

SÍNTESI DE LIPOPÈPTIDS I DE PÈPTIDS CONJUGATS DERIVATS DE BP100. CARACTERIZACIÓ ESTRUCTURAL DE LIPOPÈPTIDS LINEALS I CÍCLICS

Àngel Oliveras Rovira

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/671194>

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.



TESI DOCTORAL

SÍNTESI DE LIPOPÈPTIDS I DE PÈPTIDS
CONJUGATS DERIVATS DE **BP100**.
CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE
LIPOPÈPTIDS LINEALS I CÍCLICS

Àngel Oliveras Rovira

2020

PROGRAMA DE DOCTORAT EN QUÍMICA

Dirigida per:

Dra. Marta Planas Grabuleda

Dra. Lidia Feliu Soley

Tutora:

Dra. Lidia Feliu Soley

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



La Dra. Marta Planas Grabuleda i la Dra. Lidia Feliu Soley, de la Universitat de Girona,

DECLAREM:

Que el treball titulat “Síntesi de lipopèptids i de pèptids conjugats derivats de **BP100**. Caracterització estructural de lipopèptids lineals i cíclics”, que presenta Àngel Oliveras Rovira per a l’obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.

Signatura

Girona, juliol de 2020

A tots els que saben (o haurien de saber) que els hi agraeix-ho.

Llista de projectes

Aquesta tesi doctoral s'ha finançat mitjançant els projectes següents:

- “Péptidos conjugados para el control de bacterias fitopatógenas de cuarentena (METAPEP)” (AGL2015-69876-C2-2-R) (Ministerio de Economía y Competitividad)
- “Péptidos dirigidos a dianas y procesos clave para el control de *Xylella fastidiosa* (PEPXYL)” (RTI2018-099410-B-C22) (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades)
- “Disseny i síntesi de compostos bioactius amb aplicació fitosanitària o terapèutica” (MPCUdG2016/18) (Universitat de Girona)

A més, l'Àngel Oliveras agraeix la beca doctoral concedida per la Universitat de Girona (IFUdG2016-2018).

Llista de publicacions

Publicacions derivades d'aquesta tesi

Oliveras, À; Baro, A; Montesinos, L; Badosa, E; Montesinos, E; Feliu, L; Planas, M. Antimicrobial activity of linear lipopeptides derived from BP100 towards plant pathogens. *PLoS One*. 2018;13(7):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0201571

Rosés, C; Camo, C; Oliveras, À; Moll, L; Lopez, N; Feliu, L; Planas, M. Total solid-phase synthesis of dehydroxy fengycin derivatives. *J Org Chem*. 2018;83:15297-15311. doi:10.1021/acs.joc.8b02553

Manuscris en preparació derivats d'aquesta tesi

Camó, C; Oliveras, À; Badosa, E; Montseinos, E; Feliu, L; Planas; M. Peptide conjugates with antimicrobial activity against plant pathogens. Manuscrit en preparació.

Ng-Choi, I; Figueras, E; Oliveras, À; Feliu, L; Planas, M. Solid-phase synthesis of biaryl cyclic lipopeptides derived from arylomycins. Manuscrit en preparació.

Oliveras, À; Moll, L; Tolosa-Canudas, A; Badosa, E; Bonaterra, A; Montesinos, E; Planas, M; Feliu, L. Linear lipopeptides derived from the antimicrobial peptide BP100 containing D-amino acids. Manuscrit en preparació.

Abreviatures

Ac	Acetil
All	Al·lil
Alloc	Al·liloxicarbonil
AMP	Pèptid antimicrobià
ASM	Acibenzolar- <i>S</i> -metil
Bn	Benzil
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonil
B ₂ Pin ₂	Bis(pinacol)diborà
^t Bu	<i>tert</i> -Butil
Bz	Benzoïl
cDTE	Cicloditioeritritol
CMI	Concentració mínima inhibidora
COMU	Hexafluorofosfat d'1-[1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino]uroni
CPP	Pèptid penetrador de cèl·lules
dba	Dibenzilidenacetona
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DIAD	Azodicarboxilat de diisopropil
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N</i> -Etildiisopropilamina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DME	Dimetoxietà
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocè
Eq	Equivalents
ESI-MS	Espectrometria de masses amb ionització per electrospai
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-Rink-amida	Àcid 4'-{[<i>R,S</i>]- α -[1-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacètic

FT-IR	Espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier
Galp	Galactopiranosida
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
JA	Àcid jasmònic
MBHA	4-Metilbenzhidrilamina
MW	Radiació microones
NMP	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidona
<i>o</i> NBS	2-Nitrobenzensulfonil
Oxima	2-Ciano-2-(hidroxiimino)acetat d'etil
PAC	Àcid 3-(4-hidroximetilfenoxi)propioníc
PyOxima	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetiliden)amino]-oxitris(pirrolidin-1-il)fosfoni
RNM	Ressonància magnètica nuclear
SPhos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenil
STR-UdG	Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona
T.a.	Temperatura ambient
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofur
TIS	Triisopropilsilà
TLC	Cromatografia de capa fina
TMSOTf	Trifluorometansulfonat de trimetilsilil
Tr	Trifenilmetil
Ts	Tosil
UV/VIS	Espectroscòpia ultraviolat-visible
Wang	[4-(Hidroximetil)fenoximetil]poliestirè

Aminoàcids

Nom	Codi de tres lletres	Codi d'una lletra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Àcid aspàrtic	Asp	D
Cisteïna	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Àcid glutàmic	Glu	E
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
3-(2-Naftil)alanina	2-Nal	-
Àcid 2,4-diaminobutíric	Dab	-
Àcid pirolutàmic	Glp	pyrE
Ornitina	Orn	O
4-Clorotreonina	4-Cl-Thr	-

Índex

Índex d'esquemes	XXI
Índex de figures	XXIII
Índex de taules	XXIX
Abstract	1
Resum	3
Resumen	5
1 Introducció	9
1.1 Malalties de plantes	11
1.1.1 <i>Erwinia amylovora</i>	12
1.1.2 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	13
1.1.3 <i>Xanthomonas fragariae</i>	14
1.1.4 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	15
1.1.5 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	16
1.1.6 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	17
1.1.7 <i>Fusarium oxysporum</i>	18
1.1.8 <i>Penicillium expansum</i>	18
1.2 Pèptids antimicrobians	19
1.2.1 Interès i estructura dels pèptids antimicrobians	19
1.2.2 Mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians enfront bacteris	21
1.2.3 Mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians enfront fongs	23
1.2.4 Selectivitat dels pèptids antimicrobians	24
1.3 Estratègies per a la identificació i la millora de pèptids antimicrobians	25
1.3.1 Truncació de la seqüència peptídica	26
1.3.2 Modificació de l'extrem C- o N-terminal	26
1.3.3 Modificacions a l'esquelet	27
1.3.4 Síntesi de pèptids multimèrics	29
1.3.5 Conjugació amb compostos peptídics i no peptídics	30
1.3.6 Ciclació	33
1.3.7 Incorporació d'aminoàcids no proteïnogènics	34
1.4 Lipopèptids antimicrobians	35
1.4.1 Lipopèptids naturals	35

1.4.2	Lipopèptids sintètics.....	37
1.5	BP100, un pèptid antimicrobià i molt més.....	39
1.5.1	Identificació de BP100	39
1.5.2	Mecanisme d'acció de BP100	40
1.5.3	Pèptids antimicrobians derivats de BP100	42
1.5.4	Altres activitats biològiques de BP100	49
2	Objectius.....	55
3	Lipopèptids antimicrobians derivats de BP100	61
3.1	Lipopèptids derivats de BP100 contenint L-aminoàcids	63
3.1.1	Disseny dels lipopèptids	63
3.1.2	Síntesi dels lipopèptids.....	64
3.1.3	Activitat biològica dels lipopèptids	68
3.2	Lipopèptids derivats de BP100 contenint D-aminoàcids o una histidina	75
3.2.1	Disseny i síntesi dels lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His	75
3.2.2	Activitat biològica dels lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His.....	79
4	Lipopèptids conjugats derivats de BP100	89
4.1	Disseny dels lipopèptids conjugats	91
4.2	Síntesi dels lipopèptids conjugats	93
4.3	Activitat biològica.....	94
4.3.1	Activitat antibacteriana	94
4.3.2	Toxicitat	96
4.3.3	Influència de la seqüència en l'activitat biològica dels lipopèptids conjugats.....	98
4.3.4	Lipopèptids conjugats derivats de BP100 amb un millor perfil biològic.....	102
5	Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals	105
5.1	Els pesticides estreptomina, valifenalat i quinoxifèn	107
5.2	Pèptids conjugats derivats de BP100 i de pesticides convencionals	109
5.2.1	Conjugació d'estreptomina a BP100	110
5.2.2	Conjugació d'un derivat del valifenalat a BP100	119
5.2.3	Conjugació d'un derivat de quinoxifèn a BP100	121
5.3	Activitat biològica dels pèptids conjugats BP493 , BP523 i BP524	125
5.3.1	Activitat antimicrobiana dels pèptids conjugats BP493 , BP523 i BP524	125
5.3.2	Toxicitat dels pèptids conjugats BP493 , BP523 i BP524	126
5.3.3	Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals amb un millor perfil biològic	127

6	Caracterització estructural de lipopèptids derivats de fengicines, arilomicines i BP475	129
6.1	Anàlisi estructural del lipopèptid antimicrobià BP475	131
6.1.1	Caracterització mitjançant RMN del lipopèptid antimicrobià BP475	132
6.2	Ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines	137
6.2.1	Síntesi en fase sòlida de dehidroderivats de fengicines	139
6.2.2	Caracterització mitjançant RMN de ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines	140
6.3	Ciclolipopèptids biarílics derivats d'arilomicines	156
6.3.2	Caracterització mitjançant RMN del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.....	158
7	Conclusions	167
8	Procediment experimental.....	175
8.1	Material i mètodes	177
8.1.1	Reactius i dissolvents.....	177
8.1.2	Test de ninhidrina o de Kaiser	177
8.1.3	Instrumentació general	178
8.2	Síntesi de lipopèptids derivats de BP100	180
8.2.1	$C_5H_{11}CO$ -Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP367)	180
8.2.2	Ac-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP368)	181
8.2.3	Ac-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP369)	181
8.2.4	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP370).....	181
8.2.5	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP371)	181
8.2.6	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP372).....	182
8.2.7	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP373).....	182
8.2.8	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP374).....	182
8.2.9	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP375).....	182
8.2.10	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP376)	182
8.2.11	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-NH ₂ (BP377)	183
8.2.12	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂ (BP378)	183
8.2.13	C_3H_7CO -Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP379)	183
8.2.14	Ac-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP380)	183
8.2.15	Ac-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP381)	184
8.2.16	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP382).....	184
8.2.17	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP383)	184
8.2.18	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP384)	184

8.2.19	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP385)	184
8.2.20	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP386)	185
8.2.21	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP387)	185
8.2.22	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP388)	185
8.2.23	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP389)	185
8.2.24	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₃ H ₇)-NH ₂ (BP390)	186
8.2.25	C ₁₁ H ₂₃ CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP391)	186
8.2.26	Ac-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP392)	186
8.2.27	Ac-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP393)	186
8.2.28	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP394)	186
8.2.29	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP395)	187
8.2.30	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP396)	187
8.2.31	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP397)	187
8.2.32	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP398)	187
8.2.33	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP399)	188
8.2.34	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP400)	188
8.2.35	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-NH ₂ (BP401)	188
8.2.36	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂ (BP402)	188
8.2.37	C ₅ H ₁₁ CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP472)	188
8.2.38	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP473)	189
8.2.39	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP474)	189
8.2.40	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP475)	189
8.2.41	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂ (BP476)	190
8.2.42	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP484)	190
8.2.43	C ₃ H ₇ CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP485)	191
8.2.44	Ac-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP486)	191
8.2.45	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP488)	191
8.2.46	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP489)	191
8.2.47	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP490)	191
8.2.48	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP494)	192
8.2.49	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂ (BP495)	192
8.2.50	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₃ H ₇)-NH ₂ (BP496)	192
8.2.51	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP497)	192
8.2.52	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP498)	193

8.2.53	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP499)	193
8.2.54	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP500)	193
8.2.55	Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP501)	193
8.2.56	Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP502)	193
8.2.57	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-D-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP503).....	194
8.3	Síntesi de lipopèptids conjugats derivats de BP100	194
8.3.1	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH ₂ (BP387-BP16).....	195
8.3.2	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP16-BP387).....	195
8.3.3	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP387-BP100)	196
8.3.4	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP100-BP387).....	196
8.3.5	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP474-BP143)	196
8.3.6	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP143-BP474).....	196
8.3.7	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP387-flg15).....	197
8.3.8	Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (flg15-BP387).....	197
8.3.9	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP475-flg15).....	197
8.3.10	Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (flg15-BP475).....	197
8.3.11	Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH ₂ (BP475-Pip1)	198
8.3.12	Ac-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (Pip1-BP475)	198
8.4	Síntesi de pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals	198
8.4.1	Síntesi de les peptidil resines H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^t Bu)-Leu-NH-Rink-MBHA (6a) i H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^t Bu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (6b)	198
8.4.2	Síntesi del pèptid conjugat BP524a/b	199
8.4.3	Síntesi del pèptid conjugat BP523 contenint BP100 i un derivat de valifenalat....	200
8.4.4	Síntesi del pèptid conjugat BP493 contenint BP100 i un derivat de quinoxifèn ...	201
8.5	Síntesi de dehidroderivats de fengicines.....	203

8.5.1	C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC838).....	204
8.5.2	C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC840).....	204
8.5.3	C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC842).....	205
8.5.4	C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC844).....	205
8.5.5	C ₁₁ H ₂₃ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC854).....	206
8.5.6	C ₁₅ H ₃₁ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC856).....	206
8.6	Síntesi del ciclolipopèptid biarílic 20 derivat de les arilomicines.....	207
8.7	Avaluació de l'activitat biològica.....	209
8.7.1	Creixement de les soques bacterianes i fúngiques.....	209
8.7.2	Anàlisi de l'activitat antimicrobiana.....	209
8.7.3	Anàlisi de l'activitat hemolítica.....	210
8.7.4	Anàlisi de l'efecte dels pèptids en fulles de tabac.....	210
8.7.5	Anàlisi de l'efecte dels pèptids en la inducció de defenses en tomatera.....	210
8.7.6	Anàlisi de l'estabilitat dels pèptids a la degradació per proteases.....	211
9	Bibliografia.....	213

Contingut digital suplementari

- Tesi doctoral (arxiu pdf)
- Annex: informació suplementària referent als capítol 3-6 (arxiu pdf)

Índex d'esquemes

Esquema 1. Síntesi dels lipopèptids BP367 , BP379 i BP391 .	65
Esquema 2. Síntesi dels lipopèptids BP368 , BP380 , BP392 .	66
Esquema 3. Síntesi dels lipopèptids BP472 i BP485 .	77
Esquema 4. Síntesi dels lipopèptids BP476 , BP495 i BP496 .	78
Esquema 5. Síntesi del lipopèptid conjugat Pip1-BP475 .	93
Esquema 6. Síntesi del valifenalat.	108
Esquema 7. Síntesi del quinoxifèn.	109
Esquema 8. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat STR-BP100 .	111
Esquema 9. Síntesi de les peptidil resines 6 .	112
Esquema 10. Síntesi de la peptidil resina 8 i eliminació del grup Fmoc.	115
Esquema 11. Assajos per a la síntesi de 7 .	116
Esquema 12. Equilibri tautomèric proposat per BP524 .	118
Esquema 13. Síntesi del compost 11 .	119
Esquema 14. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat BP523 .	120
Esquema 15. Síntesi del pèptid BP523 .	121
Esquema 16. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat Q-BP100 .	122
Esquema 17. Síntesi del derivat de quinoxifèn 17 .	123
Esquema 18. Assajos d'hidròlisi del grup èster de 17 .	123
Esquema 19. Síntesi de 18 per hidròlisi de la quinolona 15 .	124
Esquema 20. Síntesi del pèptid conjugat BP493 .	124
Esquema 21. Síntesi dels dehidroderivats de fengicines BPC838 , BPC854 i BPC856 .	140
Esquema 22. Síntesi del derivat d'arilomicina 20 .	158
Esquema 23. Test de ninhidrina.	177

Índex de figures

Figura 1. Síntomes del foc bacterià en diferents hostes. A-B, pomera silvestre; C-E, perera; F-G, arç blanc; H, pomera; I-J, perera.	12
Figura 2. Síntomes de la taca bacteriana causada per <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> en fulles de pebrotera.	13
Figura 3. Síntomes de la taca angular de les fulles de la maduixera causada per <i>X. fragariae</i> . A-B, símptomes inicials al revers de les fulles; C, símptomes del progrés de la malaltia per l'anvers de la fulla; D, progressió de la malaltia en els nervis de la fulla.	14
Figura 4. Síntomes d'infecció de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> en pruneres i presseguers. A, fulles de presseguer amb nombroses taques i amb un halo groc al voltant; B, símptomes en préssecs; C, fulla de prunera amb lesions angulars impregnades de líquid; D, taques bacterianes en una pruna.	15
Figura 5. Siringomicines A, E i G.	16
Figura 6. Síntomes del xancre bacterià del kiwi causat per <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> . A, exsudat vermell en un brot jove; B, xancre amb exsudat vermell en un tronc; C, exsudat blanc en una branca; D, taques necròtiques en una fulla.	17
Figura 7. Síntomes de malalties causades per <i>F. oxysporum</i> en plantes d'enciam. A, símptomes en el sistema vascular de l'enciam; B, fulles d'enciam pansides. ⁶	18
Figura 8. Síntomes de <i>P. expansum</i> en una poma.	19
Figura 9. Articles científics publicats entre el 1997 i el 2017 sobre pèptids antimicrobians.	19
Figura 10. Estructura de la nisina, primer pèptid antimicrobià identificat i caracteritzat.	20
Figura 11. Models mecànics de disrupció de la membrana bacteriana pels pèptids antimicrobians.	22
Figura 12. Representació esquemàtica de les diferències estructurals entre: A, membrana bacteriana; B, membrana animal; C, paret cel·lular i membrana plasmàtica dels fongs.	25
Figura 13. Tipus de modificacions que s'incorporen a l'esquelet d'un pèptid.	28
Figura 14. Estructura del peptoid SPO	28
Figura 15. Estructura del pèptid antimicrobià tetramèric SB041	29
Figura 16. Estructura del pèptid Chex1-Arg20 i dels seus derivats multimèrics A3-APO , tetràmer-DTM-NHNH₂ i tetràmer-xilè-NHNH₂	30
Figura 17. Estructura del pèptid conjugat MAAPC03	32
Figura 18. Estructura del pèptid conjugat Pep-4-LVFX	32
Figura 19. Tipus de pèptids cíclics.	34

Figura 20. Estructura de lipopèptids naturals lineals i cíclics.....	36
Figura 21. Projectió d'Edmunson de l'estructura Pep3 , dels pèptids de la quimioteca CECMEL11 i de BP100	40
Figura 22. Efecte de BP100 en <i>Escherichia coli</i>	41
Figura 23. Estructura dels pèptids BP241 i BP250	43
Figura 24. Estructura d'un pèptid derivat de BP100 contenint una 3-(2-naftil)-D-alanina (D-2-Nal).	44
Figura 25. Estructura dels pèptids BP135 i BP136	45
Figura 26. Estructura dels pèptids multimèrics derivats de BP100 i BP143	46
Figura 27. Nanopartícules d'alúmina que contenen BP100	48
Figura 28. Estructura dels lipopèptids BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ , C4 i C5 , derivats de BP100	49
Figura 29. Estructura del pèptid conjugat BP101-PEG-1	50
Figura 30. Estructura dels lipopèptids antimicrobians derivats de BP100	63
Figura 31. A, Resina MBHA; B, linker Fmoc-Rink-amida.....	64
Figura 32. CMI dels lipopèptids BP367-BP402 enfront els bacteris <i>E. amylovora</i> (<i>Ea</i>), <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xav</i>), <i>X. fragariae</i> (<i>Xf</i>), <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xap</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pss</i>) i <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>) i els fongs <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>) i <i>P. expansum</i> (<i>Pe</i>).....	69
Figura 33. Activitat hemolítica dels lipopèptids BP367-BP402 a 250 µM.....	70
Figura 34. Projectió d'Edmunson de l'estructura de BP100	71
Figura 35. Efecte dels lipopèptids BP367-BP402 en fulles de tabac a 50 i 250 µM.....	72
Figura 36. Percentatge de degradació de BP100 i dels lipopèptids seleccionats enfront proteïna K.....	74
Figura 37. CMI dels lipopèptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His enfront <i>E. amylovora</i> (<i>Ea</i>), <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xav</i>), <i>X. fragariae</i> (<i>Xf</i>), <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xap</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pss</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>) i <i>P. expansum</i> (<i>Pe</i>).....	80
Figura 38. Comparació de l'activitat antimicrobiana dels 21 lipopèptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L.....	82
Figura 39. Activitat hemolítica dels lipopèptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His a 250 µM.....	83
Figura 40. Comparació de l'activitat hemolítica dels 21 lipopèptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L a 250 µM.....	84

Figura 41. Efecte dels lipopèptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His infiltrats en fulles de tabac a 250 µM..	85
Figura 42. Comparació de l'efecte de la infiltració en fulles de tabac dels 21 lipopèptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L a 250 µM..	86
Figura 43. CMI dels lipopèptids conjugats enfront, <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xav</i>), <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xap</i>), <i>X. fragariae</i> (<i>Xf</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pss</i>) i <i>E. amylovora</i> (<i>Ea</i>)..	95
Figura 44. Activitat hemolítica dels lipopèptids conjugats a 250 µM..	97
Figura 45. Efecte de la infiltració dels lipopèptids conjugats a 250 µM en fulles de tabac..	98
Figura 46. Projecció d'Edmunson de l'estructura de: A, BP387-BP16 ; B, BP16-BP387 ; C, BP475-flg15 ; D, flg15-BP475 ; E, BP475-Pip1 ; F, Pip1-BP475 .	101
Figura 47. Estructura de l'estreptomicina.	107
Figura 48. Estructura dels fungicides valifenalat i iprovalicarb, i de l'estructura general 3 .	108
Figura 49. Estructura del quinoxifèn.	109
Figura 50. Estructura dels pèptids conjugats STR-BP100 , BP523 i Q-BP100 .	110
Figura 51. Estructura de 7 .	114
Figura 52. CMI dels pèptids conjugats enfront <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>), <i>P. expansum</i> (<i>Pe</i>), <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xav</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xap</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pss</i>), <i>X. fragariae</i> (<i>Xf</i>) i <i>E. amylovora</i> (<i>Ea</i>)..	125
Figura 53. Estructura dels pèptids BP16 , BP389 i BP475 .	131
Figura 54. A, CMI dels pèptids BP16 , BP389 i BP475 enfront <i>E. amylovora</i> (<i>Ea</i>), <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xav</i>), <i>X. fragariae</i> (<i>Xf</i>), <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xap</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pss</i>), <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>) i <i>P. expansum</i> (<i>Pe</i>). B, Activitat hemolítica (en gris) i efecte en ser infiltrats en fulles de tabac (en blanc) dels pèptids BP16 , BP389 i BP475 a 250 µM.	132
Figura 55. Ampliació de l'espectre HSQC-TOCSY del lipopèptid BP475 _{desestructurat} .	133
Figura 56. Ampliació de l'espectre HSQC-TOCSY del lipopèptid BP475 _{desestructurat} .	134
Figura 57. Ampliació de l'espectre NOESY del lipopèptid BP475 _{desestructurat} .	134
Figura 58. Ampliació de l'espectre NOESY del lipopèptid BP475 _{estructurat} .	135
Figura 59. Estructura secundària adoptada pel lipopèptid BP475 _{estructurat} .	136
Figura 60. Estructura de les fengícines.	138
Figura 61. Estructura dels ciclodepsipèptids BPC838 , BPC840 , BPC842 , BPC844 , BPC854 i BPC856 .	138

