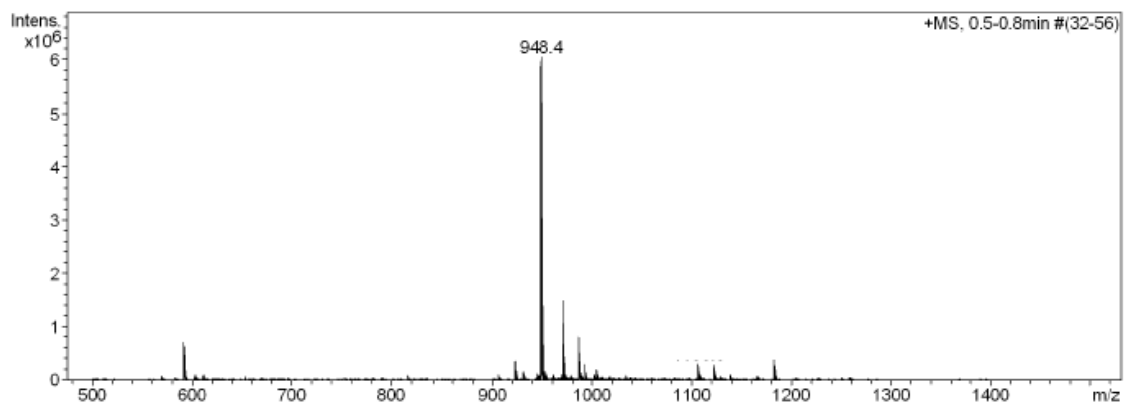
# Azidopeptide BPC794

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

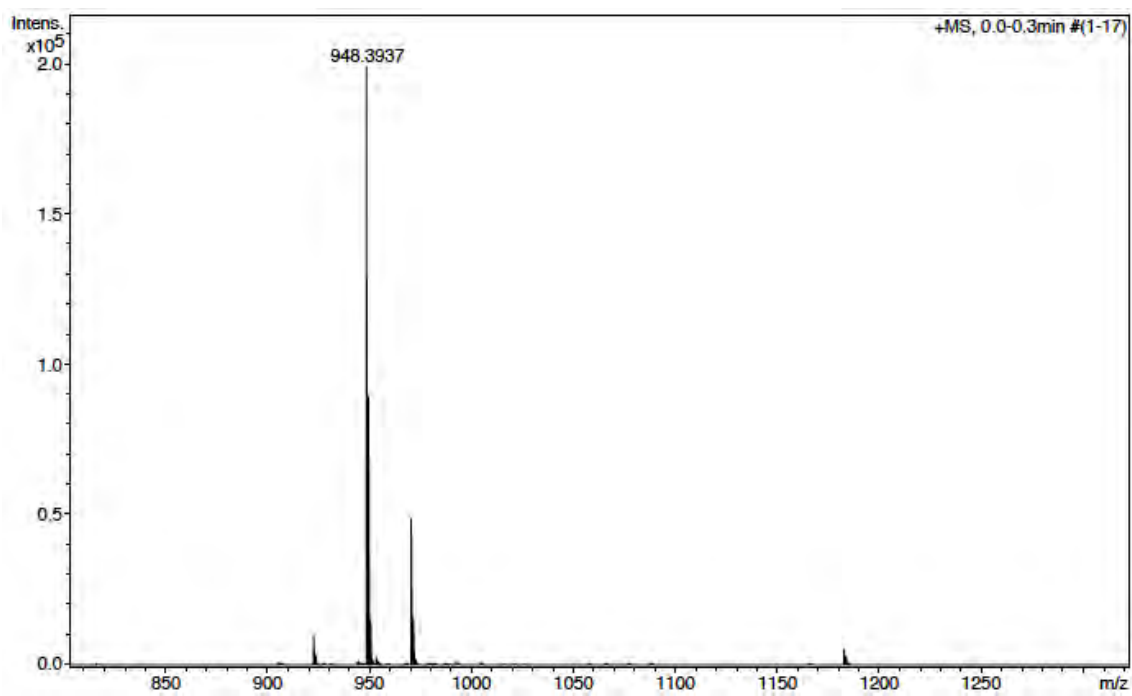


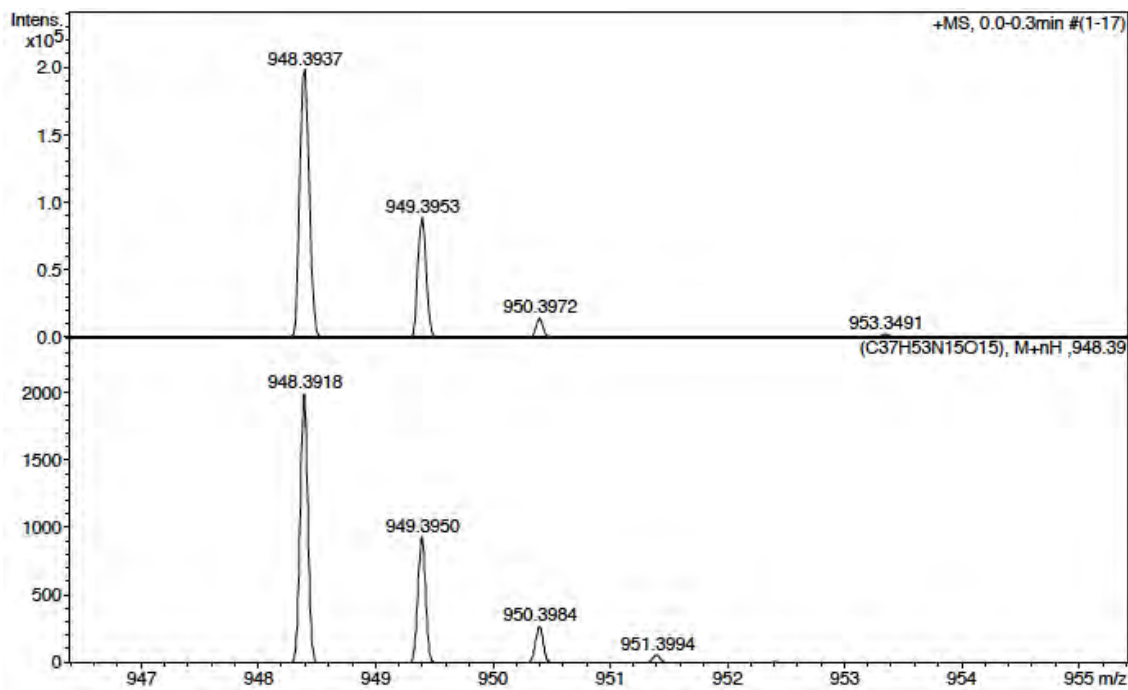
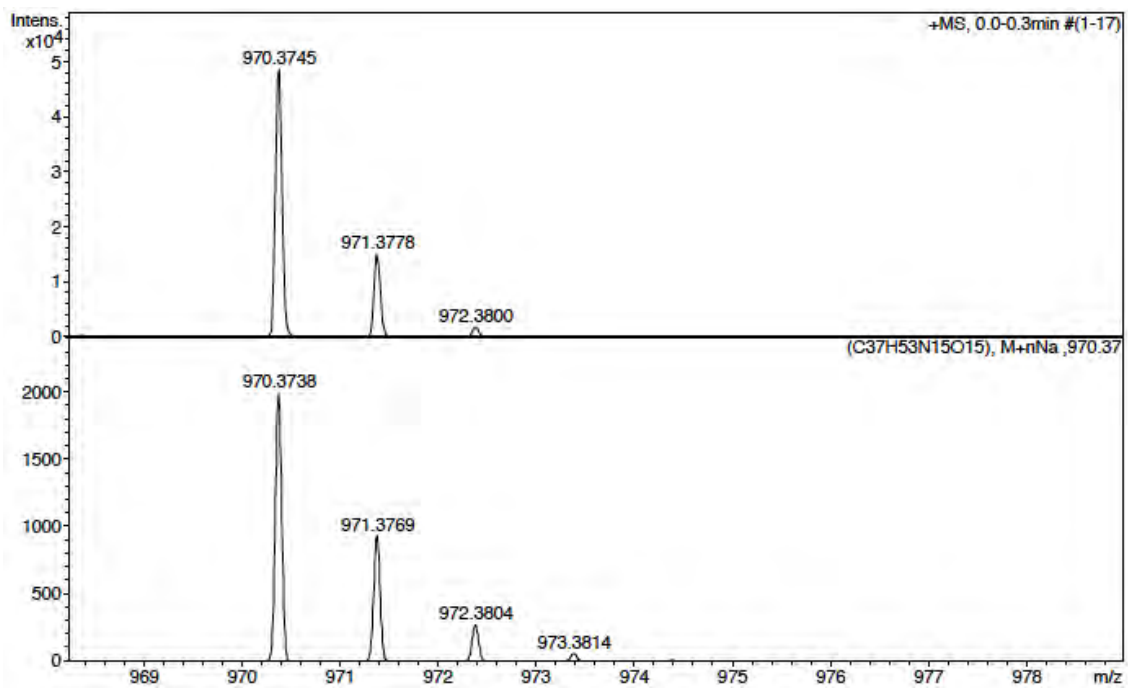
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,00	798,795	89,075	83,92
2	5,15	41,525	2,129	2,01
3	5,82	149,801	14,935	14,07
Total:		990,120	106,139	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



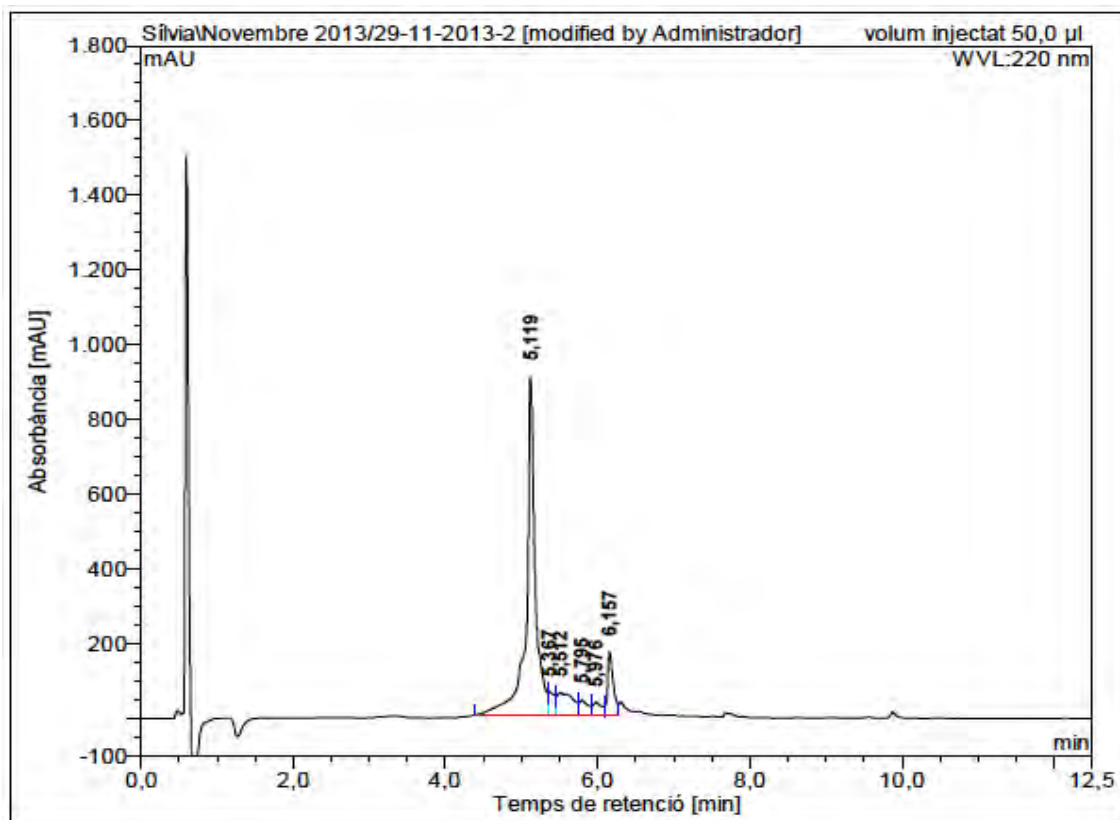
HRMS (ESI)  $m/z$





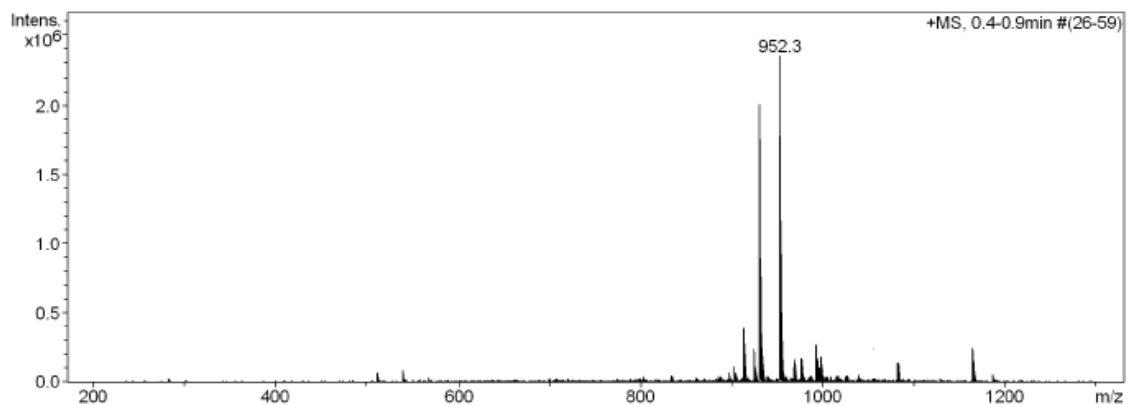
## Azidopeptide BPC796

HPLC ( $\lambda=220\text{ nm}$ )

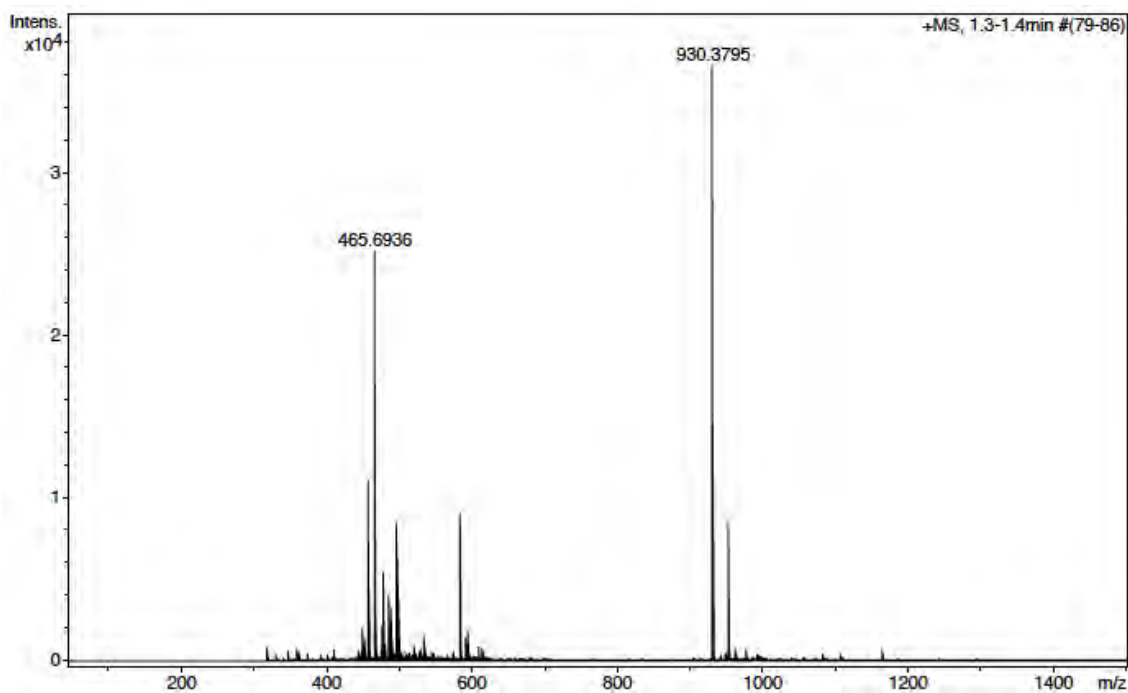


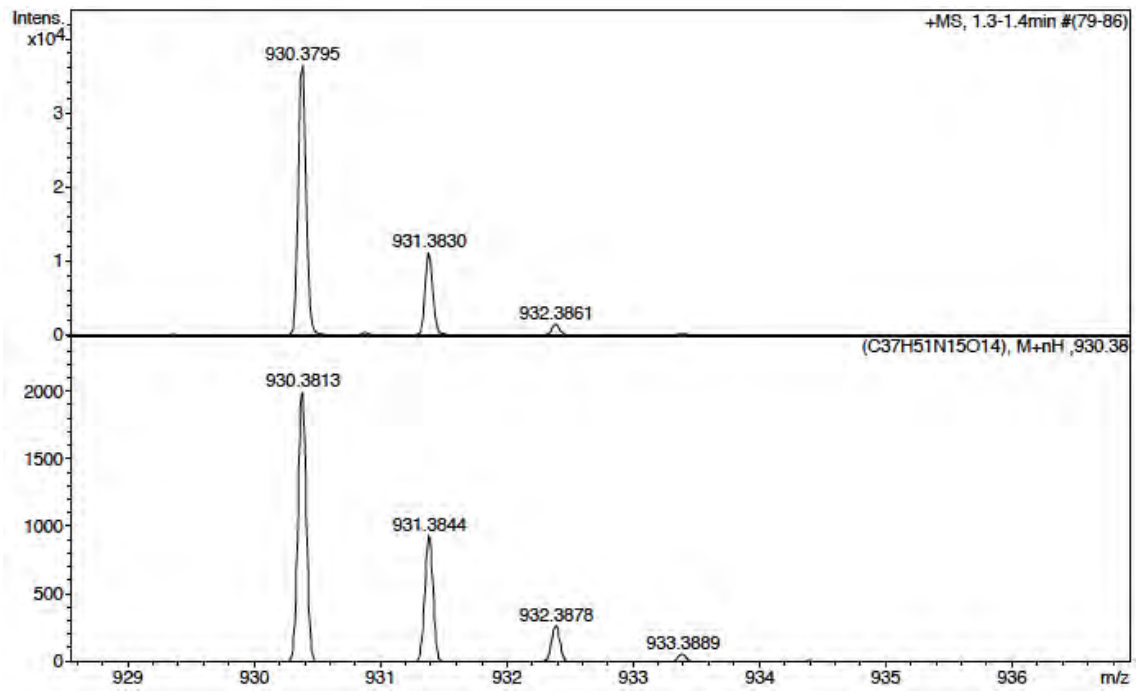
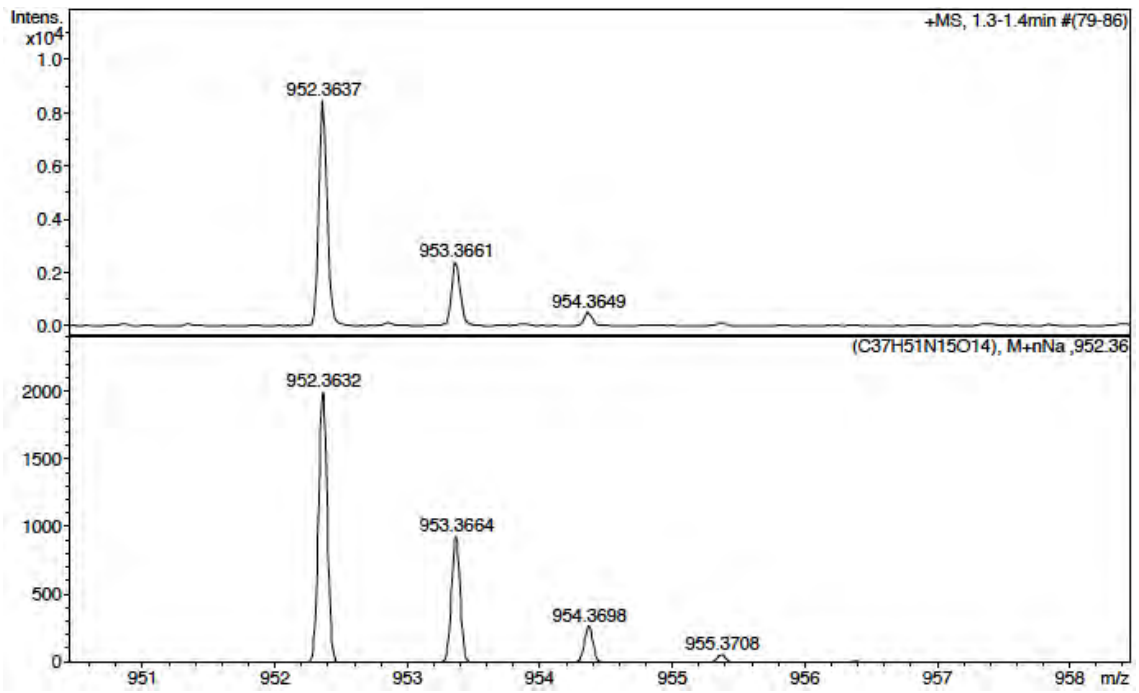
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,12	905,328	125,295	72,47
2	5,37	63,509	6,701	3,88
3	5,51	62,447	14,680	8,49
4	5,79	41,560	5,850	3,38
5	5,98	36,892	4,958	2,87
6	6,16	170,057	15,419	8,92
Total:		1279,793	172,903	100,00

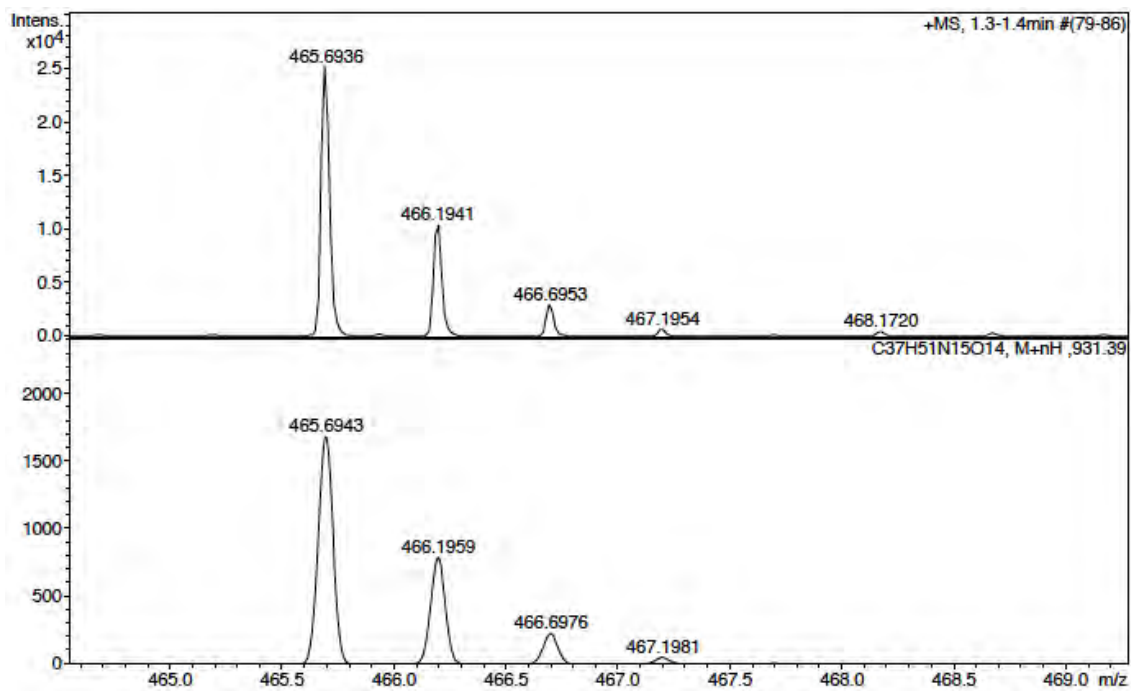
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$





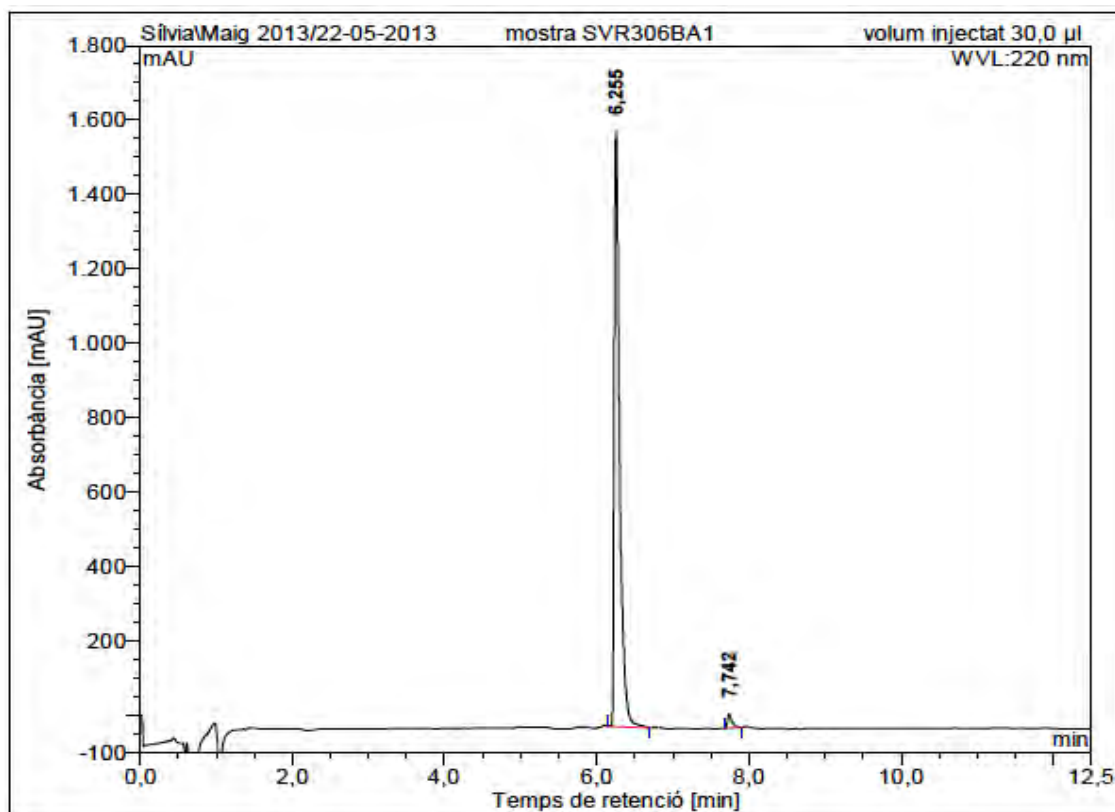


### 3. Synthesis of linear peptidyl resins

#### Fmoc-Lys-Lys-Pra-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll

(Obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pra-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (14))

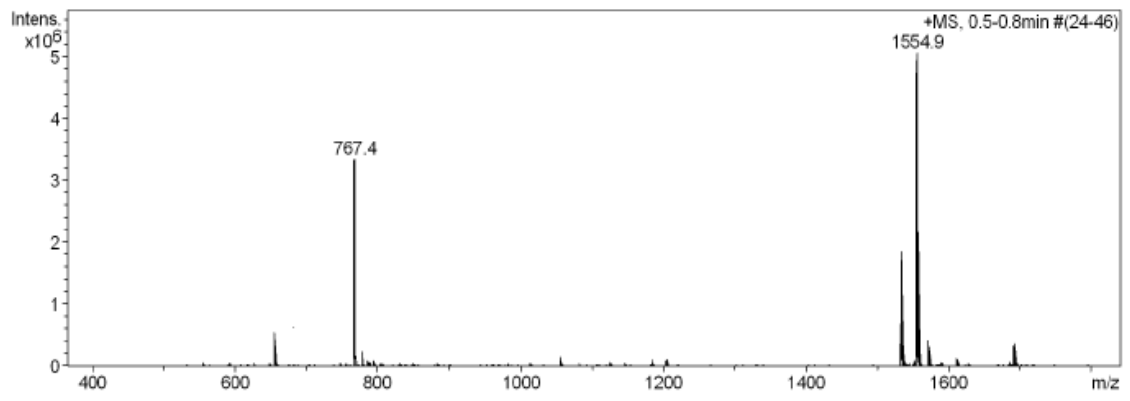
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,25	1600,639	131,118	98,04
2	7,74	38,630	2,621	1,96
Total:		1639,269	133,738	100,00



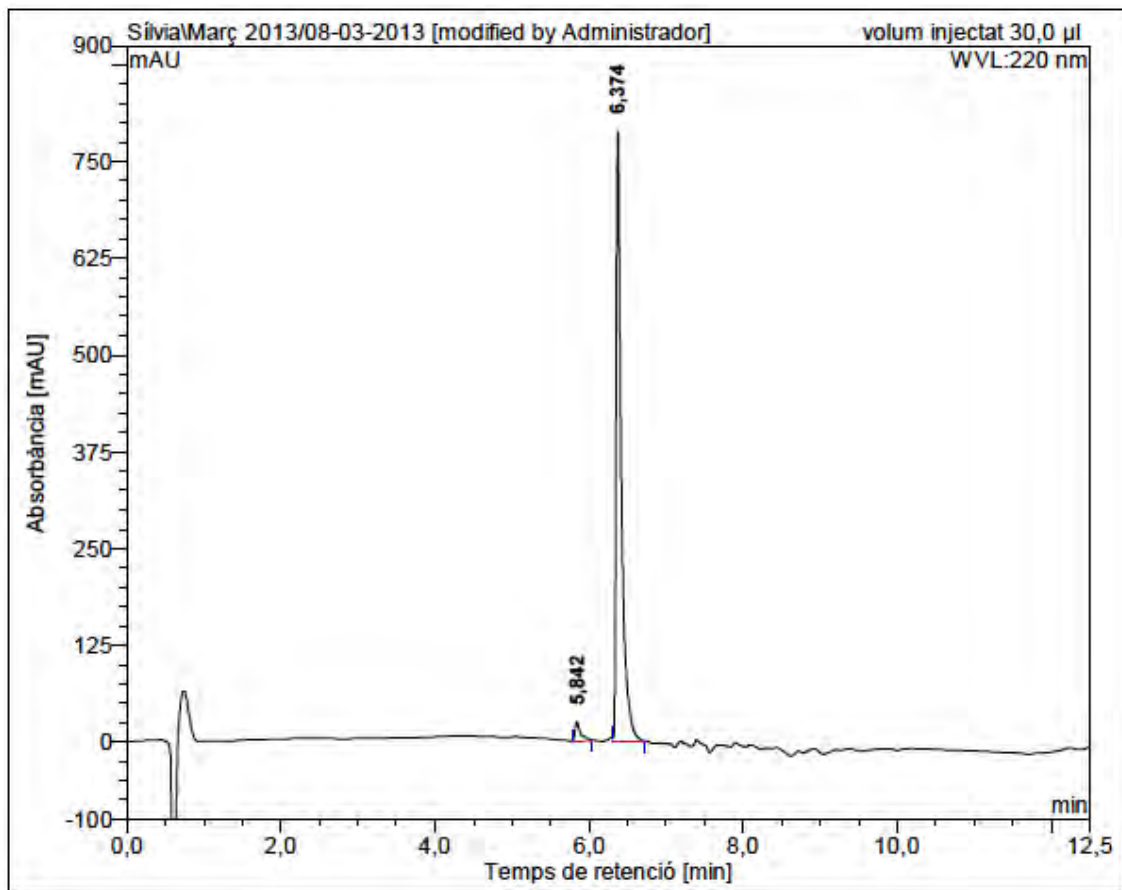
ESI-MS ( $m/z$ )



**Fmoc-Lys-Lys-Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

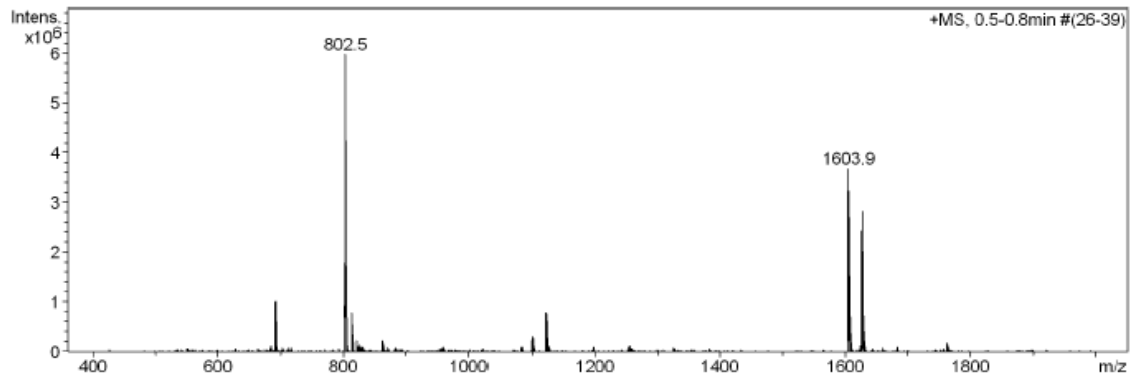
(Obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (**15**))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,84	24,997	2,136	3,32
2	6,37	788,144	62,278	96,68
Total:		813,141	64,414	100,00

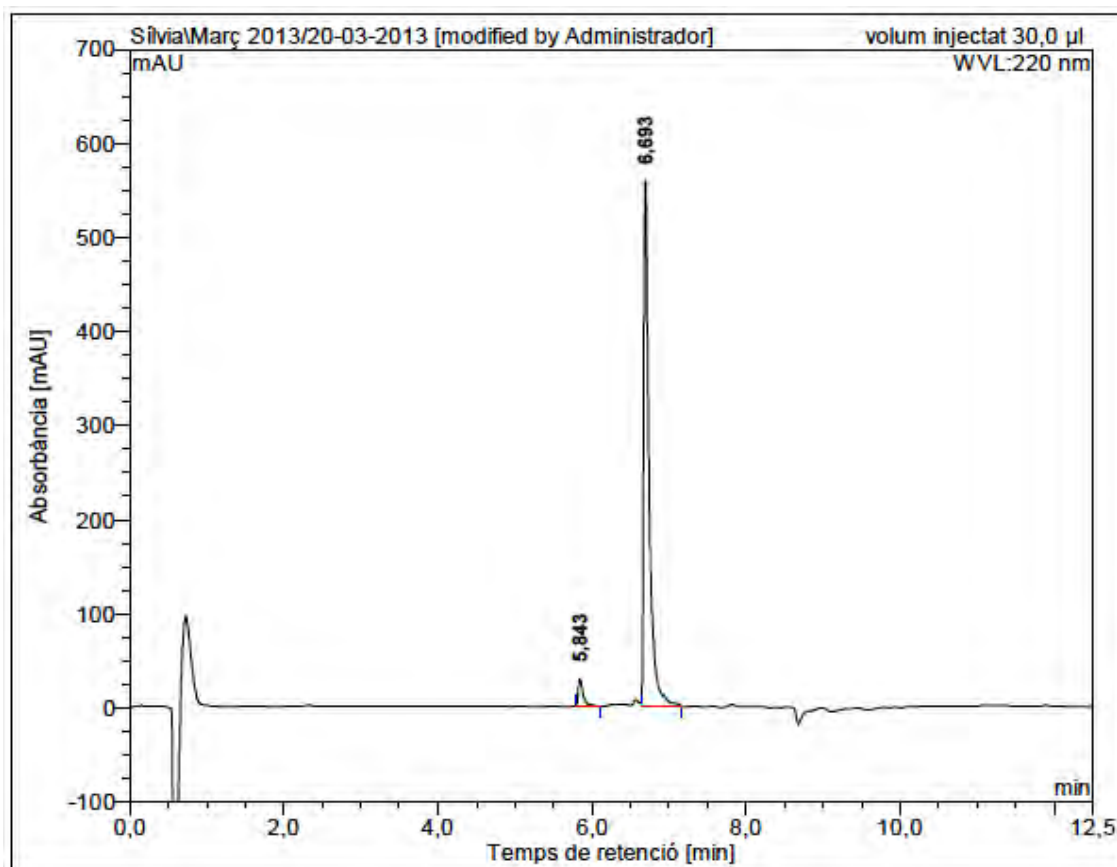
ESI-MS ( $m/z$ )



**Fmoc-Lys-Lys-Lys(pNZ)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln-OAll**

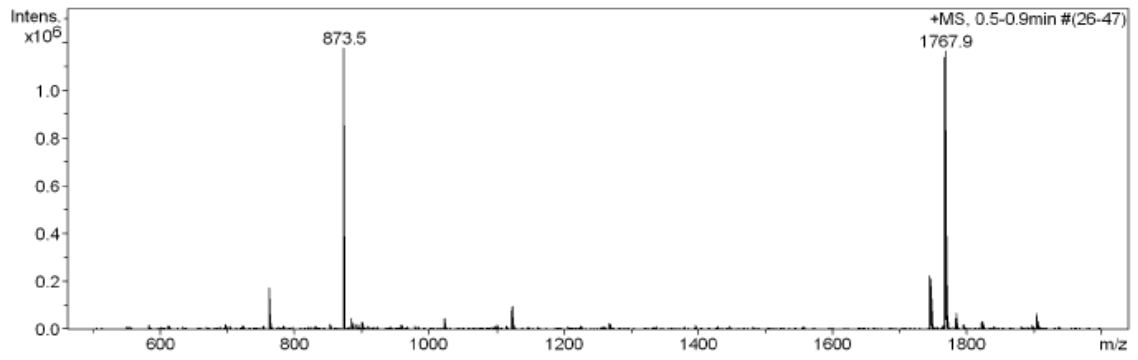
(Obtained from Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA)-OAll (17))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,84	28,962	2,158	4,52
2	6,69	559,513	45,588	95,48
Total:		588,475	47,746	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )

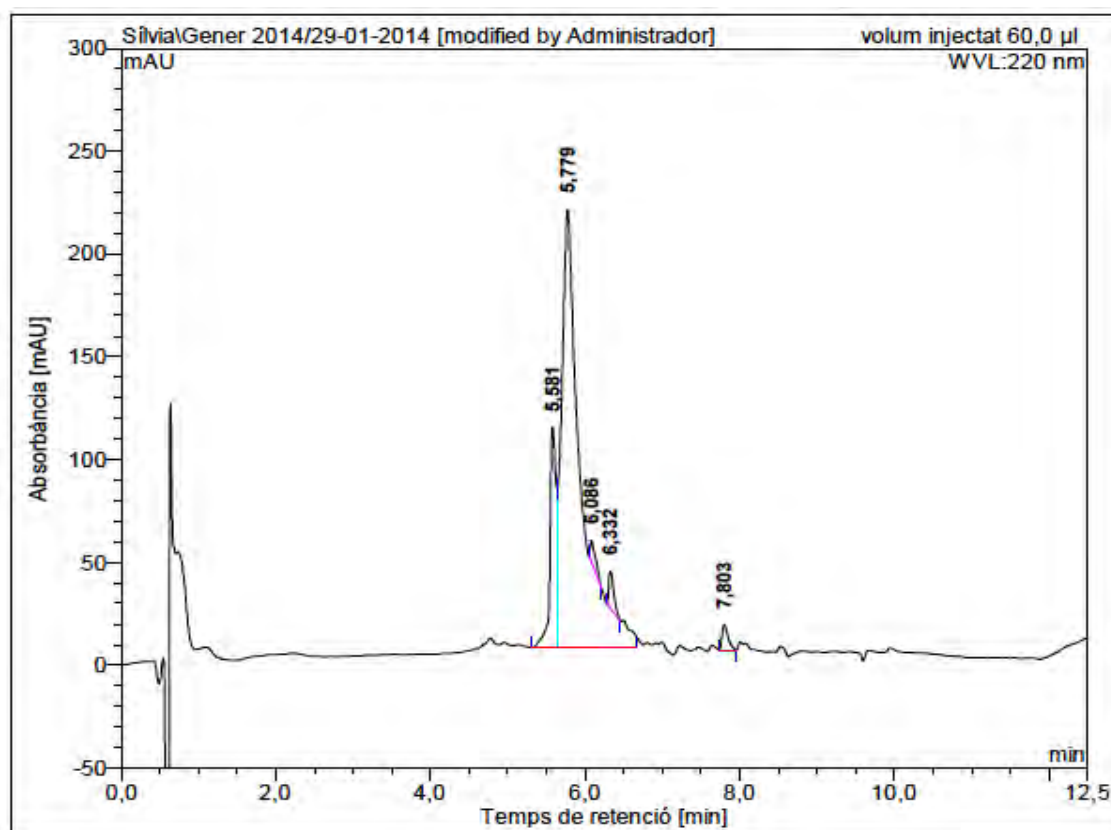


#### 4. Synthesis of cyclic peptidyl resins

##### c(Lys-Lys-Pra-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)

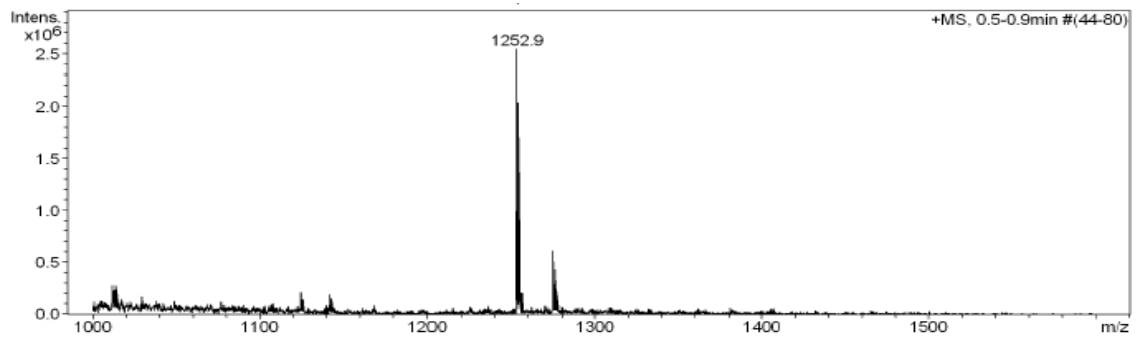
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pra-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA))  
(1))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,58	107,016	9,778	13,04
2	5,78	212,985	61,756	82,37
3	6,09	10,670	0,972	1,30
4	6,33	17,982	1,390	1,85
5	7,80	12,217	1,080	1,44
Total:		360,871	74,977	100,00

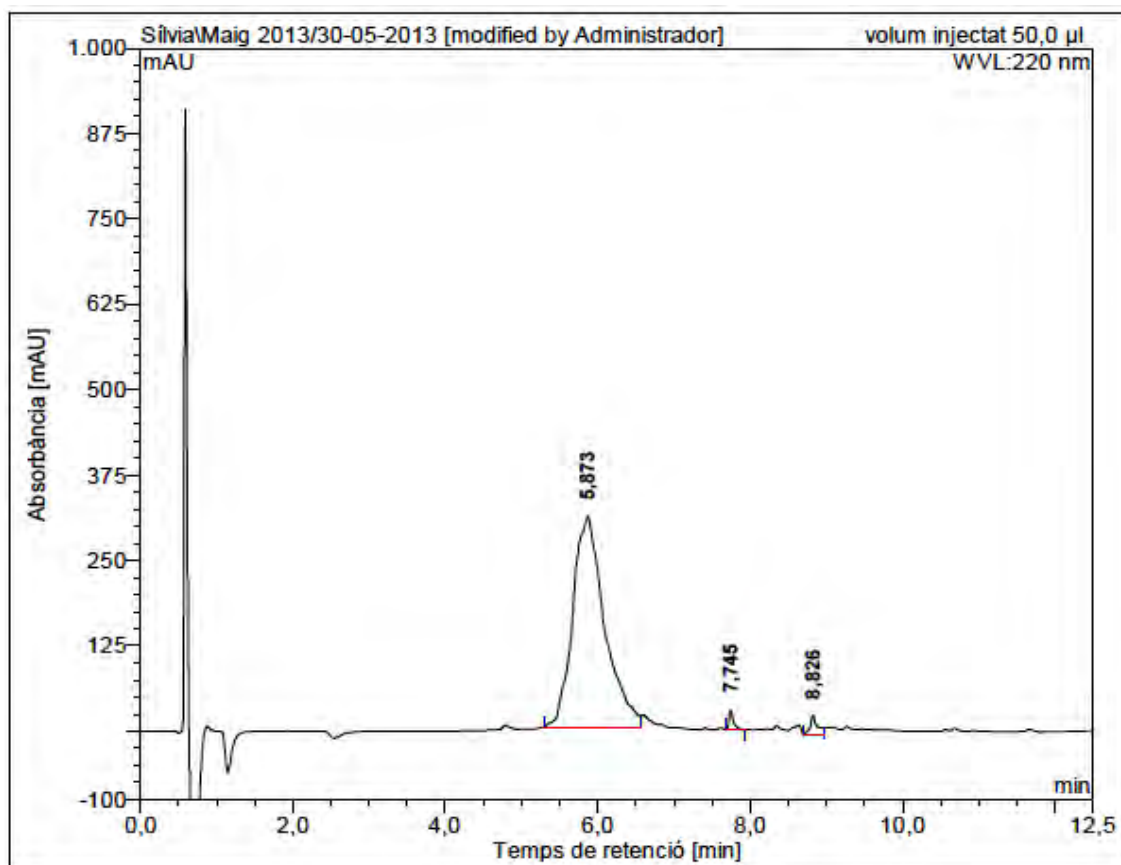
ESI-MS ( $m/z$ )



**c(Lys-Lys-Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA) (2))

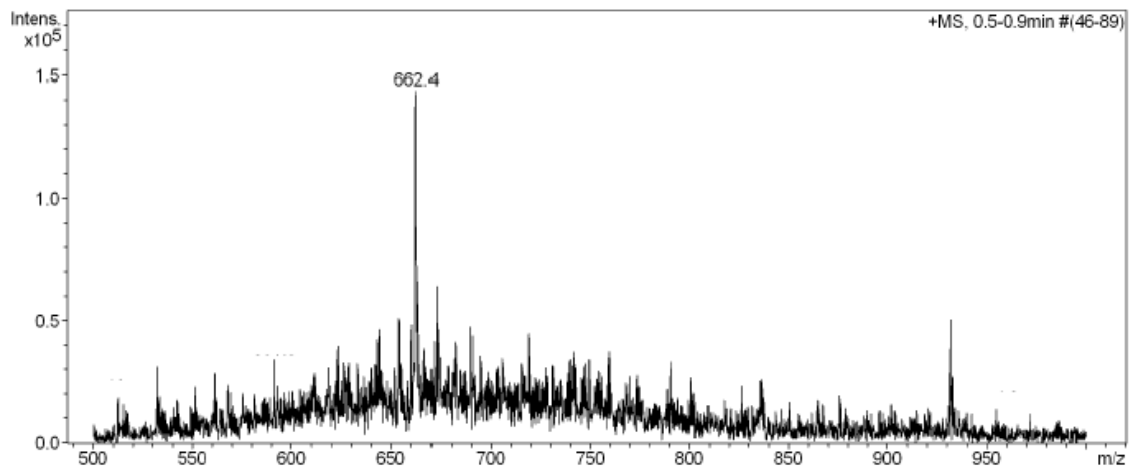
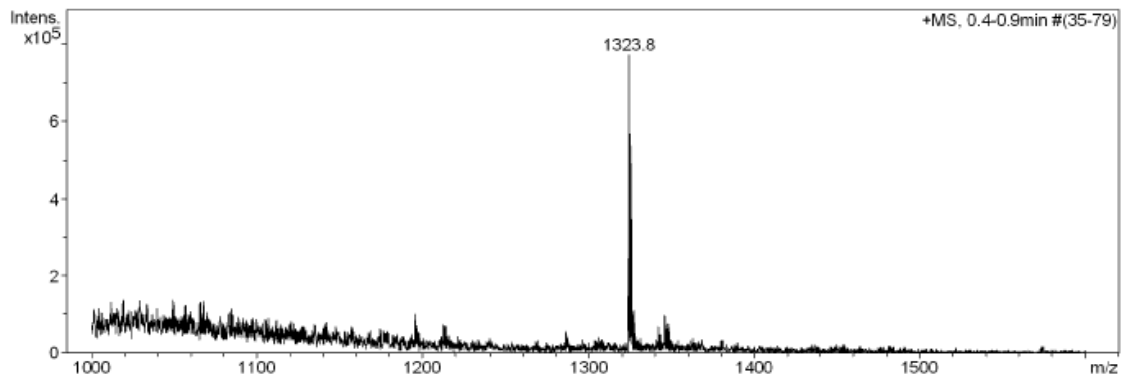
HPLC (λ=220 nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,87	307,710	149,078	96,43
2	7,75	28,797	1,941	1,26
3	8,83	29,763	3,582	2,32
Total:		366,270	154,601	100,00



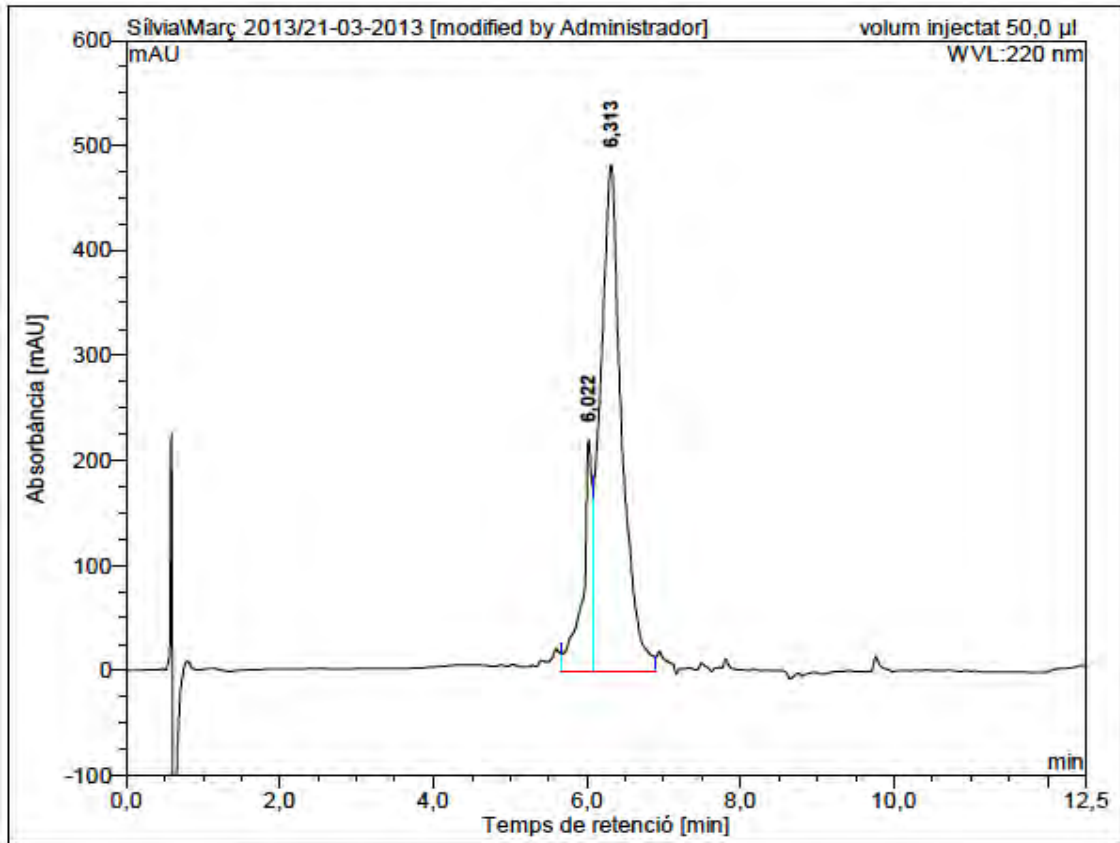
ESI-MS ( $m/z$ )



**c(Lys-Lys-Lys(pNZ)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

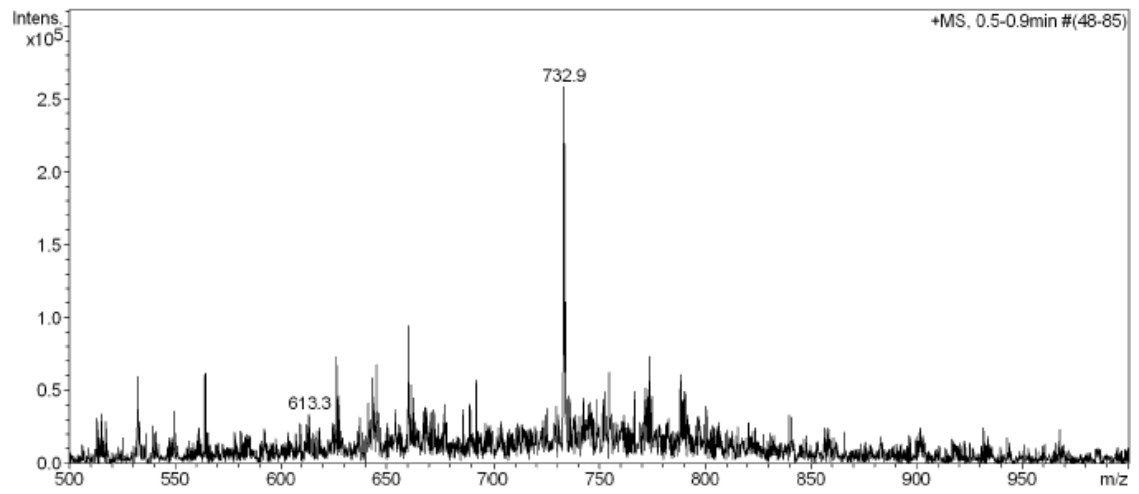
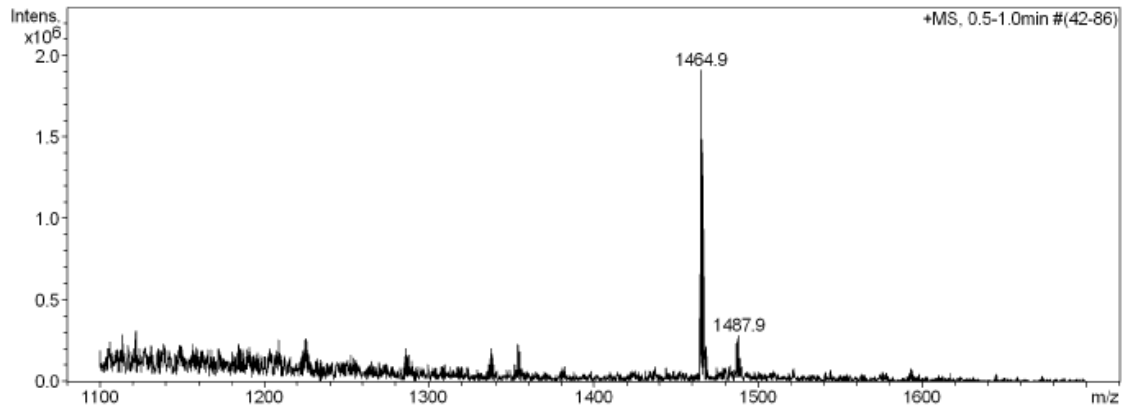
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(pNZ)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA) (16))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,02	221,802	31,142	16,58
2	6,31	483,039	156,709	83,42
Total:		704,841	187,851	100,00

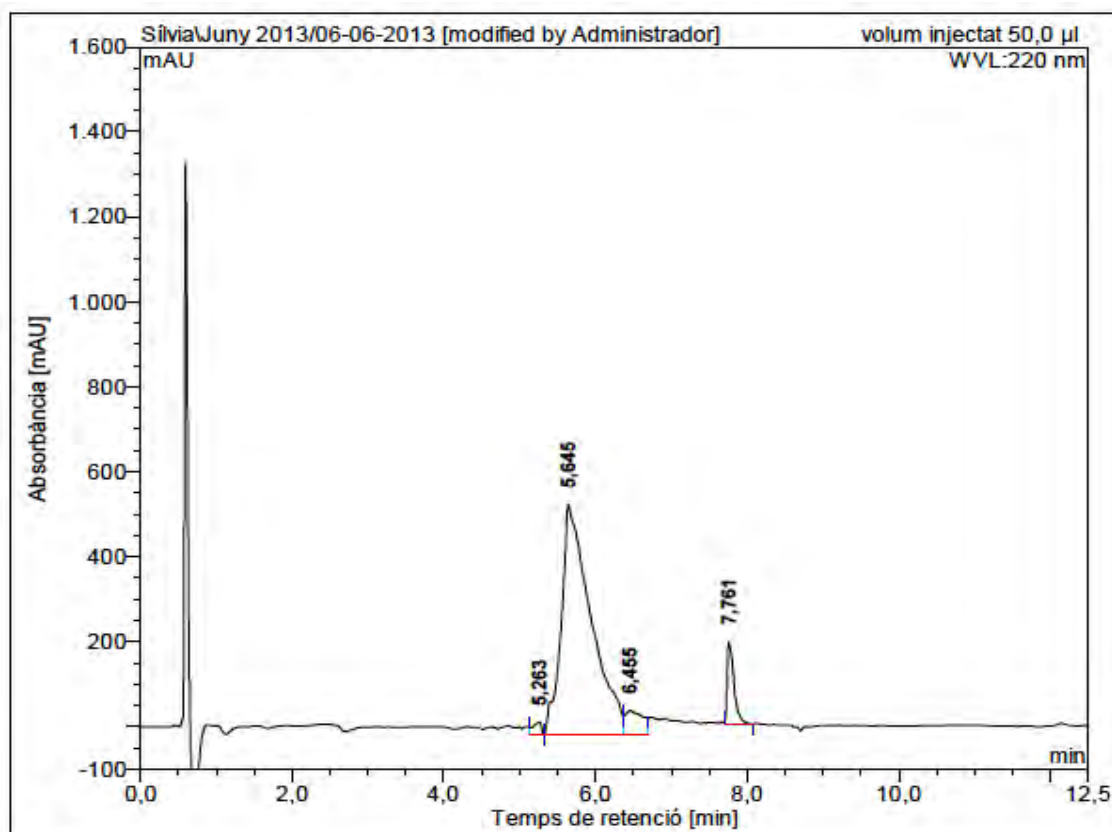
ESI-MS ( $m/z$ )



**c(Lys-Lys-Lys(Ahx)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

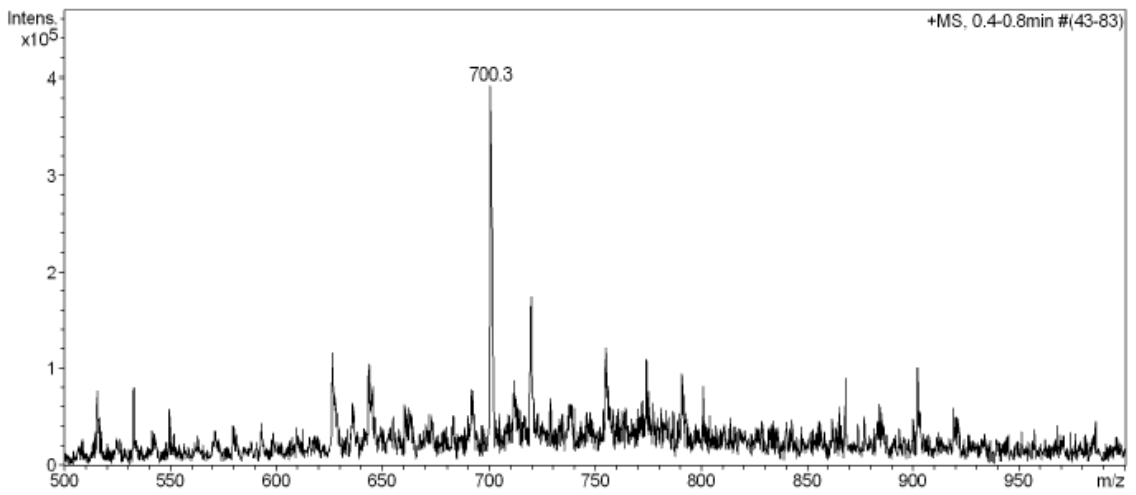
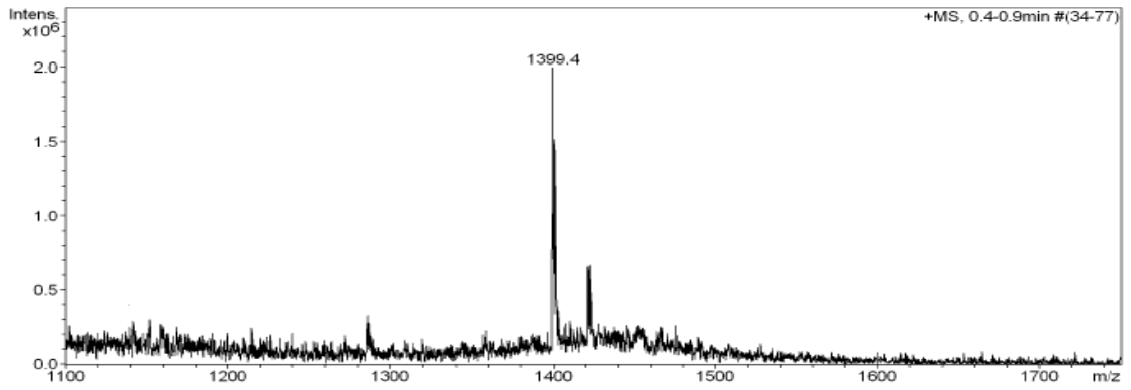
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Ahx)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA) (**18**))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,26	28,114	3,508	1,24
2	5,65	540,825	244,157	86,26
3	6,46	56,268	15,357	5,43
4	7,76	194,596	20,033	7,08
Total:		819,803	283,055	100,00

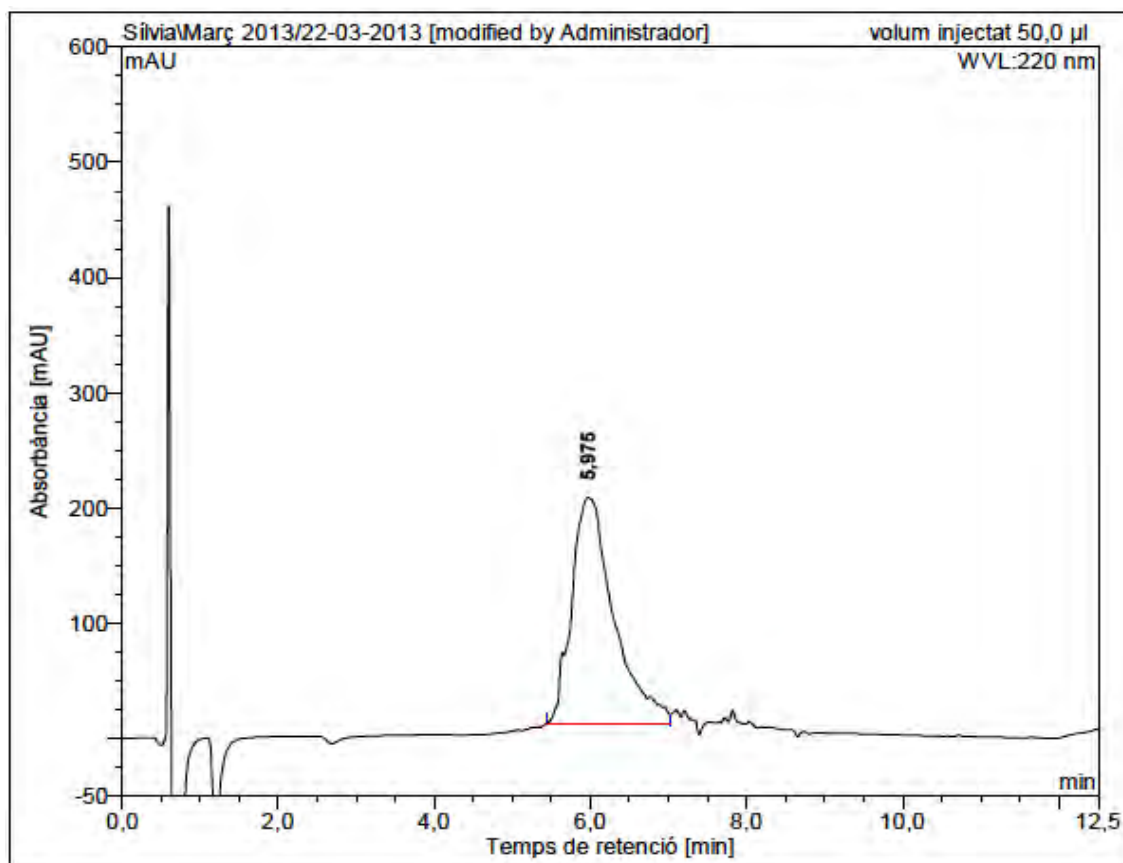
ESI-MS ( $m/z$ )



**c(Lys-Lys-Lys(Ahx-CO-C≡CH)-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)**

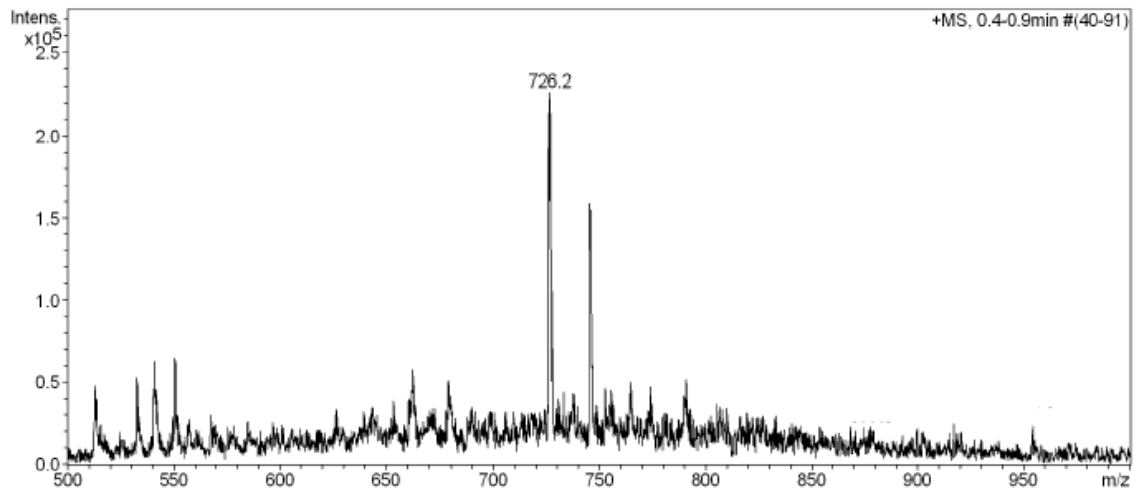
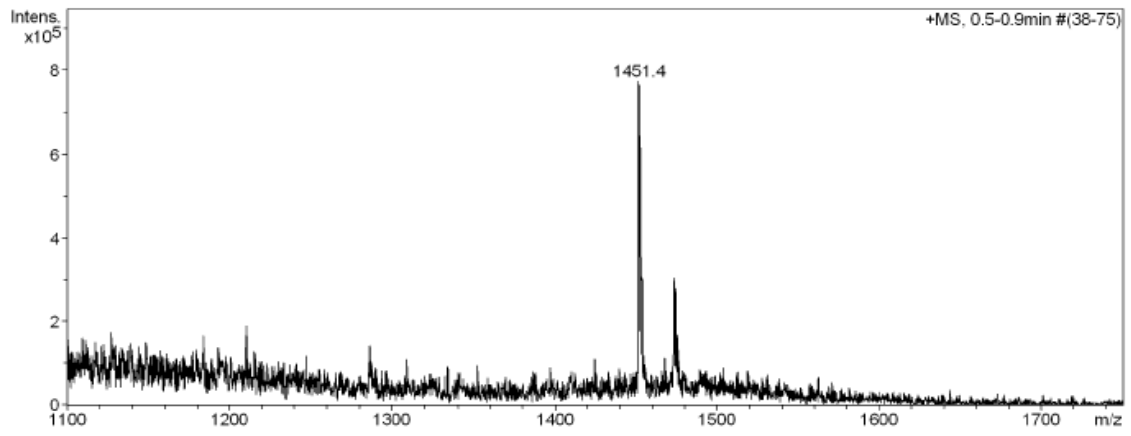
(Obtained from c(Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Ahx-CO-C≡CH)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Glu(Rink-MBHA) (3))