Figura 62. Finestra des de 0,5 ppm a 4,1 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	141
Figura 63. Finestra des d'1 ppm a 5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	141
Figura 64. Finestra des de 6,4 ppm a 7,2 ppm de: A, espectre ¹ H-RMN del ciclolipodepsipèptid BPC856 ; B, espectre TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC856 ; C, espectre ¹ H-RMN del ciclolipodepsipèptid BPC838 ; D, espectre TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	142
Figura 65. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	143
Figura 66. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	143
Figura 67. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	144
Figura 68. Finestra des de 0,5 ppm a 4,5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC856	145
Figura 69. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	145
Figura 70. Finestra des de 0,5 ppm a 2,5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838	146
Figura 71. Finestra des de 2 ppm a 5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC840	150
Figura 72. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC844	152
Figura 73. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC842	154
Figura 74. Estructura de les arilomicines A i B.	156
Figura 75. Estructura del derivat d'arilomicina 20	157
Figura 76. Finestra des de 0,5 ppm a 3 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.	159
Figura 77. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.....	160
Figura 78. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.....	161
Figura 79. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.....	161

Figura 80. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A.	162
Figura 81. Fragment biarílic cíclic del ciclolipopèptid 20 derivat de l'arilomicina A.	162
Figura 82. Finestra des de 6,5 ppm a 7,5 ppm del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A corresponent a: A, espectre ^1H -RMN; B, espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell).	163

Índex de taules

Taula 1. Classes de pèptids antimicrobians en base a la seva estructura.....	21
Taula 2. Classes de pèptids antifúngics segons el seu mecanisme d'acció.	24
Taula 3. Truncació dels pèptids LL-37 i P5 : efecte sobre l'activitat antimicrobiana i l'hemòlisi.....	26
Taula 4. Modificació de l'extrem N- i C-terminal dels pèptids.....	27
Taula 5. Pèptids que incorporen β -aminoàcids a la seqüència.....	28
Taula 6. Pèptids conjugats contenint dues seqüències peptídiques.	31
Taula 7. Pèptids conjugats contenint un pèptid antimicrobià i un antibiòtic.	33
Taula 8. Efecte de la incorporació de D-aminoàcids en la seqüència de A12L/A20L i Polybia-CP . .	35
Taula 9. Efecte de la incorporació d'un fragment acil a la seqüència OOWW-NH ₂ , Gr-SL3 (34-45) , GZCO i LF11-215	37
Taula 10. Efecte de la incorporació d'un fragment acil a la seqüència dels pèptids KSL-W i BPC194	38
Taula 11. Pèptids derivats de BP100 per modificació de la seqüència amb aminoàcids proteïnogènics.....	42
Taula 12. Pèptids derivats de BP100 incorporant aminoàcids no proteïnogènics.	44
Taula 13. Exemples de peptidomimètics derivats de BP100	45
Taula 14. Pèptids conjugats derivats de BP100	47
Taula 15. Pèptids derivats de BP100 amb activitat antitumoral.....	51
Taula 16. BP100 i pèptids derivats de BP100 utilitzats com a CPP.	52
Taula 17. Pèptids de la quimioteca CECMEL11 estudiats com a elicitors de defenses de plantes..	53
Taula 18. Seqüències, temps de retenció, puresa i caracterització dels lipopèptids derivats de BP100	67
Taula 19. Expressió de gens relacionats amb la inducció de defenses en plantes de tomatera.	73
Taula 20. Lipopèptids derivats de BP100 contenint L-aminoàcids i els seus anàlegs contenint D-aminoàcids o una His.	76
Taula 21. Temps de retenció, pureses i caracterització dels lipopèptids derivats de BP100 que contenen D-aminoàcids o una histidina.	79
Taula 22. Pèptids seleccionats per a la síntesi de lipopèptids conjugats.....	92
Taula 23. Seqüències dels lipopèptids conjugats.....	92
Taula 24. Càrrega neta, temps de retenció, puresa i caracterització dels lipopèptids conjugats....	94
Taula 25. Seqüència, càrrega neta, activitat antibacteriana i hemòlisi de pèptids conjugats resultants de la unió de dos pèptids de la quimioteca CECMEL11.	99
Taula 26. Condicions assajades per a la conjugació de l'estreptomicina a les peptidil resines 6 . .	113
Taula 27. Optimització de l'eliminació del grup Fmoc de la peptidil resina 8	114

Taula 28. Assajos per a la síntesi de 7 .	117
Taula 29. Activitat hemolítica i fitotoxicitat dels pèptids conjugats BP493 , BP523 i BP524 .	127
Taula 30. Assignació dels senyals de protó, carboni i nitrogen dels grups amida i de les posicions α i β de BP475 _{desestructurat} .	135
Taula 31. Assignació dels senyals de protó, carboni i nitrogen dels grups amida i de les posicions α i β de BP475 _{estructurat} .	136
Taula 32. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC838 .	147
Taula 33. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC854 .	148
Taula 34. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC856 .	149
Taula 35. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC840 .	151
Taula 36. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC844 .	153
Taula 37. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC842 .	155
Taula 38. Caracterització del ciclolipopèptid biarílic 20 .	164

Abstract

Nowadays, around a third of the agricultural production is lost due to the damage caused by pests, resulting in a significant economic impact. It is estimated that about a third of these losses are provoked by phytopathogens. Currently, the solution to these problems focuses on the use of pesticides, mainly copper derivatives, antibiotics or fungicides. These compounds are effective, but they are highly polluting. In addition, antibiotics are not allowed in many countries, because abusive use causes the rapid appearance of bacterial resistant strains.

The lack of non-polluting and effective treatments for plant disease control has raised the search for new compounds. Antimicrobial peptides (AMPs) are one of the most promising alternatives to traditional pesticides, because they show high biological activity, and they are unlikely to prompt the emergence of pathogen resistant strains. The LIPPSO group, in collaboration with the CIDSAV group, has identified the peptide H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100**) which displays high antibacterial activity against plant pathogens and low hemolysis. For this reason, **BP100** is an excellent candidate for the development of new sequences that can be used to control plant diseases. Thus, this PhD thesis was centered on the design and synthesis of **BP100** derivatives. With this aim, three different strategies were considered, involving the incorporation of an acyl group into **BP100**, the conjugation of **BP100** with another peptide and the derivatization of **BP100** with a common pesticide.

It has been described that the acylation of a peptide sequence is a useful strategy to increase its biological activity and improve its stability towards protease degradation. Based on these considerations, one of the objectives of this thesis was the synthesis of lipopeptides derived from **BP100** by acylation of the N-terminus or of the side chain of a lysine residue placed at each position of the peptide sequence with a butanoyl, a hexanoyl or a lauroyl group. In addition, the influence of incorporating D-amino acids or a His residue into the sequence of these lipopeptides was studied. Results showed that, in general, the lipopeptides derived from **BP100** with the best biological profile were those containing a D-Phe at position 4 and a lysine acylated with a butanoyl or a hexanoyl group at positions 3, 4, 7, 8, 10, or 11, corresponding to the apolar face of the α -helix that could adopt these peptides. In particular, the lipopeptide with the best biological profile was Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (**BP475**), which exhibits MIC values between 0.8 and 6.2 μ M against the 8 tested phytopathogens and it is not hemolytic at 250 μ M.

Conjugation of two peptides, with similar or different biological activities, to generate a hybrid peptide is a useful strategy to reinforce the properties of the two individual sequences. Thus, the second objective of this thesis was focused on the design and synthesis of peptide hybrids resulting from the conjugation of a lipopeptide derived from **BP100** (**BP387** or **BP475**) with an AMP (**BP143**), a cell-penetrating peptide (CPP) (**BP16** or **BP100**) or a plant defense elicitor peptide (**flg15** or **Pip1**). In general, lipopeptide conjugates incorporating a CPP or an AMP showed a low antibacterial activity and a high hemolytic activity. In contrast, lipopeptide conjugates containing a plant defense elicitor peptide displayed a moderate or high antibacterial activity and a low or moderate toxicity. The lipopeptide conjugates with the best biological profile were **Pip1-BP475**

and **BP475-Pip1**, with MIC values between 0.8 and 6.2 μM against 5 out of the 6 tested phytopathogens and a hemolysis <26% at 250 μM .

On the other hand, the covalent linkage of an antibiotic or a fungicide with a peptide sequence has also been reported as a useful strategy to achieve more effective compounds. Based on this, the third objective of this thesis was centered on the conjugation of **BP100** with the antibiotic streptomycin, and with the fungicides valifenalate and quinoxifen. Thus, peptides **BP493**, **BP523** and **BP524** were obtained, which incorporate at the N-terminus of **BP100** a quinolone derived from quinoxifen, a derivative of valifenalate and streptomycin, respectively. **BP524** showed the best biological profile with MIC values <6.2 μM against the 6 tested bacteria and a hemolysis of 57% at 50 μM .

In the last part of this thesis, lipopeptide **BP475** was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). From this characterization, it was determined that five C-terminal amino acids of **BP475** can adopt a α -helix structure. On the other hand, the LIPPSO group had previously described strategies for the solid-phase synthesis of fengycin and arylomycin A derivatives, but their NMR characterization had not been achieved. In this thesis, six fengycin derivatives and one arylomycin A analogue were synthesized and purified, and were characterized by NMR.

Resum

Actualment, es calcula que, aproximadament, un terç de la producció agrícola es perd a causa dels danys provocats per les plagues, resultant en un impacte econòmic molt important. S'estima que al voltant d'un terç d'aquestes pèrdues són provocades per fitopatògens. Avui en dia, la solució a aquests problemes es centra en l'ús de pesticides, fonamentalment derivats de coure, antibiòtics o fungicides. Aquests compostos, tot i ser eficaços, són altament contaminants. A més, els antibiòtics no estan permesos en molts països, perquè un ús abusiu provoca l'aparició ràpida de soques bacterianes resistents.

La manca de tractaments no contaminants i efectius per al control de malalties de plantes ha motivat la recerca de nous compostos. Els pèptids antimicrobians (AMPs) són una de les alternatives més prometedores als pesticides tradicionals, perquè mostren una activitat biològica elevada, alhora que és difícil que provoquin l'aparició de soques bacterianes resistents. En aquest àmbit, el grup LIPPSO, en col·laboració amb el grup CIDSAV, ha identificat el pèptid H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100**) que presenta activitat antibacteriana elevada enfront patògens de plantes i baixa hemòlisi. Aquest perfil biològic fa que **BP100** sigui un candidat excel·lent per a la cerca de noves seqüències que puguin ser emprades per al control de malalties de plantes. Per aquest motiu, en aquesta tesi doctoral es va plantejar el disseny i la síntesi de derivats de **BP100**. Amb aquest objectiu es varen considerar tres estratègies, concretament, la incorporació d'un grup acil a la seqüència de **BP100**, la conjugació de **BP100** amb un altre pèptid i la derivatització de **BP100** amb un pesticida convencional.

A la bibliografia s'ha descrit que l'acilació d'una seqüència peptídica és una estratègia útil per a augmentar la seva activitat biològica, així com per millorar la seva estabilitat a la degradació per proteases. En base a aquestes consideracions, un dels objectius d'aquesta tesi va ser preparar lipopèptids derivats de **BP100** per acilació (amb un grup butanoïl, hexanoïl o lauroïl) de l'extrem N-terminal o de la cadena lateral d'un residu de lisina localitzada en cadascuna de les posicions de la seqüència. A més, es va estudiar la influència d'incorporar D-aminoàcids o un residu d'His a la seqüència d'aquests lipopèptids. Els resultats obtinguts varen mostrar que, en general, els lipopèptids derivats de **BP100** amb un millor perfil biològic són els que contenen una D-Phe a la posició 4 i una lisina acilada amb un grup butanoïl o hexanoïl a les posicions 3, 4, 7, 8, 10 o 11, corresponents a la cara apolar de l'hèlix α que podrien adoptar aquests pèptids. Concretament, el lipopèptid amb el millor perfil biològic va ser Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (**BP475**), que presenta una CMI entre 0,8 i 6,2 μ M enfront els 8 fitopatògens testats i no és hemolític a 250 μ M.

La conjugació de dos pèptids, amb activitats biològiques semblants o diferents, per generar un pèptid híbrid és una estratègia útil per tal de sumar les propietats de cadascuna d'aquestes unitats. En el segon objectiu d'aquesta tesi es varen dissenyar i sintetitzar pèptids conjugats resultants de la unió d'un lipopèptid derivat de **BP100** (**BP387** o **BP475**) amb un AMP (**BP143**), un pèptid penetrador de cèl·lules (CPP) (**BP16** o **BP100**) o un pèptid elicitor de defenses de plantes (**flg15** o **Pip1**). En general, es va observar que els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP presenten una activitat antibacteriana baixa i una activitat hemolítica elevada. En canvi,

els lipopèptids conjugats que contenen un pèptid elicitor de defenses de plantes mostren una activitat antibacteriana moderada o elevada, i una toxicitat baixa o moderada. Els lipopèptids conjugats que presenten el millor perfil biològic varen ser **Pip1-BP475** i **BP475-Pip1**, amb una CMI entre 0,8 i 6,2 μM enfront 5 dels 6 fitopatògens testats i una hemòlisi <26% a 250 μM .

D'altra banda, està descrit que la unió covalent d'un antibiòtic o un fungicida a una seqüència peptídica és una estratègia útil per aconseguir compostos més efectius. En base a això, en el tercer objectiu d'aquesta tesi es va plantejar la conjugació de **BP100** amb l'antibiòtic estreptomycina, i els fungicides valifenalat i quinoxifèn. Així, es varen obtenir els pèptids **BP493**, **BP523** i **BP524**, resultat de la incorporació a l'extrem N-terminal de **BP100** d'una quinolona derivada de quinoxifèn, d'un derivat de valifenalat i de l'estreptomycina, respectivament. D'aquests, **BP524** va ser el que presenta un millor perfil d'activitat biològica, amb una CMI <6,2 μM enfront els 6 bacteris testats i una hemòlisi del 57% a 50 μM .

En l'última part d'aquesta tesi, es va caracteritzar mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN) el lipopèptid **BP475**. A partir d'aquesta caracterització, es va determinar que cinc aminoàcids de l'extrem C-terminal de **BP475** poden adoptar una estructura d'hèlix α . D'altra banda, en el grup LIPPSO, s'havien descrit estratègies de síntesi en fase sòlida derivats de fengicines i d'arilomicina A, però els compostos obtinguts no s'havien pogut caracteritzar mitjançant RMN. En aquesta tesi es varen sintetitzar i purificar sis derivats de fengicines i un derivat d'arilomicina A i es varen caracteritzar mitjançant RMN.

Resumen

Actualmente se calcula que, aproximadamente, un tercio de la producción agrícola se pierde a causa de los daños provocados por las plagas, resultando en un impacto económico muy importante. Se estima que alrededor de un tercio de estas pérdidas son provocadas por fitopatógenos. Hoy en día, la solución a estos problemas se centra en el uso de pesticidas, esencialmente derivados de cobre, antibióticos o fungicidas. Estos compuestos, aunque eficaces, son altamente contaminantes. Además, los antibióticos no están permitidos en muchos países, porque un uso abusivo provoca la aparición rápida de cepas bacterianas resistentes.

La ausencia de tratamientos no contaminantes y efectivos para el control de enfermedades de plantas ha motivado la búsqueda de nuevos compuestos. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una de las alternativas más prometedoras a los pesticidas tradicionales, porque muestran una actividad biológica elevada, a la vez que es difícil que provoquen la aparición de cepas bacterianas resistentes. En este ámbito, el grupo LIPPSO, en colaboración con el grupo CIDSAV, ha identificado el péptido H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100**) que presenta actividad antibacteriana elevada frente a patógenos de plantas y baja hemólisis. Este perfil biológico hace que **BP100** sea un candidato excelente para la búsqueda de nuevas secuencias que puedan ser usadas para el control de enfermedades de plantas. Por este motivo, en esta tesis doctoral se planteó el diseño y la síntesis de derivados de **BP100**. Con este objetivo se consideraron tres estrategias, concretamente, la incorporación de un grupo acilo a la secuencia de **BP100**, la conjugación de **BP100** con otro péptido y la derivatización de **BP100** con un pesticida convencional.

En la bibliografía se ha descrito que la acilación de una secuencia peptídica es una estrategia útil para aumentar su actividad biológica, así como para mejorar su estabilidad a la degradación por proteasas. En base a estas consideraciones, uno de los objetivos de esta tesis fue la preparación de lipopéptidos derivados de **BP100** por acilación (con un grupo butanoílo, hexanoílo o lauroílo) del extremo N-terminal o de la cadena lateral de un residuo de lisina localizada en cada una de las posiciones de la secuencia. Además, se estudió la influencia de incorporar D-aminoácidos o un residuo de His en la secuencia de estos lipopéptidos. Los resultados obtenidos mostraron que, en general, los lipopéptidos derivados de **BP100** con un mejor perfil biológico son los que contienen una D-Phe en la posición 4, una lisina acilada con un grupo butanoílo o hexanoílo en las posiciones 3, 4, 7, 8, 10 o 11, correspondientes a la cara apolar de la hélice α que podrían adoptar estos péptidos. En concreto, el lipopéptido con el mejor perfil biológico fue Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (**BP475**), que presenta una CMI entre 0,8 i 6,2 μ M frente a los 8 fitopatógenos testados y no es hemolítico a 250 μ M.

La conjugación de péptidos, con actividades biológicas parecidas o diferentes, para generar un péptido híbrido es una estrategia útil para sumar las propiedades de cada una de estas unidades. En el segundo objetivo de esta tesis se diseñaron y sintetizaron péptidos conjugados resultantes de la unión de un lipopéptido derivado de **BP100** (**BP387** o **BP475**) con un AMP (**BP143**), un péptido penetrador de células (CPP) (**BP16** o **BP100**) o un péptido elicitor de defensas de plantas (**flg15** o **Pip1**). En general, se observó que los lipopéptidos conjugados que incorporan un CPP o

un AMP presentan una actividad antibacteriana baja y una actividad hemolítica elevada. En cambio, los lipopéptidos conjugados que contienen un péptido elicitor de defensas de plantas muestran una actividad antibacteriana moderada o elevada, y una toxicidad baja o moderada. Los lipopéptidos conjugados que presentan el mejor perfil biológico fueron **Pip1-BP475** y **BP475-Pip1**, con una CMI entre 0,8 y 6,2 μM frente a 5 de los 6 fitopatógenos testados y una hemólisis <26% a 250 μM .

Por otro lado, está descrito que la unión covalente de un antibiótico o un fungicida a una secuencia peptídica es una estrategia útil para conseguir compuestos más efectivos. En base a esto, en el tercer objetivo de esta tesis se planteó la conjugación de **BP100** con el antibiótico estreptomina, y los fungicidas valifenalato y quinoxifeno. Así, se obtuvieron los péptidos **BP493**, **BP523** y **BP524**, resultantes de la incorporación en el extremo N-terminal de **BP100** de una quinolona derivada de quinoxifeno, un derivado de valifenalato y de estreptomina, respectivamente. De estos, **BP524** fue el que presentó un mejor perfil de actividad biológica, con una CMI <6,2 μM frente a las 6 bacterias testadas y una hemólisis del 57% a 50 μM .

En la última parte de esta tesis, se caracterizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) el lipopéptido **BP475**. A partir de esta caracterización, se determinó que cinco aminoácidos del extremo C-terminal de **BP475** pueden adoptar una estructura de hélice α . Por otro parte, en el grupo LIPPSO se habían descrito estrategias de síntesis en fase sólida de derivados de fengicinas y de arilomicina A, pero los compuestos obtenidos no se habían podido caracterizar mediante RMN. En esta tesis se sintetizaron y purificaron seis derivados de fengicinas y un derivado de arilomicina A, y se caracterizaron mediante RMN.

1 Introducció

1.1 Malalties de plantes

Ara fa aproximadament 10.000 anys certes cultures de l'actual zona del Kurdistan, observant els cicles de creixement de les espècies vegetals del seu entorn, van aprendre que si es plantava una llavor aquesta germinaria i acabaria donant fruit. Amb el descobriment de l'agricultura la humanitat va entrar en el període que anomenem neolític. Aquells primers pagesos ja van haver de lluitar contra plagues, és a dir, contra altres organismes del seu entorn, per a l'obtenció de l'aliment que conreaven. Entre aquests organismes s'hi troben des d'insectes fins a rosegadors o ocells; així com també males herbes i microorganismes fitopatògens, com virus, fongs o bacteris. Totes aquestes plagues poden disminuir la producció abans de la collita o un cop els fruits han estat emmagatzemats.

Actualment, es calcula que aproximadament un terç de la producció es perd a causa de les diverses plagues i que al voltant d'un terç d'aquestes pèrdues són provocades per fitopatògens.¹ Concretament, en el cas del conreu de blat, es calcula que es perd un 28% de la producció a causa de les plagues. D'aquestes pèrdues, un 9% són causades per virus, un 27% per males herbes, un 28% per animals i un 36% per l'efecte de fitopatògens. A aquesta problemàtica s'hi afegeix el fet que es preveu que la població mundial continuï augmentant. Segons càlculs de l'Organització de les Nacions Unides, s'estima que l'any 2100 la població arribi als 11.000 milions de persones,² amb la qual cosa, en un futur no tant llunyà, es necessitarà augmentar la producció d'aliments, millorant-ne la producció i la conservació.

La humanitat va entendre ja fa milers d'anys que s'havien de combatre els diferents agents perjudicials de diverses formes, des del simple gest d'arrencar físicament les males herbes fins a l'ús de compostos químics. Concretament, els primers pesticides per intentar combatre aquestes plagues, compostos sulfurats o d'origen vegetal, daten d'entre el 2500 i el 1500 aC a Sumèria i Xina. Tanmateix, va ser a partir del segle XIX que es va començar a desenvolupar el control químic de les malalties que afecten a les plantes. En particular, el 1885 es va començar a utilitzar un dels fungicides més coneguts, la pedra blava o barreja de Bordeus.^{1,3}

Des de llavors, s'han descrit centenars de compostos útils per a la lluita contra els diversos patògens de plantes. Tot i això, actualment a la Unió Europea només estan aprovats 157 compostos pel seu ús en agricultura com a fungicides; 14, com a bactericides; i 11, com a elicitors de les defenses de les plantes.⁴ Alguns d'ells presenten una efectivitat reduïda i certs patògens estan desenvolupant resistències a aquests tractaments. D'altra banda, la Comissió Europea reavalua periòdicament els compostos permesos, desaprovant aquells que generen problemes secundaris, com ara bioacumulació i persistència en el medi, falta de selectivitat danyant altres organismes de l'ecosistema o generació de resistència dels patògens. Així doncs, tot i que hi ha 171 compostos aprovats com a bactericides i antifúngics, cal tenir present que 180 han sigut avaluats i el seu ús no ha sigut aprovat o se li ha retirat l'aprovació. Un exemple seria el quinoxifèn, antifúngic d'ús habitual a l'agricultura europea i mundial. Aquest compost va ser reavaluat per la Comissió Europea, se li va retirar l'aprovació l'octubre de 2018 i va ser retirat del mercat europeu entre el juny de 2019 i el març de 2020 a causa de la seva persistència en el medi.⁴

Per tant, a causa de les pèrdues econòmiques i de productivitat que provoquen els diversos fitopatògens juntament amb la falta de tractaments eficients és necessari desenvolupar alternatives als pesticides actuals. Per aquest motiu, el grup LIPPSO, en col·laboració amb el grup de Patologia Vegetal (CIDSAV), de la UdG, estudia i desenvolupa nous tractaments de control de les malalties causades pels patògens descrits a continuació.

1.1.1 *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora (*Ea*) és un bacteri gramnegatiu considerat com un dels 10 bacteris fitopatògens més importants tant científicament com econòmicament. De fet, és responsable del foc bacterià que és la malaltia més destructiva de les plantes de la família de les rosàcies, que inclou plantes ornamentals o d'interès agrícola com els gerds, les pomeres i les pereres. No només redueix la producció de les plantes d'una temporada, sinó que causa la mort de la planta sencera.⁵ La malaltia va ser descrita per primera vegada el 1817 als Estats Units i des d'allà s'ha escampat a més de 50 països d'arreu del món. Es calcula que el 1999 a Estats Units va causar pèrdues econòmiques de més de 68 milions de dòlars i que aquell mateix any a Itàlia es van perdre aproximadament 500.000 arbres fruiters.⁶⁻⁸

Els primers símptomes s'observen a les flors i en els brots joves que s'enfosqueixen, fins a acabar quedant marrons. A continuació, la malaltia s'escampa ràpidament dels brots joves cap a les branques més grans i madures. A l'inici, les fulles de les zones infectades presenten un enfosquiment del nervi foliar i, en pocs dies, acaben presentant un aspecte completament necròtic semblant a l'efecte d'una cremada (Figura 1 A-H). Finalment, apareixen al llarg de la planta diversos xancre (Figura 1 I-J) i s'observa una caiguda de fulles general que acaba derivant en la mort de la planta.



Figura 1. Símptomes del foc bacterià en diferents hostes. A-B, pomera silvestre; C-E, perera; F-G, arç blanc; H, pomera; I-J, perera.⁸

El millor tractament descrit fins el moment es basa en l'ús d'estreptomicina, oxitetraciclina o kasugamicina durant la floració. Tot i això, s'ha observat l'aparició de soques resistents a l'estreptomicina a Estats Units i Canadà i, d'altra banda, cap d'aquests tres antibiòtics estan aprovats a la Unió Europea. De fet, *E. amylovora* està considerat un organisme de quarantena a la Unió Europea ja que no existeix cap tractament específic efectiu per combatre el foc bacterià. Concretament, les úniques substàncies aprovades per la Comissió Europea pel control d'aquesta malaltia són l'acibenzolar-S-metil, descrit com a activador de defenses de la pròpia planta; la laminarina, un sucre descrit també com a elicitor de defenses; i el vinagre, utilitzat per la neteja i desinfecció de les eines que entren en contacte amb les plantes.⁴

1.1.2 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* (Xav) és un bacteri gramnegatiu causant de la taca bacteriana de les pebroteres i les tomateres. En un estudi realitzat a Macedònia, país situat a una latitud similar a la catalana, Mitrev et. al. varen estimar que la taca bacteriana reduïa la producció de les plantes afectades entre un 10-20%. De tota manera, si es donen les condicions adequades de temperatura i humitat, els danys poden ser extremadament superiors.⁹ Aquesta malaltia va ser identificada per primer cop el 1914 a Sud-àfrica i el 1921 a Indiana, als Estats Units. Actualment, és present en uns 85 països d'arreu dels cinc continents.^{6,10}

El primer símptoma visible és l'aparició de lesions circulars que es necrosen, tornant-se marrons o negres amb un halo cloròtic al voltant (Figura 2). En certes condicions d'alta humitat i clima xafogós, la infecció pot derivar en una defoliació de la planta. Tot això provoca una reducció del creixement i també de la qualitat i quantitat dels fruits.

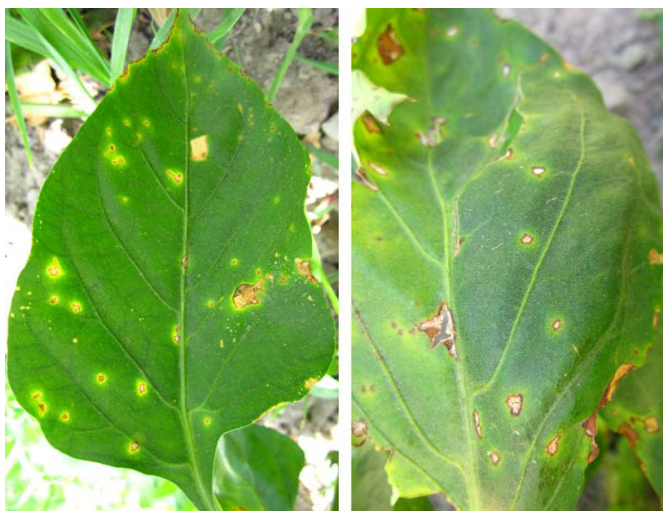


Figura 2. Síntomes de la taca bacteriana causada per *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* en fulles de pebrotera.¹⁰

El tractament més habitual per combatre la taca bacteriana és l'ús d'estreptomicina o de compostos cúprics, com l'hidròxid o el sulfat de coure. Tanmateix, l'estreptomicina no està permesa a la Unió Europea. De fet, el 1985 es van trobar soques resistents a Mèxic, a principis

dels 90 a Estats Units i a Barbados, i el 2007 a Turquia. Així doncs, l'ús de compostos cúprics constitueix l'únic tractament aprovat per combatre la infecció. A més, el vinagre s'utilitza de forma preventiva per netejar les eines de poda.¹¹

1.1.3 *Xanthomonas fragariae*

Xanthomonas fragariae (Xf) és també un bacteri del gènere *Xanthomonas*, causant de la taca angular de les fulles de maduixeres. Aquesta malaltia va ser detectada per primer cop el 1959 a plantacions comercials de Minnesota, a Estats Units, des d'on s'ha escampat a més de 20 països, principalment d'Amèrica i Europa, a través del transport internacional de plançons de maduixera i d'altre material vegetal.^{6,12}

Actualment, no es coneix cap control químic efectiu enfront *X. fragariae*. Tot i que alguns compostos de coure mostren certa efectivitat, es requereix una concentració i una freqüència d'aplicació que poden causar fitotoxicitat.¹³ Així doncs, *X. fragariae* està considerat un bacteri de quarantena i l'única solució és un estricte control del comerç de material vegetal potencialment afectat. Tot i que la malaltia generalment no és mortal per la planta, provoca una reducció de la qualitat i de la quantitat de fruita produïda. A més, la indústria estatunidenca de vivers de maduixeres calcula que aquest estricte control comporta una pèrdua anual d'entre 700.000 i 1.100.000 de dòlars.¹⁴

Els primers símptomes de la infecció consisteixen en l'aparició de ferides angulars impregnades d'aigua i translúcides al revers de la fulla (Figura 3 A-B). Al cap de dues setmanes apareixen taques irregulars marró vermelloses a l'anvers de la fulla (Figura 3 C), principalment en els nervis principals i secundaris (Figura 3 D), que pot continuar amb un ennegriment dels sèpals, la podridura de les tiges i la mort de la planta.^{12,13}

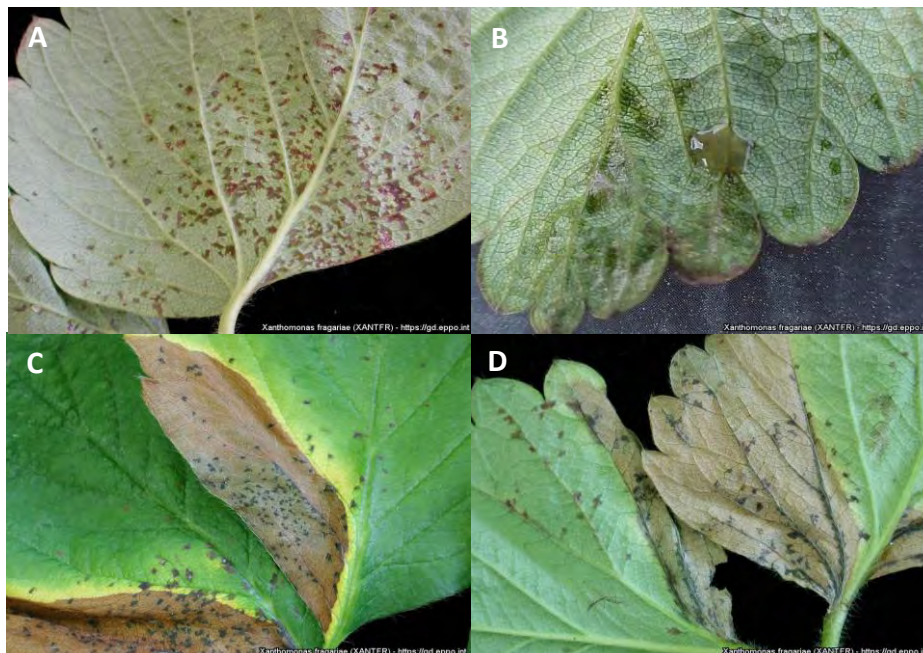


Figura 3. Síntomes de la taca angular de les fulles de la maduixera causada per *X. fragariae*. A-B, símptomes inicials al revers de les fulles; C, símptomes del progrés de la malaltia per l'anvers de la fulla; D, progressió de la malaltia en els nervis de la fulla.⁶

1.1.4 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

La taca bacteriana dels fruiters de pinyol, causada per *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), va ser descrita per primer cop el 1903 a Michigan, els Estats Units, en plantacions de pruneres japoneses, presseguers i nectarines. Actualment, però, es troba present en més de 35 països d'arreu del món i és una de les malalties més importants dels arbres fruiters del gènere *Prunus*, com ara presseguers, pruneres, ametllers, cirerers o albercoquers. Tot i que normalment no és mortal, causa una important reducció de la productivitat dels arbres, alhora que redueix la qualitat i la comercialització del fruit, incrementant el cost de producció.^{6,15}

En els albercoquers, cireres, ametllers i presseguers els símptomes són unes taques petites, pàl·lides i irregulars al revers de la fulla, i unes taques evidents i fosques, amb el borl grogós a l'anvers (Figura 4 A). A més, en alguns casos, les taques poden evolucionar formant perforacions. D'altra banda, a la superfície del fruit s'observen unes taques petites de color marró, sovint acompanyades d'un halo cloròtic (Figura 4 B). També es desenvolupen xancres lleugerament foscos impregnats de líquid a les branques.¹⁶

A les fulles de les pruneres apareixen unes lesions angulars impregnades de líquid (Figura 4 C) que ràpidament adquireixen un color marró vermellós i, sovint, amb perforació necròtica. En els fruits apareixen grans taques negres a la pell (Figura 4 D). En el cas dels cirerers, els fruits poden arribar a desenvolupar-se de forma distorsionada.¹⁶

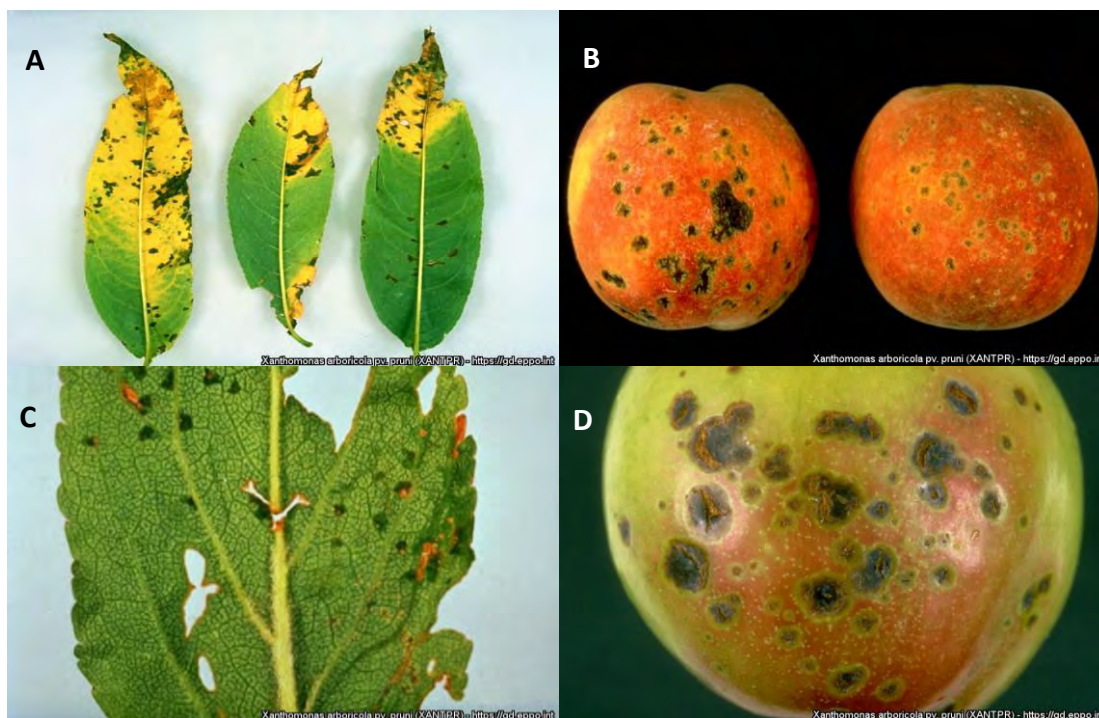


Figura 4. Síntomes d'infecció de *X. arboricola* pv. *pruni* en pruneres i presseguers. A, fulles de presseguer amb nombroses taques i amb un halo groc al voltant; B, símptomes en préssecs; C, fulla de prunera amb lesions angulars impregnades de líquid; D, taques bacterianes en una pruna.⁶

Actualment, no existeix cap tractament efectiu aprovat a la Unió Europea, sent un bacteri declarat de quarantena. En les àrees infectades el tractament es limita a aplicacions preventives de compostos de coure quan el bacteri es troba en estadi latent o a l'inici de l'etapa de creixement. Aquests compostos, però, presenten una eficàcia moderada, una certa fitotoxicitat i existeix el risc que el bacteri generi resistència.¹⁵

1.1.5 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*Pss*) és un ampli i heterogeni patovar del bacteri gramnegatiu *Pseudomonas syringae*. Aquest bacteri ocupa la primera posició del rànquing dels 10 bacteris fitopatògens més importants segons l'impacte econòmic que causen.⁵

P. syringae pv. *syringae* es troba present a tots 5 continents i afecta a més de 200 espècies vegetals,^{17,18} incloent plantes ornamentals d'interior, com el filodendre;¹⁹ cereals, com el blat o l'ordi;²⁰ herbàcies, com la userda;¹⁸ cucurbitàcies, com la xíndria, el meló o el carbassó;²¹ lleguminoses, com els pèsols;¹⁷ la vinya;²² i arbres fruiters, com la pomera, el presseguer, el cirerer, la perera, el mango o la figuera.^{19,23}

P. syringae pv. *syringae* causa pèrdues econòmiques anuals molt grans en els diversos cultius sobretot perquè redueix considerablement la producció de la planta. Es calcula, per exemple, que en el cas dels pèsols aquesta reducció és d'un 75%,¹⁷ d'un 50% en la userda¹⁸ o d'un 30% en les cucurbitàcies.²¹

P. syringae pv. *syringae* produeix una gran disparitat de símptomes en els diversos hostes. Tanmateix, de forma general s'observen ferides necròtiques a les fulles, els fruits, els brots joves o en altres parts de la planta, podent causar, en casos severs, la seva mort.

Aquesta activitat necròtica és causada, en part, pels lipodepsipèptids cíclics siringomicina A, E i G, essent el més comú el derivat E. Aquests pèptids contenen un cycle de nou aminoàcids que presenta un enllaç ester entre l'hidroxil de la cadena lateral d'una Ser i el grup àcid carboxílic d'una 4-clorotreonina. Les diferents siringomicines es diferencien per la llargada del grup 3-hidroxiacil de l'extrem N-terminal, essent de 10, 12 o 14 carbonis per la siringomicina A, E i G, respectivament (Figura 5).^{24,25}

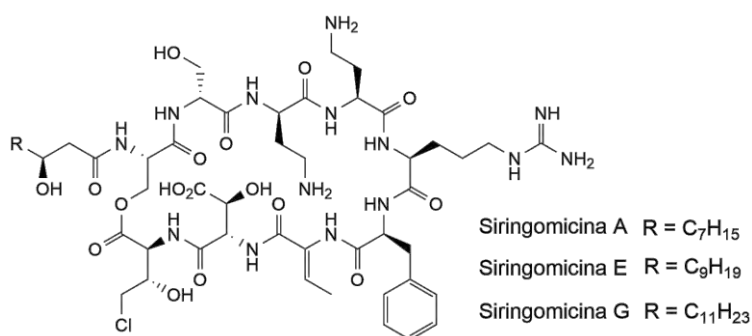


Figura 5. Siringomicines A, E i G.

1.1.6 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) és un altre patovar del bacteri gramnegatiu *Pseudomonas syringae* i és el causant del xancre bacterià del kiwi, considerada la malaltia més greu i destructiva que afecta aquest cultiu. De fet, es calcula que provoca una greu pèrdua de productivitat amb una reducció d'aproximadament dos terços respecte a cultius no infectats. Es va identificar per primera vegada al Japó el 1984 i, actualment, es troba en més de 15 països d'Amèrica del Sud, Àsia, Oceania i Europa.^{6,26,27}

Les actinídies infectades per *P. syringae* pv. *actinidiae* presenten xancre a les branques i tronc que, principalment a la primavera, expulsen un líquid blanc o rogenc fosc (Figura 6 A-C). A més, les lenticel·les de les branques infectades solen ser pronunciades. Les fulles presenten lesions angulars humides que deriven a punts necròtics foscos amb un halo cloròtic al voltant (Figura 6 D). Els brots joves i les flors s'enfosqueixen, necrosen i acaben caient. Per últim, els fruits poden caure abans d'hora a causa del pansiment de les branques, generant fruits immadurs i impossibles de comercialitzar. En casos greus pot acabar provocant la mort completa de la planta.^{27,28}

Actualment, les estratègies de control es limiten a mesures preventives que passen per la desinfecció de l'equipament que entra en contacte amb les plantes, el control en els vivers i la destrucció de la matèria vegetal infectada. A Japó es va intentar el control químic mitjançant l'ús d'antibiòtics i de compostos cuprats, però el seu ús ha donat lloc a l'aparició de soques resistents.²⁹

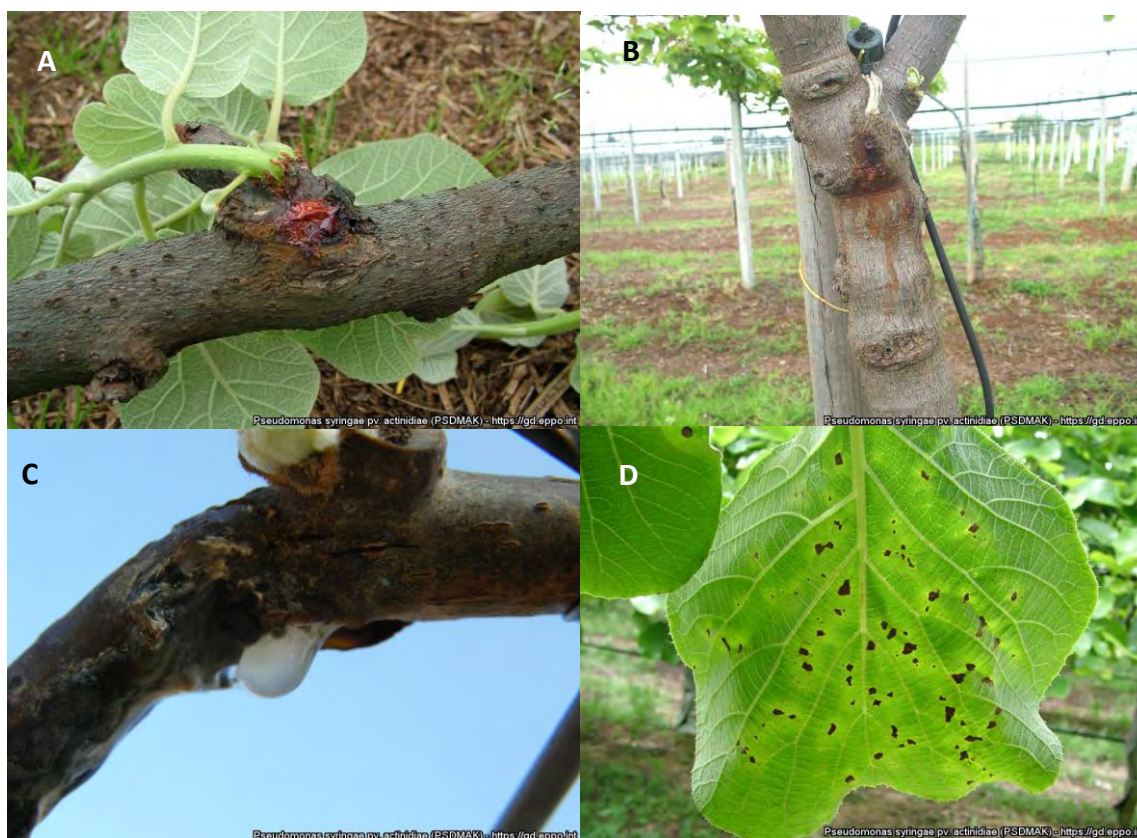


Figura 6. Síntomes del xancre bacterià del kiwi causat per *P. syringae* pv. *actinidiae*. A, exsudat vermell en un brot jove; B, xancre amb exsudat vermell en un tronc; C, exsudat blanc en una branca; D, taques necròtiques en una fulla.⁶