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,98	196,255	122,918	100,00
Total:		196,255	122,918	100,00

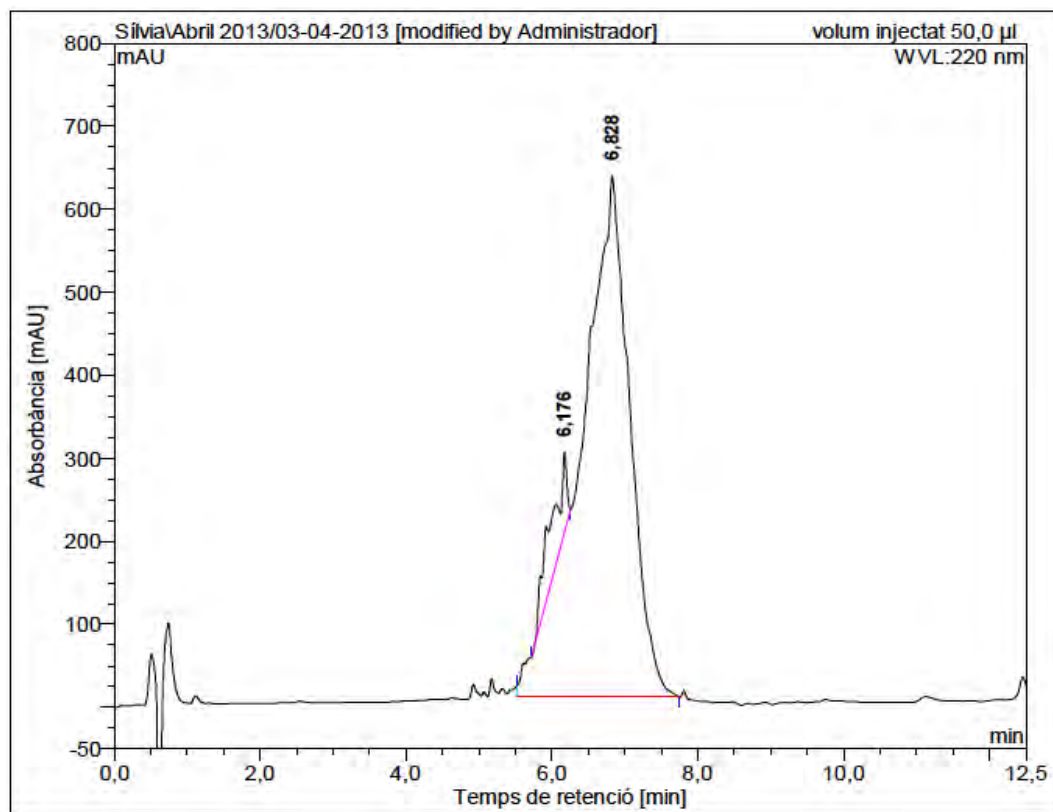
ESI-MS ( $m/z$ )



## 5. Peptide conjugates

### Peptide conjugate 22

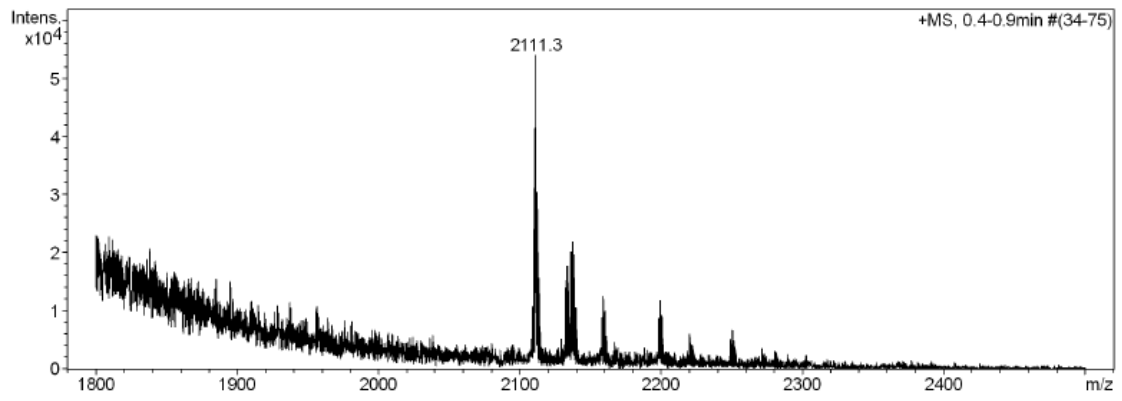
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



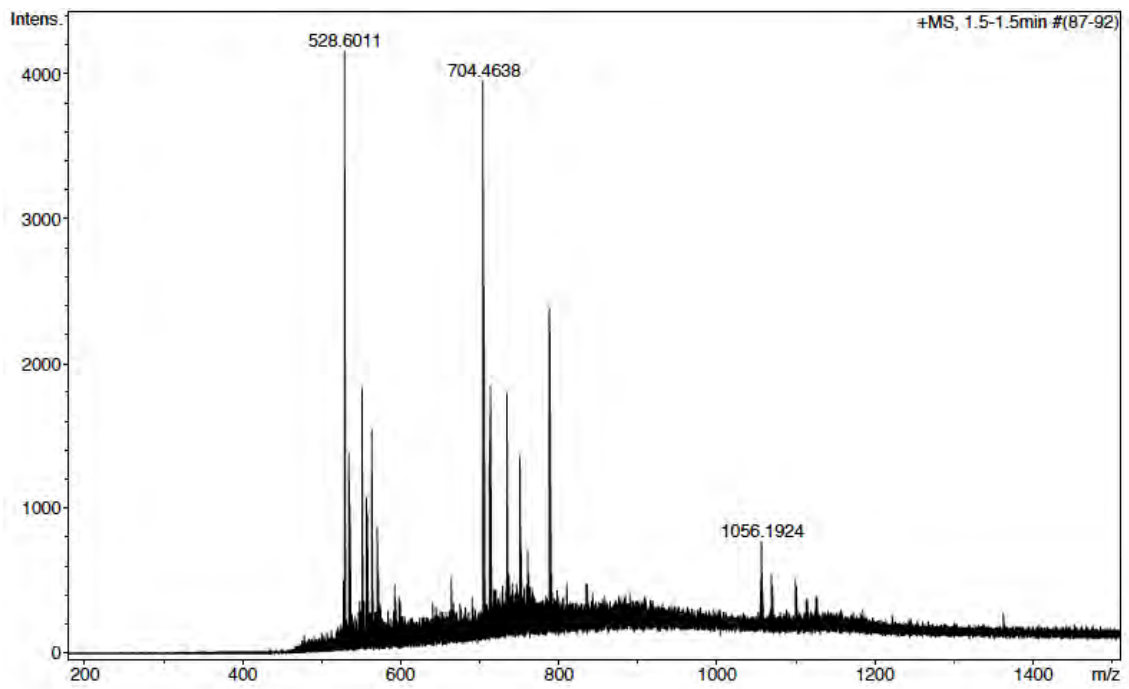
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,18	95,438	27,873	5,32
2	6,83	627,596	496,514	94,68
Total:		723,035	524,387	100,00

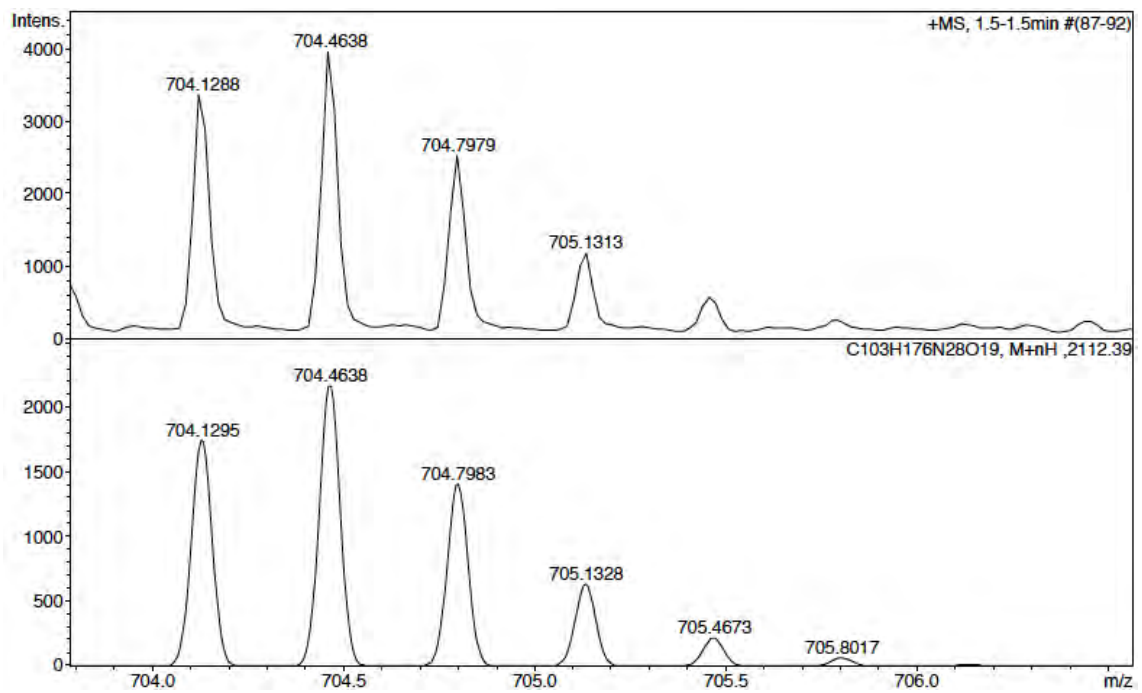
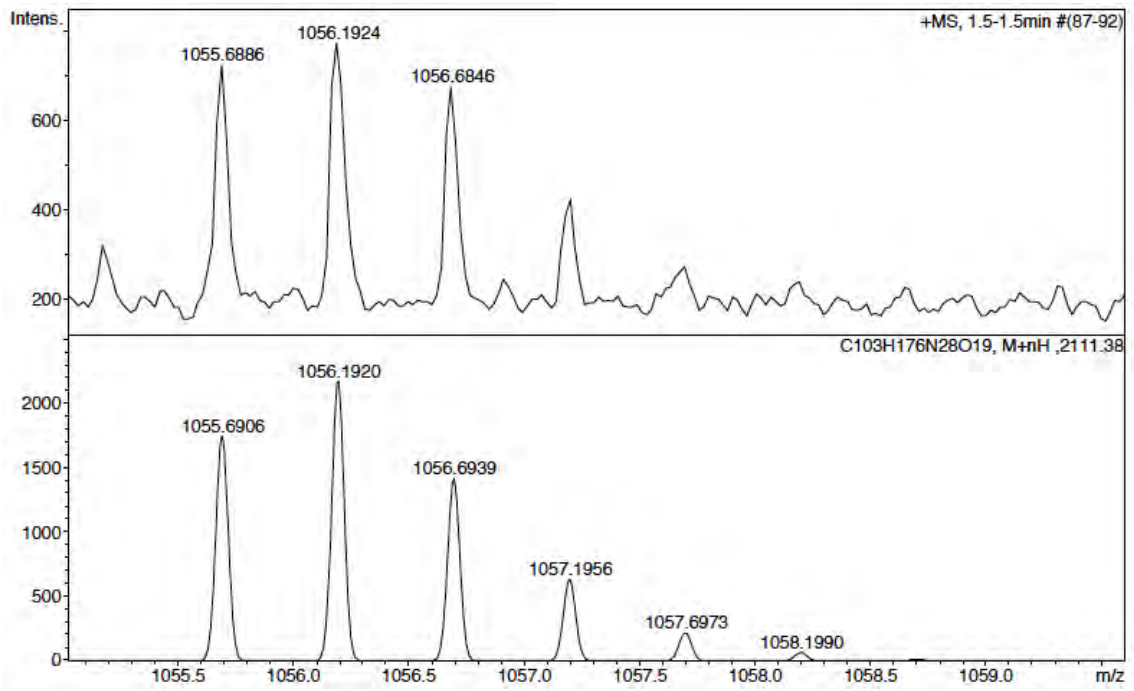


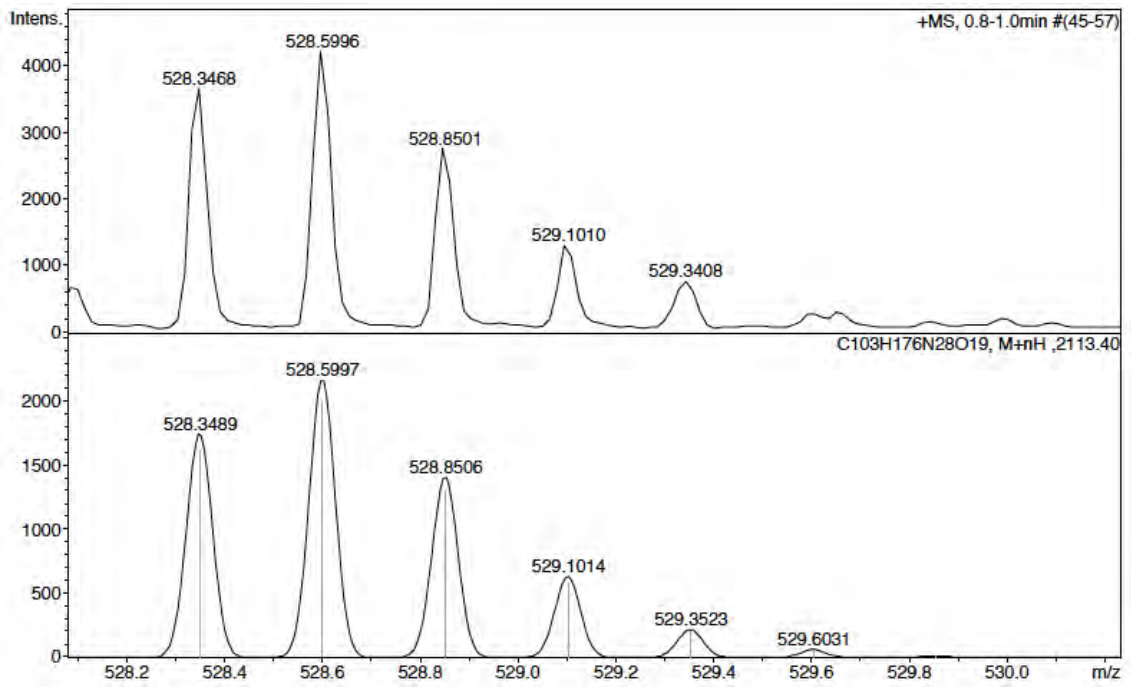
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

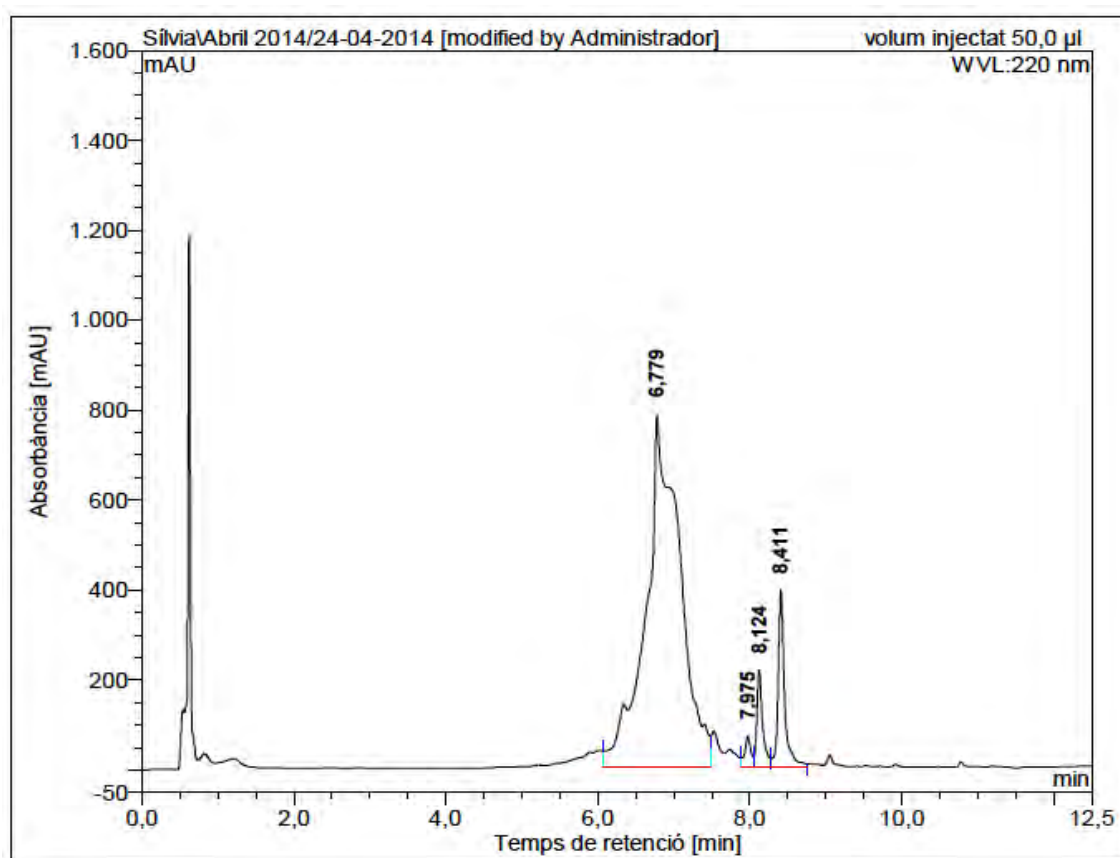






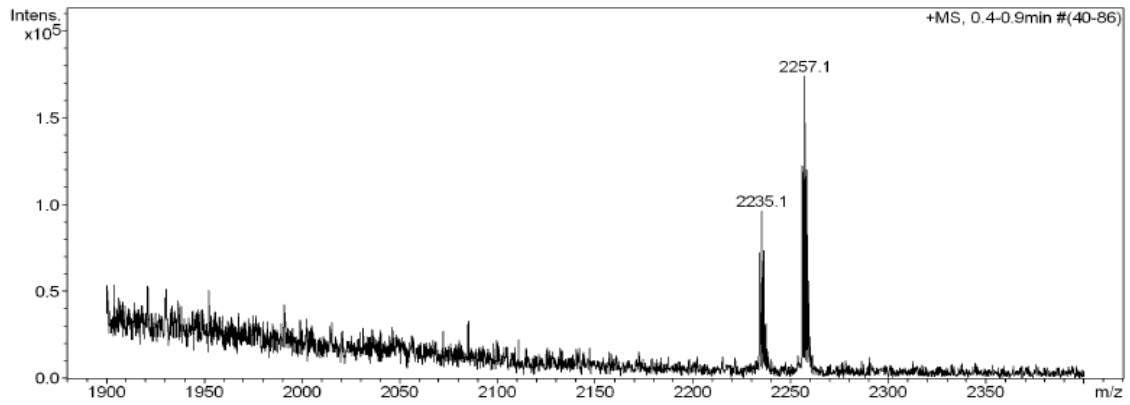
## Peptide conjugate 23

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

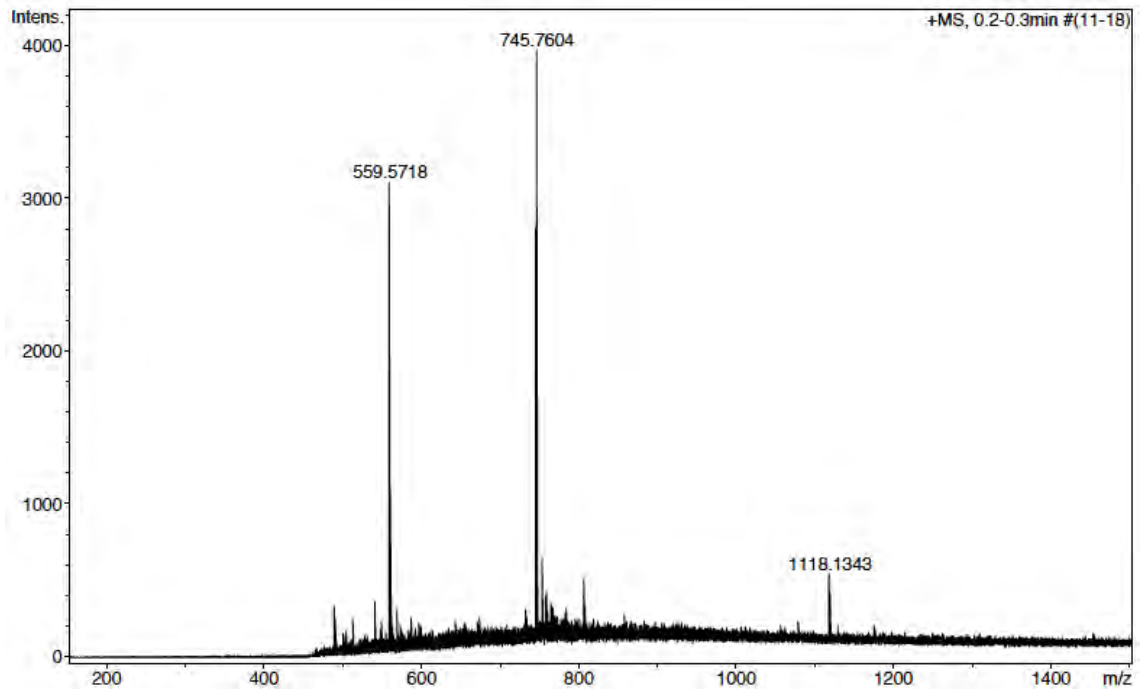


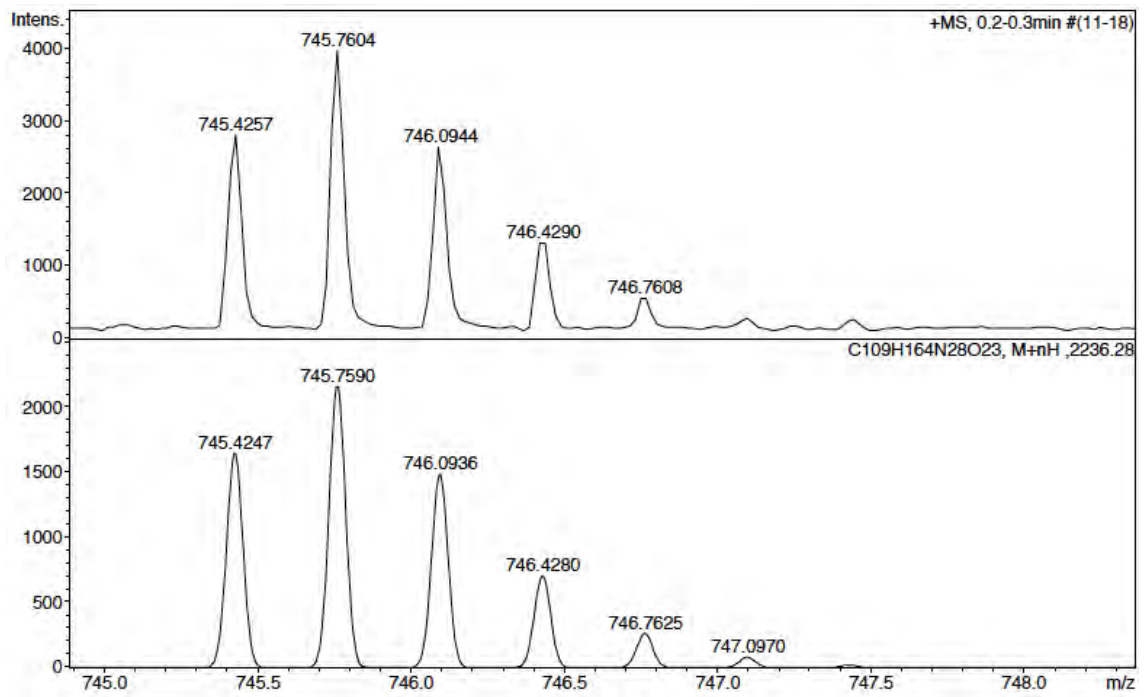
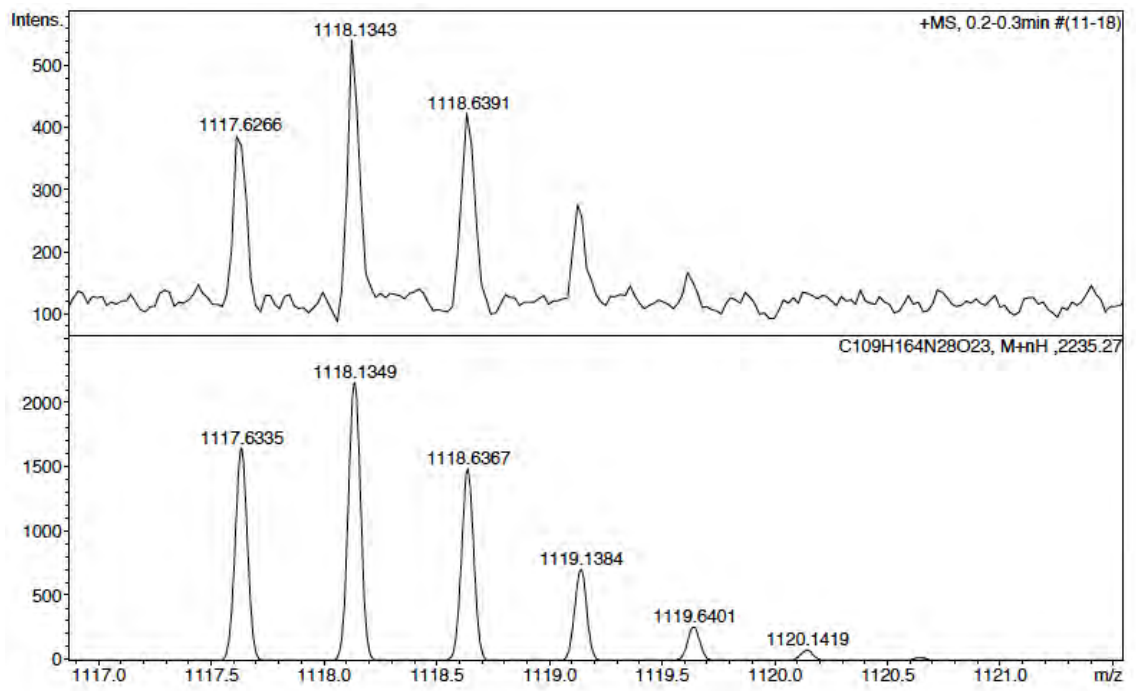
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU·min	Area relativa %
1	6,78	782,697	406,473	86,30
2	7,98	68,628	6,507	1,38
3	8,12	214,848	19,079	4,05
4	8,41	393,027	38,937	8,27
Total:		1459,200	470,996	100,00

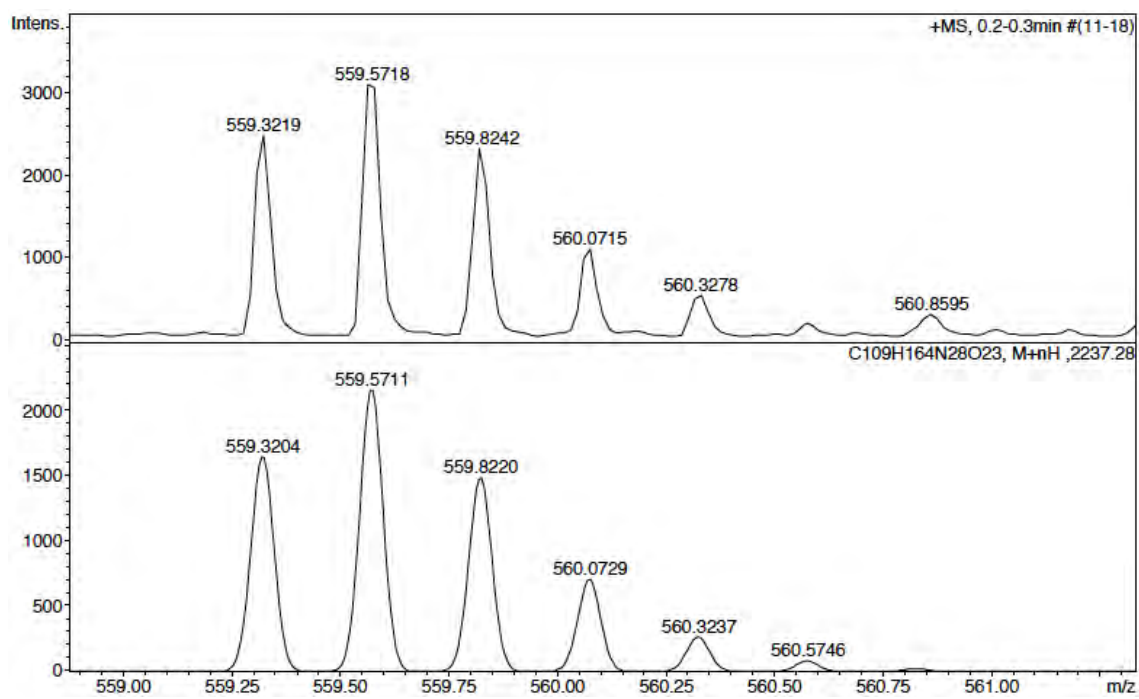
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

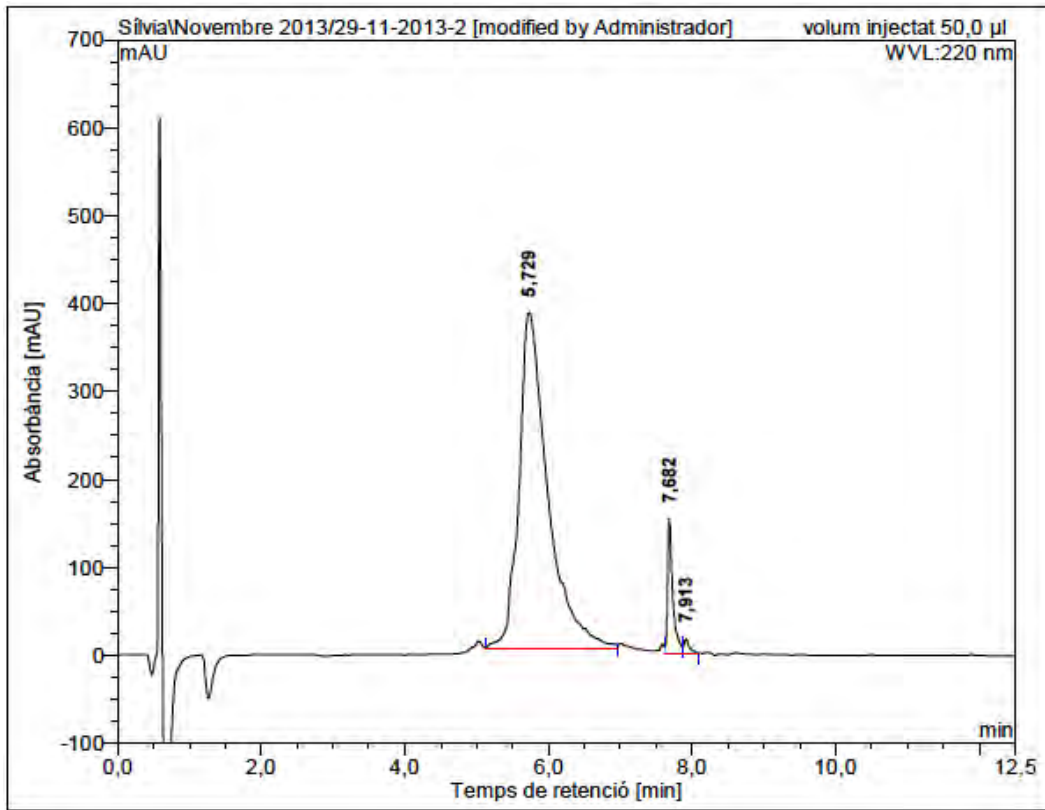






# BPC798

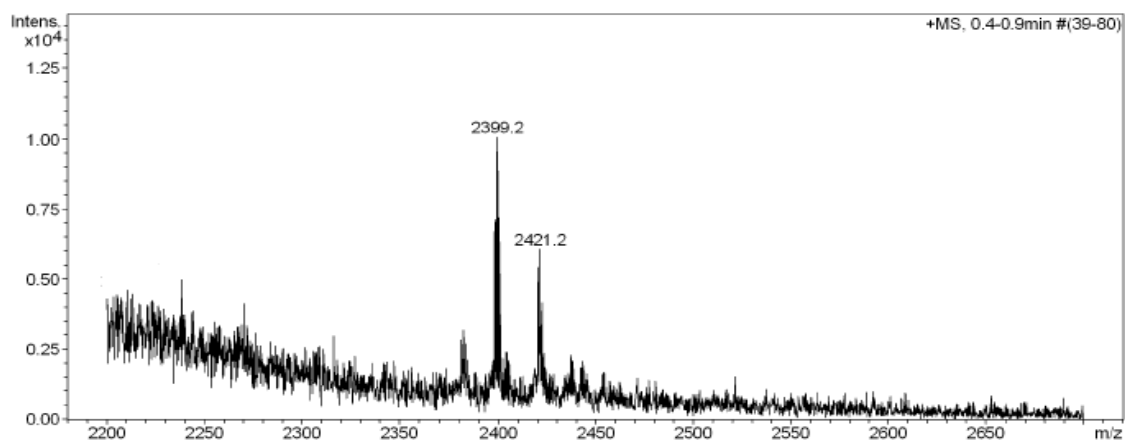
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