1.1.7 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum (Fo) és un complex de més de 120 *formae speciales* que causen pansiment i podridura fusariana en més de 100 hostes diferents: lleguminoses, com les mongeteres o cigroneres; cucurbitàcies, com les meloneres; palmeres datileres o d'oli; tomateres; plataners o cotoners. *F. oxysporum* fins i tot pot infectar mamífers, com ara els humans, en casos d'immunodeficiència. Per això, *F. oxysporum* és considerat un dels 10 fitopatògens fúngics més importants del món.^{30,31}

F. oxysporum es troba present en el sòl en forma d'espores dorments des d'on infecta les arrels de la planta i colonitza el seu sistema vascular provocant-ne l'enfosquiment (Figura 7 A), epinàstia (encorbament de les fulles), reducció del creixement de la planta, engrogiment del revers de la fulla, pansiment progressiu de les fulles (Figura 7 B) i les tiges i, finalment, defoliació i mort de l'hoste. Aquestes conseqüències provoquen greus pèrdues econòmiques en tot el món.^{30,32}

Actualment, existeixen diversos compostos antifúngics aprovats a la Unió Europea per combatre la infecció amb *F. oxysporum* de cultius de cereals, com el blat o la civada, tant en camp com en el tractament i esterilització de les llavors. Tot i això, la seva eficàcia és qüestionable i el control es fa majoritàriament mitjançant l'ús de varietats de plantes resistents o mitjançant l'esterilització del sòl en el cas dels hivernacles.^{4,30}



Figura 7. Síntomes de malalties causades per *F. oxysporum* en plantes d'enciam. A, símptomes en el sistema vascular de l'enciam; B, fulles d'enciam pansides.⁶

1.1.8 *Penicillium expansum*

Penicillium expansum (Pe) és el fong responsable de la floridura blava en la fruita un cop collida, causant pèrdues en l'emmagatzemament de pomes, peres, kiwis, nectarines, préssecs, cireres, albercocs, prunes, maduixes i mores, entre altres. Concretament, es calcula que a Estats Units es perden anualment 4,4 milions de dòlars en pomes, sent el patogen més perjudicial per aquesta fruita un cop collides.^{33,34}

P. expansum actua secretant un conjunt d'àcids orgànics, principalment àcid D-glucònic, que afavoreixen la degradació enzimàtica de les parets cel·lulars del fruit, provocant la seva podridura (Figura 8). A més, *P. expansum* també secreta patulina, una micotoxina tòxica pels humans i altres espècies animals, amb efectes teratogènics, carcinogènics i immunotòxics. Tot i això, la patulina

es troba en concentracions baixes en la zona que no està visiblement afectada per la floridura, amb la qual cosa, eliminant la zona afectada, s'elimina la contaminació.^{34,35}

A la UE s'han aprovat dos fungicides per combatre *P. expansum*, l'imazalil i el tiabendazole. També s'utilitza bicarbonat de sodi per desinfectar la fruita abans de ser emmagatzemada. Tanmateix, l'eficàcia d'aquest darrer és limitada i, d'altra banda, s'han descrit resistències per part de *P. expansum* als fungicides anteriors.^{4,35}



Figura 8. Síntomes de *P. expansum* en una poma.³⁶

1.2 Pèptids antimicrobians

1.2.1 Interès i estructura dels pèptids antimicrobians

La manca de tractaments no contaminants i efectius per al control de malalties de plantes ha motivat la recerca de nous compostos. Els pèptids antimicrobians (AMPs) són una de les alternatives que es troben sobre la taula i que en aquests últims anys està agafant força tal com queda palès a partir de l'augment significatiu del número d'articles científics publicats en aquest camp els darrers anys (Figura 9).³⁷

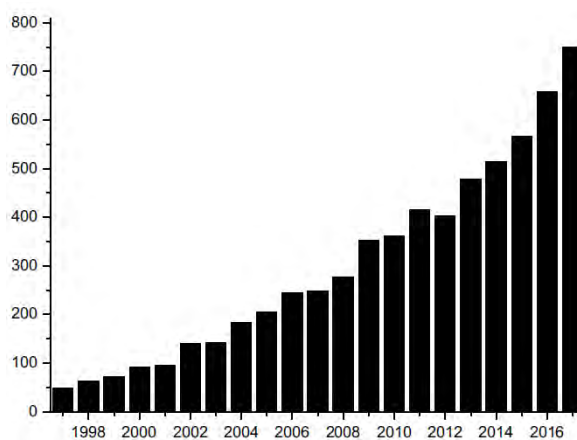


Figura 9. Articles científics publicats entre el 1997 i el 2017 sobre pèptids antimicrobians.³⁸

Durant la segona meitat del segle XIX ja es va descriure que els fluids corporals d'animals presentaven propietats antimicrobianes, però el primer pèptid antimicrobià, la nisina, no va ser aïllat i caracteritzat fins el 1947. La nisina és un pèptid policíclic de 34 aminoàcids que conté diversos aminoàcids no ribosomals com la lantionina, la metil-lantionina, la dehidroalanina i l'àcid dehidroaminobutíric (Figura 10). És activa contra bacteris grampositius amb concentracions mínimes inhibidores (CMI) nanomolars de manera que, encara avui en dia, s'utilitza en la indústria alimentària.³⁹

De forma general, els AMPs són pèptids relativament petits de fins a uns 50 aminoàcids. Solen presentar una càrrega neta positiva i una proporció d'aproximadament un 50% de residus hidrofòbics. Aquesta definició engloba milers de compostos diferents tant naturals com sintètics. Els AMPs naturals són un element clau en els mecanismes de defensa de diferents organismes vius de tots els regnes (bacteris, arqueus, plantes, animals, fongs i protists).^{37,40} De fet, bases de dades com "The antimicrobial peptide database"⁴¹ inclouen més de 3.000 pèptids.

La naturalesa catiònica dels AMPs, amb una càrrega neta compresa normalment entre +2 i +13, és deguda a la presència a la seqüència de residus de Lys, Arg i, en menor proporció, d'His. D'altra banda, el caràcter hidrofòbic deriva de la presència de residus de Val, Leu, Ile, Ala, Met o Phe. La naturalesa catiònica i la presència de residus hidrofòbics, conjuntament amb una estructura secundària concreta, afavoreix que molts AMPs siguin amfipàtics, és a dir, que presentin dos dominis diferenciats, un polar i un altre apolar.

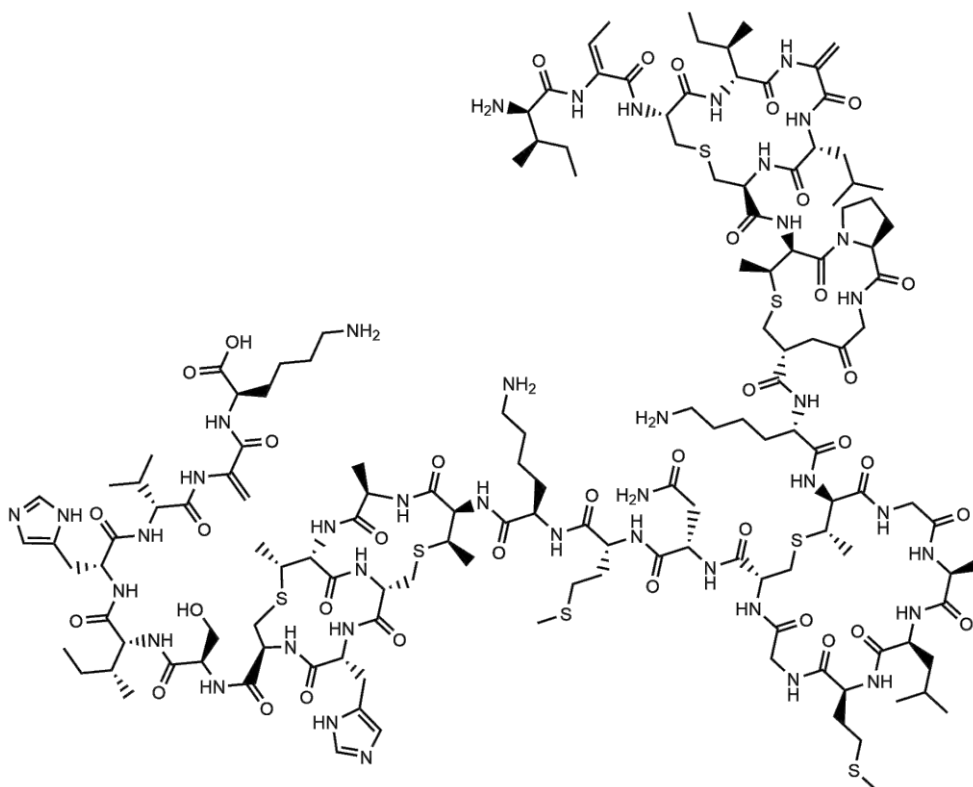


Figura 10. Estructura de la nisina, primer pèptid antimicrobià identificat i caracteritzat.

Els AMPs es poden classificar segons l'estructura secundària que presenten: hèlix α , làmina β o desestructurats (Taula 1). Els pèptids amb una estructura d'hèlix α són els més abundants i els més estudiats. Molts d'ells s'han aïllat d'insectes, com són les cecropines o la melitina; o d'amfibis, com la magainina-2. Tot i això, també se'n troben en mamífers, com seria el cas del pèptid **LL-37** en humans. Molts d'aquests pèptids no presenten aquesta estructura en solució aquosa, però adopten la conformació d'hèlix α quan estan en contacte amb les membranes biològiques.^{39,42-44}

D'altra banda, els pèptids que presenten una estructura de làmina β solen contenir residus de Cys formant enllaços disulfur que estableixen aquesta estructura. Alguns exemples de pèptids que presenten fragments amb estructura làmina β són la protegrina-1, aïllada de leucòcits porcins, o la gomesina, aïllada d'aràcnids com les taràntules.^{39,42,43,45}

Per últim, els pèptids desestructurats no presenten una conformació determinada i solen contenir una gran proporció de residus d'Arg, Pro o Trp. La indolicidina, present en bovins, o la crotalidina(15-34), aïllada del verí d'algunes espècies de serp en són alguns exemples.^{39,42,43,46}

Taula 1. Classes de pèptids antimicrobians en base a la seva estructura.

Estructura	Pèptid	Seqüència	Origen	Ref.
Hèlix α	Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂	Insectes	39
	Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	Abelles	39
	Magainina-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Amfibis	39,42
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH ₂	Humans	42,43
Làmina β	Protegrina-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR 	Porcs	42,43
	Gomesina	ZCRRLCYKQRCVTCRGR 	Aranyes	45,47
Desestructurada	Indolicidina	ILPWKWPWWPWRN-NH ₂	Bovins	39,42,43
	Crotalidina(15-34)	RFKFFKVKKSVKRLKKIFKKPMVIGVTI	Serps	39,46

1.2.2 Mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians enfront bacteris

Tot i que el mecanisme d'acció dels AMPs no és del tot conegut, s'ha determinat que la majoria d'aquests pèptids provoquen la disrupció de la membrana bacteriana. Ara bé, també s'ha descrit que alguns, com la nisina, actuen en receptors específics amb un mecanisme similar al dels antibiòtics tradicionals.^{37,39,48-50}

Degut a la seva cationicitat, els AMPs interaccionen electrostàticament amb la membrana bacteriana, que presenta càrrega negativa. Després d'aquesta interacció i quan el pèptid assoleix una certa concentració sobre la membrana, té lloc la seva disrupció. S'han proposat tres models mecànics per explicar aquesta disrupció: el *barrel-stave*, el *toroidal pore* i el *carpet* (Figura 11).^{37,39,44,51}

En el model *barrel-stave*, els pèptids, després d'interaccionar amb la membrana, s'introdueixen perpendicularment en la bicapa formant porus transmembrana. Els pèptids es col·loquen en el porus amb la cara hidrofòbica en contacte amb els fosfolípids i amb la cara hidrofílica catiònica a la part interior (Figura 11 A).

En canvi, en el model *toroidal-pore* els pèptids s'insereixen perpendicularment en la bicapa lipídica amb la cara polar hidrofílica a la part exterior, en contacte amb els grups fosfats dels fosfolípids. Aquesta inserció resulta en una reordenació dels fosfolípids i en la curvatura de la membrana (Figura 11 B).

Finalment, en el model *carpet* els pèptids s'acumulen en la superfície exterior de la bicapa provocant tensions que acaben en la seva disrupció i en la formació de micel·les amb un efecte de tipus detergent (Figura 11 C).

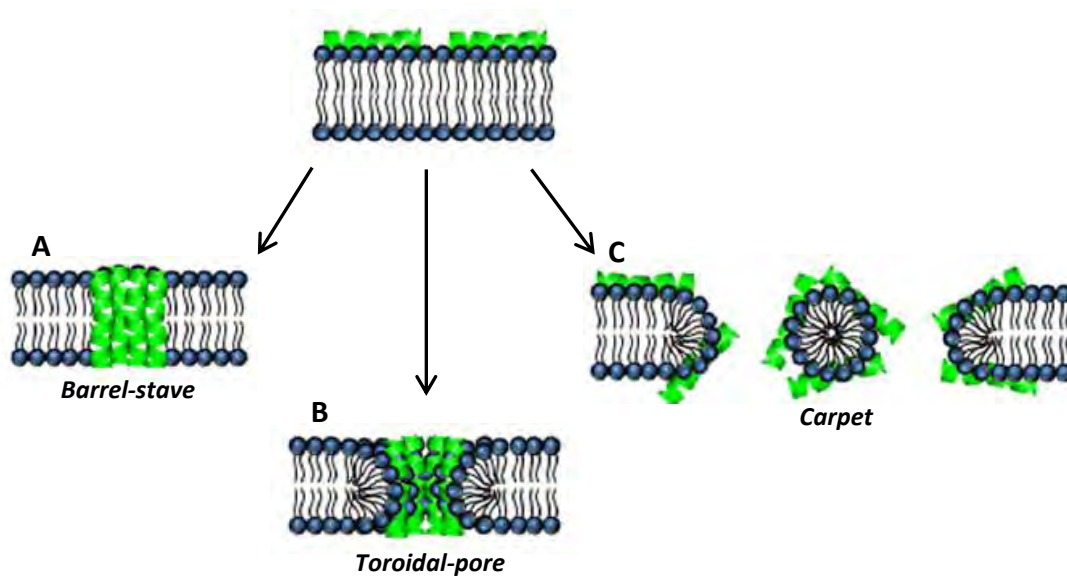


Figura 11. Models mecànics de disrupció de la membrana bacteriana pels pèptids antimicrobians.³⁷

1.2.2.1 Resistència bacteriana enfront els pèptids antimicrobians

La generació de resistència bacteriana enfront els antibiòtics és un dels problemes més greus d'avui en dia. Amb el pas dels anys, centenars de productes actius enfront bacteris han perdut la seva eficàcia a causa de l'evolució d'aquests microorganismes.

Durant molts anys s'ha considerat que el mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians dificulta l'aparició de resistència bacteriana ja que això suposaria un canvi en l'estructura de la membrana,

cosa que és difícil. Ara bé, estudis recents indiquen que els bacteris sí que poden desenvolupar resistència a l'acció dels AMPs.^{37,40,50,52}

Concretament, els bacteris poden desenvolupar dos tipus de resistència als AMPs: intrínseca o induïda. La resistència intrínseca, o passiva, fa referència a propietats que adquireix el bacteri independentment de la presència d'AMPs. D'altra banda, la resistència induïda, o adaptativa, és resultat d'una resposta del bacteri als efectes dels AMPs.^{40,50}

La resistència intrínseca inclou principalment canvis en la càrrega neta del bacteri. Per exemple, s'ha descrit que l'activació de l'operó *dlt* en el bacteri grampositiu *Staphylococcus aureus* provoca una reducció de la càrrega neta negativa de la paret cel·lular de *S. aureus*. D'igual forma, també s'han descrit canvis en la composició lipídica i de lipopolisacàrids en la paret cel·lular de bacteris gramnegatius que condueixen a una reducció de la càrrega neta negativa. Aquests canvis en la paret cel·lular provoquen una disminució de l'afinitat dels pèptids antimicrobians catiònics pels bacteris.^{50,53}

La resistència induïda inclou diverses estratègies com el transport de proteases i peptidases del citoplasma a l'espai extracel·lular per degradar els AMPs; l'activació de bombes per expulsar els pèptids que actuen de forma intracel·lular; o la modificació de dianes específiques. Per exemple, s'ha observat com *S. aureus* és capaç de degradar el pèptid LL-37 mitjançant l'ús de la proteïna aureolisina.⁵⁰

1.2.3 Mecanisme d'acció dels pèptids antimicrobians enfront fongs

Els estudis mecanístics dels AMPs s'han centrat principalment en la seva activitat enfront els bacteris. En canvi, el seu mecanisme enfront els fongs ha estat menys estudiat. Tot i això, en general, es creu que aquest mecanisme és molt més complex, ja que generalment implica la penetració del pèptid al citoplasma del fong i la seva interacció amb dianes específiques internes o la generació d'espècies reactives d'oxigen (Taula 2).^{54,55}

Així, per exemple, el pèptid **NaD1**, aïllat de la planta ornamental de tabac *Nicotiana glauca*, o la histatina 5, localitzada en la saliva humana, s'ancoren inicialment a la paret del fong, a continuació s'internalitzen mitjançant endocitosi, i provoquen la mort del fong a causa de la producció d'espècies reactives d'oxigen i de la permeabilització de la membrana fúngica.⁵⁶ En canvi, estudis amb el dodecapèptid **Sub 5** o la indolicidina indiquen que hi ha una relació directa entre l'activitat antifúngica i la capacitat d'internalització del pèptid a través de la membrana, i que interactuen amb dianes específiques internes, com ara enzims dependents d'ATP.⁵⁵ En canvi, altres pèptids com la cecropina A o el **LL-37** no sembla que interaccionin amb cap diana específica, sinó que actuen a nivell de la membrana cel·lular provocant-ne la disrupció.⁵⁴

Taula 2. Classes de pèptids antifúngics segons el seu mecanisme d'acció.

Mecanisme d'acció	Pèptid	Seqüència	Origen	Ref.
Producció d'espècies reactives d'oxigen	NaD1	RECKTESNTFPGICITKPPCRKACISEKFTDGHCSKILRRCLCTKPC	<i>Nicotiana alata</i>	56
	Histatina 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY	Humà	
Dianes específiques internes	Sub 5	RRWKIVVIRWRR	Sintètic	55
	Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	Boví	
Disrupció de la membrana	Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂	Insecte	54
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH ₂	Humà	

1.2.4 Selectivitat dels pèptids antimicrobians

La selectivitat dels pèptids antimicrobians ve donada per les diferències estructurals existents entre la membrana bacteriana, la membrana animal i la paret cel·lular dels fongs. D'una banda, la membrana bacteriana està formada, entre altres compostos, per una bicapa de fosfolípids amb els grups fosfat aniònics a la part externa, de manera que presenta una càrrega neta negativa (Figura 12 A). D'altra banda, la membrana animal, com ara la dels mamífers, està composta d'una bicapa de fosfolípids en la qual s'embeuen molècules de colesterol. A més els fosfolípids de la part externa de la membrana tenen caràcter zwitteriònic, amb la qual cosa aquesta membrana presenta una càrrega neta neutra (Figura 12 B). Per últim, els fongs tenen una membrana plasmàtica formada per una bicapa de fosfolípids que conté esterols i que està envoltada per una paret de polisacàrids, com β -glucans i quitina, i de proteïnes glicosilades amb residus de carbohidrats aniònics (Figura 12 C).^{39,54,57-59}

La diferència de càrrega entre la membrana de les cèl·lules animals (neutra) i la dels bacteris i fongs (aniònica) explica la selectivitat dels AMPs. Aquests pèptids catiònics són atrets electrostàticament per la membrana bacteriana i fúngica, però no tant per la membrana cel·lular dels animals. La diferent composició de les membranes cel·lulars també explica la utilitat dels AMPs com a compostos antitumorals, ja que la membrana de les cèl·lules cancerígenes sol presentar una càrrega negativa neta superior a la de les cèl·lules no tumorals.³⁹

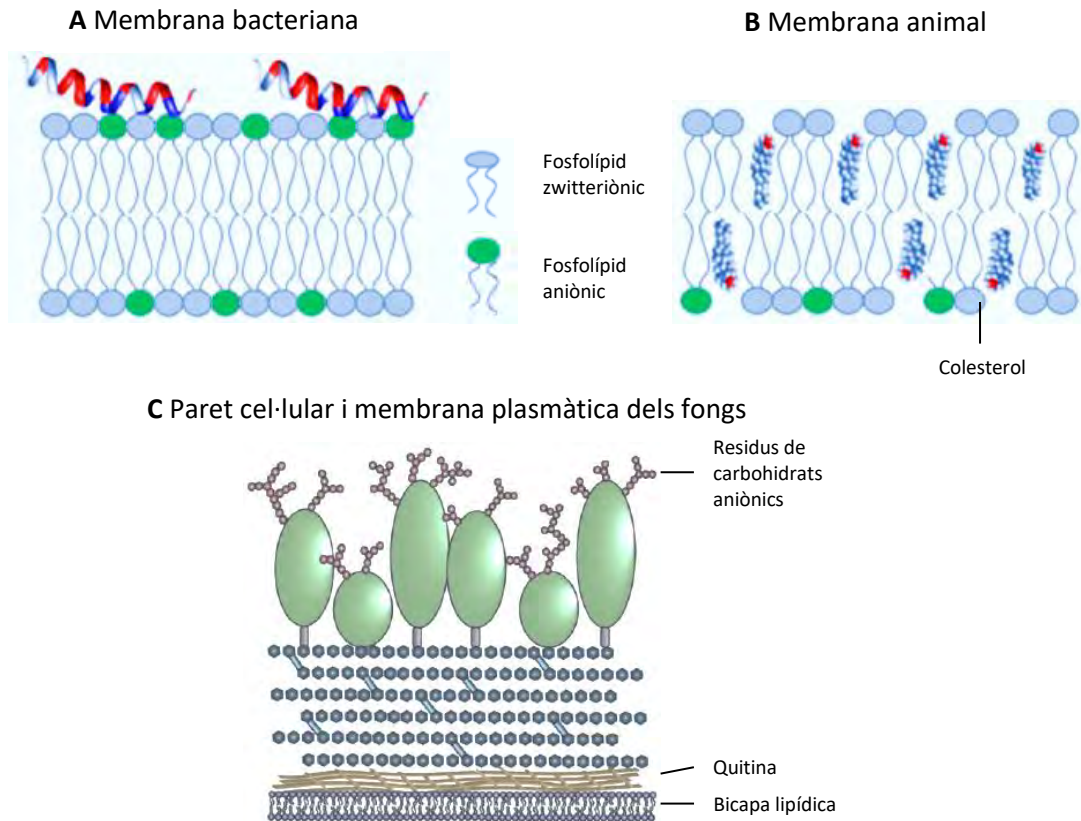


Figura 12. Representació esquemàtica de les diferències estructurals entre: A, membrana bacteriana; B, membrana animal; C, paret cel·lular i membrana plasmàtica dels fongs.^{39,54}