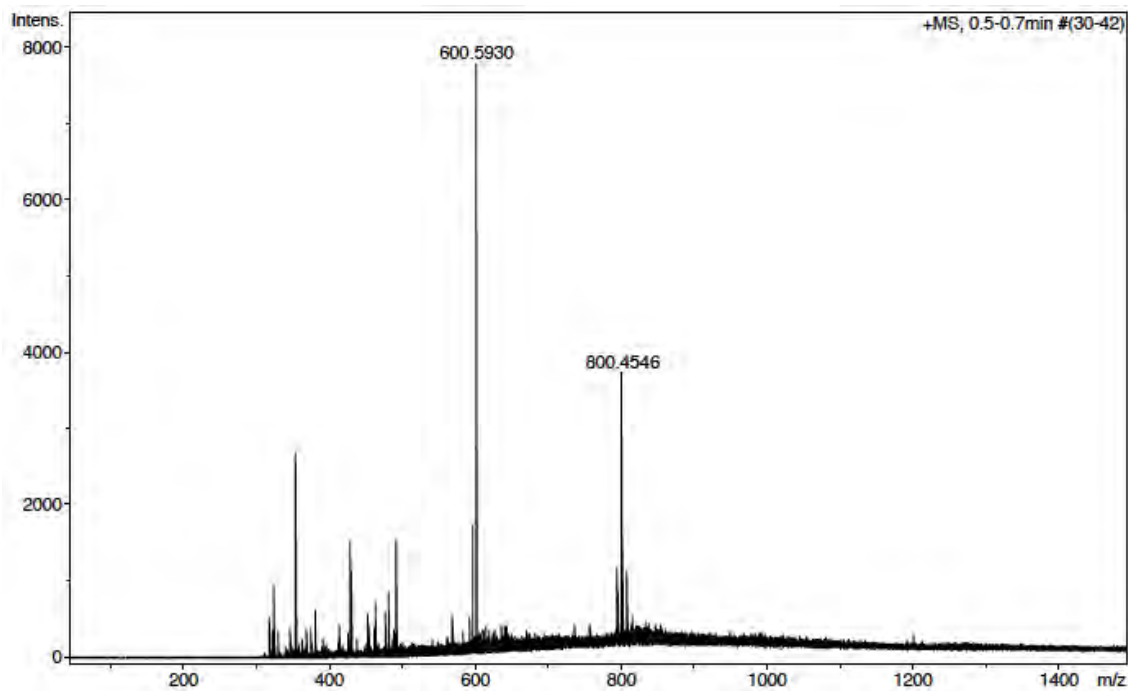
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,73	381,329	176,969	92,62
2	7,68	152,775	12,652	6,62
3	7,91	16,159	1,455	0,76
Total:		550,263	191,076	100,00

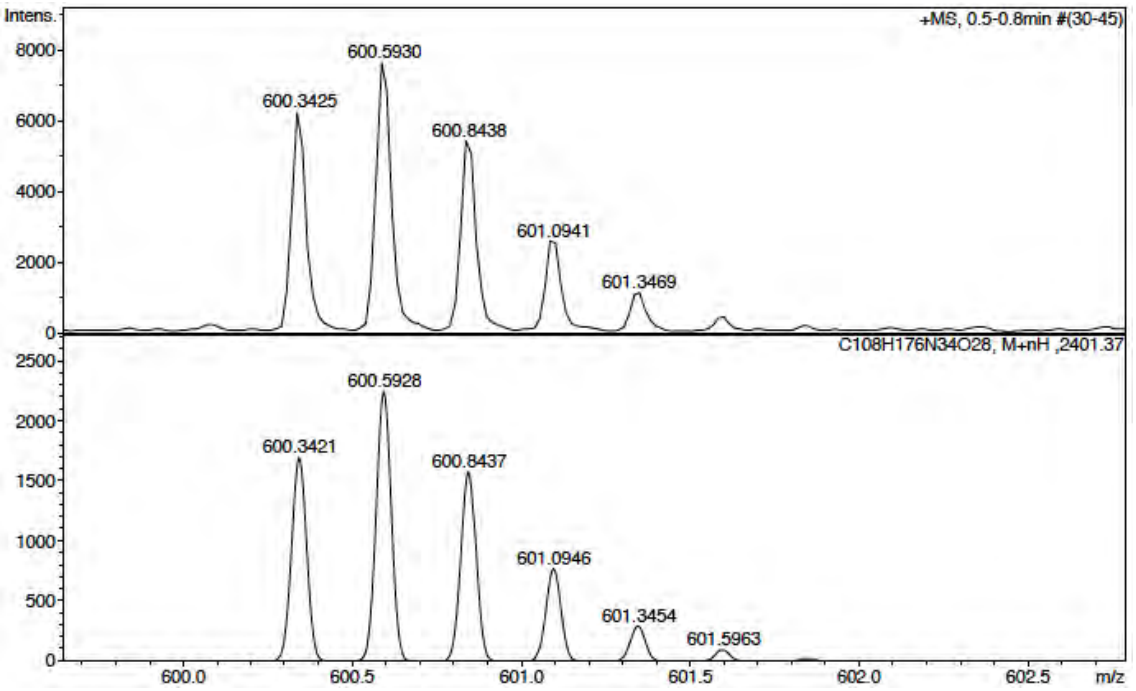
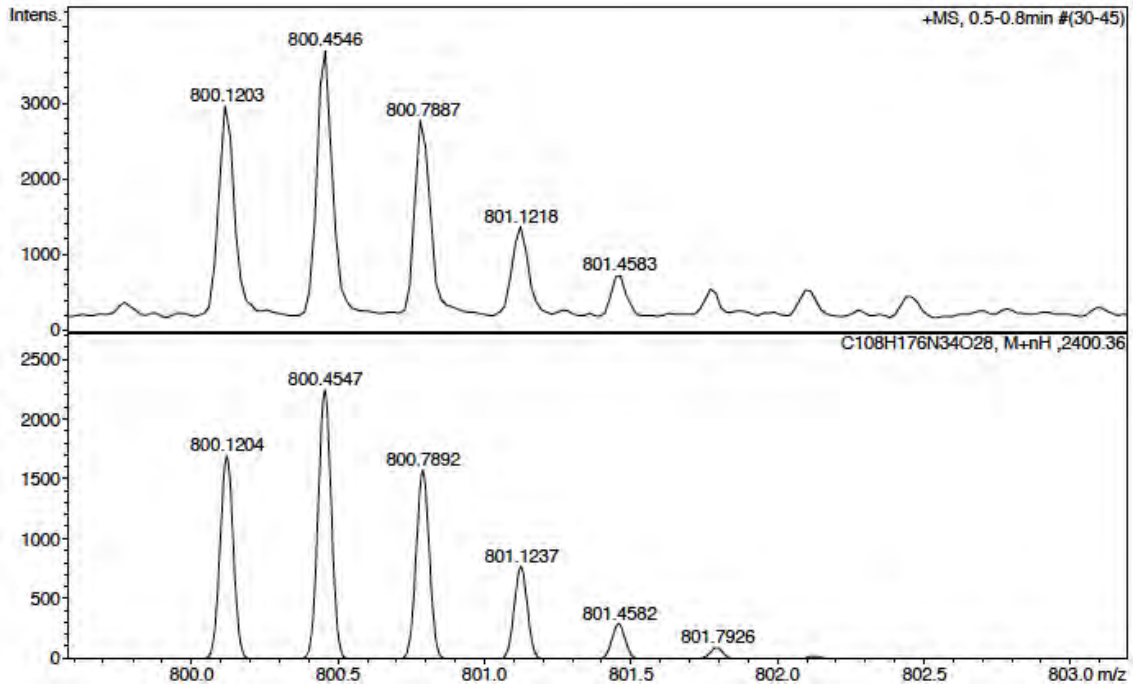


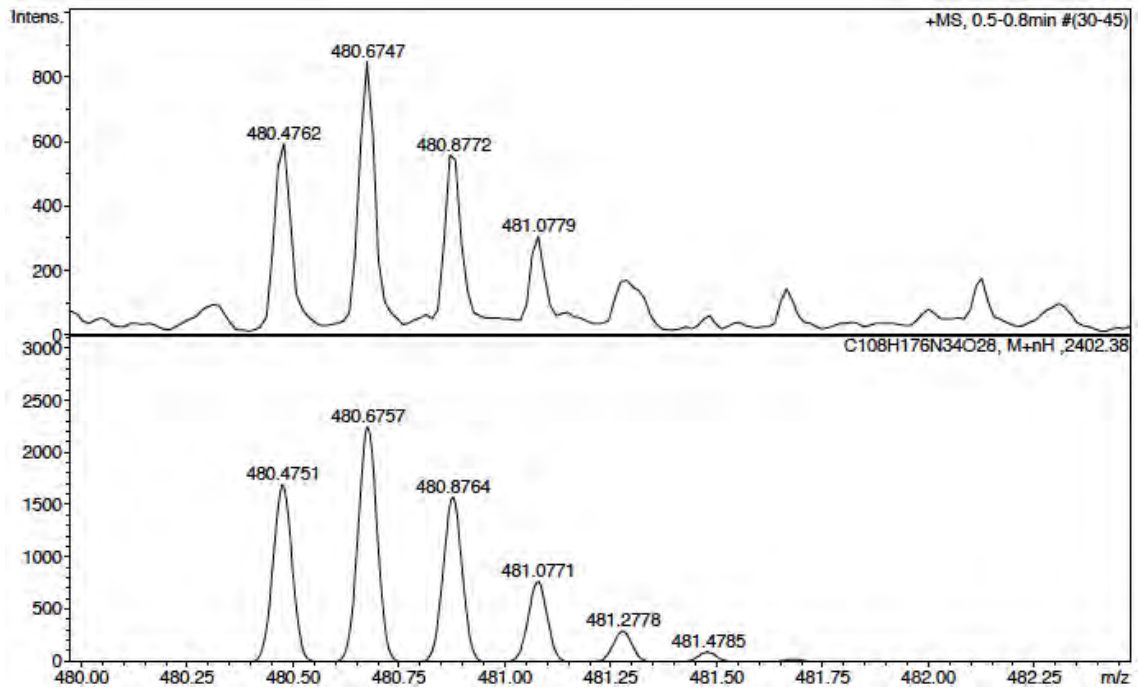
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

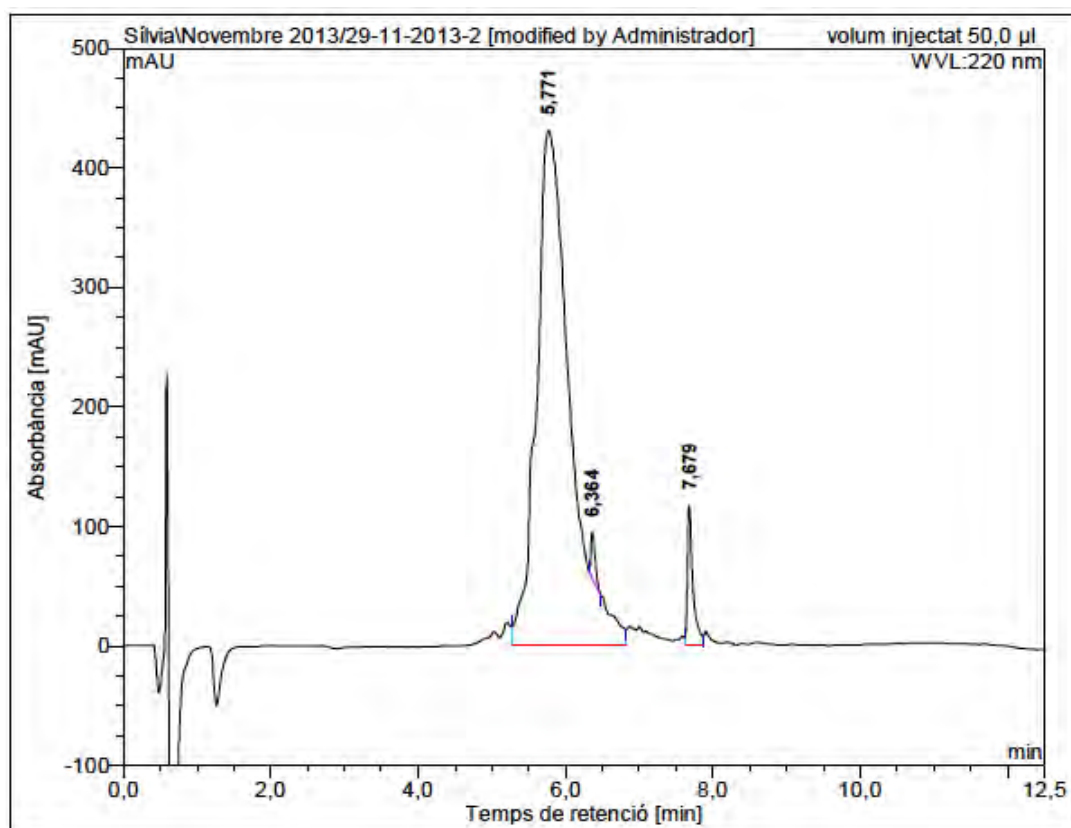






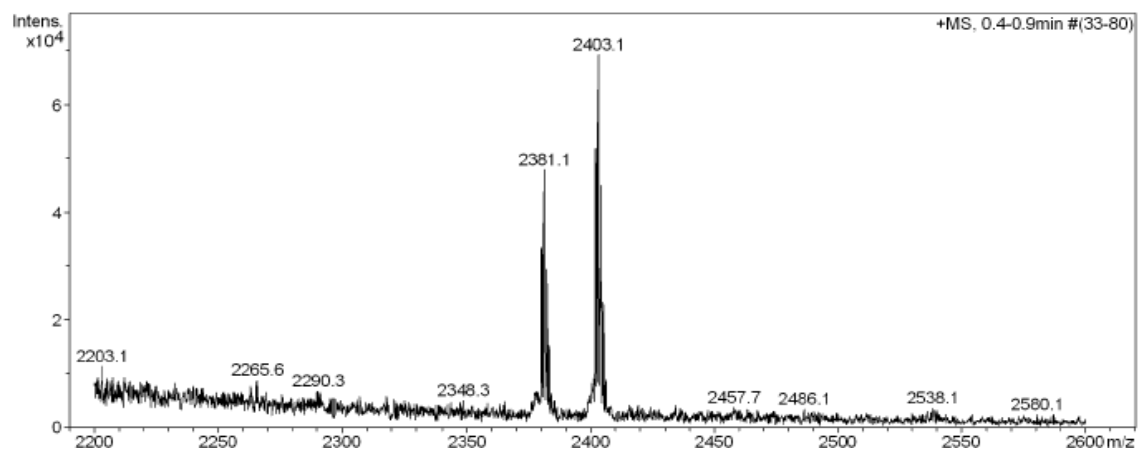
# BPC800

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

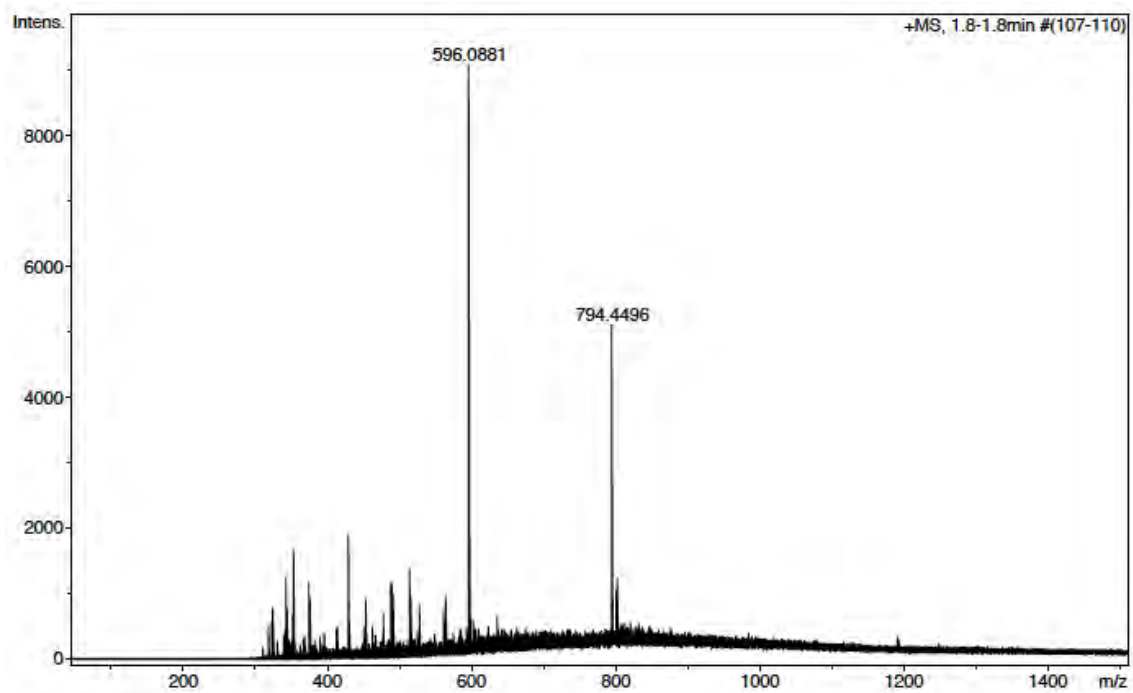


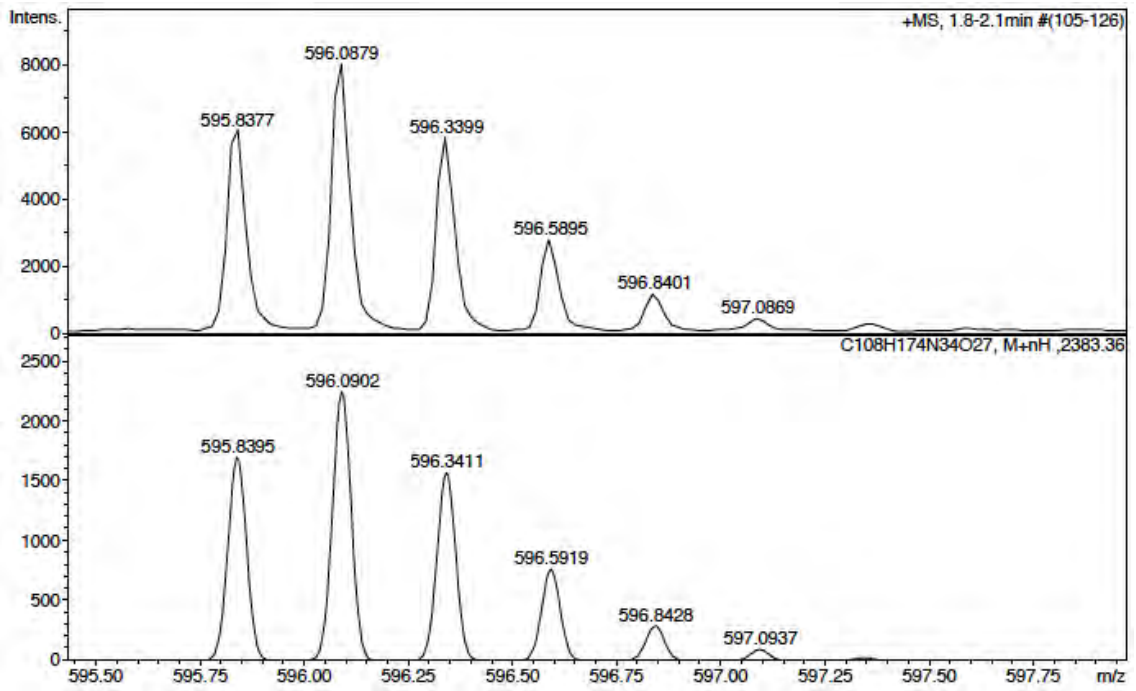
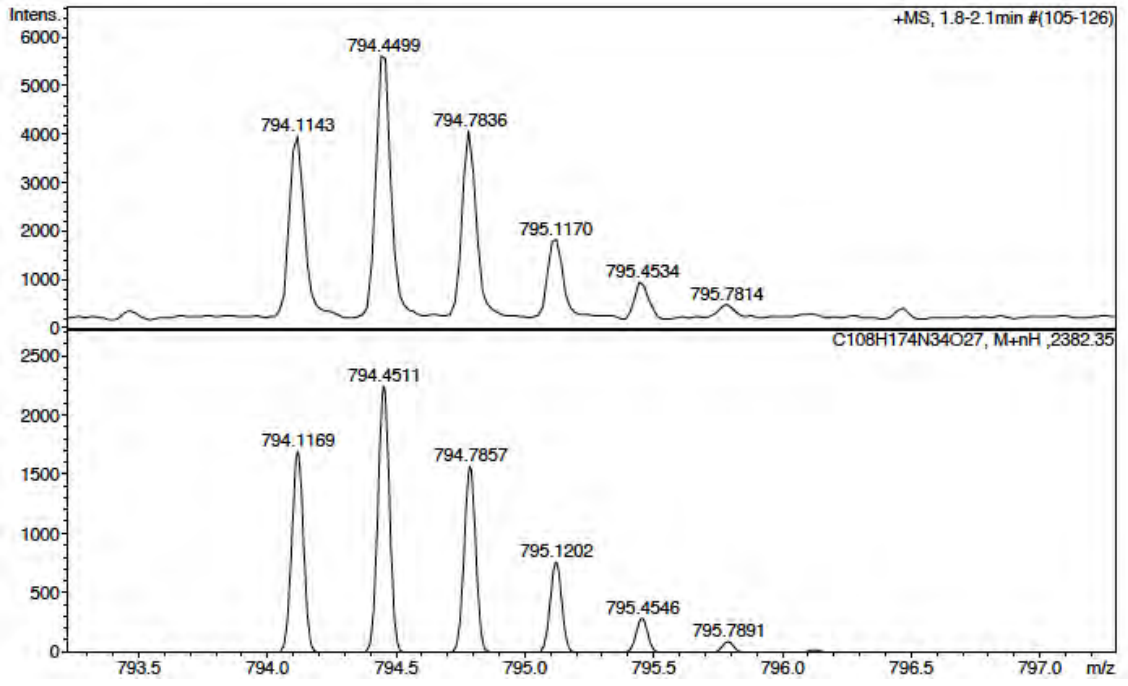
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,77	430,079	225,527	94,76
2	6,36	38,830	2,556	1,07
3	7,68	116,301	9,911	4,16
Total:		585,209	237,995	100,00

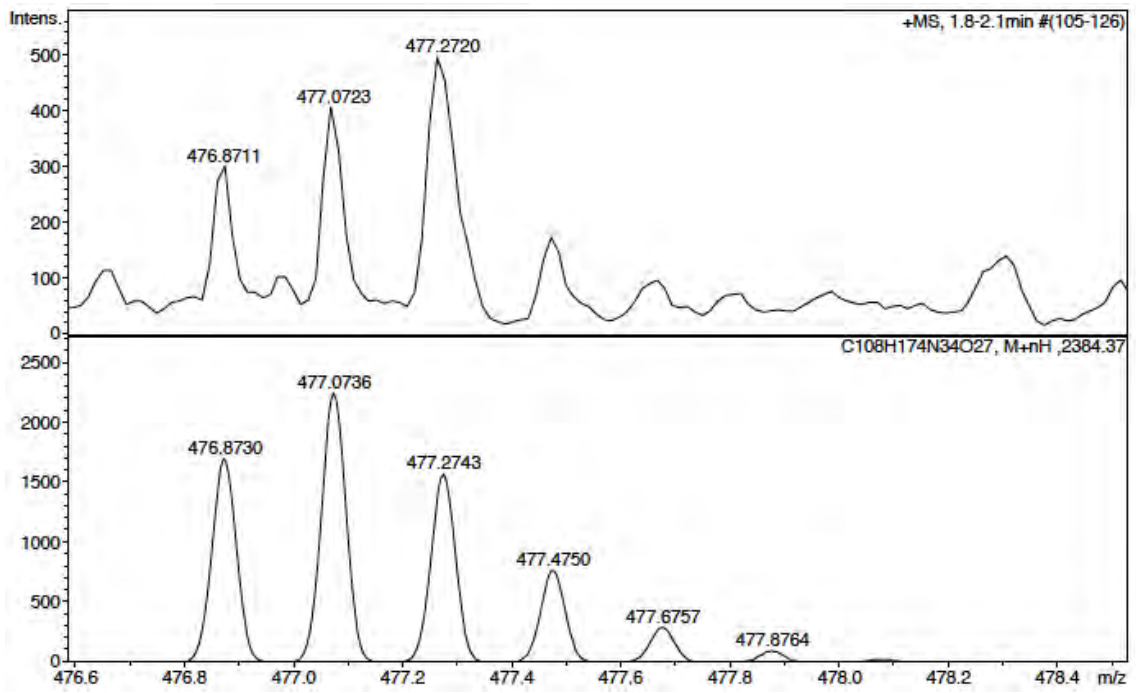
ESI-MS ( $m/z$ )

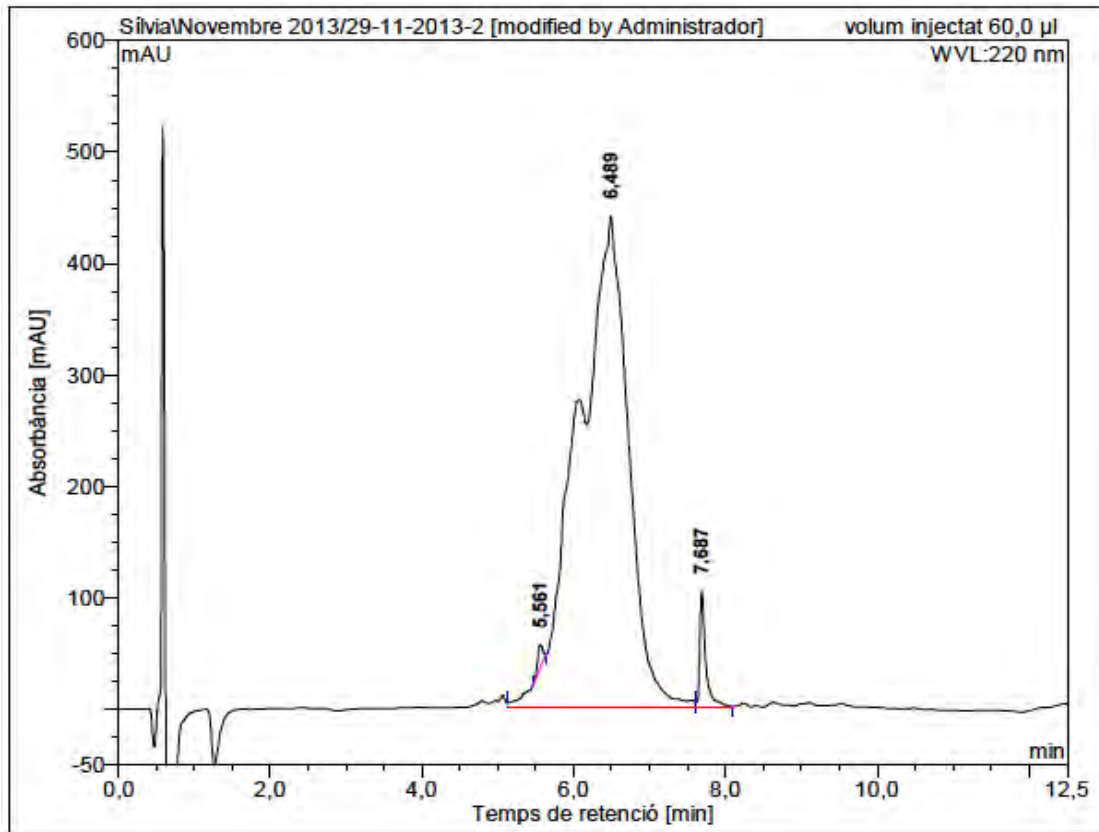


HRMS (ESI)  $m/z$





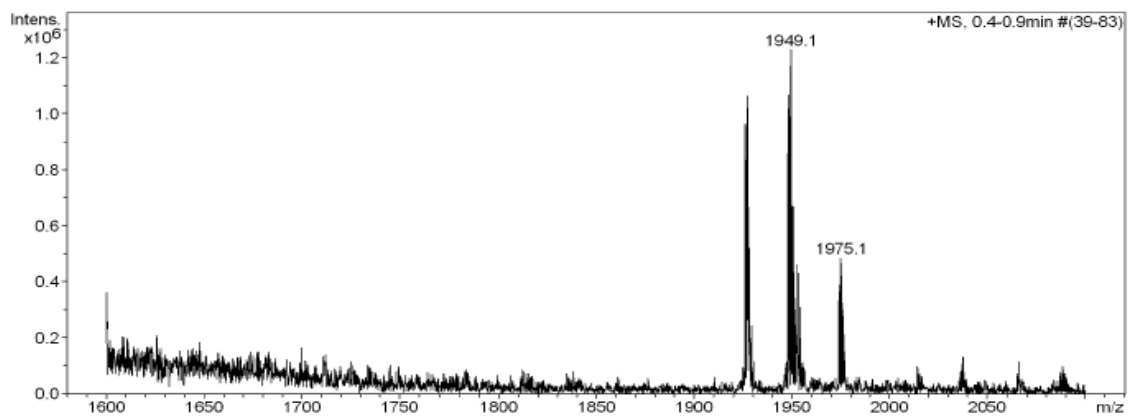


**BPC802**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

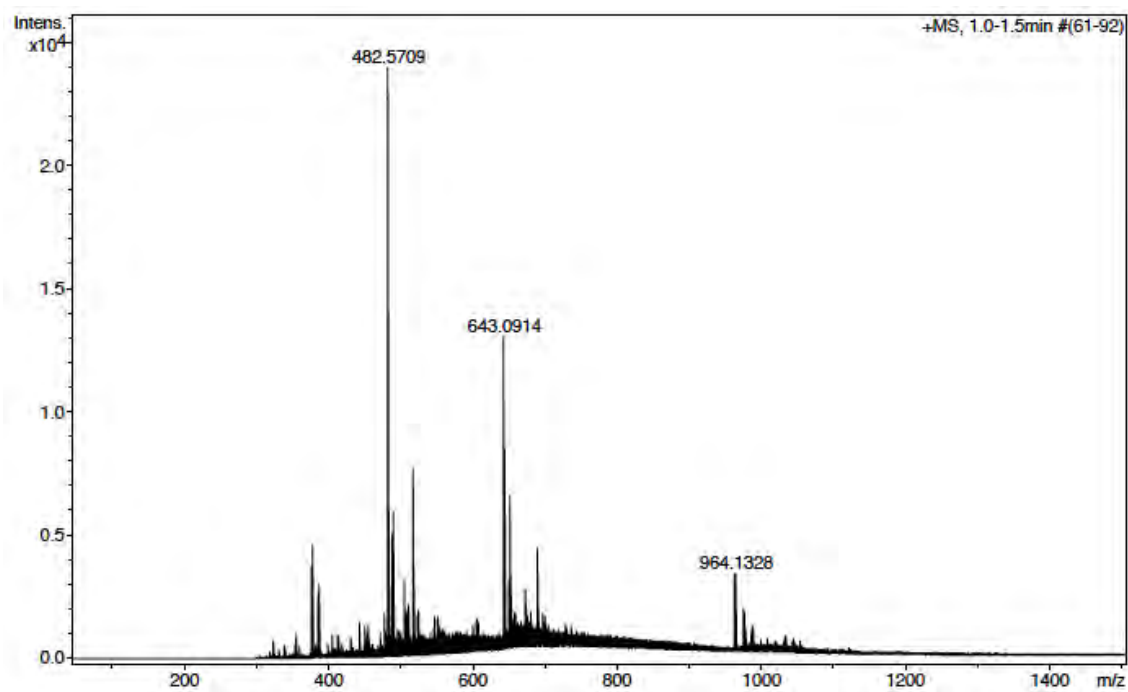
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,56	20,235	1,622	0,47
2	6,49	439,741	337,437	96,86
3	7,69	103,628	9,330	2,68
Total:		563,604	348,388	100,00

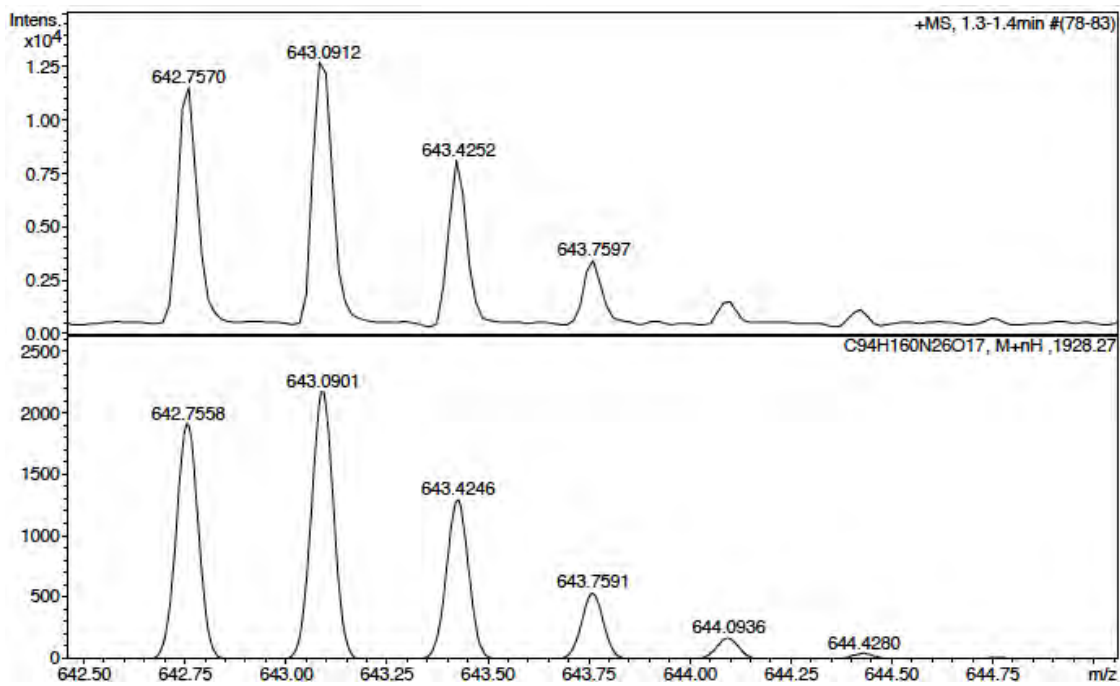
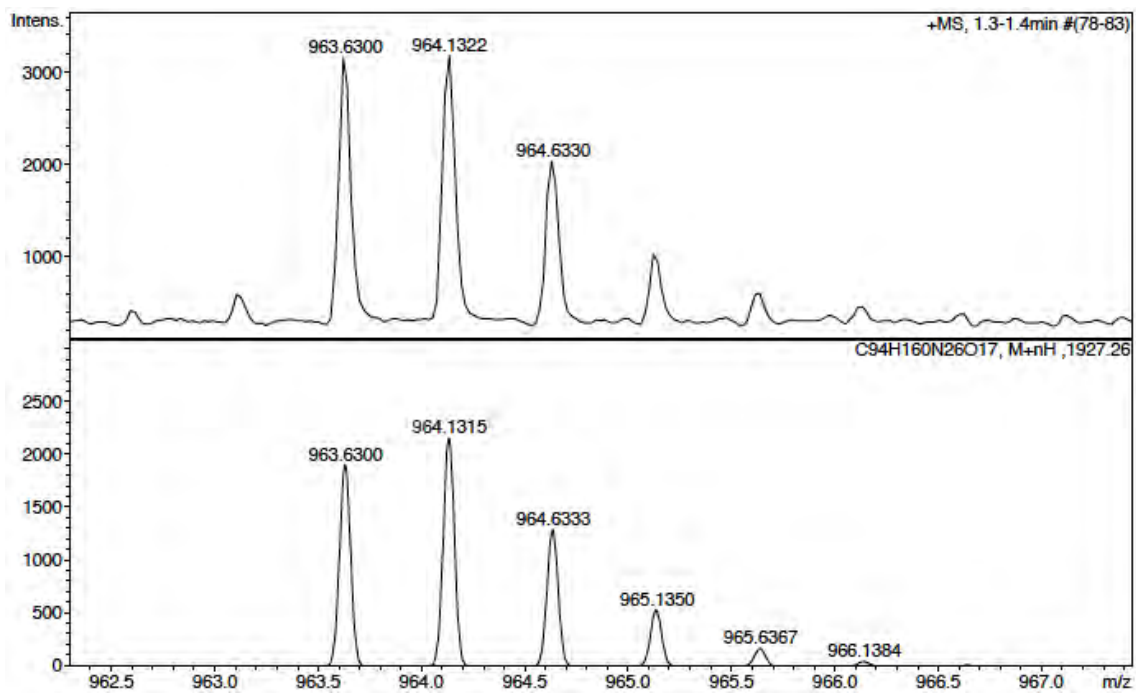


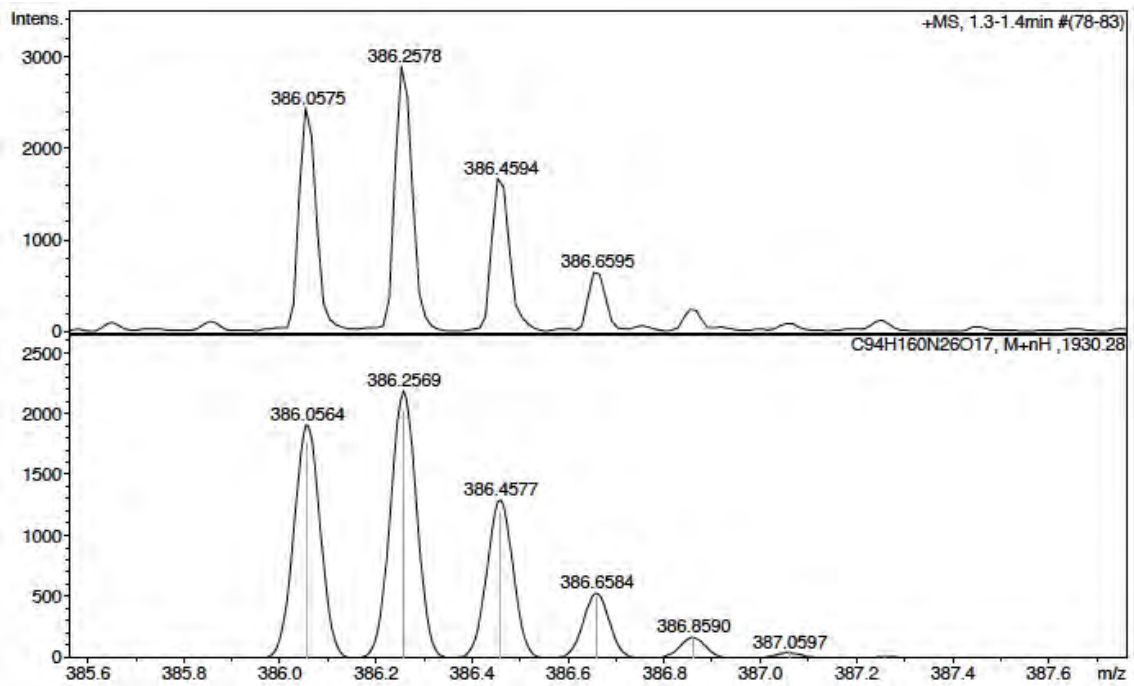
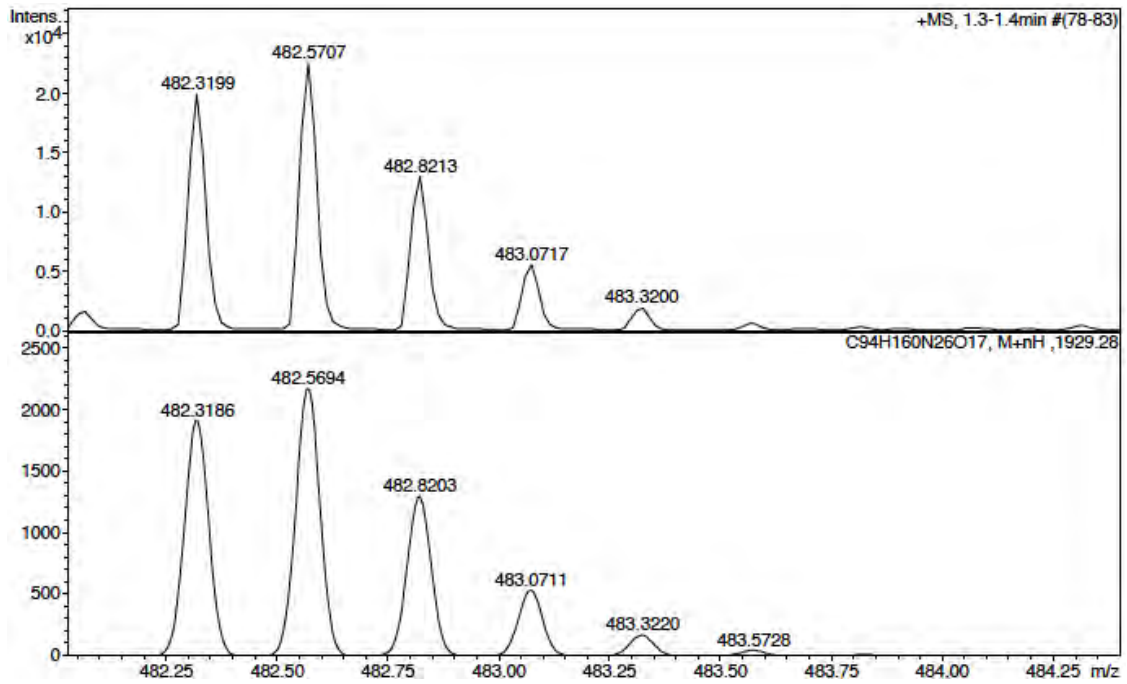
ESI-MS ( $m/z$ )

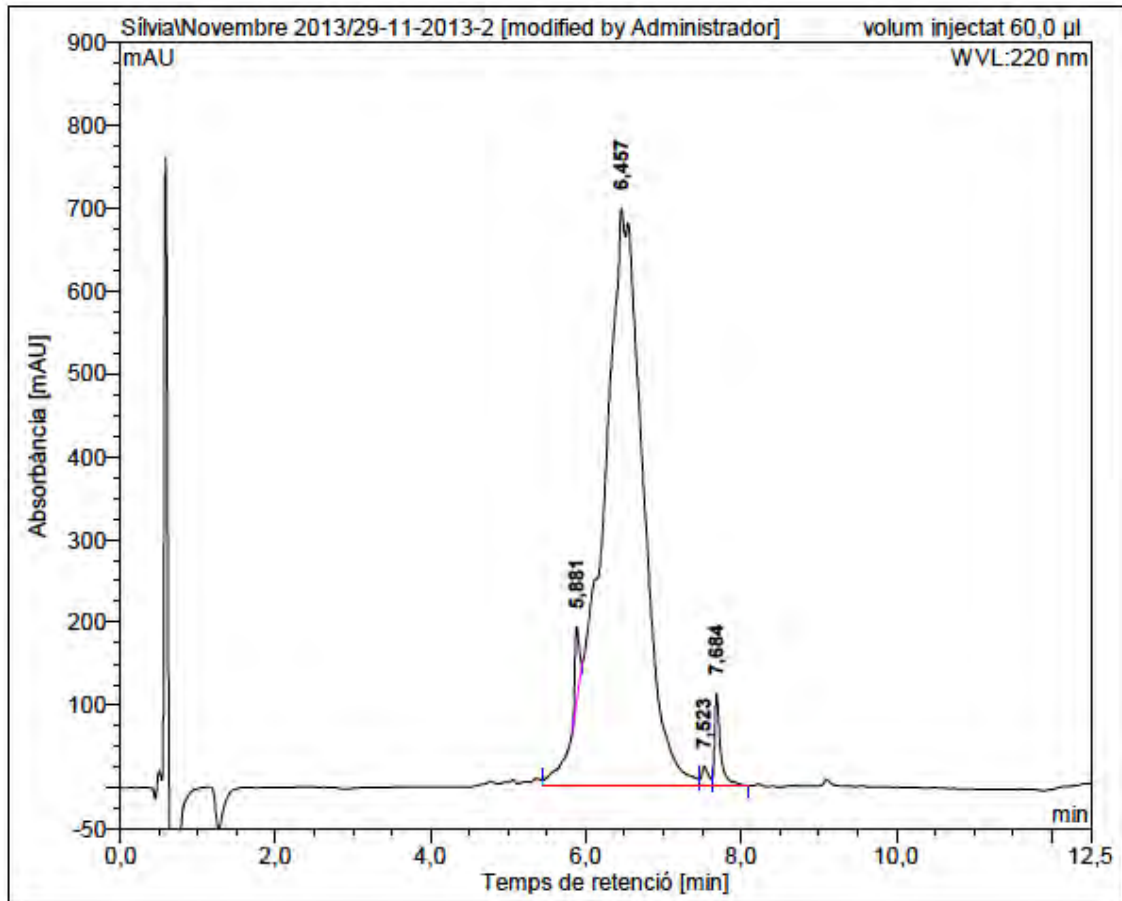


HRMS (ESI)  $m/z$



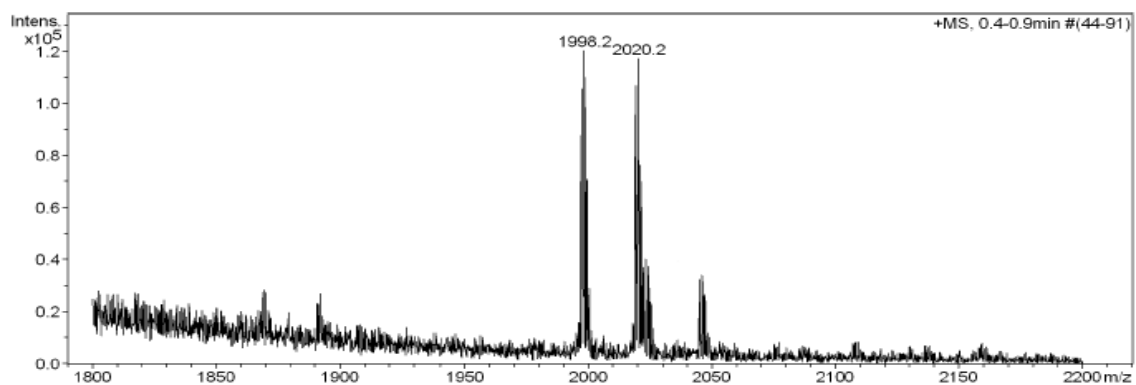




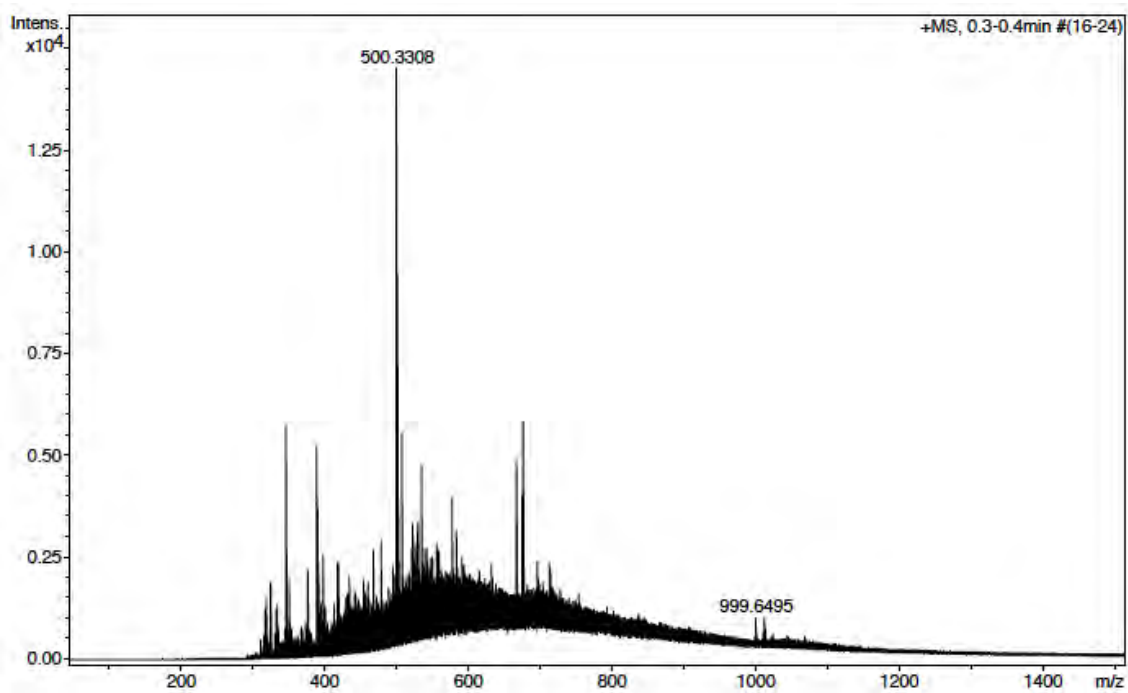
**BPC804**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

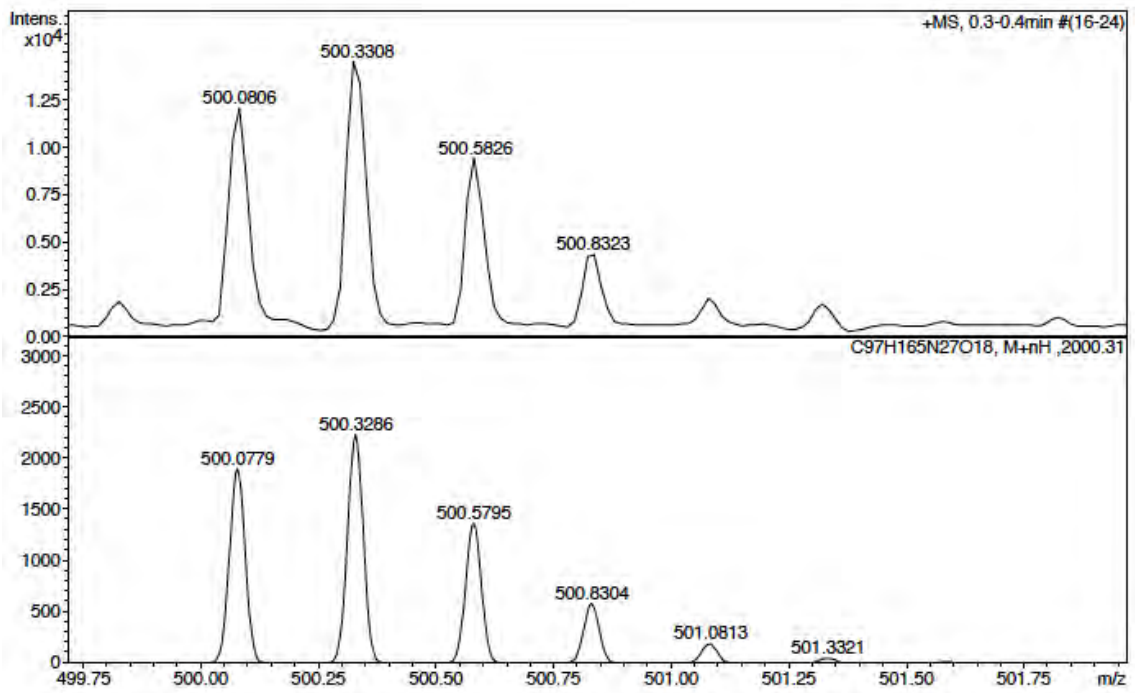
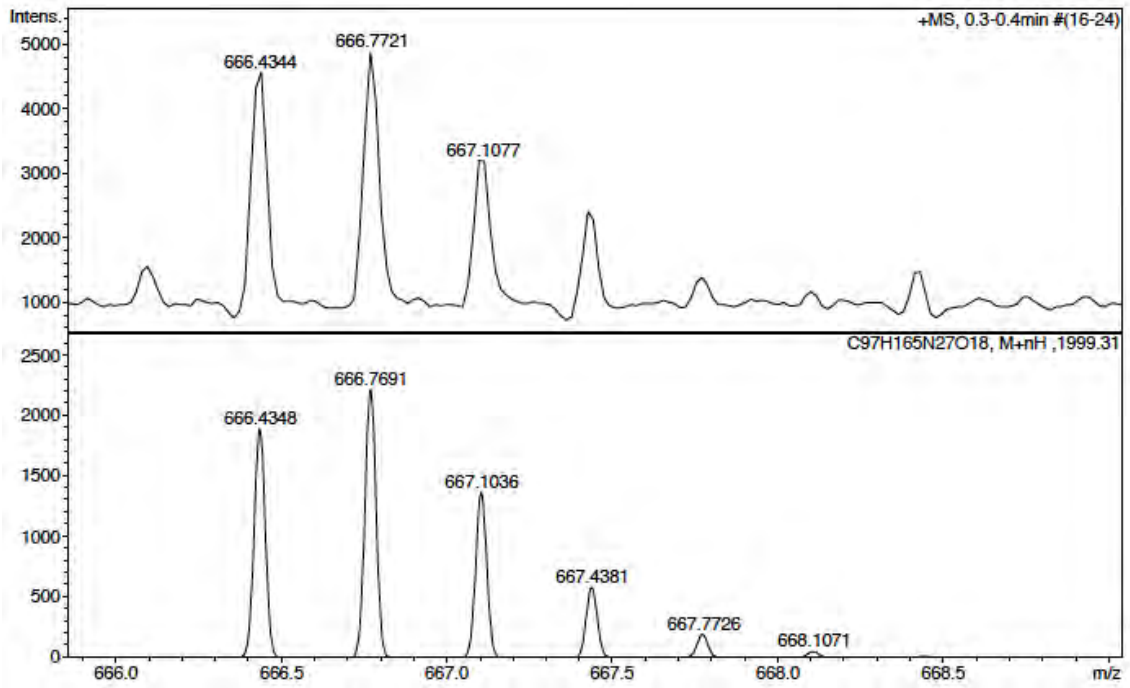
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,88	89,162	5,162	1,16
2	6,46	696,066	427,327	96,12
3	7,52	22,821	2,302	0,52
4	7,68	110,781	9,763	2,20
Total:		918,830	444,554	100,00

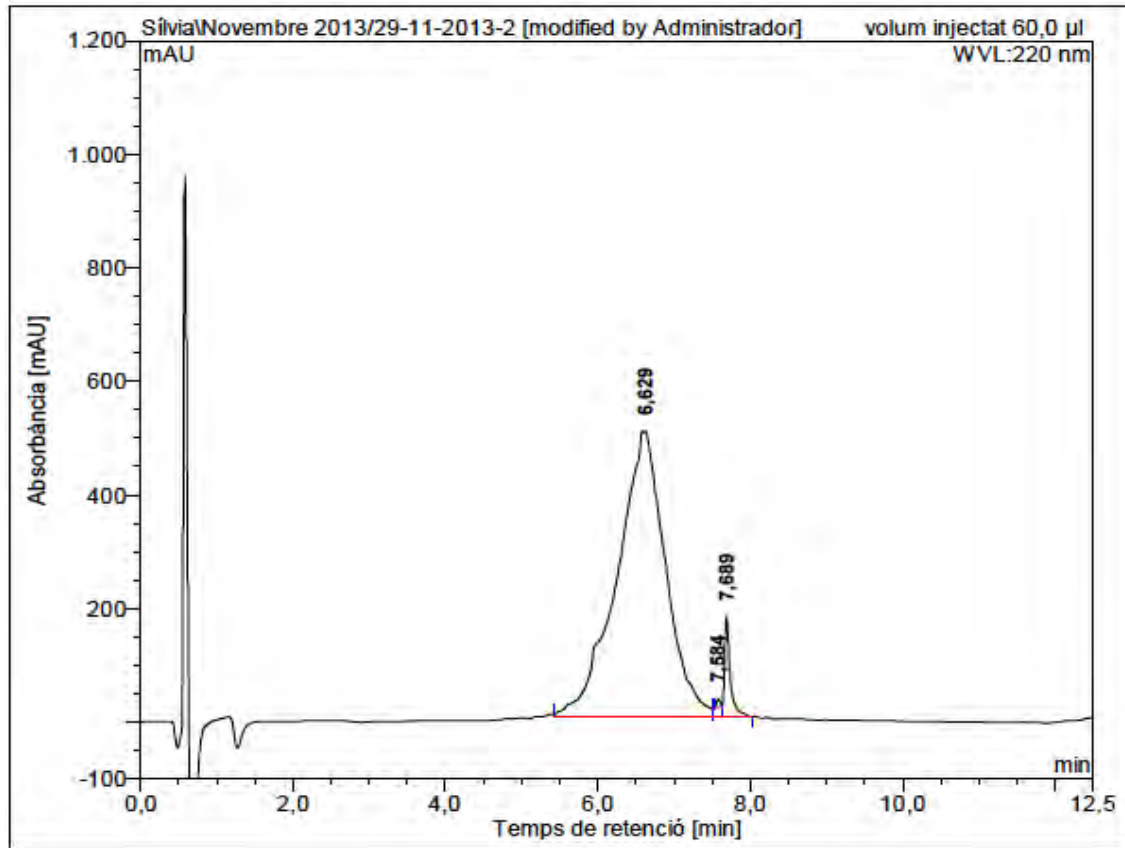
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

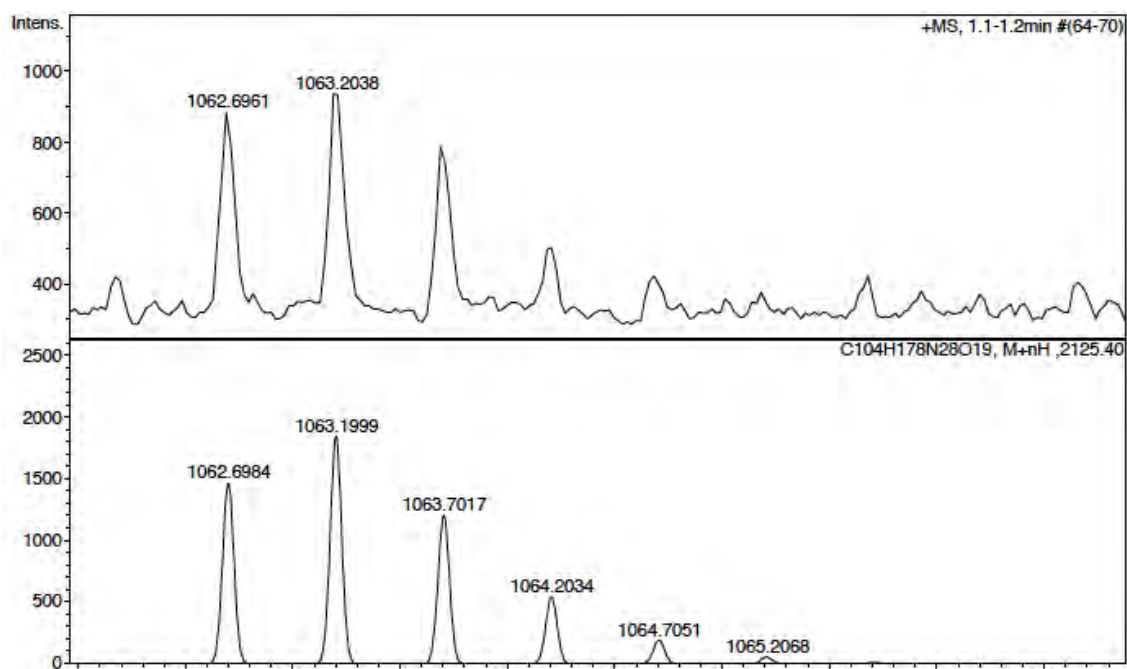
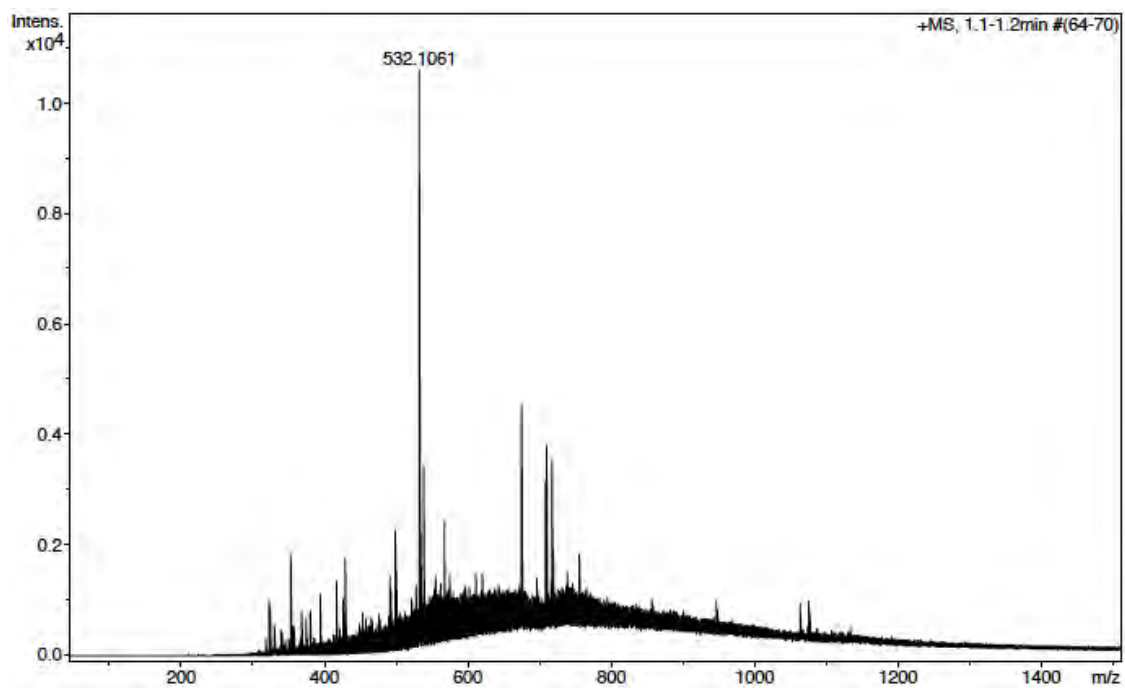




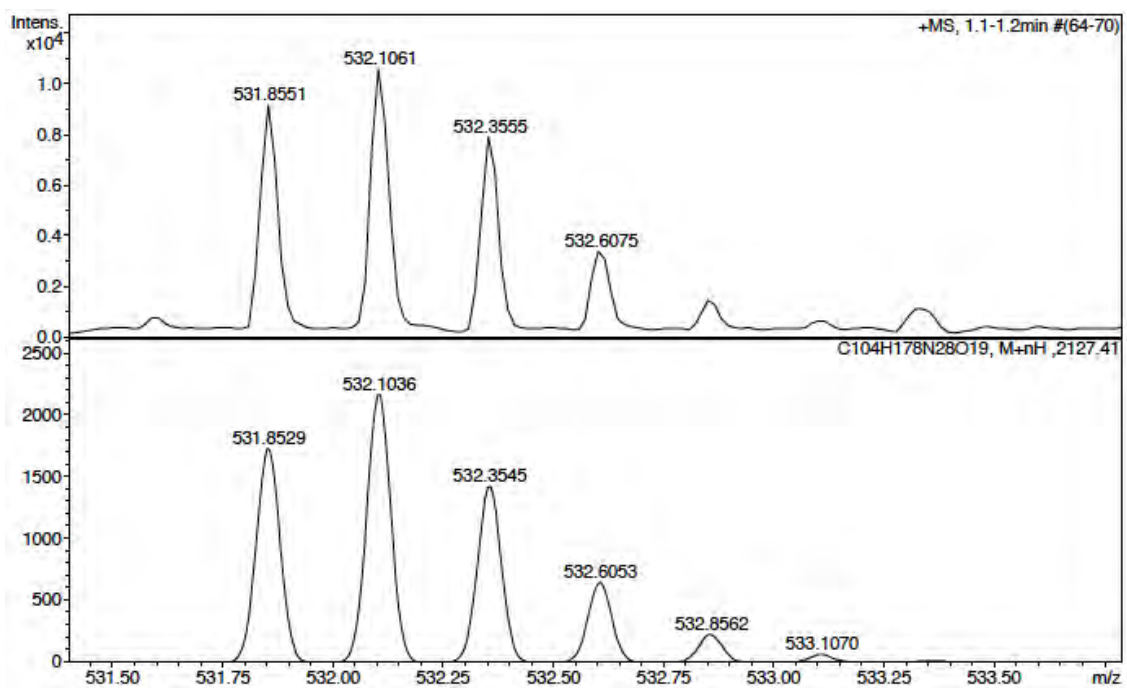
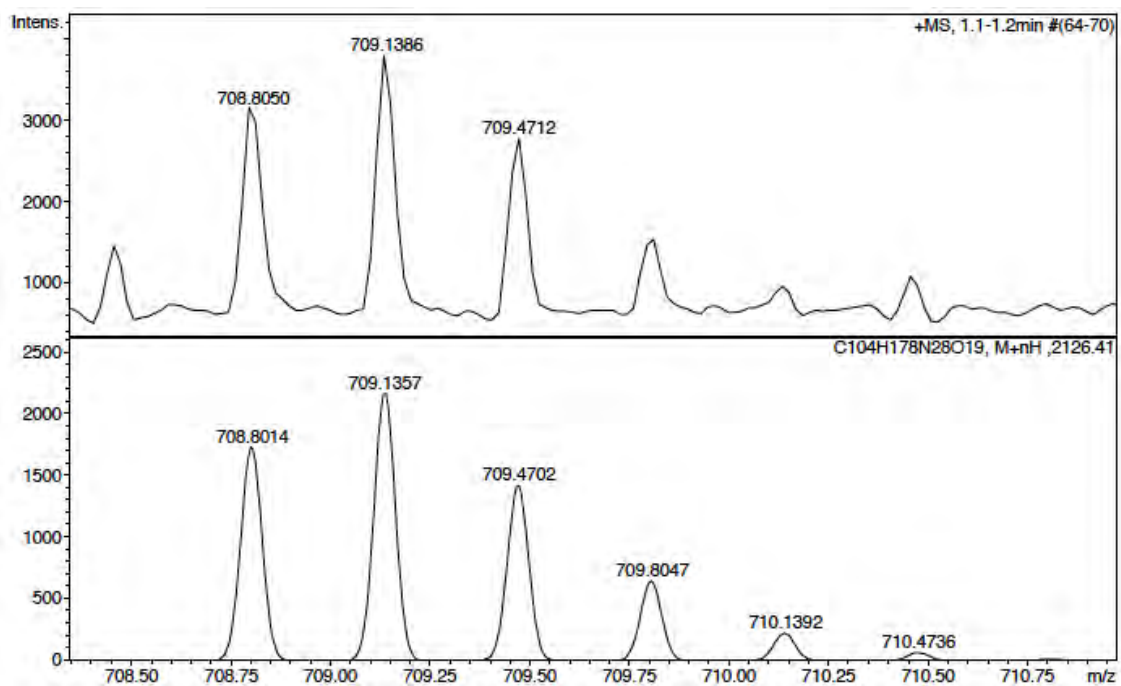
**BPC806**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,63	503,973	372,837	95,38
2	7,58	15,527	0,804	0,21
3	7,69	177,097	17,259	4,42
Total:		696,597	390,900	100,00