1.3 Estratègies per a la identificació i la millora de pèptids antimicrobians

Les estratègies per a la identificació de pèptids actius es basen en la modificació de seqüències naturals o bé en el disseny *de novo* utilitzant eines bioinformàtiques.^{39,51,57} En aquest últim cas, les característiques comunes dels AMPs naturals (càrrega neta positiva, amfipaticitat i estructura secundària) són el punt de partida del disseny de nous pèptids. Així, la combinació d'un nombre determinat de residus catiónics (Arg, Lys o His), per facilitar la interacció electrostàtica amb la membrana bacteriana, i de residus hidrofòbics (Ala, Val, Leu, Phe, Tyr o Trp), per afavorir la inserció a la membrana bacteriana, constitueix una de les aproximacions més emprades.^{51,57}

Un cop s'ha identificat una seqüència amb un perfil biològic prometedora, les estratègies per obtenir derivats més actius, menys tòxics i més estables són molt diverses. Aquestes estratègies poden incloure la truncació de la seqüència, la modificació de l'extrem C- o N-terminal o de l'esquelet, la síntesi de pèptids multimèrics, la conjugació amb pèptids o compostos no peptídics, la ciclació o la incorporació d'aminoàcids no proteïnogènics, entre d'altres.^{39,51,57}

1.3.1 Truncació de la seqüència peptídica

Els pèptids naturals generalment presenten seqüències relativament llargues, amb la qual cosa una estratègia útil per l'obtenció de nous pèptids és la truncació de la seqüència. D'aquesta manera es poden identificar seqüències més actives, més curtes i, per tant, més barates i fàcils de produir. L'eliminació de fragments de la seqüència no implicats en l'activitat antimicrobiana pot suposar, a més, una reducció de la toxicitat i de la susceptibilitat a la degradació per proteases.⁵¹ Així, per exemple, la truncació de la catelicidina humana **LL-37**, tant per l'extrem C- com N-terminal, va mostrar que el fragment corresponent als residus 13-31 constituïa el domini mínim necessari per mantenir l'activitat bactericida (Taula 3).⁶⁰

Aquesta estratègia, però, no només es pot aplicar a la truncació de pèptids naturals, sinó que també s'aplica a pèptids sintètics. Així, Kwon *et al.* van dissenyar anàlegs a **P5**, un pèptid híbrid de cecropina A i magainina 2, per truncació tant de l'extrem N- com C-terminal. En tots els casos es va observar una reducció de l'activitat hemolítica dels pèptids, i alguns fragments varen mantenir l'activitat (Taula 3).⁶¹

Taula 3. Truncació dels pèptids LL-37 i P5: efecte sobre l'activitat antimicrobiana i l'hemòlisi.

Pèptid	Fragment	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a	Activitat hemolítica ^a	Ref.
LL-37		LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES			
LL-31	1-31	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL	≈	-	
RK-25	7-31	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL	≈	-	60
IG-19	13-31	IGKEFKRIVQRIKDFLRNL	≈	-	
RK-13	13-25	IGKEFKRIVQRIK	X	-	
P5		KWKLLKPLLKLLKLL			
P5-CT1	1-16	KWKLLKPLLKLLKLL	≈	✓✓	
P5-CT2	1-14	KWKLLKPLLKLL	X	✓✓	61
P5-NT1	3-18	KLLKPLLKLLKLL	≈	✓✓	
P5-NT2	5-18	LKKPLLKLLKLL	X	✓✓	

^a Els símbols ≈, ✓ i X indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

1.3.2 Modificació de l'extrem C- o N-terminal

L'acetilació de l'extrem N-terminal i l'amidació del C-terminal constitueixen estratègies per millorar l'estabilitat enfront proteases. Aquest efecte, però, pot dependre de diversos factors com ara la seqüència peptídica inicial, la hidrofobicitat i la proteasa que s'utilitza. Tanmateix, l'acilació de l'extrem N-terminal provoca un canvi en la càrrega neta del pèptid i, en alguns casos, pot anar acompanyada d'una disminució de l'activitat antimicrobiana del pèptid.^{39,51}

Així, s'ha descrit que l'amidació de l'extrem C-terminal dels pèptids **Lfc1** (RRWQWR) i **Com1** (RRWWRF) no modifica significativament la seva estabilitat enfront la degradació enzimàtica, però millora lleugerament l'activitat antimicrobiana. En canvi, l'acetilació d'aquests pèptids comporta una pèrdua d'activitat i una millora de l'estabilitat. La combinació de les dues estratègies dona lloc a seqüències més actives i més estables enfront proteases (Taula 4).⁶²

En un altre exemple, Svenson *et al.* van estudiar l'efecte de la modificació de l'extrem C-terminal amb amides secundàries i terciàries voluminoses. Es varen aconseguir seqüències amb una major estabilitat enfront proteases (Taula 4).⁶³

A part de l'acetilació, també s'ha descrit la modificació de l'extrem N-terminal d'un pèptid per incorporació d'una cadena d'àcid gras, donant lloc a lipopèptids amb una activitat biològica remarcable (veure secció 1.4).

Taula 4. Modificació de l'extrem N- i C-terminal dels pèptids.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a	Estabilitat ^a	Ref.
Lfc1	RRWQWR			
Lfc2	RRWQWR-NH ₂	✓	≈	62
Lfc3	Ac-RRWQWR	XX	✓	
Lfc4	Ac-RRWQWR-NH ₂	✓	✓✓	
Com1	RRWWRF			
Com2	RRWWRF-NH ₂	✓	≈	62
Com3	Ac-RRWWRF	X	✓	
Com4	Ac-RRWWRF-NH ₂	✓	✓✓	
CAP2	RF(4-Ph)R-NHBn			
CAP12	RF(4-Ph)R-NHCH ₂ CH ₂ Ph	✓	✓	63
CAP13	RF(4-Ph)R-NMeBn	X	✓✓	
CAP15	RF(4-Ph)R-NBn ₂	✓	✓✓	

^a Els símbols ≈, ✓ i X indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

1.3.3 Modificacions a l'esquelet

Una altra estratègia per millorar l'activitat biològica d'un pèptid consisteix en la incorporació d'un β-aminoàcid o d'una N-alquilglicina (Figura 13). La incorporació de monòmers d'aquest tipus provoca canvis en l'estructura secundària del pèptid i una disminució de la degradació enzimàtica, i pot afectar a les activitats antimicrobiana i hemolítica.^{51,64}

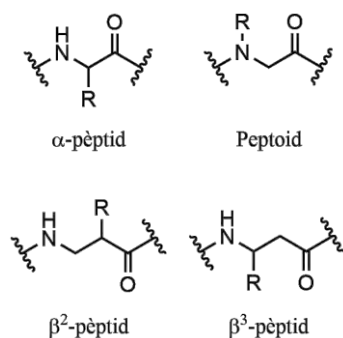


Figura 13. Tipus de modificacions que s'incorporen a l'esquelet d'un pèptid.

Per exemple, s'observa que la incorporació de β -aminoàcids a l'estructura del pèptid GLFKIIKKIAKSF-NH₂, un derivat de l'aureïna 1.2 (GLFDIIKIAESF-NH₂), condueix a seqüències més actives enfront *Candida albicans* i amb una menor activitat hemolítica.⁶⁵ De forma similar, Rikeshwer *et al.* van introduir β -aminoàcids a l'AMP A-12, obtenint el pèptid β A-12, que, tot i que presenta menor activitat antimicrobiana, és més resistent a tripsina i a proteïnasa K i menys hemolític (Taula 5).⁶⁶

Taula 5. Pèptids que incorporen β -aminoàcids a la seqüència. Els símbols \approx , ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

Pèptid	Seqüència ^a	Activitat antimicrobiana ^b	Activitat hemolítica ^b	Ref.
Derivat de l'aureïna 1.2	GLFKIIKKIAKSF-NH ₂			65
	GLFKIIKKIAKSF-NH ₂	✓	✗✗	
	GLFKIIKKIAKSE-NH ₂	✓	≈	
A-12	KWLKWLKWLKK-NH ₂			66
β A-12	KWLKWLKWLKK-NH ₂	✗✗	✓✓	

^a Els aminoàcids subratllats indiquen un β^3 -aminoàcid.

^b Els símbols \approx , ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

D'altra banda, s'ha descrit que el peptoid SPO (Figura 14), anàleg del pèptid antimicrobià IOWAGOLFOLFO-NH₂ (SA4) presenta una activitat antimicrobiana similar a SA4, una millor estabilitat enfront proteases i una millor activitat antibiofilm.⁶⁷

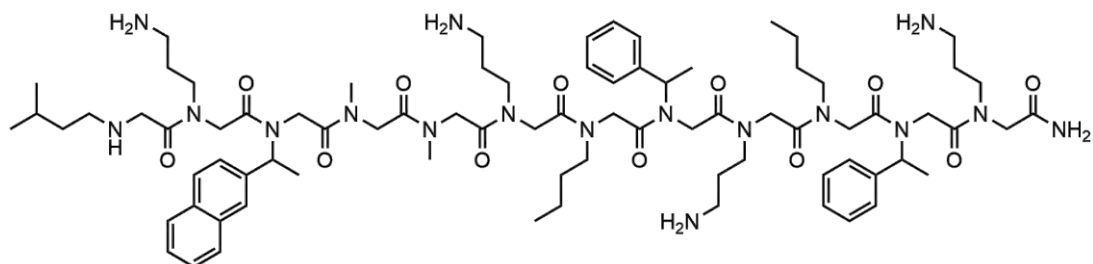


Figura 14. Estructura del peptoid SPO.

1.3.4 Síntesi de pèptids multimèrics

Els pèptids multimèrics són compostos que s'obtenen per unió de diverses seqüències peptídiques a un nucli. La preparació de pèptids multimèrics és una estratègia per millorar tant l'estabilitat del pèptid enfront a la degradació enzimàtica com l'activitat antimicrobiana. Aquest augment de l'activitat antimicrobiana es sol atribuir a l'augment de la concentració local dels fragments bioactius. Els primers pèptids multimèrics es varen preparar mitjançant la unió de seqüències a un nucli format per residus de Lys. A la Figura 15 es representa el pèptid tetramèric **SB041** que consisteix en un nucli de tres Lys i quatre fragments peptídics.^{39,51,68}

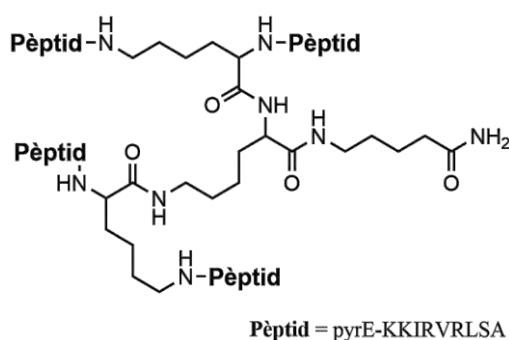


Figura 15. Estructura del pèptid antimicrobià tetramèric **SB041**. (pyrE representa un àcid piroglutàmic).

S'han desenvolupat altres estratègies sintètiques per obtenir pèptids multimèrics. Per exemple, Li *et al.* van dissenyar i sintetitzar una quimioteca de pèptids multimèrics contenint diverses unitats de l'AMP **Chex1-Arg20** (Figura 16). Concretament, varen preparar el dímer **A3-APO**, amb un nucli d'àcid 2,4-diaminobutíric (Dab), i tetràmers amb un nucli de ditiolmaleïmida o de *p*-xilè (**tetràmer-DTM-NH₂** i **tetràmer-xilè-NH₂**, respectivament). Mentre que **Chex1-Arg20** no és actiu enfront *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, (concentració mínima inhibidora (CMI) >100 i 56,3 μ M, respectivament), els pèptids multimèrics anteriors són actius enfront ambdós patògens amb CMIs entre 1,1 i 12,7 μ M.⁶⁹

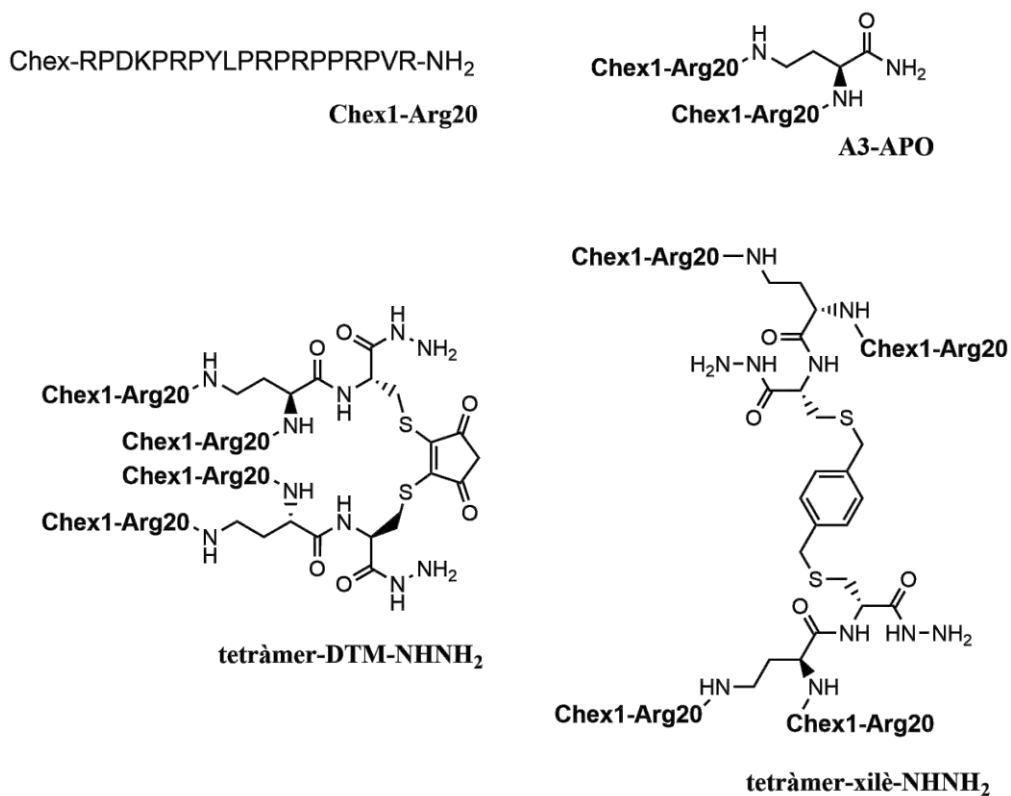


Figura 16. Estructura del pèptid Chex1-Arg20 i dels seus derivats multimèrics A3-APO, tetràmer-DTM-NHNH₂ i tetràmer-xilè-NHNH₂. (Chex correspon a 1-aminociclohexancarboxilat).

1.3.5 Conjugació amb compostos peptídics i no peptídics

La unió covalent d'una seqüència peptídica amb una altra molècula és una estratègia molt utilitzada per aconseguir compostos més efectius. Els pèptids es poden conjuguar amb diversos tipus de compostos: des de pèptids fins a antibiòtics, entre d'altres.

1.3.5.1 Conjugació d'un pèptid antimicrobià amb un altre pèptid

La conjugació de dos pèptids, de naturalesa semblant o diferent, és una estratègia efectiva per tal d'intentar sumar les característiques positives de cadascuna de les unitats. Aquesta estratègia pot involucrar, per exemple, la unió d'un pèptid antimicrobià molt actiu però tòxic amb un altre poc actiu i poc tòxic, per proporcionar un compost quimèric amb una elevada activitat antimicrobiana i una baixa toxicitat.⁵¹ Un exemple seria el pèptid resultant de la conjugació de la melitina(12-26) (activa i tòxica) amb la tanatina (poc activa i tòxica). Aquest pèptid conjugat, GLPLLSWIKRKRQQ-AGP-GSKKPVIYCNRRTGKQRM, mostra una elevada activitat antimicrobiana i una baixa activitat hemolítica (Taula 6).⁷⁰

D'altra banda, Wade *et al.* van dissenyar i sintetitzar 16 pèptids conjugats contenint seqüències amb diferents mecanismes d'acció. Concretament, aquest conjugats combinen la buforina II (TRSSRAGLQWPVGRVHLLRK) i el pèptid **DesHDAP1** (ARDNKKTRIWPRHLQLAVRN), que creuen la membrana bacteriana, i la parasina (KGRGKQGGJVRWKAKTRSS) i la magainina 2

(GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS), que la permeabilitzen. En aquest estudi van avaluar la influència de l'ordre de les seqüències en l'activitat del pèptid conjugat. En tots els casos es va observar que el mecanisme predominant era la permeabilització de la membrana i alguns pèptids conjugats varen resultar ser més actius que els pèptids lliures (Taula 6).⁷¹

Taula 6. Pèptids conjugats contenint dues seqüències peptídiques.

Estructura	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a	Activitat hemolítica ^a	Ref.
Melitina(12-26)-AGP-tanatina	GLPLLSIWIKRKRQQ-AGP-GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM	✓✓	✓✓	70
Buforina II-A-parasina	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK-A-KGRGKQGGJVRWKAKTRSS	✗	-	
Parasina-A-buforina II	KGRGKQGGJVRWKAKTRSS-A-TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK	≈	-	
Buforina II-magainina2	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK-GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS	✗	-	71
Magainina2-buforina II	GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS-TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK	✓	-	
DesHDAP1-A-magainina2	ARDNKKTRIWPRHLQLAVRN-A-GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS	✓	-	
Magainina2-A-DesHDAP1	GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS-A-ARDNKKTRIWPRHLQLAVRN	✓✓	-	
BMAP-27(9-20)-LL-37(17-29)	KFKKLFKKLSPV-FKRIVQRIJDFLR	✓	✓✓	72

^a Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la dels pèptids lliures, respectivament.

Al Tall *et al.* van sintetitzar el pèptid conjugat KFKKLFKKLSPV-FKRIVQRIJDFLR corresponent a la unió entre **BMAP-27(9-20)** (GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL) i **LL-37(17-29)** (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDLFLRNLVPRTES), dos AMPs d'origen boví i humà, respectivament. Aquest pèptid conjugat va mostrar una activitat antimicrobiana més elevada que els pèptids lliures i una activitat hemolítica menor (Taula 6).⁷²

1.3.5.2 Conjugació d'un pèptid antimicrobià amb un antibiòtic

S'han descrit estudis sobre la conjugació covalent d'un pèptid amb un antibiòtic amb l'objectiu d'obtenir compostos que presentin les activitats d'aquests dos components. En general, s'observa que la conjugació redueix la dosi necessària d'antibiòtic a més de dificultar el desenvolupament de resistència bacteriana.^{73,74}

En aquest sentit, Deshayes *et al.* varen conjuguar seqüències peptídiques amb l'antibiòtic tobramicina obtenint conjugats amb una elevada activitat antimicrobiana i una baixa activitat hemolítica. D'entre aquests, va destacar tobramicina-GWRRNQFWIKIQR-NH₂ (**MAAPC03**, Figura 17) per al que estudis del mecanisme d'acció varen indicar que l'activitat antimicrobiana era deguda majoritàriament a l'antibiòtic i no únicament a la disrupció de la membrana per part del pèptid (Taula 7).^{74,75}

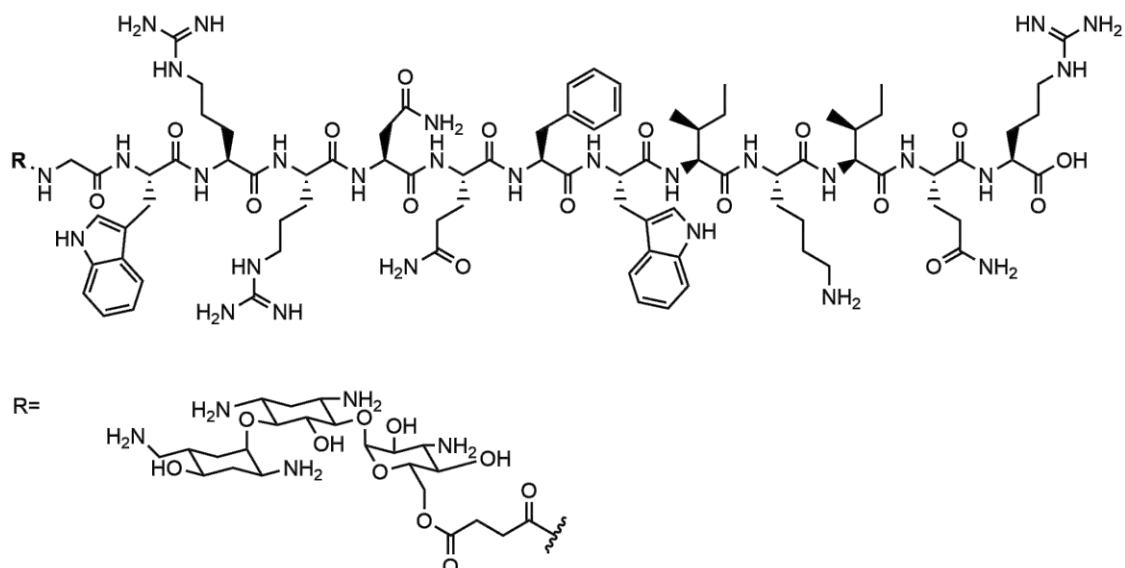


Figura 17. Estructura del pèptid conjugat MAAPC03.