HRMS (ESI)  $m/z$

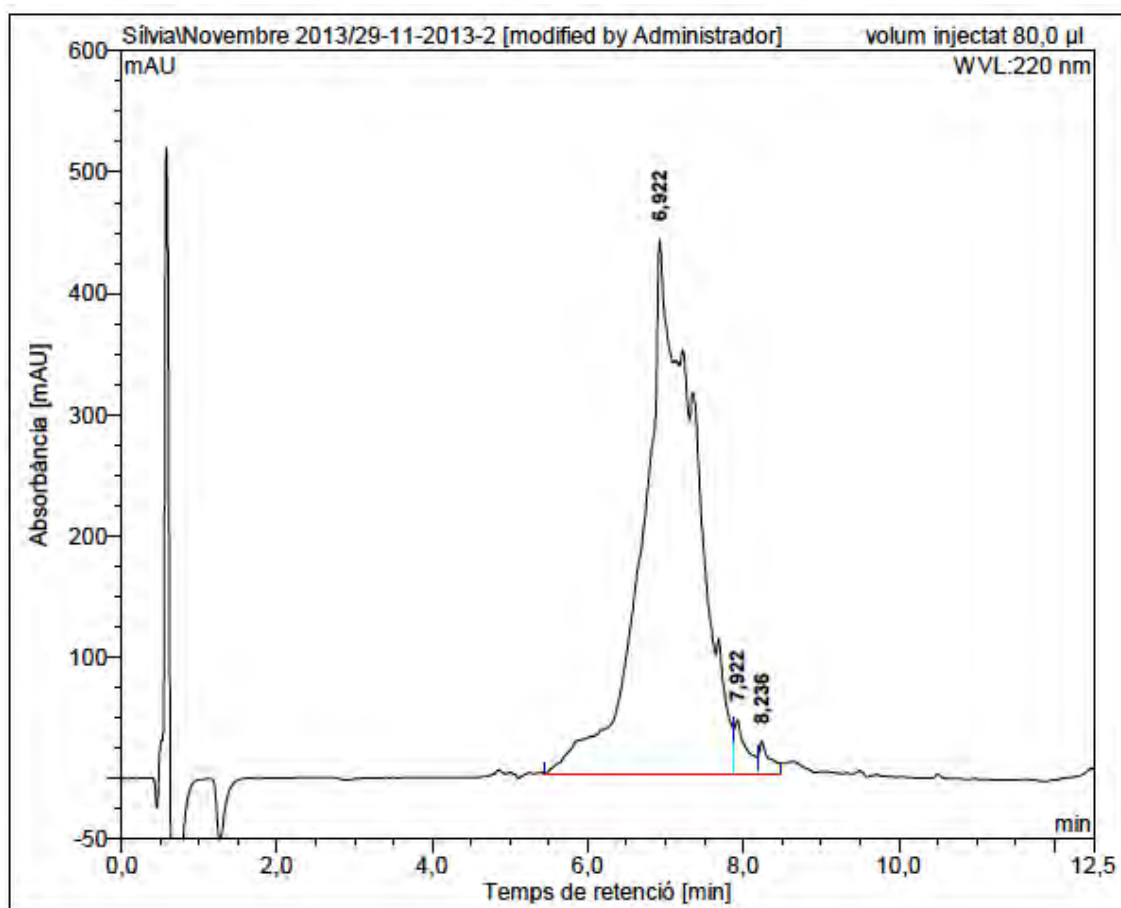






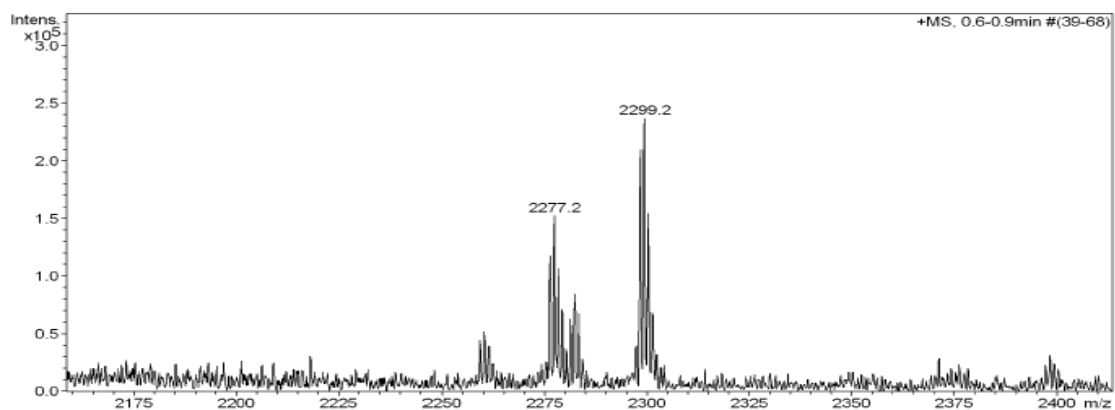
BPC808/Fmoc

HPLC ( $\lambda=220$  nm)

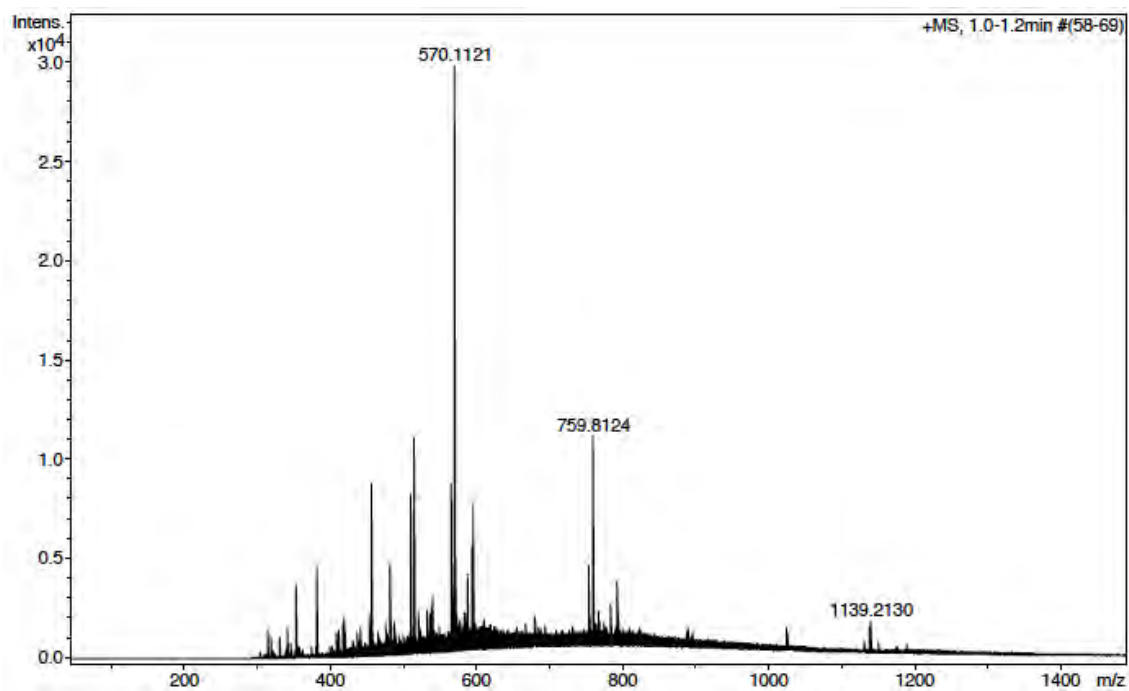


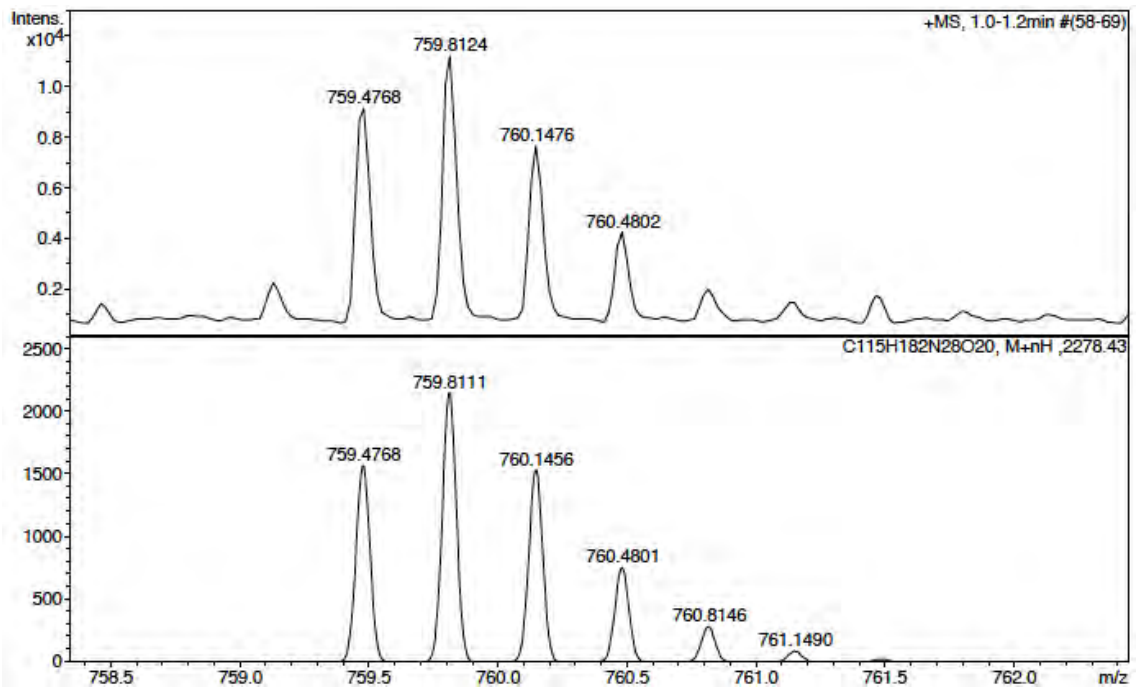
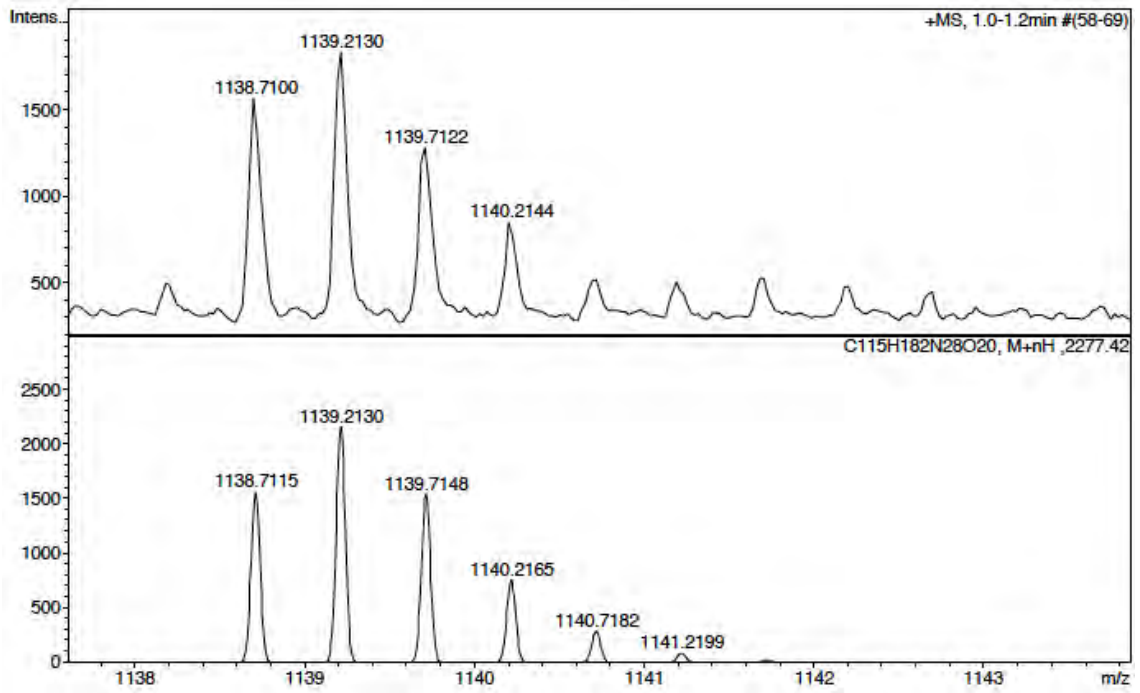
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,92	440,393	344,538	96,60
2	7,92	44,454	7,537	2,11
3	8,24	26,778	4,606	1,29
Total:		511,625	356,681	100,00

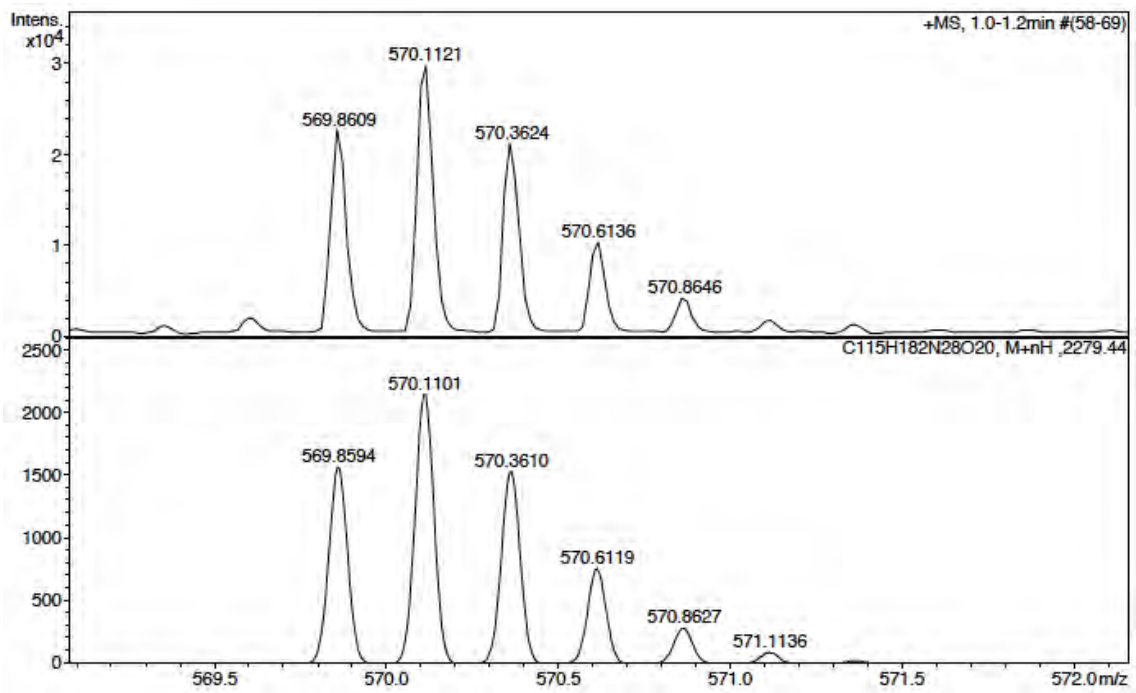
ESI-MS ( $m/z$ )

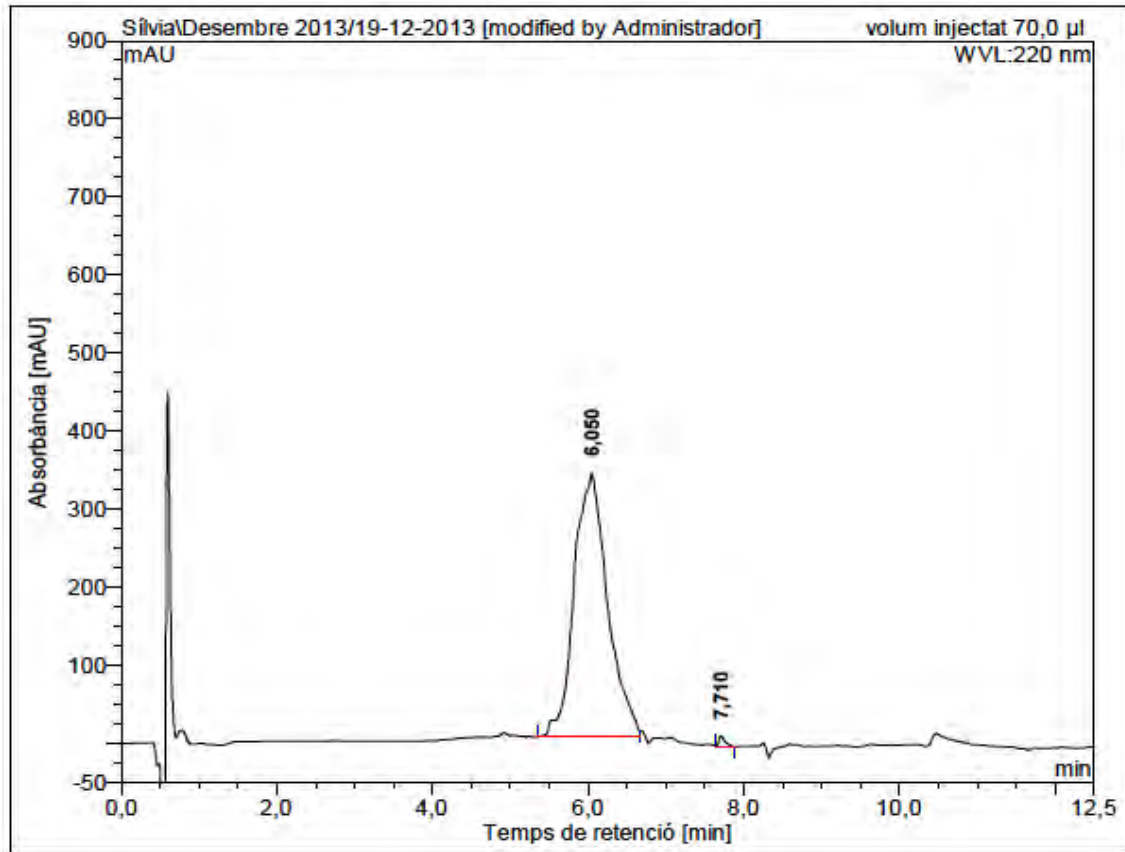


HRMS (ESI)  $m/z$



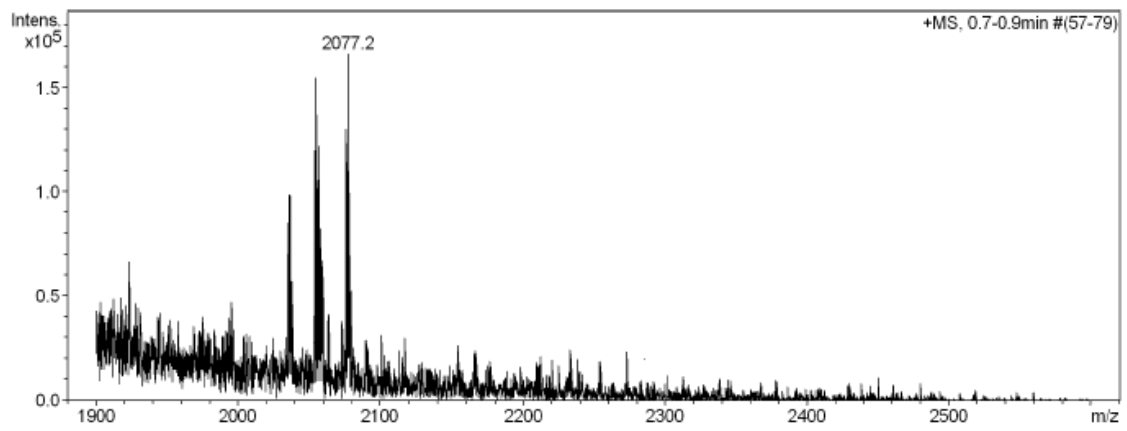




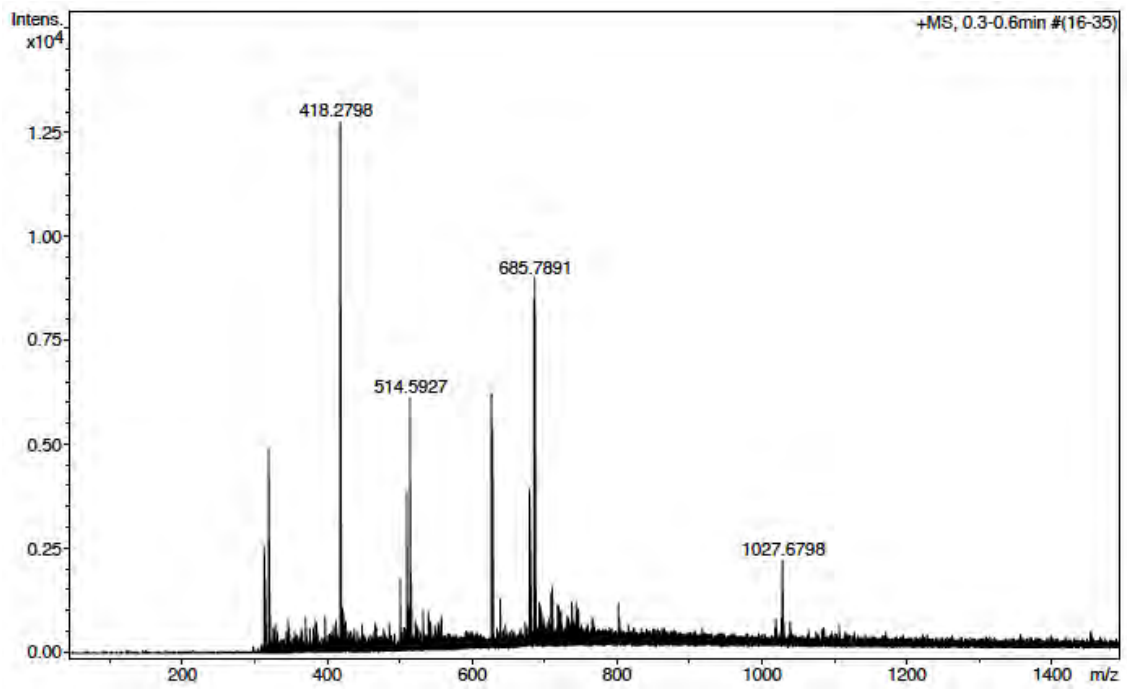
**BPC808**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

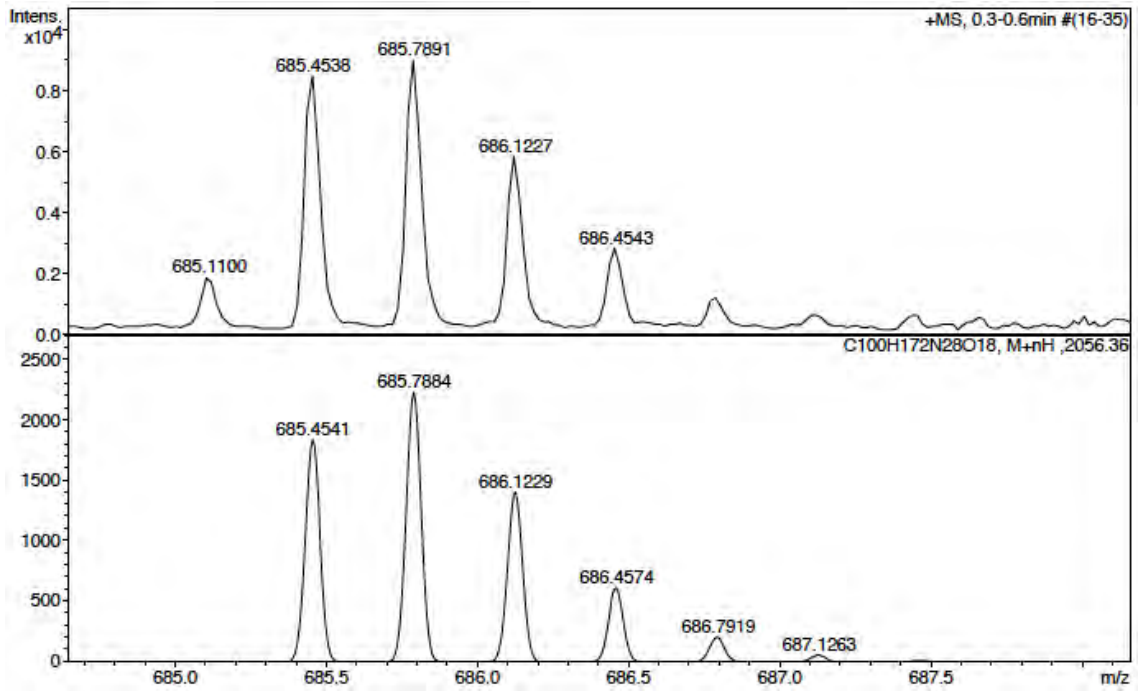
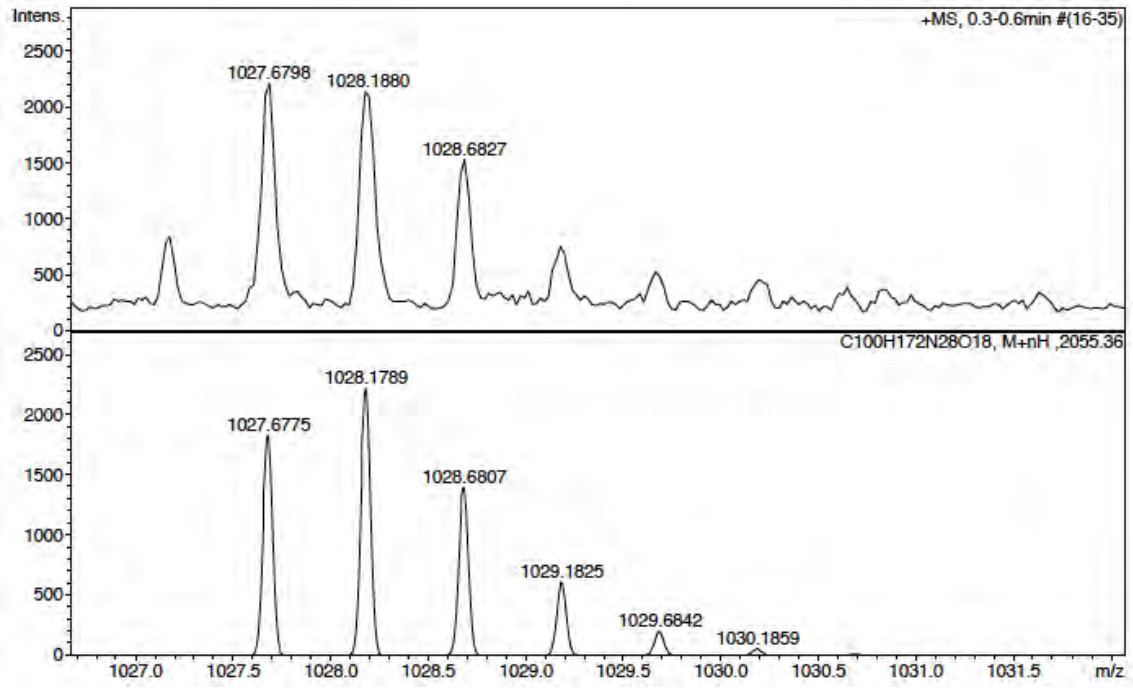
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,05	337,063	167,792	99,23
2	7,71	14,059	1,306	0,77
Total:		351,122	169,098	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )

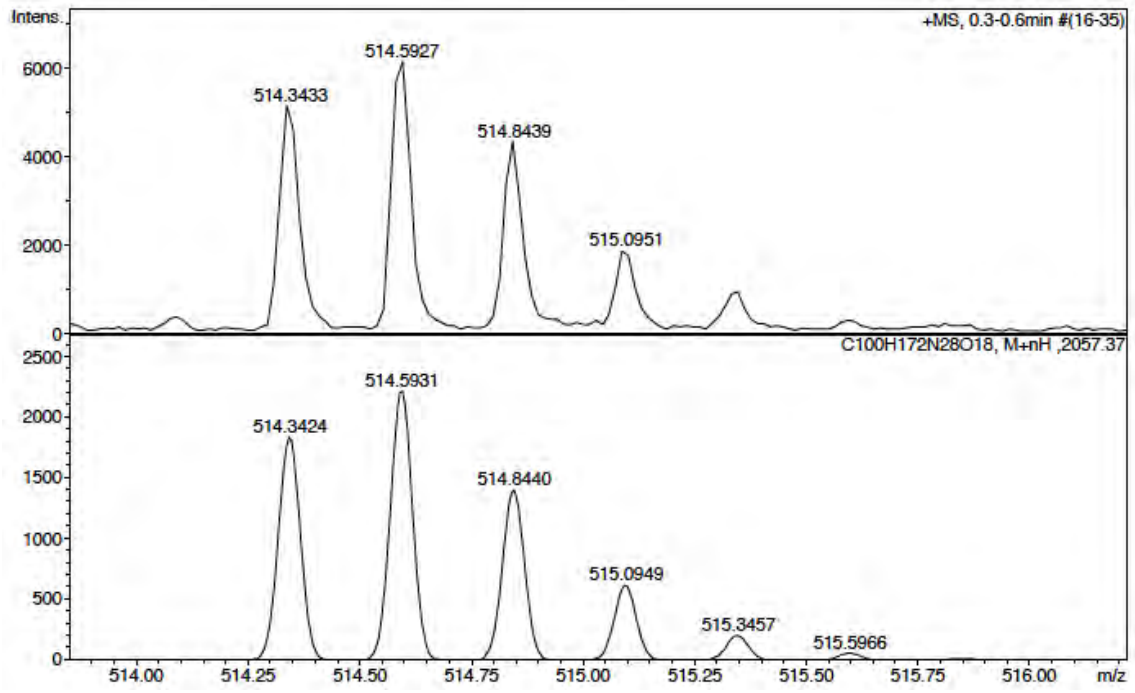


HRMS (ESI)  $m/z$



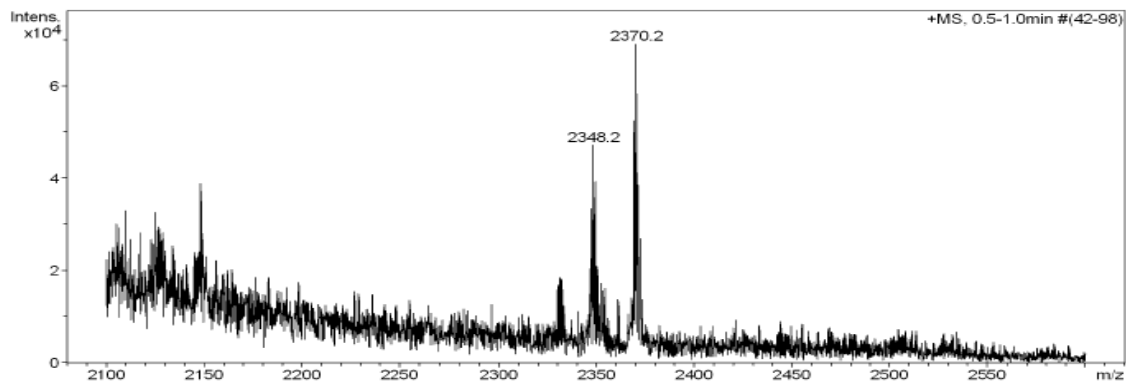




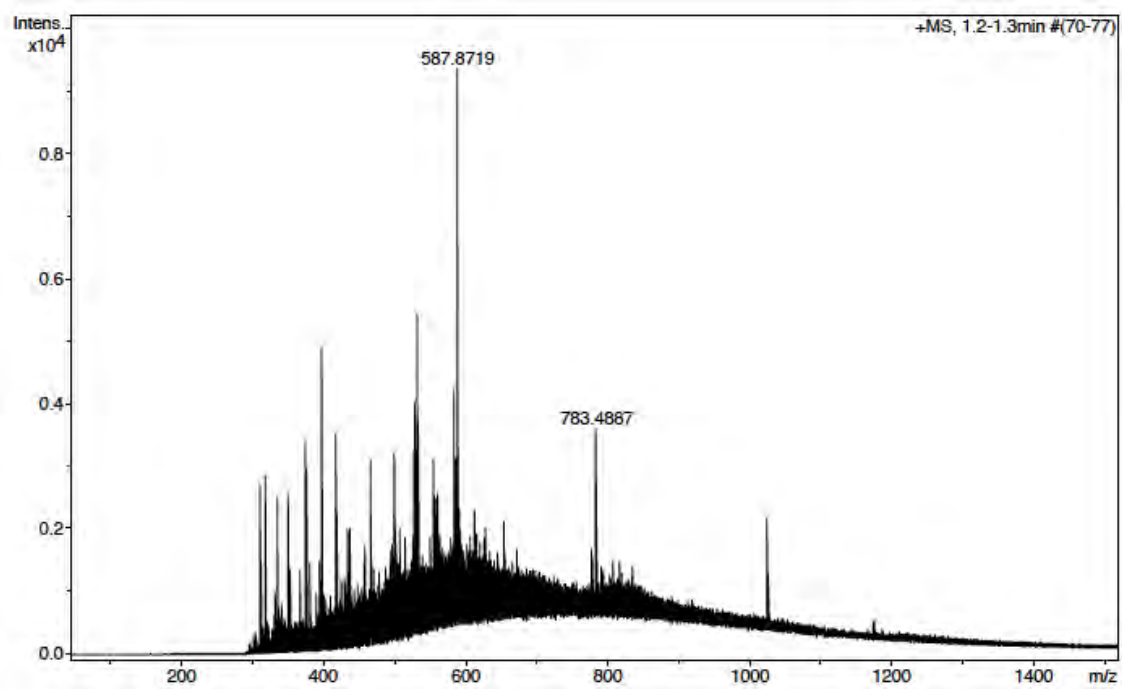


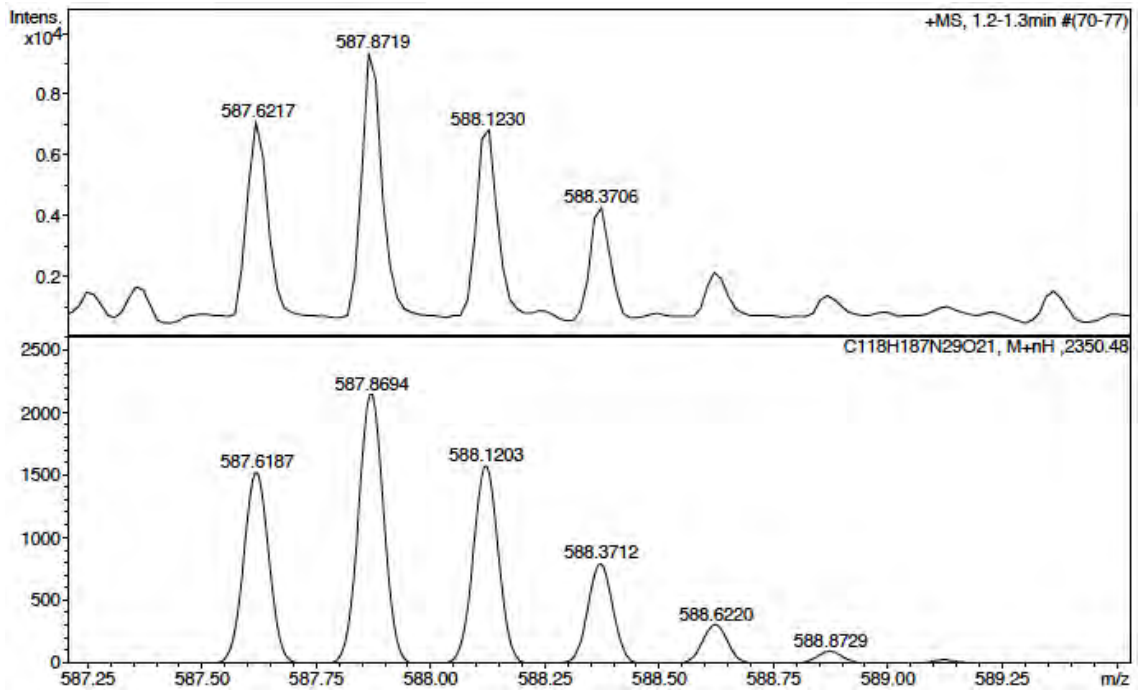
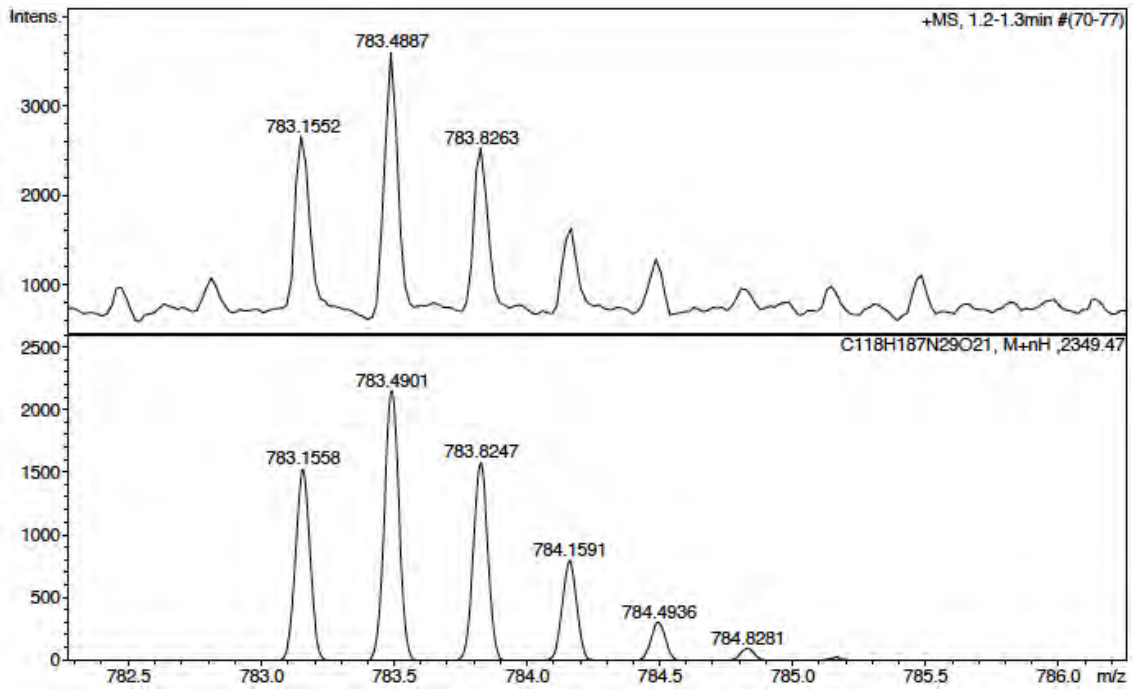
**BPC810/Fmoc**