En altres casos s'ha descrit que el pèptid és el principal responsable de l'activitat antimicrobiana d'aquest tipus de conjugats. Per exemple, pèptids conjugats derivats de la levofloxacina i l'AMP RGRSSRRKK-NH₂ (**Pep-4**), com el **Pep-4-LVFX** (Figura 18), mostren una millor activitat que el pèptid no conjugat. De tota manera, el mecanisme d'acció es deu a la disrupció de la membrana bacteriana (Taula 7).^{57,74,76}

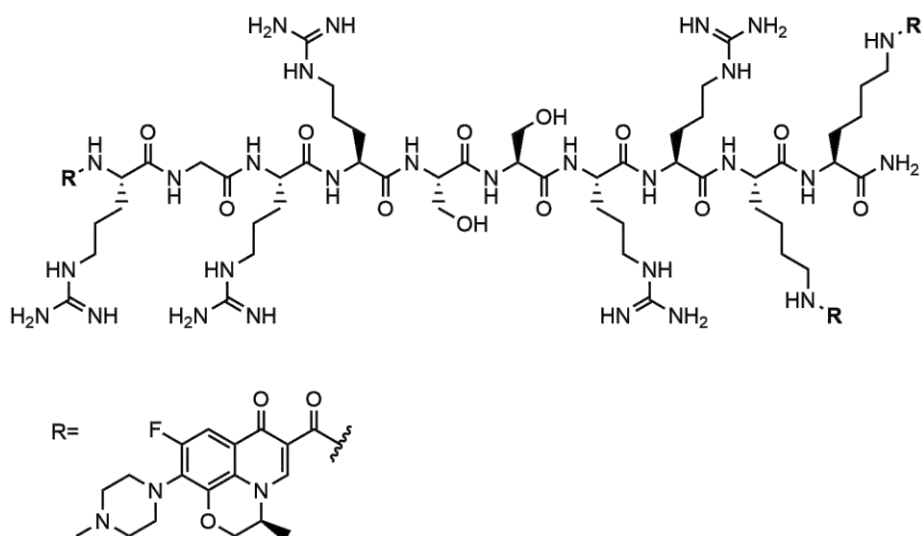


Figura 18. Estructura del pèptid conjugat Pep-4-LVFX.

Taula 7. Pèptids conjugats contenint un pèptid antimicrobià i un antibiòtic.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a	Activitat hemolítica ^a	Ref.
P3	GWRRNQFWIKIQR-NH ₂			75
MAAPC03	Tobramicina-GWRRNQFWIKIQR-NH ₂	✓✓	✓✓	
Pep-4	RGRRSSRRKK-NH ₂			76
Pep-4-LVFX	Levofloxacin-RGRRSSRRKK(Levofloxacin)K(Levofloxacin)-NH ₂	✓	-	

^a Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

1.3.5.3 Conjugació de pèptids antimicrobians amb altres compostos

A la bibliografia també s'han descrit conjugats de pèptids antimicrobians amb compostos inorgànics, polimèrics o al·lòtrops de carboni, entre altres. Pel que fa als compostos inorgànics, s'han utilitzat nanopartícules d'or i plata, partícules de sílice o complexos metàl·lics com el ferro. En general, els conjugats són més estables enfront la degradació enzimàtica i, en alguns casos, presenten una activitat antimicrobiana millor i una toxicitat menor.^{39,73}

D'altra banda, la conjugació d'un pèptid amb un compost polimèric va ser una de les primeres estratègies utilitzades per millorar les propietats dels pèptids, sent el polietilenglicol un dels polímers més utilitzats. El conjugat resultant generalment és menys tòxic i més estable enfront a la degradació enzimàtica que el pèptid de partida. Malgrat això, aquests conjugats sovint mostren una activitat antimicrobiana menor.³⁹

També s'ha descrit la unió de pèptids a cadenes de polisacàrids com el quitosan o l'àcid hialurònic. Els corresponents conjugats en general presenten una menor toxicitat, mentre que la seva activitat antimicrobiana es manté o augmenta.³⁹

A la bibliografia també es troben exemples de pèptids conjugats amb al·lòtrops de carboni, com ara grafè o nanotubs de carboni. Recentment, Lu *et al.* han sintetitzat conjugats de melitina amb grafè que mostren valors menors de CMI que la melitina lliure.^{39,77}

1.3.6 Cicllació

Molts pèptids antimicrobians d'origen natural presenten una estructura cíclica. Un exemple és la gramicidina S, un dels primers AMPs utilitzat a gran escala com a antibiòtic, que és un ciclodecapèptid produït per *Bacillus brevis*. En general, els pèptids cíclics mostren una conformació més restringida que les corresponents seqüències lineals, a més d'una millor activitat i estabilitat enfront proteases. Així doncs, inspirats en aquests pèptids naturals s'han establert diverses estratègies per sintetitzar pèptids cíclics. En base a la posició dels aminoàcids implicats en la ciclació, els pèptids es classifiquen en: cap-cua, cap-cadena lateral, cadena lateral-cua i cadena lateral-cadena lateral (Figura 19).

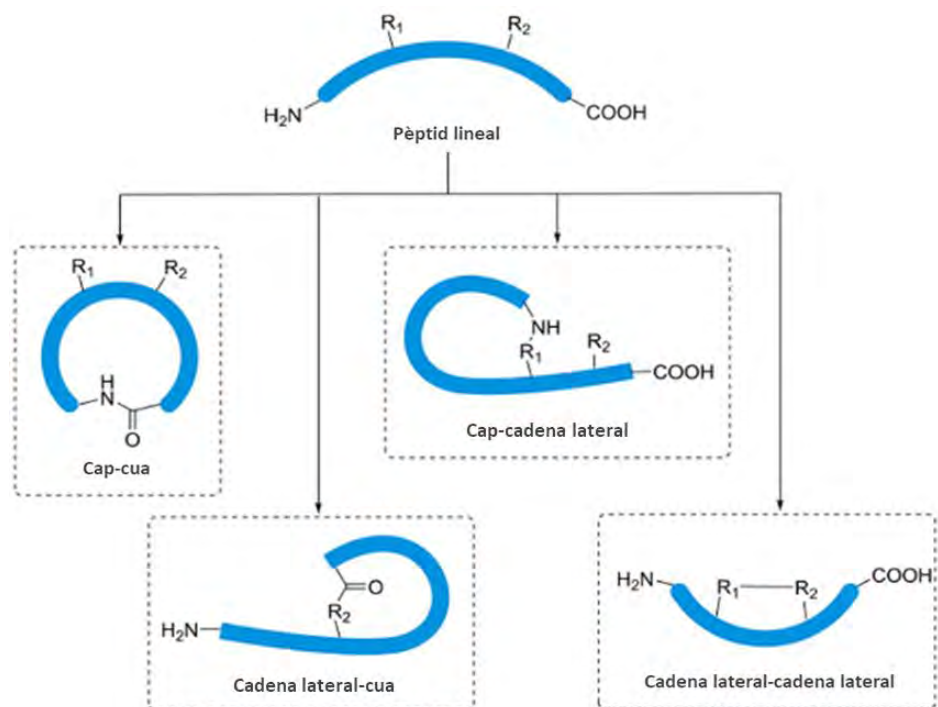


Figura 19. Tipus de pèptids cíclics.⁷⁸

La ciclació dels pèptids lineals es pot dur a terme mitjançant diversos tipus de reaccions entre les que destaquen la formació d'un pont disulfur, les reaccions *click* o la formació d'un enllaç amida. La ciclació mitjançant un pont disulfur implica la reacció entre les cadenes laterals de dos residus de Cys. Aquesta estratègia pot conduir a subproductes no desitjats, com ara productes multimèrics, i, a més, genera un enllaç disulfur molt susceptible a condicions reductores. La utilització d'una reacció *click* per a la preparació de pèptids cíclics implica la cicloadició 1,3-dipolar entre les cadenes laterals d'un azido i d'un alquil aminoàcid presents en la mateixa seqüència. Aquesta reacció està catalitzada generalment per Cu^+ i dona lloc a la formació d'un 1,2,3-triazole. Una altra aproximació àmpliament utilitzada consisteix en la formació d'un enllaç amida entre el grup amino i el grup àcid carboxílic de dos aminoàcids, que es poden trobar a l'extrem N- o C-terminal o en posicions intermèdies de la seqüència. Aquesta estratègia de ciclació requereix l'ús de grups protectors que es puguin eliminar de manera selectiva.⁷⁸⁻⁸⁰

1.3.7 Incorporació d'aminoàcids no proteïnogènics

Una altra estratègia per millorar el perfil biològic dels AMPs és la incorporació d'aminoàcids no proteïnogènics, tant naturals com sintètics. De fet, apart dels 20 aminoàcids proteïnogènics, es comptabilitza que existeixen més de 900 aminoàcids naturals no codificats mitjançant processos ribosomàtics i més d'un centenar d'aminoàcids sintètics.⁸¹

La incorporació d'un aminoàcid no proteïnogènic generalment causa una reducció de la susceptibilitat a la degradació enzimàtica, ja que les proteases no reconeixen els enllaços amida on intervenen aquests residus. A més, la incorporació de, per exemple, D-aminoàcids, especialment a la cara apolar del pèptid, està directament relacionada amb una disminució de

l'activitat hemolítica, mentre que es manté l'activitat antimicrobiana. Això s'atribueix al fet que aquesta incorporació provoca una certa distorsió en l'estructura secundària del pèptid. Aquests efectes s'han descrit per Huang *et al.* en un estudi basat en el pèptid Ac-KWKSFLKTFKSLKKTVLHTLLKAISS-NH₂ (**A12L/A20L**) en el que varen substituir diversos aminoàcids pel seu D-enantiòmer. De forma similar, Jia *et al.* van observar que la incorporació de D-aminoàcids a l'estructura del pèptid ILGTILGLLKSL-NH₂ (**Polybia-CP**) reduïa l'activitat hemolítica i augmentava l'estabilitat enfront tripsina (Taula 8).⁸²⁻⁸⁵

Taula 8. Efecte de la incorporació de D-aminoàcids en la seqüència de A12L/A20L i Polybia-CP.

Pèptid	Seqüència ^a	Activitat antimicrobiana ^b	Activitat hemolítica ^b	Ref.
A12L/A20L	Ac-KWKSFLKTFKSLKKTVLHTLLKAISS-NH ₂			
L12_D/L20_D	Ac-KWKSFLKTFKSIKKTVLHTILKAISS-NH ₂	≈	✓✓	82
L6_D/L12_D/L20_D	Ac-KWKSFIKTFKSIKKTVLHTILKAISS-NH ₂	≈	✓✓	
Polybia-CP	ILGTILGLLKSL-NH ₂			
D-lys-CP	ILGTILGLLKSL-NH ₂	✗	✓✓	85
D-CP	ilgtilgllksl-NH ₂	≈	✓	

^a Les lletres minúscules són D-aminoàcids.

^b Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

1.4 Lipopèptids antimicrobians

Existeix una gran varietat de lipopèptids, tant naturals com sintètics, tant cíclics com lineals i amb activitats diverses: antimicrobiana, antifúngica i antitumoral, entre d'altres. En general, els lipopèptids antimicrobians presenten un mecanisme d'acció similar al dels pèptids antimicrobians (secció 1.2.2). Inicialment, la part hidrofílica del lipopèptid i la membrana bacteriana interaccionen electrostàticament i, seguidament, la part hidrofòbica s'insereix en la paret bacteriana provocant-ne la disrupció i la mort del bacteri. Així doncs, la cadena d'àcid gras afavoreix aquesta inserció resultant en l'increment d'activitat. De tota manera, cal tenir en compte que la presència d'aquesta cadena també pot provocar un augment de l'afinitat per les membranes de les cèl·lules eucariotes, donant lloc a una major toxicitat.⁸⁶⁻⁹⁰

1.4.1 Lipopèptids naturals

A la natura s'hi troba una gran varietat de lipopèptids, principalment d'origen bacterià i fúngic, i que presenten una estructura lineal o cíclica. Alguns exemples de lipopèptids lineals aïllats de fonts naturals són la tridecaptina A1, la tauramadina i la dragomida E (Figura 20). La tridecaptina A1, aïllada de *Paenibacillus terrae* i amb una estructura anàloga a les polimixines, consisteix en una seqüència de 13 aminoàcids i una cua lipídica de nou carbonis. Aquest lipopèptid és actiu enfront bacteris grampositius i gramnegatius.⁹¹ La tauramadina és un lipopentapèptid lineal amb una cua lipídica de sis carbonis, aïllat de *Brevibacillus laterosporus*, amb una activitat

antibacteriana important.⁹² La dragomida E és un altre lipopentapèptid lineal que incorpora un grup acil de nou carbonis amb activitat antileishmània.⁹³

D'altra banda, alguns exemples de lipopèptids cíclics naturals són les fengicines, les arilomicines o la daptomicina (Figura 20). Les fengicines són una família de ciclolipodepsipèptids, aïllats de diverses soques de *Bacillus*. La seva estructura conté un macrocicle de vuit aminoàcids amb un enllaç ester entre el grup fenol d'una Tyr i el grup α -carboxílic d'una Ile, i una cadena β -hidroxilipídica d'entre 14 i 16 carbonis. Presenten una activitat antifúngica elevada alhora que una hemòlisi relativament baixa.⁹⁴ Les arilomicines presenten un anell format per tres aminoàcids amb un enllaç biarílic entre una 4-hidroxifenilglicina i una Tyr. L'extrem N-terminal d'aquest anell es troba metilat i derivatitzat amb un tripèptid acilat amb un àcid gras de 12-16 carbonis. Aquests lipopèptids són actius enfront bacteris grampositius i gramnegatius.⁹⁵ Per últim, la daptomicina és un lipodepsipèptid cíclic format per un anell de 10 aminoàcids amb un enllaç ester entre el grup alcohol d'una Thr i el grup α -carboxílic d'una cinurenina. L'extrem N-terminal presenta un tripèptid acilat amb un grup decanoil. La daptomicina mostra activitat enfront bacteris grampositius.^{96,97}

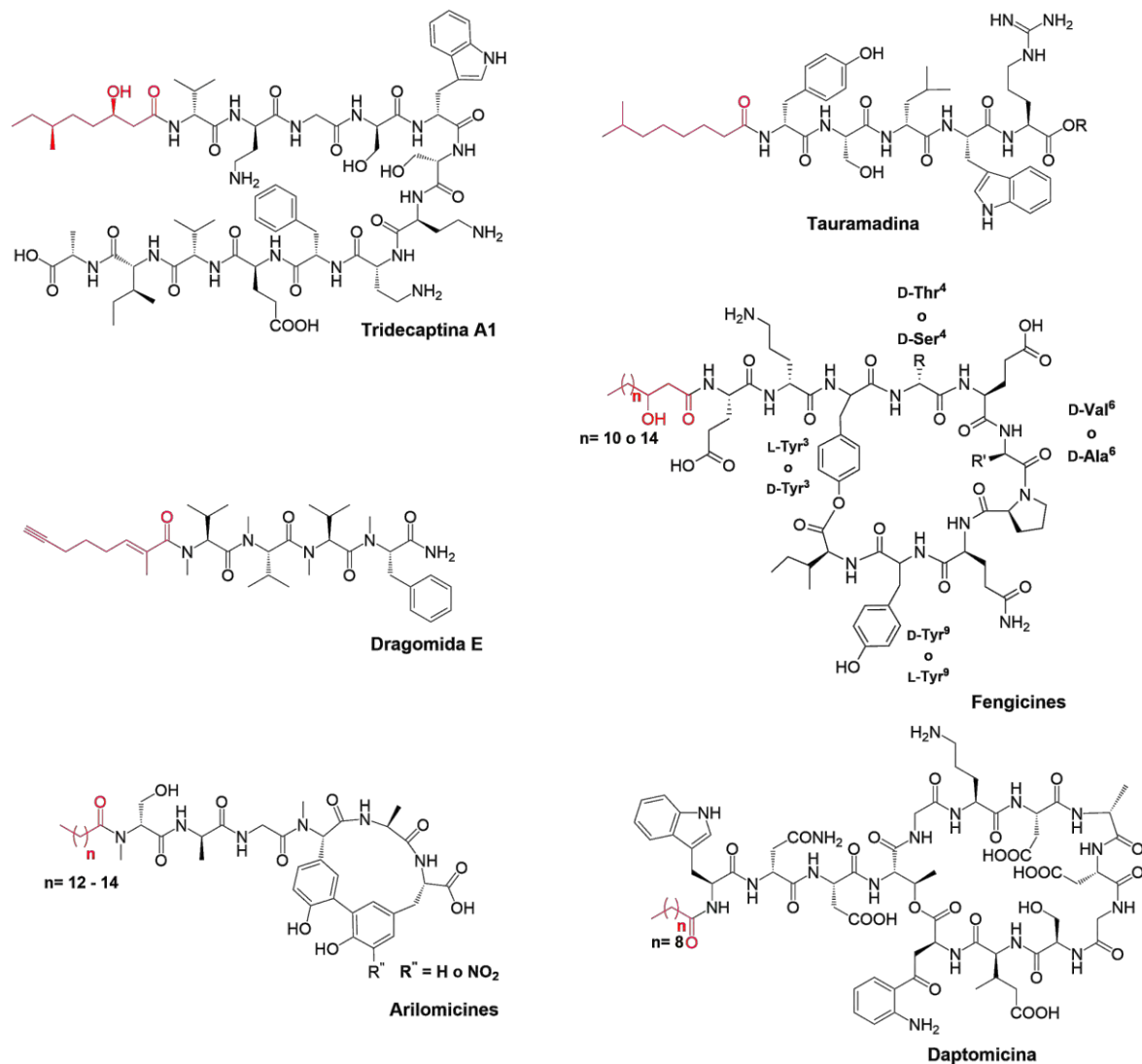


Figura 20. Estructura de lipopèptids naturals lineals i cíclics.

1.4.2 Lipopèptids sintètics

A la bibliografia es troben nombrosos exemples de lipopèptids sintètics. Per exemple, Laverty *et al.* van dissenyar i sintetitzar lipopèptids ultracurts. Es consideren ultracurts aquells pèptids que contenen menys de 7 residus. Els lipopèptids dissenyats per Laverty *et al.* varen resultar de l'acilació del tetrapèptid OOWW-NH₂ amb una cadena lipídica de 6 a 16 carbonis. Els lipopèptids que contenen un fragment acil de 12 o 14 carbonis, a diferència del pèptid de partida, van mostrar una elevada activitat antimicrobiana amb una CMI ≤1,95 μM enfront *S. aureus* (Taula 9).⁹⁸

Siano *et al.* van dissenyar i sintetitzar lipopèptids antimicrobians derivats de **Gr-SL3 (34-45)**, que correspon al fragment 34-45 de la proteïna humana granulisina. Mentre que **Gr-SL3 (34-45)** no va presentar activitat antimicrobiana, els derivats contenint un fragment lauroil o palmitoil varen mostrar activitat antimicrobiana enfront *Mycobacterium tuberculosis* i una activitat hemolítica moderada (Taula 9).⁹⁹

Taula 9. Efecte de la incorporació d'un fragment acil a la seqüència OOWW-NH₂, Gr-SL3 (34-45), GZC0 i LF11-215.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^b	Activitat hemolítica ^b	Ref.
	OOWW-NH ₂			
	C ₁₁ H ₂₃ CO-OOWW-NH ₂	✓✓	X	98
	C ₁₃ H ₂₇ CO-OOWW-NH ₂	✓	-	
Gr-SL3 (34-45)	CRTGSRWTDVC			
Gr-SL3-làuric (Lau-34-45)	C ₁₁ H ₂₃ CO-CRTGSRWTDVC	✓	XX	99
Gr-SL3-palmític (Pal-34-45)	C ₁₅ H ₂₉ CO-CRTGSRWTDVC	✓✓	X	
GZC0	XXXLFXL-NH ₂ ^a			
GZC6	C ₅ H ₁₁ CO-XXXLFXL-NH ₂ ^a	✓	-	100,101
GZC6B	C ₂ H ₅ CHCH ₃ C ₂ H ₄ CO-XXXLFXL-NH ₂ ^a	✓✓✓	✓	
GZC14	C ₁₃ H ₂₇ CO-XXXLFXL-NH ₂ ^a	✓✓	XX	
LF11-215	FWRIRIRR-NH ₂			102
DI-MB-LF11-215	C ₂ H ₅ C(CH ₃) ₂ CO-FWRIRIRR-NH ₂	✓	≈	

^a X representa un residu d'àcid 2,4-diaminobutíric.

^b Els símbols ≈, ✓ i X indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

D'altra banda, Kihara *et al.* van observar que l'acilació de l'extrem N-terminal del pèptid **GZC0**, un derivat de la batcina, amb àcid hexanoic, 4-metilhexanoic o mirístic va conduir a seqüències més actives enfront bacteris tant grampositius com gramnegatius. Van observar que el lipopèptid amb el fragment acil més llarg (**GZC14**) presentava una menor activitat antibacteriana i una major

activitat hemolítica que els lipopèptids amb un grup hexanoïl (**GZC6**) o 4-metilhexanoïl (**GZC6B**). Aquest darrer és el que va mostrar un millor perfil biològic (Taula 9).^{100,101}

Per la seva banda, Sánchez-Gómez *et al.* varen preparar lipopèptids antimicrobians derivats del pèptid FWRIRIRR-NH₂ (**LF11-215**) mitjançant l'acilació de l'extrem N-terminal. Aquests lipopèptids varen mostrar una CMI inferior a la de **LF11-215** enfront cèl·lules planctòniques de *P. aeruginosa* i, sobretot, enfront biofilm. En va destacar C₂H₅C(CH₃)₂CO-FWRIRIRR-NH₂ (**DI-MB-LF11-215**), amb un grup 2,2-dimetilbutanoïl a l'extrem N-terminal, que va presentar una CMI de 12,3 µM enfront *P. aeruginosa* (Taula 9).¹⁰²

Cal destacar que també s'han descrit lipopèptids actius enfront patògens de plantes. Per exemple, el grup de Shai va desenvolupar un conjunt de lipopèptids catiónics ultracurts amb estructura R-KXXK-NH₂, on X correspon a Leu, Ala, Gly o Lys, i R a una cadena lipídica d'entre 12 i 16 carbonis. D'aquest conjunt en va destacar C₁₃H₂₇CO-KLLK-NH₂ (**C14-KLLK**) (l'aminoàcid subratllat indica un D-enantiòmer) que va mostrar una activitat antimicrobiana elevada enfront diversos fitopatògens fúngics i bacterians.¹⁰³ En un posterior estudi, se'n va avaluar la capacitat d'estimular el sistema immune de les plantes. En aquest cas varen destacar C₁₅H₃₁CO-KKKK-NH₂ (**C16-KKKK**) i C₁₅H₃₁CO-KLLK-NH₂ (**C16-KLLK**) que, tot i no ser els lipopèptids amb una major activitat antimicrobiana, varen resultar ser els que presentaven una major capacitat d'estimular les defenses de plantes de cogombrera i d'*Arabidopsis thaliana*.^{103,104}

Camó *et al.* varen desenvolupar una quimioteca de 33 lipopèptids derivats de KKVFWVKFK-NH₂ (**KSL-W**), amb un fragment acil (butanoïl, hexanoïl o lauroïl) a l'extrem N-terminal o a la cadena lateral d'un residu de Lys incorporat a cadascuna de les posicions de la seqüència. En aquest cas, aquests lipopèptids varen mostrar, en general, una menor activitat que **KSL-W** enfront els fitopatògens testats. Es va observar que els derivats amb un fragment lipídic més llarg (lauroïl) presentaven una activitat antimicrobiana generalment superior a la dels lipopèptids incorporant un grup butanoïl o hexanoïl. Així mateix, en general, tots els lipopèptids varen mostrar una baixa o moderada toxicitat. Les seqüències amb un millor perfil d'activitat biològica varen ser **BP410** i **BP411**, amb un grup hexanoïl o lauroïl a l'extrem N-terminal, i **BP432** amb un grup lauroïl a la cadena lateral d'una Lys a la posició 4 (Taula 10).¹⁰⁵

Taula 10. Efecte de la incorporació d'un fragment acil a la seqüència dels pèptids KSL-W i BPC194.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a	Activitat hemolítica ^a	Fitotoxicitat ^a	Ref.
KSL-W	KKVFWVKFK-NH ₂				
BP410	C ₅ H ₁₁ CO-KKVFWVKFK-NH ₂	X	✓	✓	105
BP411	C ₁₁ H ₂₃ CO-KKVFWVKFK-NH ₂	X	X	✓	
BP432	Ac-KKVK(COC ₁₁ H ₂₃)FWVKFK-NH ₂	X	X	✓	
BPC194	c(KLKKFKKLQ)				106,107
BPC500	c(KLKK(COC ₃ H ₇)FKKLQ)	✓	X	✓	

^a Els símbols ≈, ✓ i X indiquen una activitat similar, millor o pitjor que la del pèptid inicial, respectivament.

En un altre estudi, Vilà *et al.* varen sintetitzar una quimioteca de lipopèptids cíclics derivats del pèptid cíclic antimicrobià c(KKLKFKKLQ) (**BPC194**) per acilació de la cadena lateral d'un residu de Lys. Es va estudiar la influència de la llargada de la cadena lipídica en l'activitat antibacteriana. **BPC500**, que incorpora un grup butanoïl, a la posició 5 va ser el lipopèptid cíclic més actiu (Taula 10).^{106,107}

1.5 **BP100, un pèptid antimicrobià i molt més**

1.5.1 Identificació de BP100

Entre finals dels anys 80 i principis dels anys 90 el grup de Merrifield va sintetitzar diversos pèptids híbrids de cecropina A i melitina d'entre 15 i 37 aminoàcids amb l'objectiu d'identificar seqüències amb un millor perfil biològic que aquests pèptids naturals.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ La cecropina A va ser aïllada inicialment de l'arna *Hyaliphora cecropia* i consisteix en una seqüència de 37 aminoàcids que presenta dues hèlixs α unides per un pont flexible format per quatre residus (AGPA). Mentre que l'hèlix de l'extrem N-terminal és bàsica i amfipàtica, l'hèlix de l'extrem C-terminal és hidrofòbica. Aquesta estructura secundària li confereix una activitat antibacteriana diversa i una toxicitat baixa enfront cèl·lules eucariotes. D'altra banda, la melitina és un pèptid de 26 aminoàcids que forma part del verí d'abella. També consta de dues hèlixs α unides per un fragment central flexible. A diferència de la cecropina A, l'hèlix de l'extrem C-terminal és bàsica i la de l'extrem N-terminal és hidrofòbica. També presenta activitat antibacteriana, però és tòxica enfront cèl·lules eucariotes. Els estudis del grup de Merrifield amb els pèptids híbrids de cecropina A-melitina varen mostrar que aquells que presentaven un millor perfil biològic eren els que contenien un fragment de l'hèlix α polar de la cecropina A a l'extrem N-terminal conjuntament amb un fragment de l'hèlix α hidrofòbica de la melitina a l'extrem C-terminal.

A finals dels anys 90, Cavallarin *et al.* varen identificar l'undecapèptid cecropina A(2-8)-melitina(6-9) (WKLFKKILKVL-NH₂, **Pep3**).¹¹¹ Aquest pèptid presenta activitat enfront bacteris i fongs, és amfipàtic, amb 4 aminoàcids hidrofílics a una cara de l'hèlix i 7 residus hidrofòbics a la cara contrària, tal com s'observa a la projecció d'Edmunson representada a la Figura 21.¹¹²

Amb aquests precedents, el grup LIPPSO, conjuntament amb el grup CIDSAV, va dissenyar 22 anàlegs de **Pep3**: (i) per modificació de l'extrem C-terminal (àcid carboxílic o amida) o de l'N-terminal (lliure o derivatitzat amb un grup acetil (Ac), tosil (Ts), benzoïl (Bz), benzil (Bn) o palmitoïl); (ii) substitució del Trp¹ i/o de la Val¹⁰ (situats a la interfície entre les cares polar i apolar del pèptid, Figura 21) per residus amb diferent grau d'hidrofobicitat i hidrofilitat; (iii) truncació dels extrems N- o C-terminal. D'aquest estudi es va identificar KKLKFKILKFL-NH₂ (**BP76**), que presenta una millor activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* que **Pep3**, i una activitat hemolítica menor.¹¹³

A partir d'aquests resultats es va dissenyar una quimioteca de 125 pèptids (**CECMEL11**), per investigar la influència dels residus de les posicions 1 i 10. Concretament, es va incorporar Lys, Leu, Trp, Tyr o Phe a la posició 1, i Lys, Val, Trp, Tyr o Phe a la posició 10. A més l'extrem N-terminal es va derivatitzar amb un grup Ac, Ts, Bz o Bn (Figura 21). D'entre aquesta quimioteca, 118 pèptids van mostrar una potent activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv.

syringae i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i, concretament, 18 pèptids varen ser més actius que **BP76**. El pèptid amb un millor perfil biològic va ser KKLFFKKILKYL-NH₂ (**BP100**), que presenta una càrrega neta de +6, un 45% de residus hidrofòbics, una CMI <7,5 µM enfront els 3 bacteris gramnegatiu testats i una hemòlisi del 22% a 150 µM.¹¹⁴ En estudis posteriors es va estudiar l'activitat dels 125 pèptids d'aquesta quimioteca enfront els fongs *F. oxysporum* i *P. expansum*. Concretament, **BP100** va mostrar una CMI compresa entre 0,8 i 1,6 µM enfront *F. oxysporum* i una CMI >25 µM enfront *P. expansum*.¹¹⁵

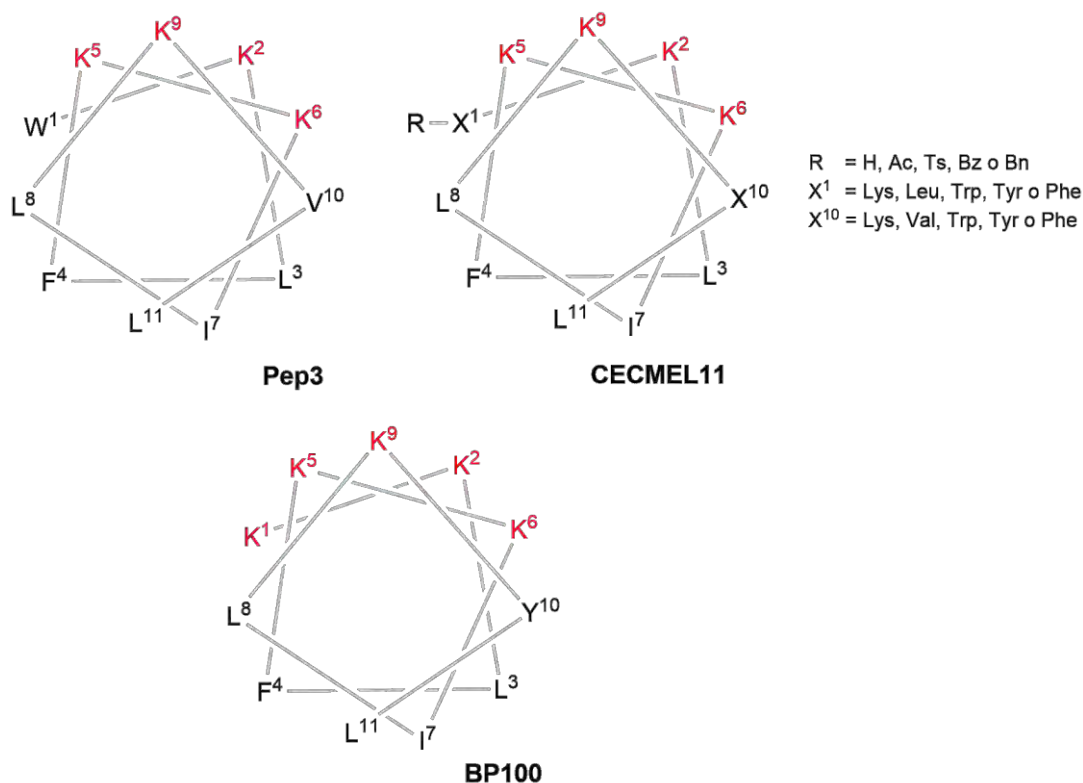


Figura 21. Projectió d'Edmunson de l'estructura Pep3, dels pèptids de la quimioteca CECMEL11 i de BP100. Els aminoàcids polars es troben representats en vermell i els hidrofòbics en negre.

1.5.2 Mecanisme d'acció de BP100

Anàlogament a altres AMPs, el mecanisme d'acció de **BP100** no és del tot conegut. No obstant, els estudis realitzats en aquest sentit mostren que **BP100** actua sobre la membrana bacteriana, provocant-ne la seva desestabilització i la conseqüent mort del bacteri.

Concretament, s'ha estudiat el mecanisme de **BP100** mitjançant simulacions de dinàmica molecular utilitzant diferents models de membrana. D'una banda, Alves *et al.* van concloure que, de forma general, **BP100** no presenta una estructura definida en solució i que pren una estructura d'hèlix α de 15,57 Å de llargada quan està en contacte amb la membrana bacteriana. Aquesta llargada no és suficient per a què **BP100** pugui inserir-se formant porus.¹¹⁶ D'altra banda, Park *et al.* van observar que **BP100** interacciona inicialment amb la membrana bacteriana de forma electrostàtica a través dels residus de Lys. A continuació, l'hèlix fa un gir i les interaccions de la

cara polar amb la membrana bacteriana disminueixen, mentre que les interaccions amb la cara hidrofòbica augmenten, resultant en una lleugera inserció de **BP100** en la bicapa lipídica.¹¹⁷

Aquests estudis computacionals es veuen reforçats amb estudis empírics. Concretament, el grup de M. A. R. B. Castanho va observar que **BP100** neutralitza i permeabilitza la membrana a concentracions pròximes a la CMI mentre que la creua a concentracions inferiors.¹¹⁸ D'altra banda, el mateix grup va mostrar, mitjançant microscòpia de força atòmica que, després de 30 min de la neutralització inicial, són visibles efectes a la membrana (Figura 22 D). Després de 2 h es va observar la formació d'estructures de tipus vesícula i la disrupció de la membrana bacteriana (Figura 22 E i F).¹¹⁹ Aquest efecte permeabilitzador de la membrana sembla que depèn de la concentració local del pèptid sobre el bacteri, deformant i tensionant la membrana a concentracions baixes i provocant la formació d'estructures tipus micel·les o clústers a concentracions més altes.^{115,120}

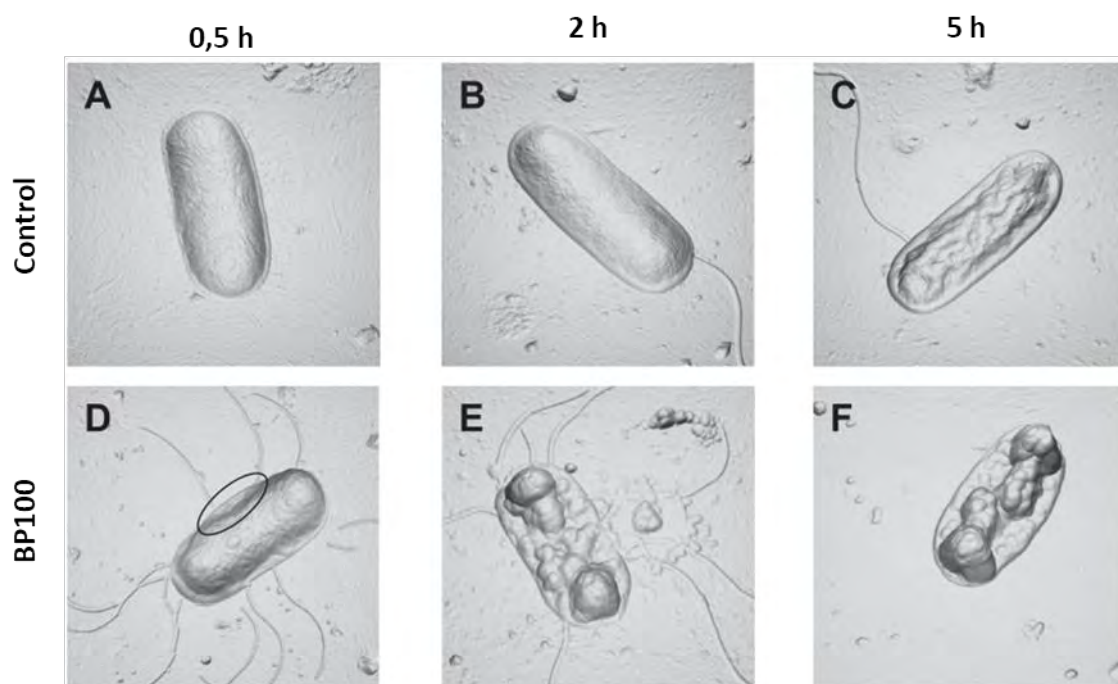


Figura 22. Efecte de BP100 en *Escherichia coli*. Imatges obtingudes per microscòpia de força atòmica. A-C, *E. coli* en una solució tampó (control); D-F, *E. coli* en una solució de BP100 3 µM.¹¹⁹

El grup d'A. S. Ulrich va determinar mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN) que **BP100** actua de forma monomèrica, sense formar agregats, situant-se paral·lelament a la membrana bacteriana i amb l'extrem C-terminal lleugerament inserit en aquesta.¹²¹⁻¹²³

Finalment, Zamora-Carreras *et al.* varen sintetitzar derivats de **BP100** per substitució de cadascun dels 11 aminoàcids de la seva seqüència per un residu d'Ala. Es va observar que aquesta substitució d'un residu hidrofílic, tot i que comporta la pèrdua de càrrega neta del pèptid, no efecta substancialment l'activitat. En canvi, la substitució d'un residu hidrofòbic per una Ala causa una pèrdua acusada de l'activitat, cosa que demostra la importància de la cara hidrofòbica de l'hèlix α de **BP100**.¹²⁴

Tots aquests estudis semblen indicar que el mecanisme d'acció de **BP100** és similar al del model *carpet* (secció 1.2.2), segons el qual l'acumulació del pèptid a la superfície exterior de la bicapa provoca tensions en la membrana que acaben en la seva disrupció i en la formació de micel·les per un efecte detergent (Figura 11 C).^{116,120,121,123-125}

1.5.3 Pèptids antimicrobians derivats de BP100

A la bibliografia existeixen múltiples exemples de pèptids derivats de **BP100** que s'han dissenyat amb l'objectiu de millorar la seva activitat antimicrobiana, reduir la seva hemòlisi o millorar la seva resistència enfront la degradació enzimàtica. Així, s'han sintetitzat derivats de **BP100** per modificació de la seqüència o de l'esquelet (peptidomimètics), derivats multimèrics, conjugats i lipopèptids. A continuació, es recullen els principals derivats de **BP100** descrits.

1.5.3.1 Derivats de BP100 per modificació de la seqüència

Torcato *et al.* varen dissenyar i sintetitzar dos pèptids anàlegs de **BP100**, substituïnt les Lys per Arg i incorporant un residu de Trp a la posició 10. Els pèptids resultants RRLFRRILRYL-NH₂ (**R-BP100**) i RRLFRRILRWL-NH₂ (**RW-BP100**) varen ser més actius que **BP100** enfront patògens gramnegatius (*E. coli*, *P. aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*) i, especialment, enfront patògens grampositius (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Enterococcus faecium*), però també més hemolítics (Taula 11).¹²⁶

Taula 11. Pèptids derivats de BP100 per modificació de la seqüència amb aminoàcids proteïnogènics.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^a		Activitat hemolítica ^a	Ref.
		Grampositiu	Gramnegatiu		
BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂				
R-BP100	RRLFRRILRYL-NH ₂	✓	✓	✗	126
RW-BP100	RRLFRRILRWL-NH ₂	✓	✓	✗	
	RKLFKRILKYL-NH ₂	✗	✗✗	✗	
	KRLFRKILKYL-NH ₂	✓✓	✓✓	✗	
	KKLFKKILRYL-NH ₂	✓	✓✓	≈	127
	KRLFRKILRYL-NH ₂	✓✓	✗	✗✗	
	KKLFRRILKYL-NH ₂	✓	✓	✗✗	
	RRLFKKILKYL-NH ₂	✓	≈	✗✗	
BP100K2A	KALFKKILKYL-NH ₂	≈	✗	✓	124
BP100K9A	KKLFKKILAYL-NH ₂	≈	✗	✓	

^a Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que **BP100**, respectivament.

Seguint aquesta mateixa estratègia, Oddo *et al.* van dissenyar i sintetitzar 6 pèptids derivats de **BP100** reemplaçant una, dues o tres Lys de la seqüència de **BP100** per Arg. Cinc dels 6 pèptids

sintetitzats van mostrar una CMI inferior a **BP100** enfront els patògens testats (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* i *A. baumannii*). Tanmateix, les seqüències que incorporaven 2 o 3 residus d'Arg també van presentar activitats hemolítiques superiors. En va destacar KKLFFKILRYL-NH₂ que va presentar una millor activitat antimicrobiana i una hemòlisi similar a **BP100** (Taula 11).¹²⁷

D'altra banda, Zamora-Carreras *et al.* varen sintetitzar derivats de **BP100** per substitució de cadascun dels 11 aminoàcids de la seva seqüència per un residu d'Ala. Tots ells van presentar una activitat hemolítica similar o inferior a **BP100**. En destaquen especialment KALFFKILKYL-NH₂ (**BP100K2A**) i KKLFFKILAYL-NH₂ (**BP100K9A**), que presenten una menor activitat hemolítica mantenint o perdent lleugerament l'activitat antimicrobiana enfront els patògens analitzats (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Staphylococcus epidermis*) (Taula 11).¹²⁴

Güell *et al.* també varen preparar 13 seqüències dissenyades a partir de **BP100** per substitució d'una Lys o de la Phe⁴ per un aminoàcid que incorpora un anell de triazole a la cadena lateral. Tots aquests peptidotriazoles van mostrar activitats considerables enfront els patògens testats (els bacteris *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *P. syringae* pv. *syringae*, i els fongs *P. expansum* i *F. oxysporum*) i els que contenen el triazolil aminoàcid en comptes de la Phe una menor hemòlisi. Concretament, **BP241**, amb una triazolil lisina a la posició 2, i **BP250**, amb una triazolil alanina a la posició 4, van mostrar activitat enfront els patògens testats, no van ser hemolítics i van ser més estables que **BP100** enfront proteases (Figura 23, Taula 12).¹²⁸

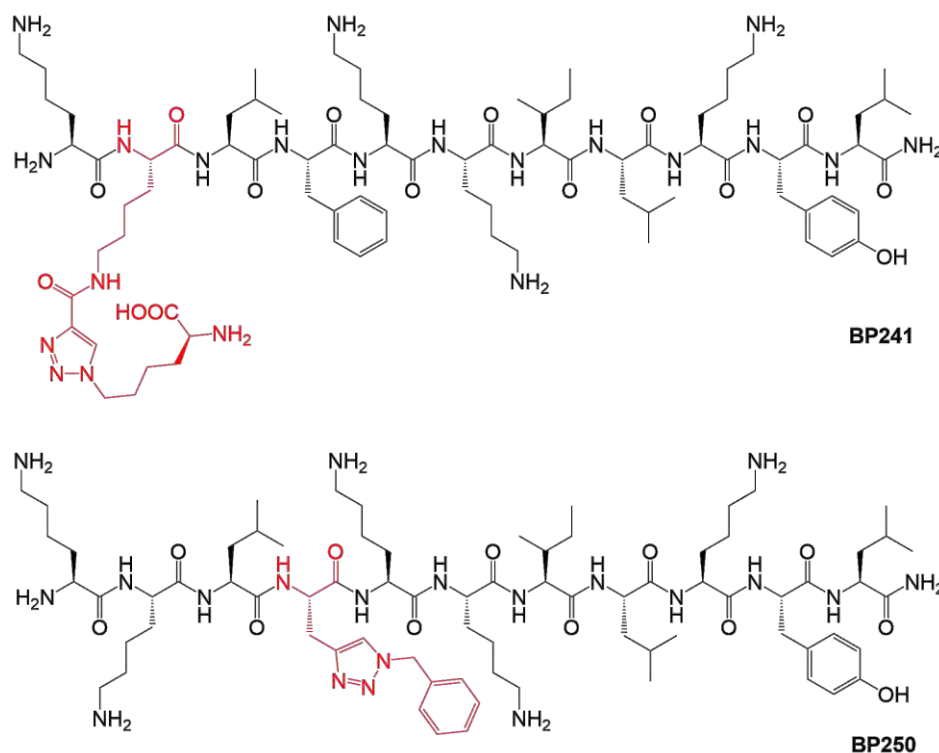


Figura 23. Estructura dels pèptids BP241 i BP250.

Oddo *et al.* varen sintetitzar 2 seqüències derivades de **BP100** incorporant l'aminoàcid no proteïnogènic 3-(2-naftil)alanina (2-Nal) a la posició 4 (Figura 24, Taula 12). Aquests pèptids van

ser més hemolítics que **BP100**, però més actius, especialment enfront bacteris grampositius (*E. faecium*, *S. aureus*). A més, van dissenyar 3 anàlegs de **BP100** substituint la Lys de la posició 9 per una Arg i incorporant 1, 6 o 11 D-aminoàcids. D'aquestes seqüències va destacar kklfkkilryl-NH₂ que, tot i ser lleugerament més hemolítica que **BP100**, va presentar una activitat igual o superior enfront els bacteris testats (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* i *A. baumannii*) (Taula 12).¹²⁷

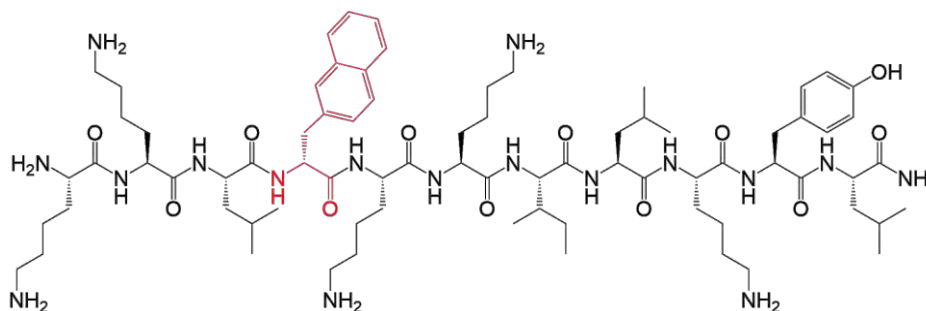


Figura 24. Estructura d'un peptid derivat de BP100 contenint una 3-(2-naftil)-D-alanina (D-2-Nal).