ESI-MS ( $m/z$ )



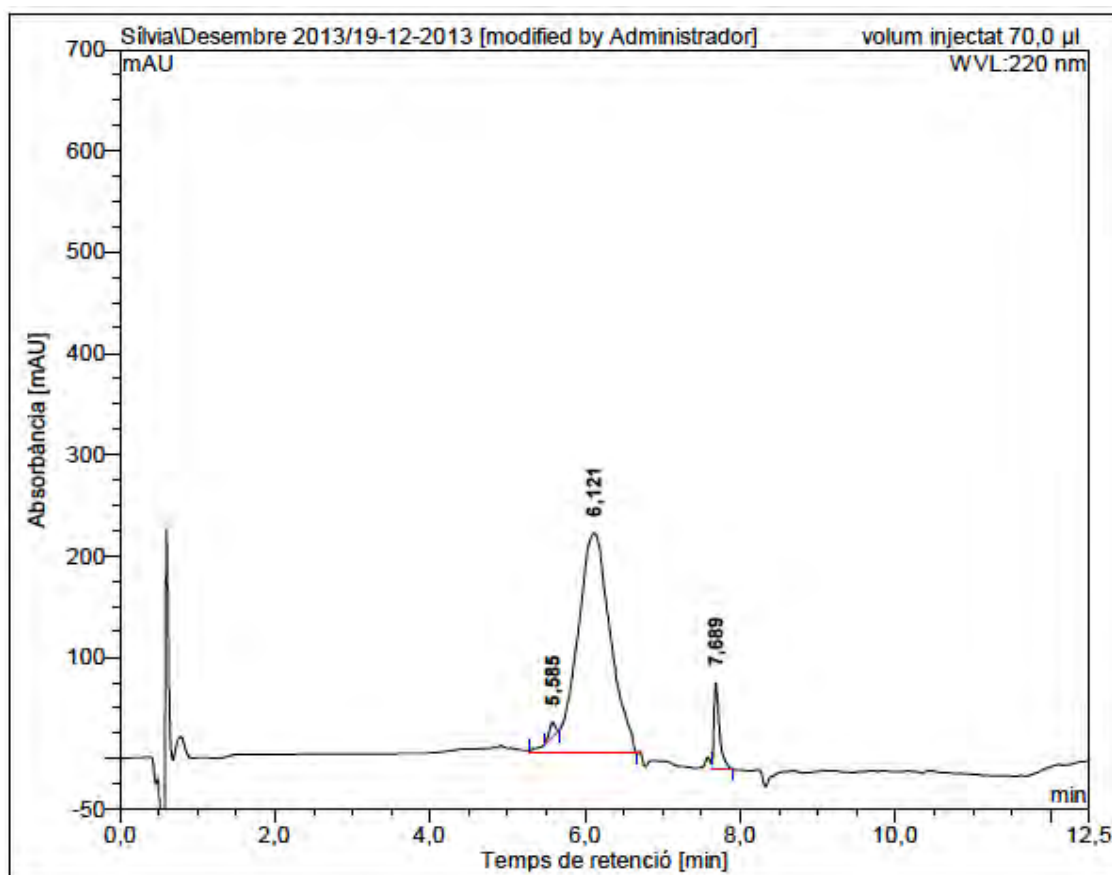
HRMS (ESI)  $m/z$





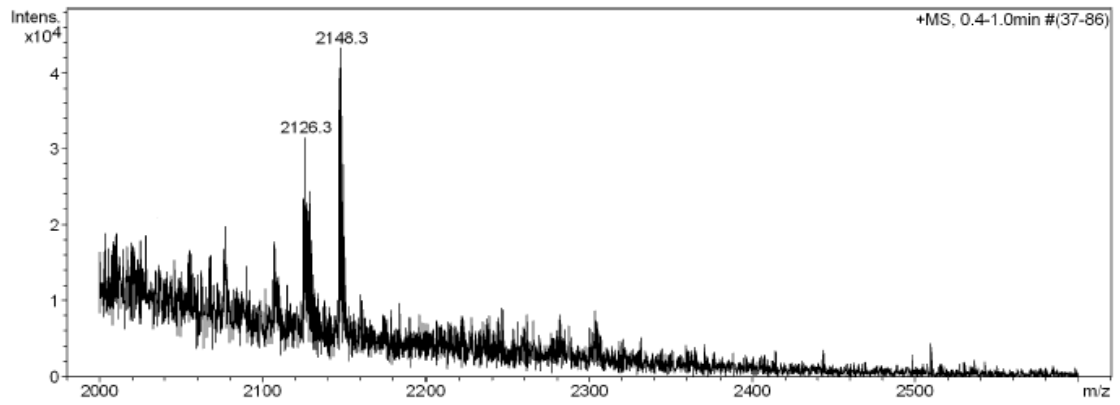
### BPC810

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



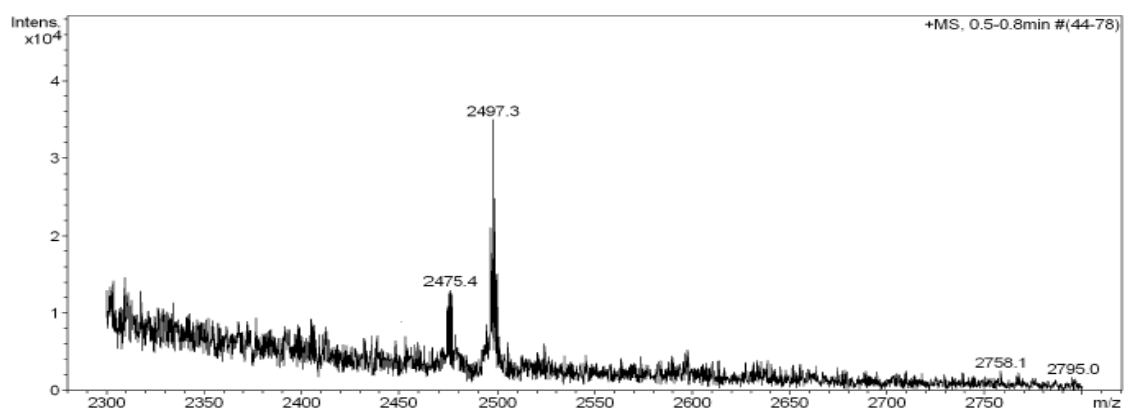
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,58	14,434	1,261	1,07
2	6,12	217,580	109,230	93,01
3	7,69	84,738	6,942	5,91
Total:		316,753	117,433	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )

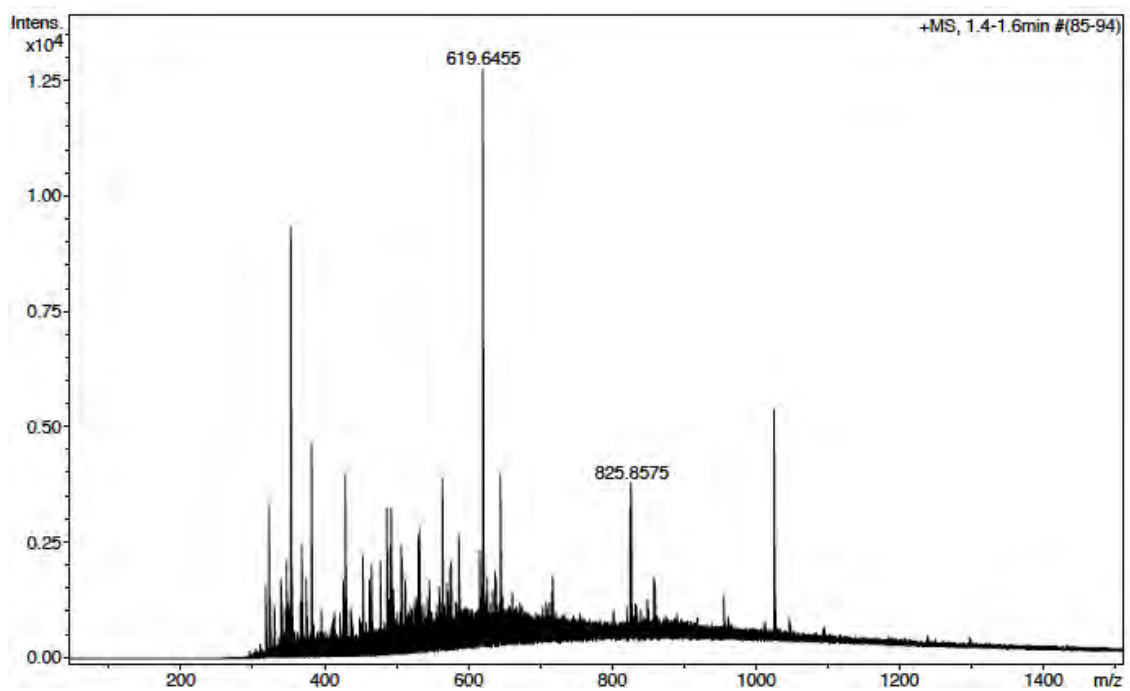


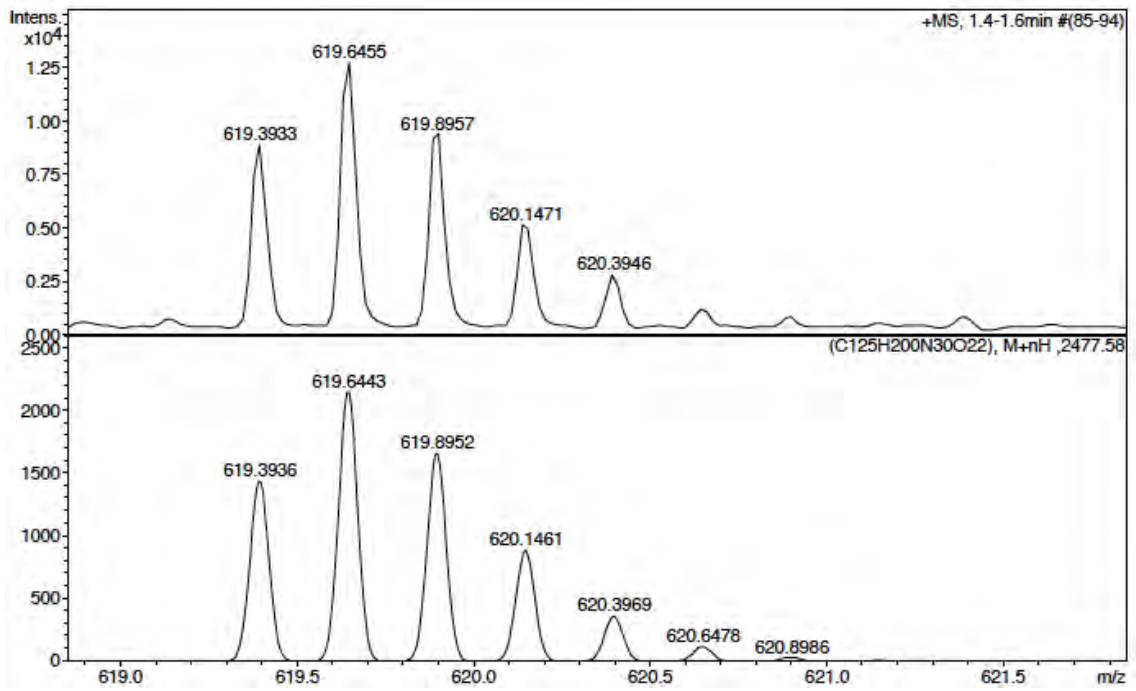
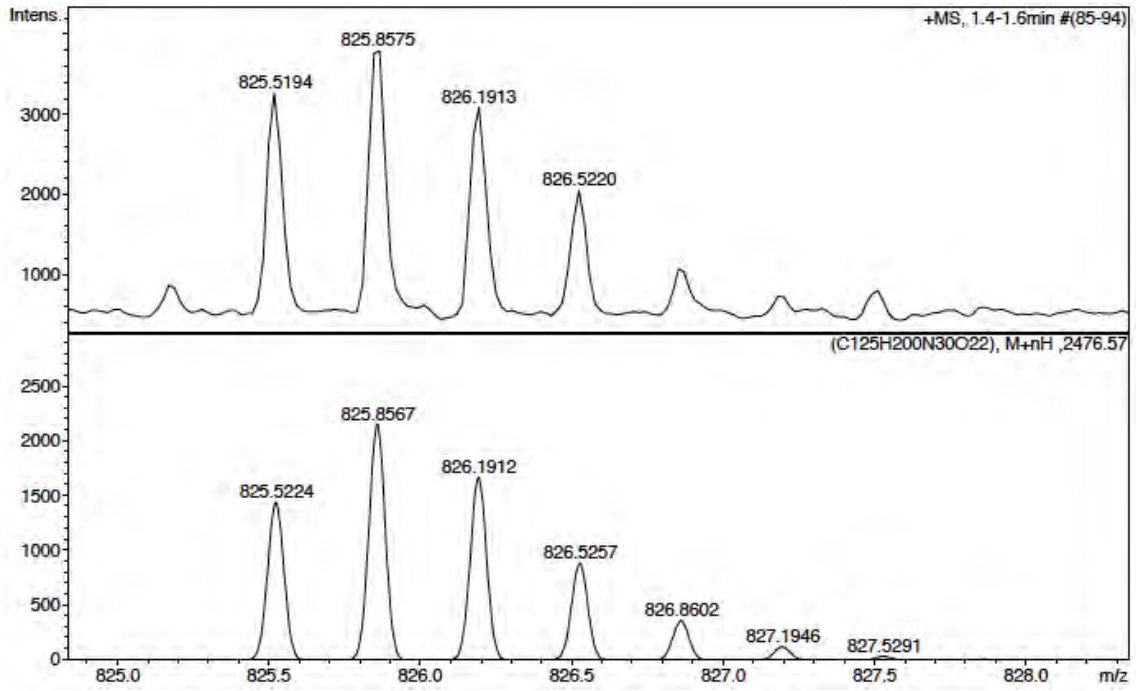
**BPC812/Fmoc**

ESI-MS ( $m/z$ )



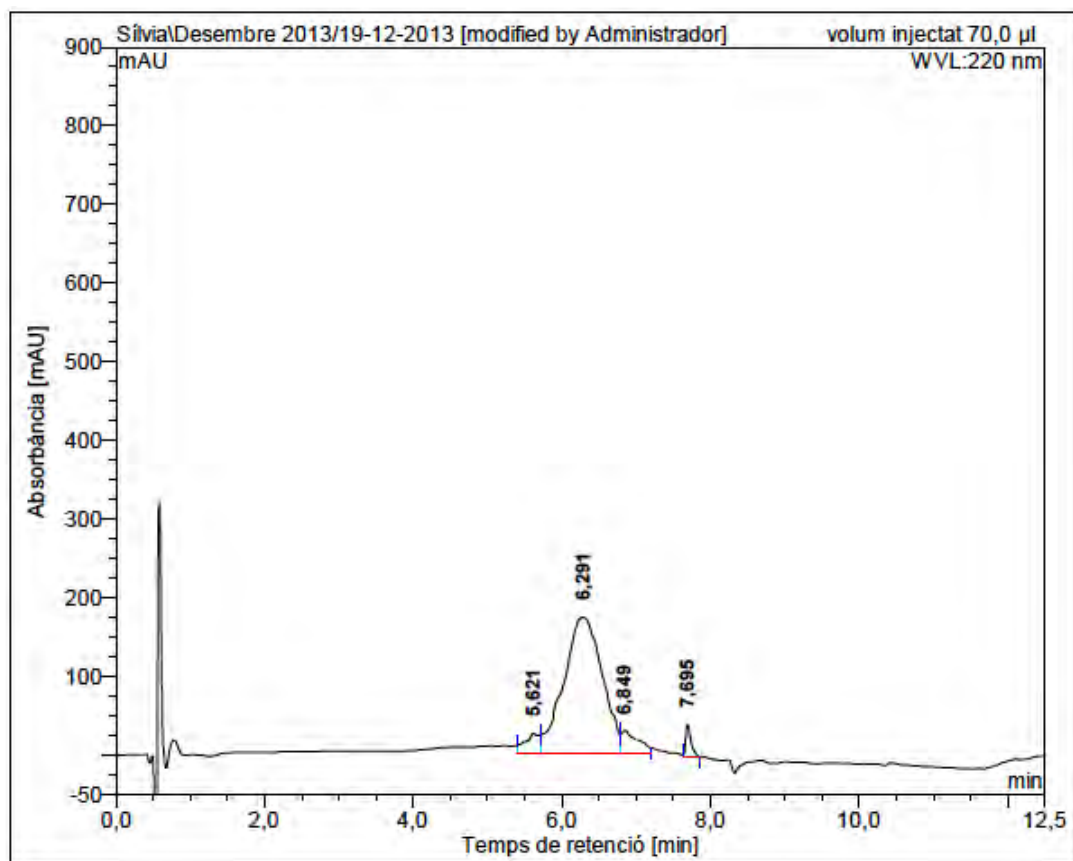
HRMS (ESI)  $m/z$





### BPC812

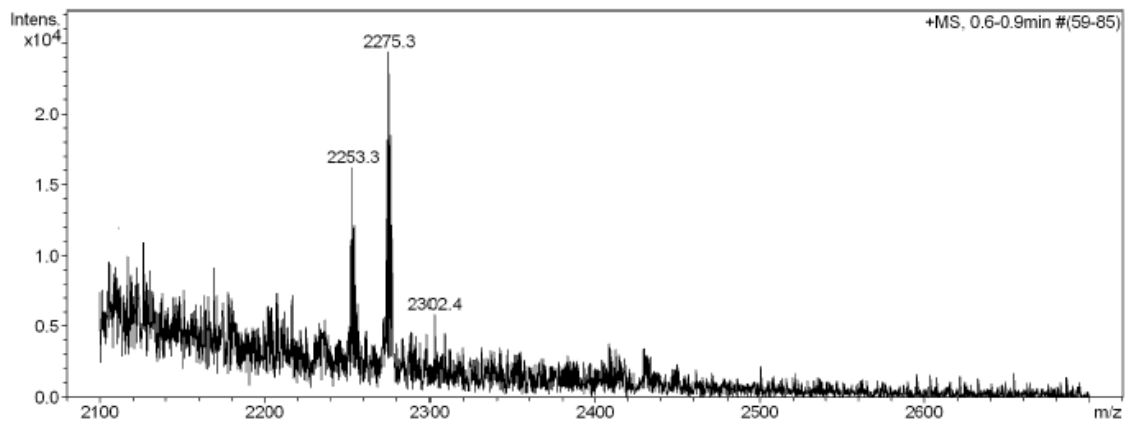
HPLC ( $\lambda=220$  nm)



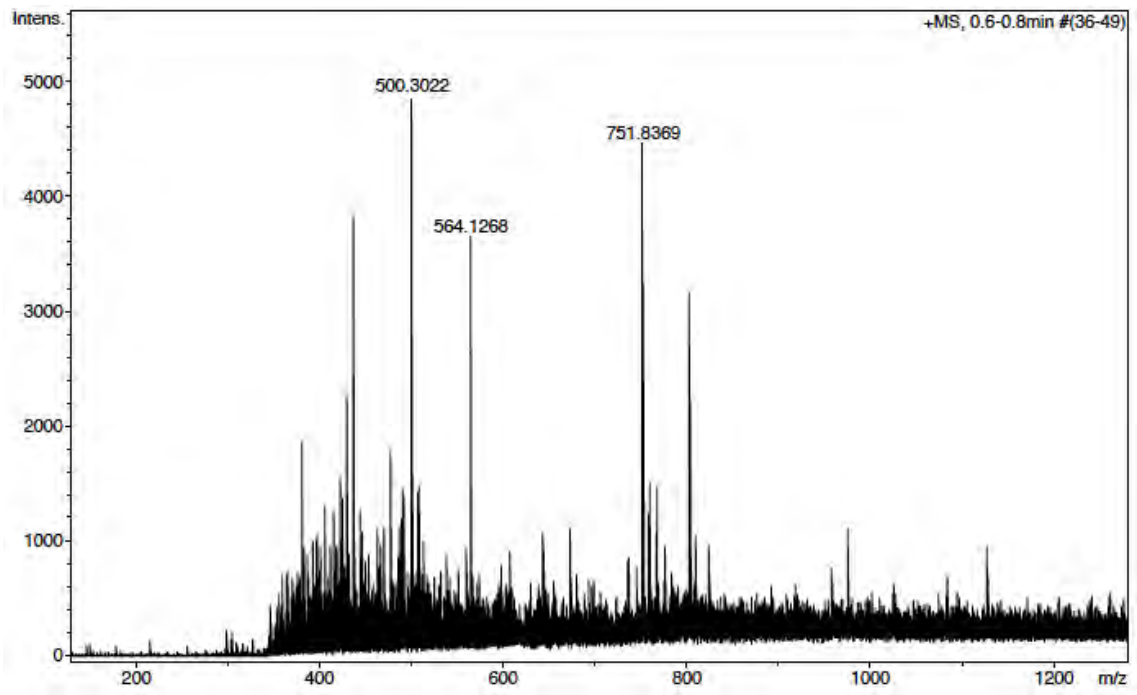
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,62	25,227	6,212	5,14
2	6,29	172,876	103,440	85,65
3	6,85	29,196	7,533	6,24
4	7,70	41,725	3,590	2,97
Total:		269,023	120,775	100,00

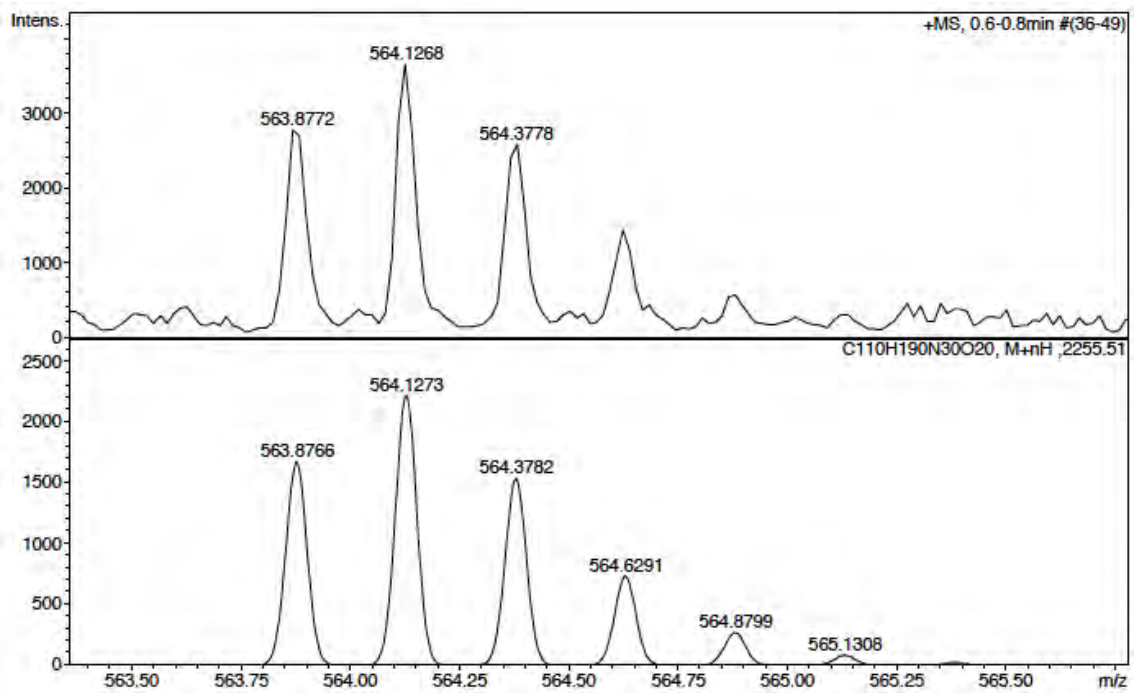
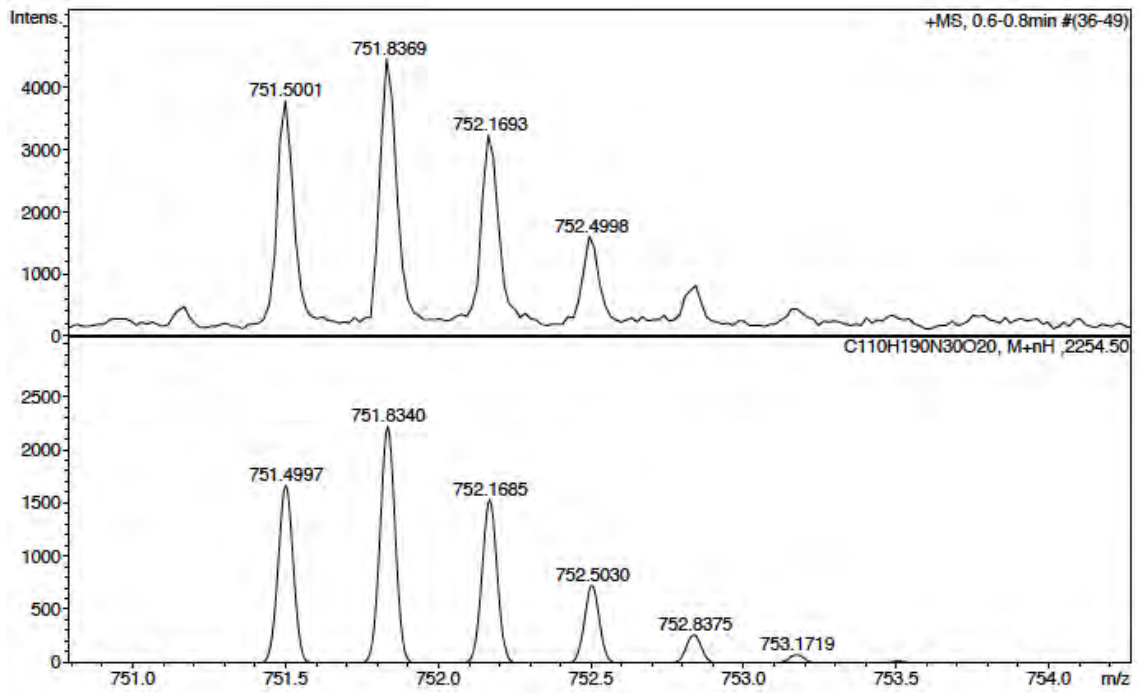


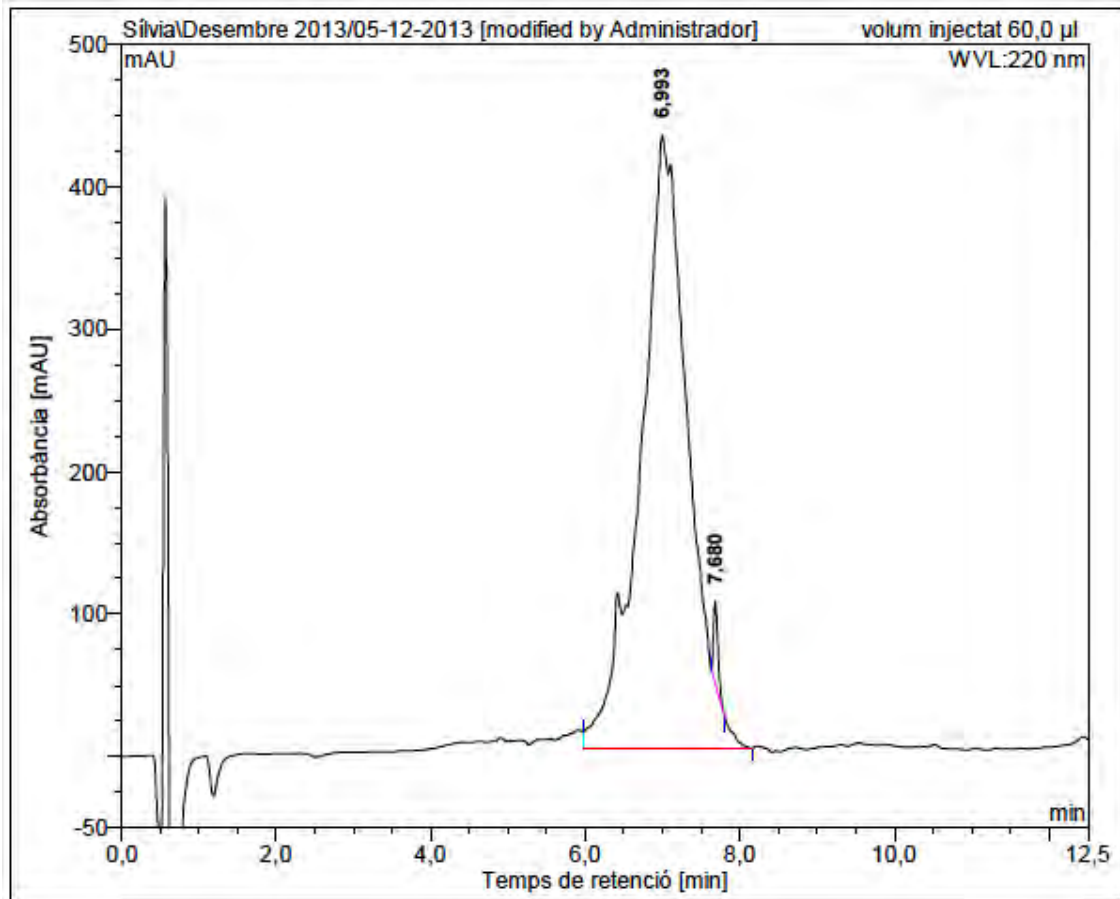
ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

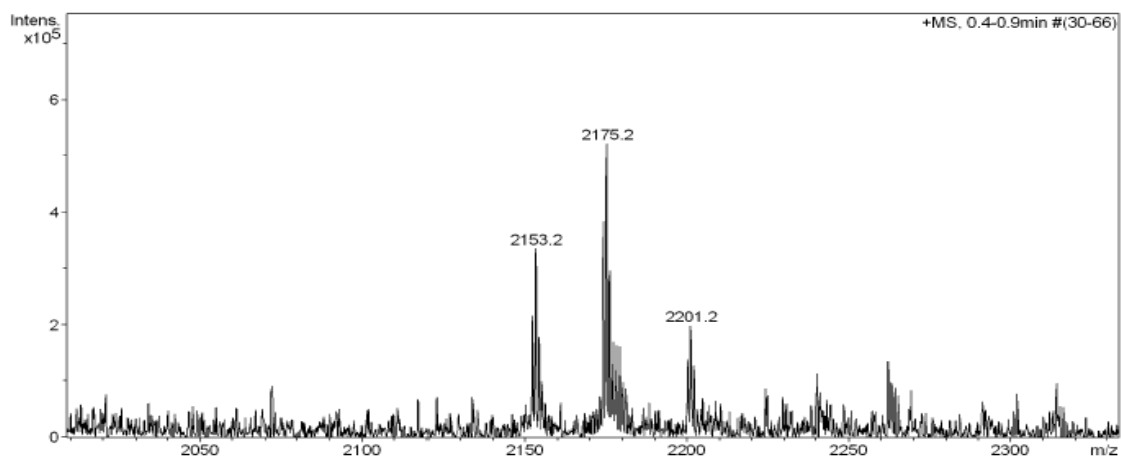




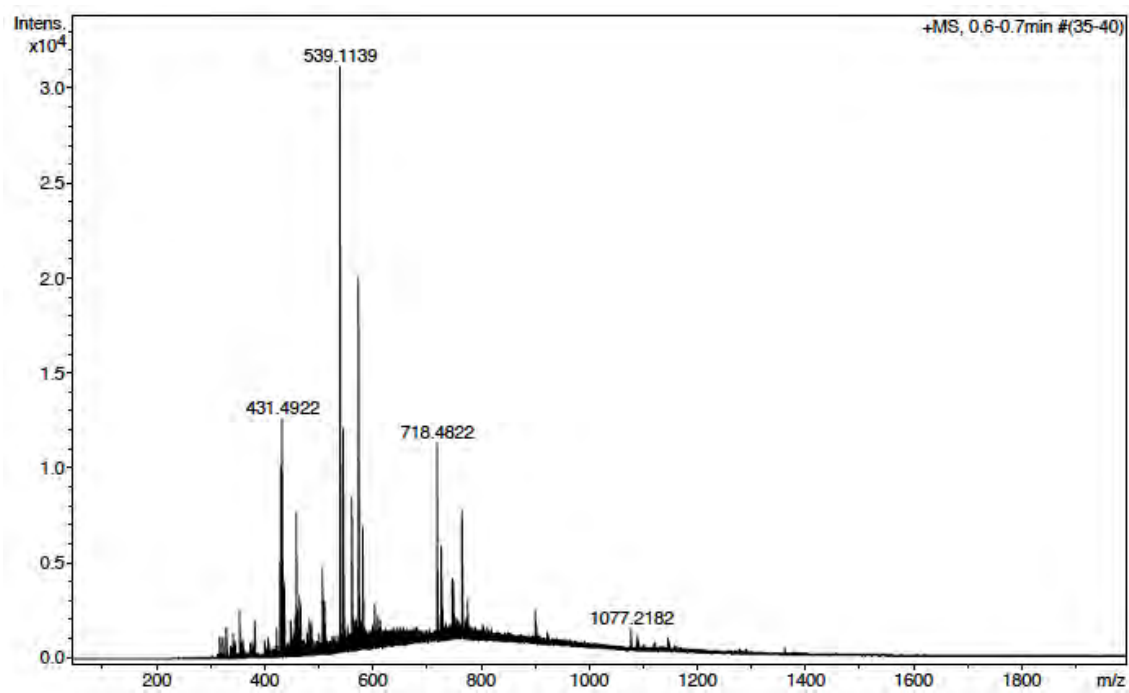
**BPC814**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

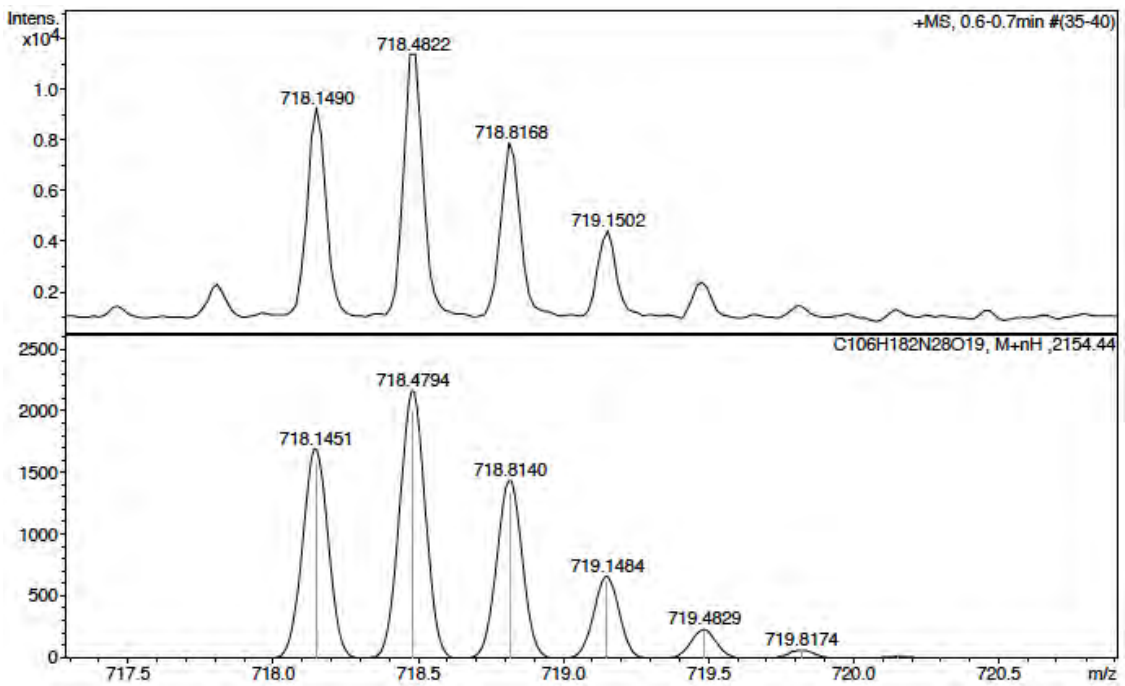
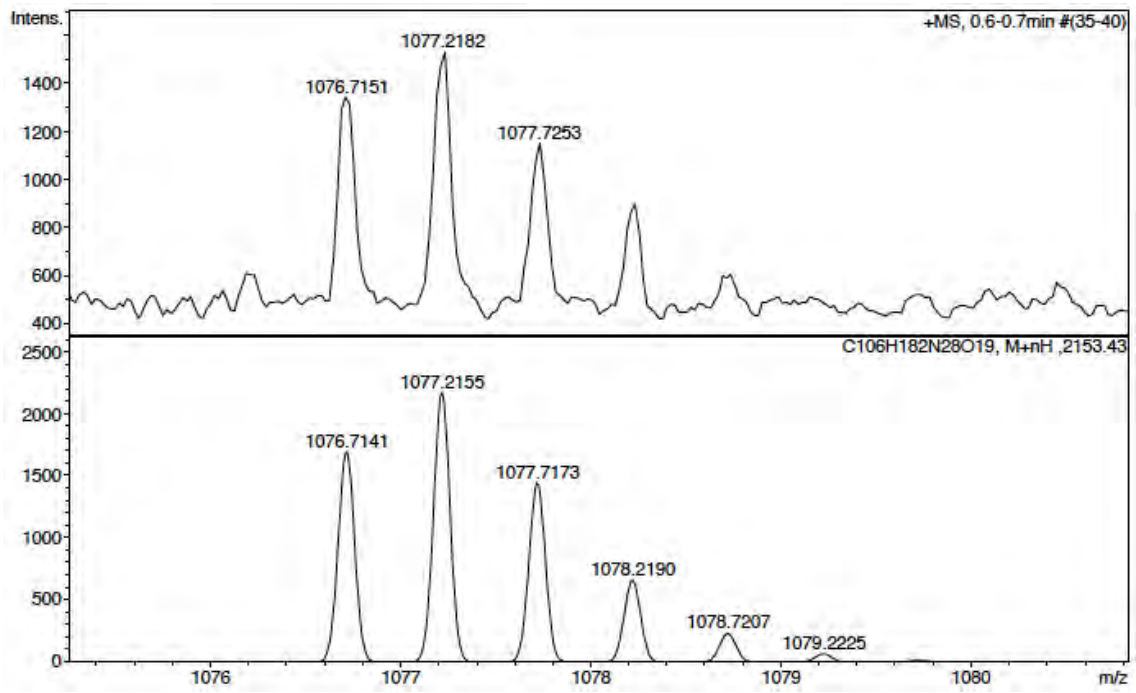
No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,99	429,961	304,555	98,75
2	7,68	57,420	3,848	1,25
Total:		487,380	308,403	100,00

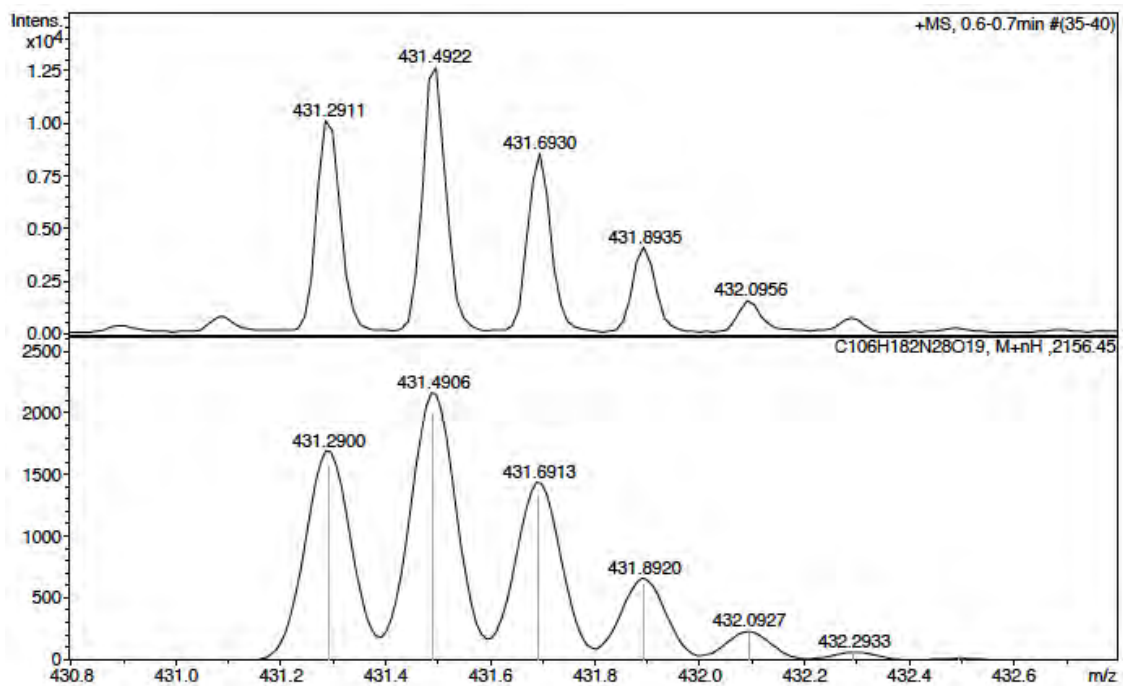
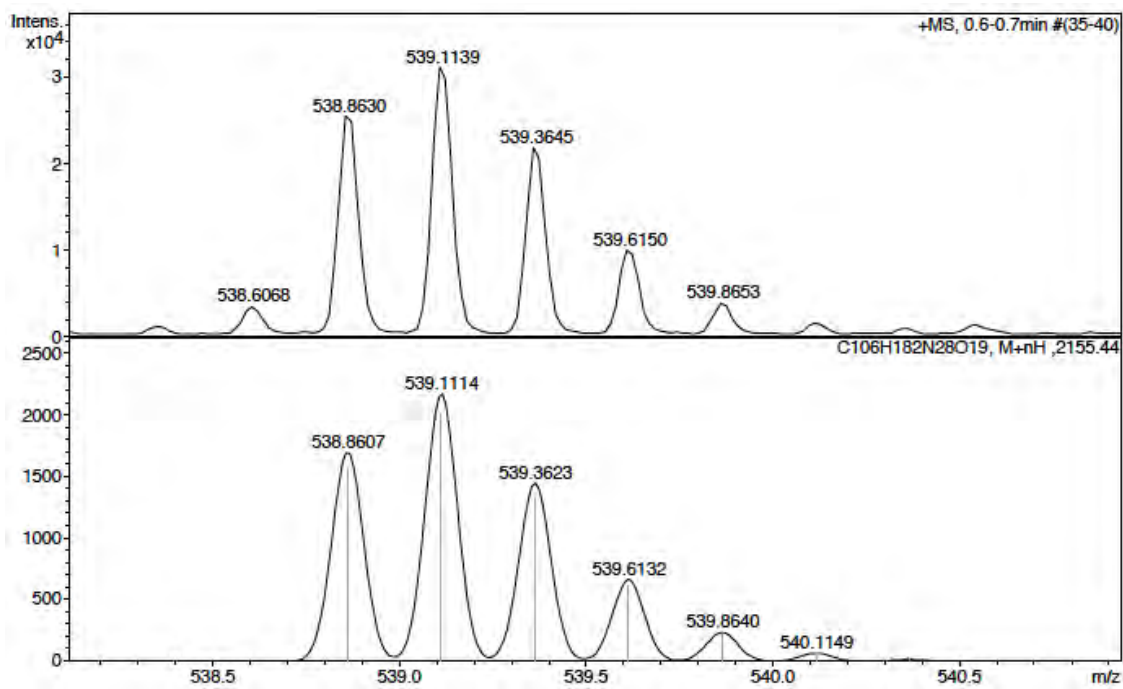
ESI-MS ( $m/z$ )

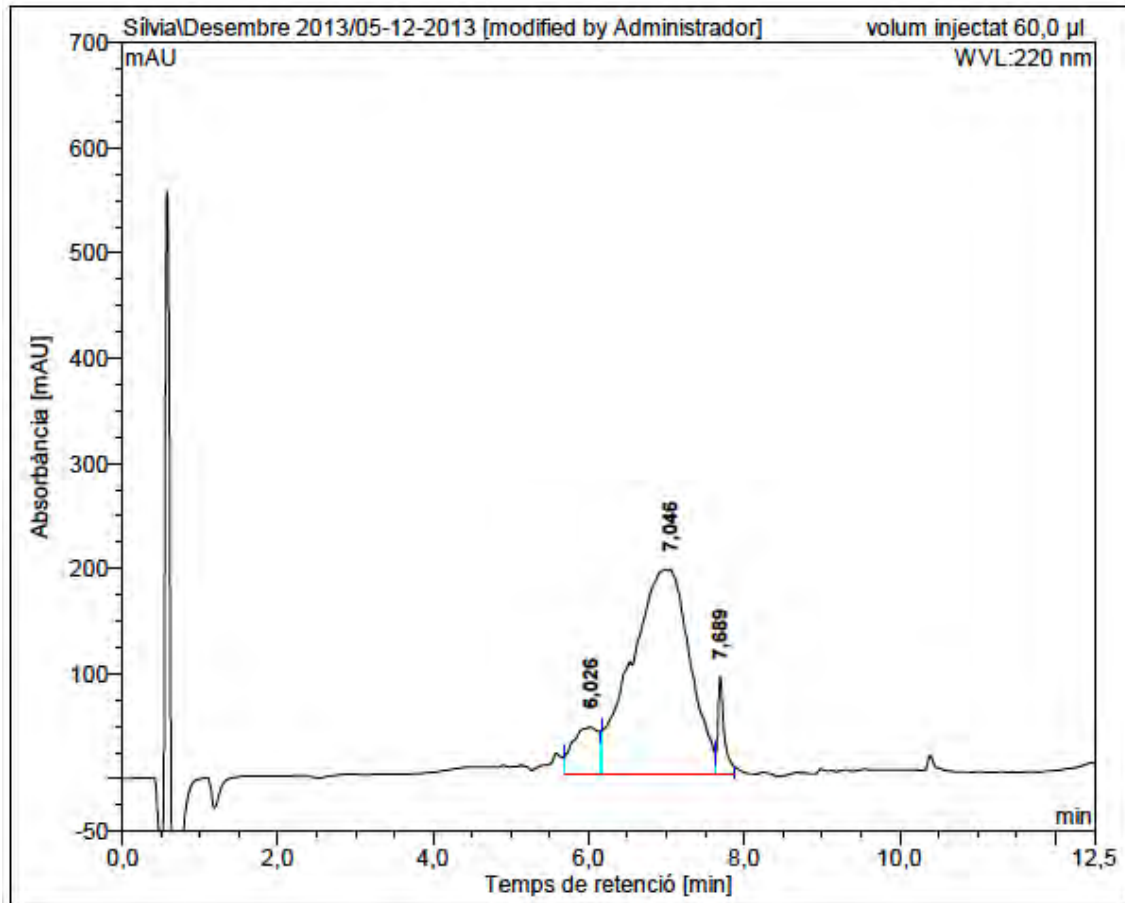


HRMS (ESI)  $m/z$



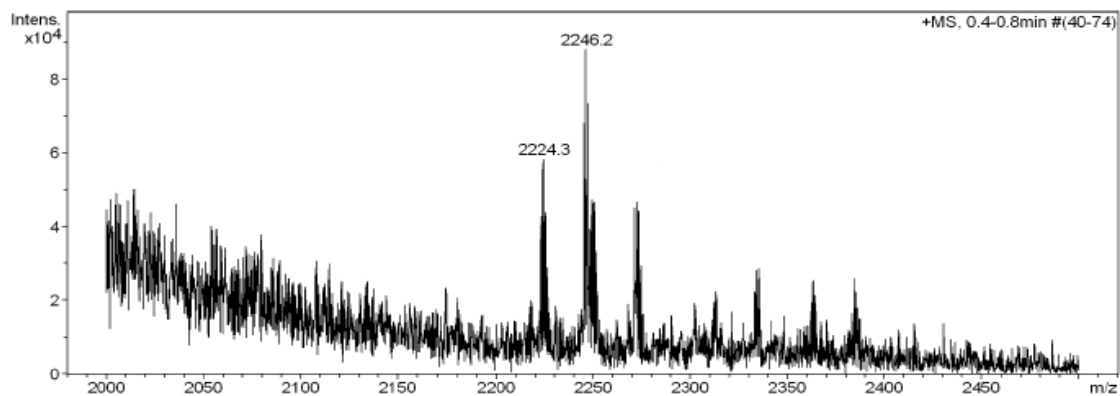




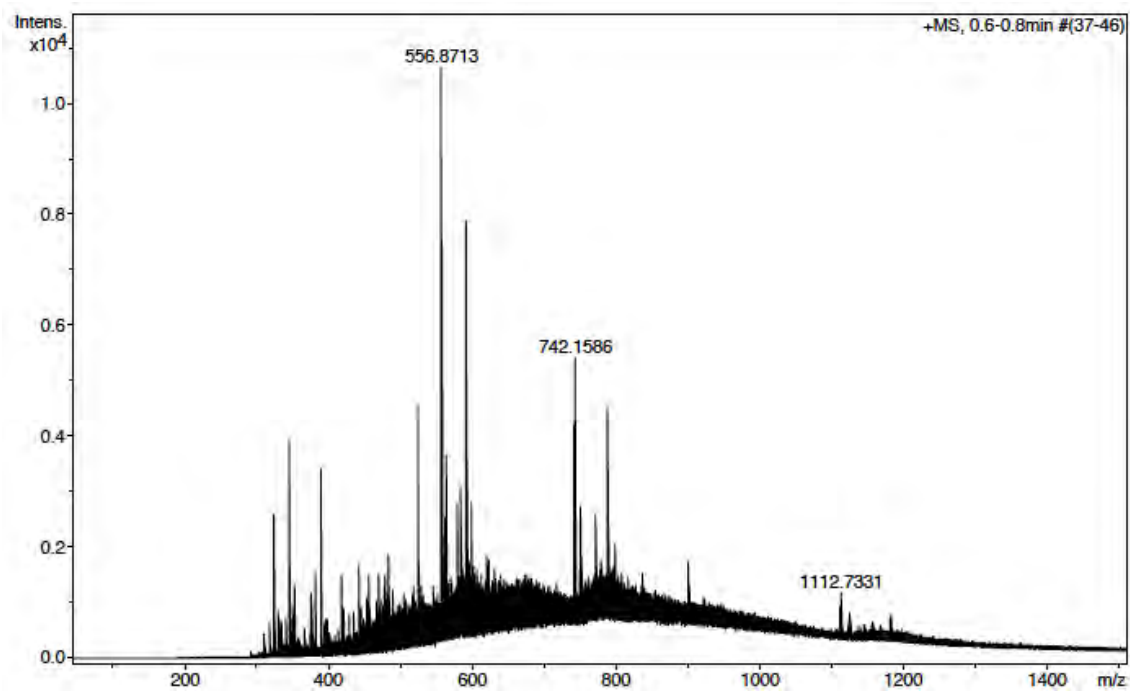
**BPC816**HPLC ( $\lambda=220$  nm)

No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	6,03	44,581	17,155	8,85
2	7,05	194,542	167,656	86,52
3	7,69	92,210	8,957	4,62
Total:		331,334	193,769	100,00

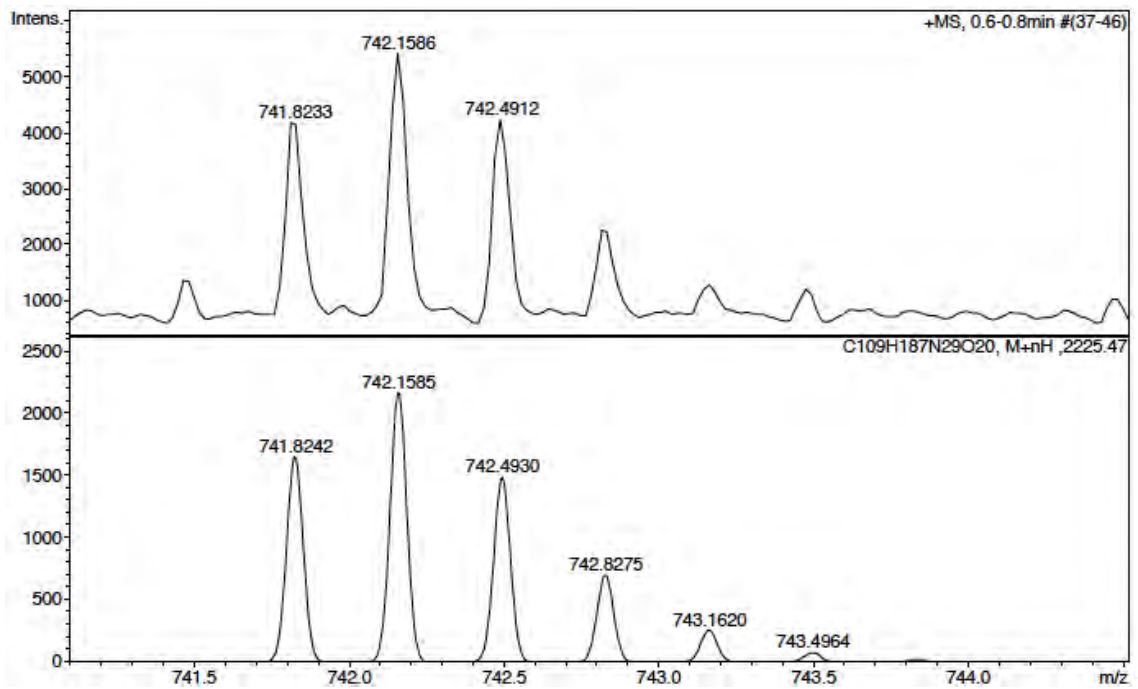
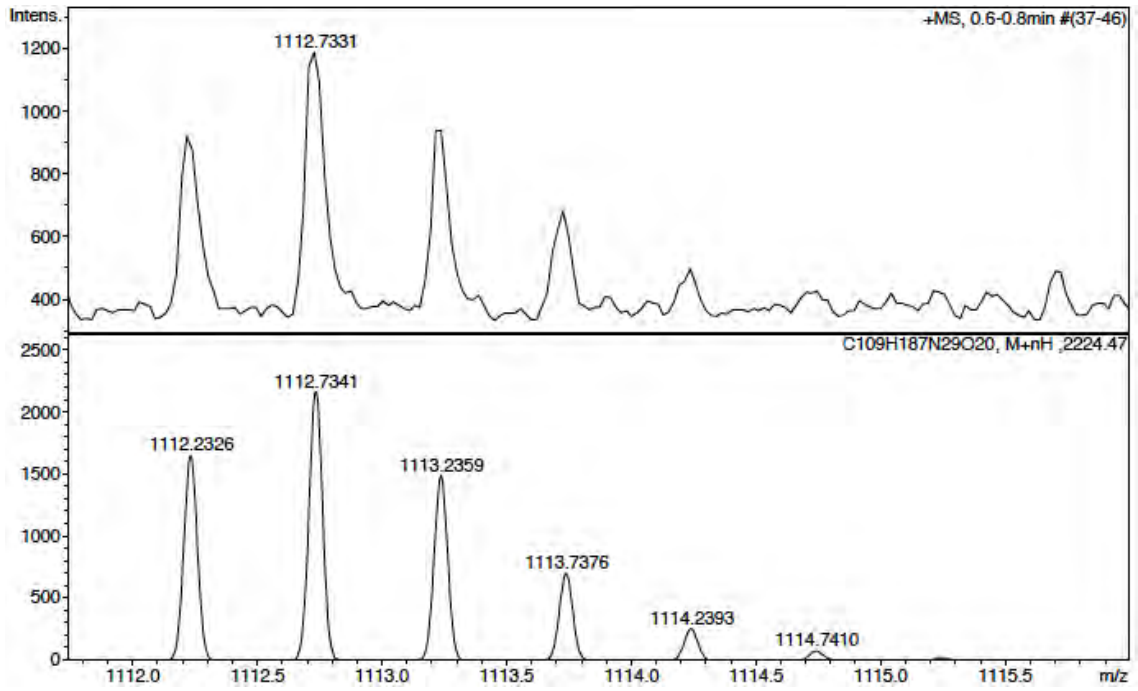
ESI-MS ( $m/z$ )

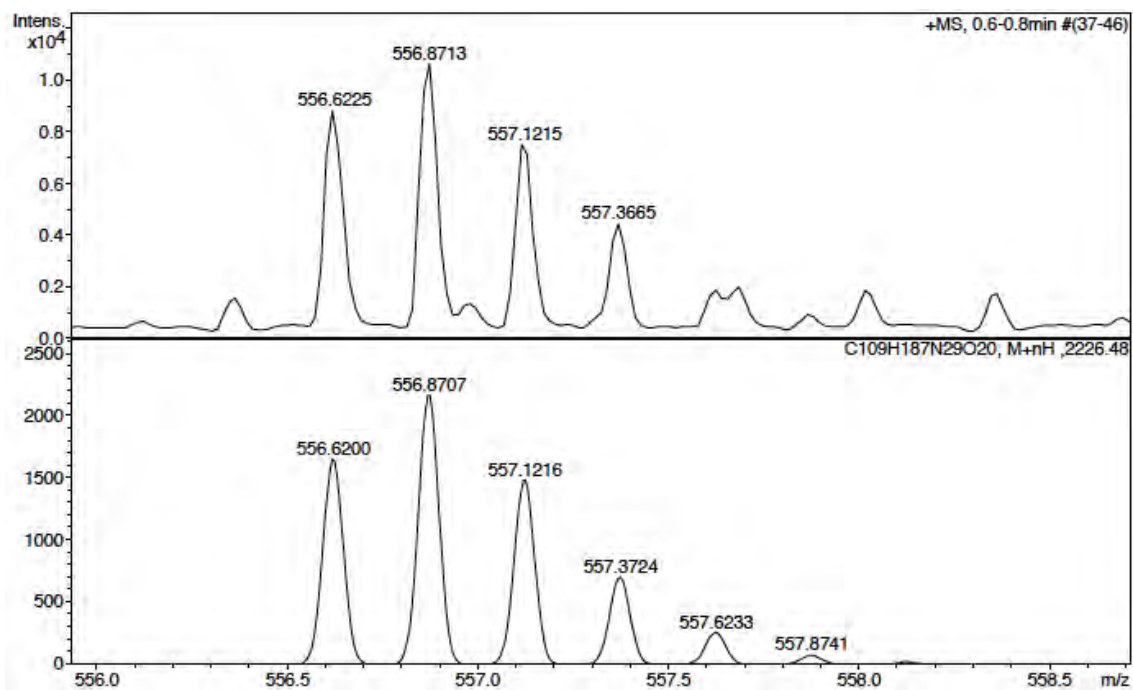


HRMS (ESI)  $m/z$



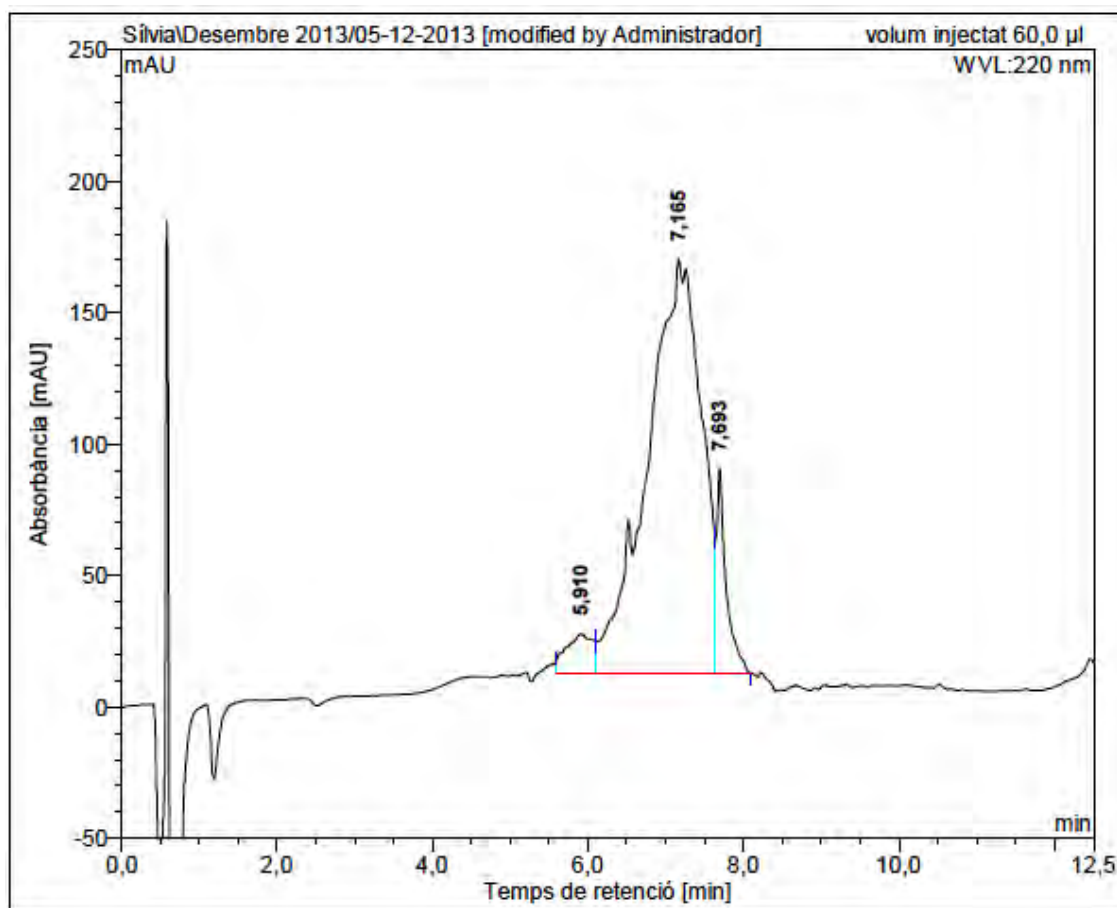






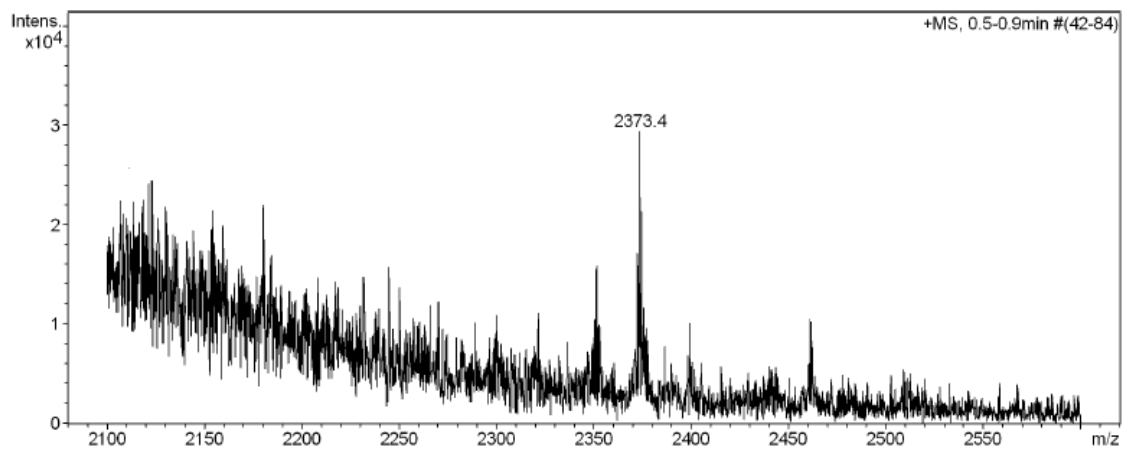
# BPC818

HPLC ( $\lambda=220$  nm)



No.	mps retenc min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	5,91	14,894	5,873	4,09
2	7,17	157,511	127,006	88,35
3	7,69	77,880	10,866	7,56
Total:		250,284	143,745	100,00

ESI-MS ( $m/z$ )



HRMS (ESI)  $m/z$