Taula 12. Peptids derivats de BP100 incorporant aminoàcids no proteïnogènics.

Peptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^e			Activitat hemolítica ^e	Estabilitat ^e	Ref.
		Grampositiu	Gramnegatiu	Fongs			
BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂						
BP143	KKLfKKILKYL-NH ₂ ^a	-	≈	-	✓	✓	129
	RRL-2-Nal-RRILRYL-NH ₂ ^b	✓	✗	-	✗✗	-	
	KKL-D-2-Nal-KKILKYL-NH ₂ ^b	✓✓	✓	-	✗✗	-	
	KKLfKKILRYL-NH ₂ ^a	✓✓	✓	-	✗	-	127
	KKLFKkilryl-NH ₂ ^a	≈	✗	-	✓✓	-	
	kklfkkilryl-NH ₂ ^a	✓✓	✓	-	✗	-	
BP241	KK(Tr-Ahx)LFKKILKYL-NH ₂ ^c	-	✗	≈	✓	✓	128
BP250	KKLA(Tr-Bn)KKILKYL-NH ₂ ^d	-	≈	✗	✓	✓	

^a Les lletres minúscules són D-aminoàcids.

^b 2-Nal correspon a 3-(2-naftil)-alanina.

^c Tr-Ahx correspon a un anell d'1,2,3-triazole que incorpora un àcid 2-aminohexanoic.

^d Tr-Bn correspon a un anell d'1,2,3-triazole que incorpora un grup benzil.

^e Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que **BP100**, respectivament.

1.5.3.2 Peptidomimètics derivats de BP100

En referència als peptidomimètics derivats de **BP100**, d'una banda, Güell *et al.* van estudiar l'efecte de la incorporació d'un anell de triazole en l'esquelet d'aquest peptid. Així, es varen substituir els dipèptids Ile⁷-Leu⁸ o Leu⁸-Lys⁹ per un fragment Ile-Ψ[CH₂triazoleCO]. Els peptids

resultants, **BP135** i **BP136** (Figura 25), varen ser més estables a les proteases i menys hemolítics, però també significativament menys actius enfront *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. expansum* i *F. oxysporum* (Taula 13). Els autors van postular que aquesta pèrdua d'activitat podria venir donada pel fet que l'anell de triazole provoca restriccions estructurals que impedeixen que el pèptid adopti l'estructura secundària necessària per la seva activitat antimicrobiana.¹²⁸

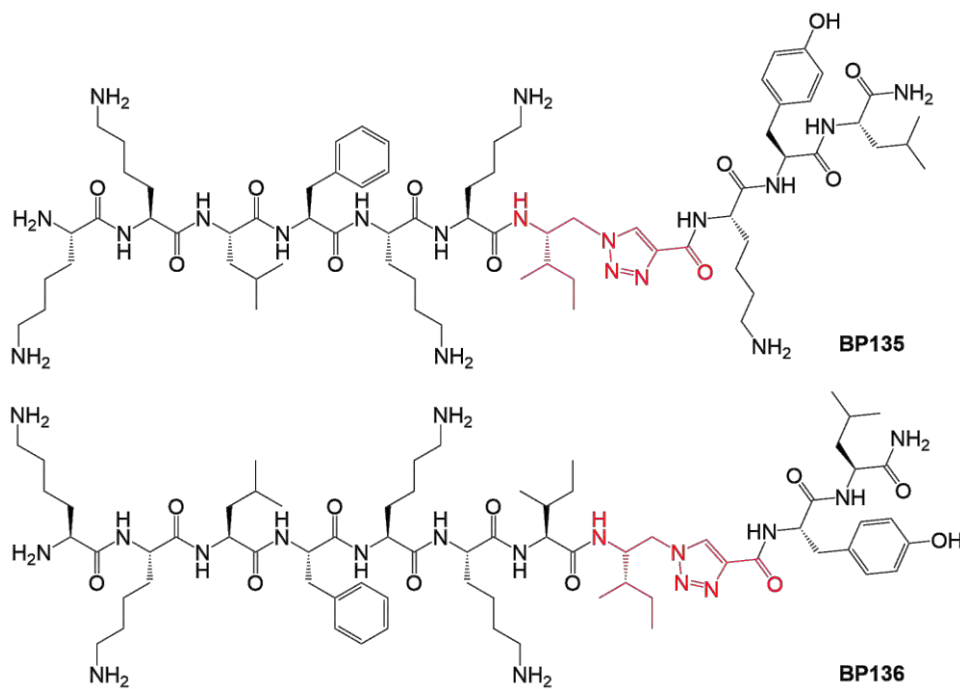


Figura 25. Estructura dels pèptids **BP135** i **BP136**. El fragment Ile-Ψ[CH₂triazoleCO] apareix remarcat en vermell.

D'altra banda, Oddo *et al.* van dissenyar i sintetitzar dos anàlegs de **BP100** incorporant un o sis residus d'N-alquilglicina. Aquests anàlegs varen presentar una pèrdua d'activitat antibacteriana en comparació a **BP100** enfront *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* i *A. baumannii* (Taula 13).¹²⁷

Taula 13. Exemples de peptidomimètics derivats de **BP100**.

Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^c			Activitat hemolítica ^c	Estabilitat	Ref.
		Grampositiu	Gramnegatiu	Fongs			
BP100	KKLFFKILKYL-NH ₂						
BP135	KKLFFKXYL-NH ₂ ^a	-	X	X	✓	✓	128
BP136	KKLFFKIXYL-NH ₂ ^a	-	X	X	✓	✓	
	KKL <u>F</u> KKILKYL-NH ₂ ^b	X	X	-	-	-	127
	KKLFFK <u>I</u> LKYL-NH ₂ ^b	X	X	-	-	-	

^a X correspon a Ile-Ψ[CH₂triazoleCO].

^b Els aminoàcids subratllats indiquen N-alquilglicines substituïdes amb les cadenes laterals dels aminoàcids corresponents.

^c Els símbols -, ✓ i X indiquen una activitat similar, millor o pitjor que **BP100**, respectivament.

1.5.3.3 Pèptids multimèrics derivats de BP100

El pèptid **BP100** i el seu derivat contenint una D-Phe, **BP143**, es varen unir a un nucli de cicloditioeritritol (cDTE) o de galactopiranosida (Galp) per tal d'obtenir pèptids multimèrics (Figura 26). Concretament, aquests pèptids multimèrics contenen 2 o 4 unitats de **BP100** o **BP143**. Varen presentar una activitat antimicrobiana més elevada que el corresponent pèptid monomèric enfront *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Lysteria monocytogenes* i *Salmonella enterica*, però no es va observar un efecte multimèric significatiu. D'altra banda, aquests pèptids multimèrics van presentar una activitat hemolítica molt més alta que **BP100** i **BP143**, que podria ser atribuïda probablement a què la seva interacció amb les membranes zwitterioniques dels eritròcits és diferent a les dels pèptids monomèrics.¹³⁰

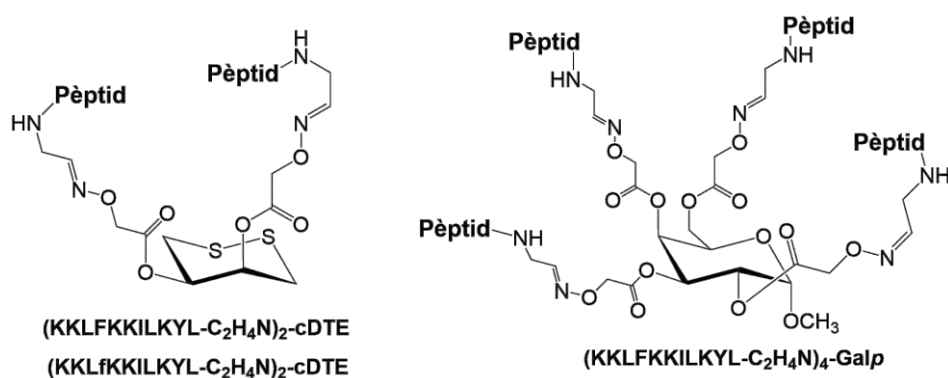


Figura 26. Estructura dels pèptids multimèrics derivats de BP100 i BP143.

1.5.3.4 Pèptids conjugats derivats de BP100

La conjugació covalent d'un pèptid amb un altre compost (inorgànic o orgànic) és una estratègia àmpliament usada per millorar l'activitat d'un pèptid (secció 1.3.5). En aquest sentit, diversos autors han descrit la conjugació de **BP100** amb compostos inorgànics o amb altres seqüències peptídiques.

1.5.3.4.1 Conjugació de **BP100** amb altres pèptids

En un estudi de Carretero *et al.* es va sintetitzar un pèptid híbrid que contenia **BP100** a l'extrem C-terminal i el tetrapèptid cíclic **ciclo(1-4)-cILC** a l'extrem N-terminal. El pèptid conjugat resultant, **cILC-BP100**, va mostrar una activitat antimicrobiana similar o lleugerament inferior a **BP100** enfront *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* però una major activitat hemolítica (Taula 14).¹²⁵

D'altra banda, amb l'objectiu de poder assolir la bioproducció de **BP100** en planta, Badosa *et al.* van dissenyar i sintetitzar pèptids conjugats. Per al disseny d'aquests pèptids es va plantejar: i) incrementar la mida del pèptid a un mínim expressable mitjançant la conjugació de diverses unitats de **BP100** o d'una unitat de **BP100** amb un fragment d'un pèptid natural com la cecropina A, la magainina o la melitina; ii) incorporar el fragment AGPA entre les diferents unitats peptídiques; iii) incorporar el fragment KDEL a l'extrem C-terminal com a senyal de retenció i

acumulació del pèptid al reticle endoplasmàtic de la cèl·lula; iv) incorporar Gly o Ser a l'extrem N-terminal com a punt de reconeixement per proteases, i v) incorporar seqüències diana a l'extrem C-terminal per a facilitar la detecció i la purificació del pèptid.¹³¹

Dels 38 pèptids resultants en van destacar **BP178** (BP100-AGPA-magainina(1-10)-KDEL-OH), **BP209** (G-BP100-AGPA-magainina(1-10)-OH), **BP210** (S-BP100-AGPA-magainina(1-10)-OH) i **BP211** (G-BP100-AGPA-magainina(4-10)-OH), que varen presentar una activitat antimicrobiana elevada enfront *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *P. syringae* pv. *syringae*, una baixa hemòlisi i una moderada fitotoxicitat. D'aquests, se'n va seleccionar **BP178** per tal d'assajar-ne la seva bioproducció en arròs transgènic. Es va obtenir una producció remarcable d'entre 0,17 i 0,41 µg de pèptid per gra d'arròs.¹³²

Taula 14. Pèptids conjugats derivats de BP100.

Codi	Pèptid	Seqüència	Activitat antimicrobiana ^b		Activitat hemolítica ^b	Ref.
			Gram positiu	Gram negatiu		
BP100		KKLFKKILKYL-NH ₂				
cILC-BP100	Ciclo-(1-4)-cILC-BP100	cLIC-KKLFKKILKYL-NH ₂ ^a	≈	≈	✗	125
BP178	BP100-AGPA-magainina(1-10)-KDEL	KKLFKKILKYL-AGPA-GIGKFLHSAK-KDEL-OH	-	≈	✓	
BP209	G-BP100-AGPA-magainina(1-10)	G-KKLFKKILKYL-AGPA-GIGKFLHSAK-OH	-	✓	✓	131
BP210	S-BP100-AGPA-magainina(1-10)	S-KKLFKKILKYL-AGPA-GIGKFLHSAK-OH	-	✓	✓	
BP211	G-BP100-AGPA-magainina(4-10)	G-KKLFKKILKYL-AGPA-KFLHSAK-OH	-	✓	✓✓	

^a Les lletres minúscules són D-aminoàcids.

^b Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que **BP100**, respectivament.

1.5.3.4.2 Conjugació de **BP100** amb compostos inorgànics

Per tal de millorar la biodisponibilitat de **BP100**, Torres *et al.* van estudiar la conjugació de **BP100** amb nanopartícules d'alúmina. Per unir el fragment peptídic i la nanopartícula varen utilitzar un enllaç amida (**NP-EAAA-BP100**), un pont disulfur (**NP-CAAA-BP100**) o un anell de triazole (**NP-[Trz-β-A¹]AAA-BP100**) (Figura 27).^{133,134}

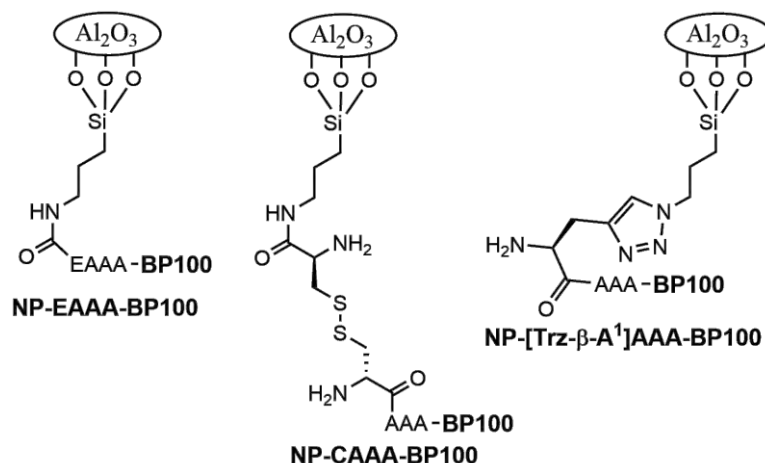


Figura 27. Nanopartícules d'alúmina que contenen BP100.

Per la formació de **NP-EAAA-BP100**, s'incorpora el tetrapèptid EAAA a l'extrem N-terminal de **BP100** i, posteriorment, el pèptid resultant s'uneix a nanopartícules d'alúmina aminofuncionalitzades per formació d'un enllaç amida amb la cadena lateral del Glu. En el cas del conjugat **NP-CAAA-BP100**, després d'incorporar el tetrapèptid CAAA a l'extrem N-terminal de **BP100**, el pèptid resultant s'uneix mitjançant un pont disulfur a nanopartícules derivatitzades amb un residu de Cys. Les nanopartícules **NP-[Trz-β-A¹]AAA-BP100** s'obtenen a través de la formació d'un anell de triazole entre un derivat de **BP100** contenint un alquini aminoàcid i nanopartícules funcionalitzades amb un grup azida.

Pel que fa a l'activitat, les nanopartícules **NP-CAAA-BP100** varen ser menys actives que **BP100** enfront els bacteris *S. aureus*, *E. coli* i *Salmonella typhimurium*. En canvi, les nanopartícules **NP-EAAA-BP100** varen mostrar uns valors de CMI més baixos i les **NP-[Trz-β-A¹]AAA-BP100** varen ser més actives que **BP100** enfront els fongs *Candida krusei* i *Candida parapsilosis*.

1.5.3.5 Lipopèptids derivats de BP100

En base als avantatges que confereix la incorporació d'una cadena hidrofòbica en un AMP, Carretero *et al.* van sintetitzar el pèptid KKLFFKILKYL-A-NH-C₁₆H₃₃ (**BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃**) que incorpora a l'extrem C-terminal de **BP100** un residu d'Ala derivatitzat com a N-hexadecil amida (Figura 28). Aquest lipopèptid va presentar una activitat antimicrobiana lleugerament inferior a **BP100** i una activitat hemolítica superior.¹²⁵

Cal esmentar que Zhang *et al.* van preparar una família de lipopèptids derivats de **BP100** amb l'extrem N-terminal acilat amb una cadena d'entre 10 i 18 carbonis. Els lipopèptids **C4** i **C5** varen mostrar activitat antitumoral (Figura 28 i secció 1.5.4.2 Taula 15).¹³⁵

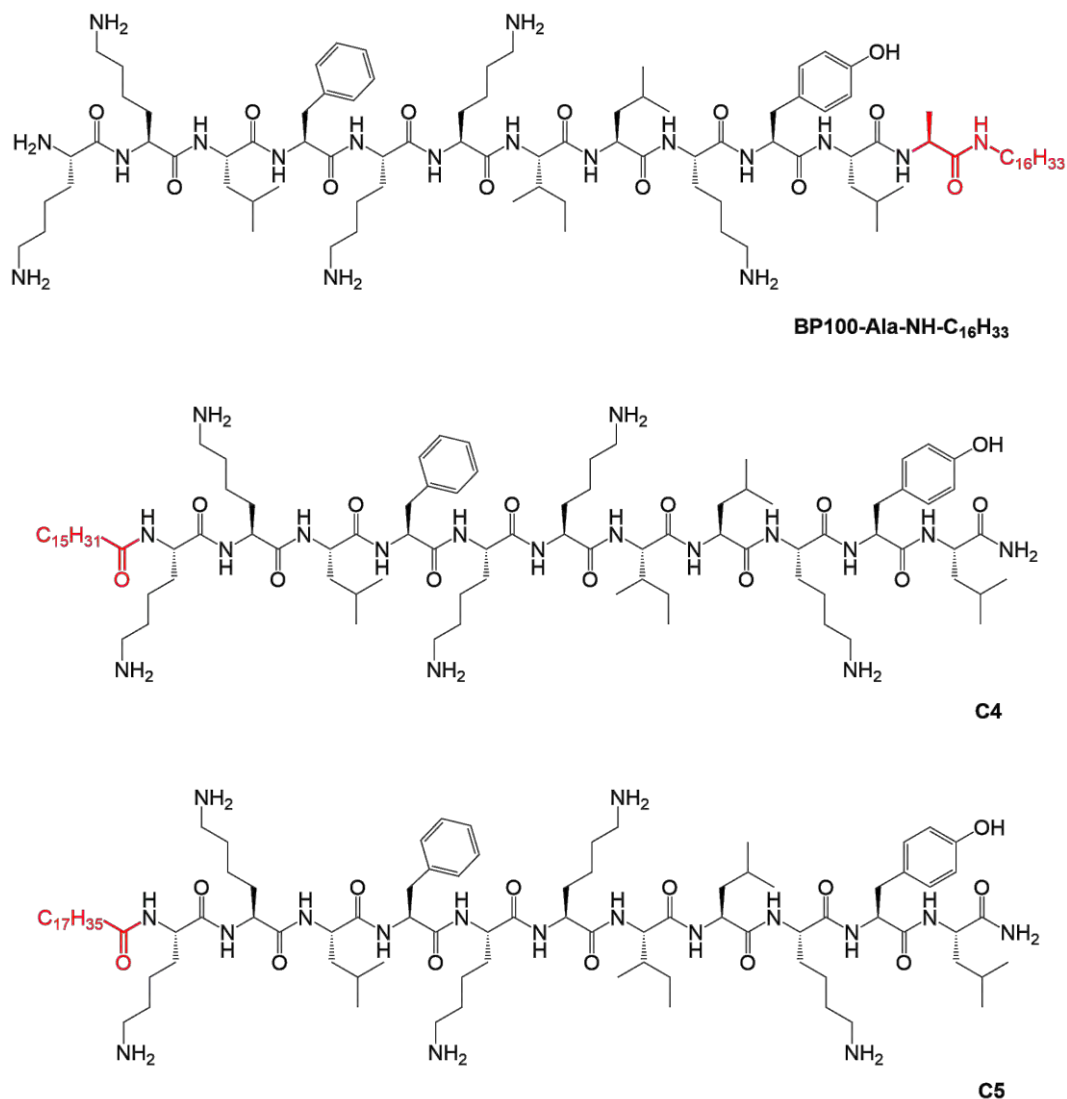


Figura 28. Estructura dels lipopèptids BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, C4 i C5, derivats de BP100.

1.5.4 Altres activitats biològiques de BP100

A més de l'activitat antimicrobiana, també s'ha estudiat l'activitat antibiofilm i antitumoral de **BP100**, així com la seva capacitat d'actuar com a pèptid penetrador de cèl·lules (CPP) o com a elicitor de defenses en plantes.

1.5.4.1 Activitat antibiofilm

Un biofilm és una colònia de bacteris encapsulats en una matriu composta de substàncies polimèriques extracel·lulars com ara polisacàrids, proteïnes, lípids i àcids nucleics. La generació d'aquest biofilm pot protegir els bacteris de l'acció d'agents externs com els antibiòtics, amb la qual cosa és interessant desenvolupar compostos capaços d'inhibir la formació de biofilm o de destruir el que ja està format. En aquest sentit, Eales *et al.* van assajar l'activitat antibiofilm de **BP100** enfront el bacteri gramnegatiu *A. baumannii*, observant-se que és capaç d'inhibir el

creixement del biofilm a concentracions pròximes a la CMI (2,8 μM) i de destruir-lo a concentracions elevades (reducció del 93% de biofilm a 2048 $\mu\text{g/ml}$).¹³⁶

1.5.4.2 Activitat antitumoral

Les cèl·lules de mamífers sanes estan compostes per fosfolípids zwitteriònics o per fosfolípids amb els grups fosfat a la part interna de la membrana, en contacte amb el citoplasma, amb la qual cosa presenten una càrrega neta neutra. En canvi, les cèl·lules tumorals solen presentar una sobreexpressió de molècules aniòniques com ara fosfatidilserina, de manera que tenen una certa càrrega negativa. Per tant, de forma similar als bacteris, els AMPs poden interaccionar electrostàticament amb les cèl·lules tumorals.

En aquest sentit, Rosés *et al.* van sintetitzar 7 pèptids conjugats resultants de la unió del γ -pèptid penetrador de cèl·lules **PEG-1** i de diferents pèptids de la quimioteca **CECMEL11**. Entre d'altres, va destacar el conjugat Ac-KKLFKKILKYL-PEG-1 (**BP101-PEG-1**), (Figura 29), que correspon a l'anàleg de **BP100** amb l'extrem N-terminal acetilat (Ac-KKLFKKILKYL-NH₂ (**BP101**)) incorporant **PEG-1** a l'extrem C-terminal. Aquest pèptid conjugat va mostrar una activitat moderada enfront càncer de mama (línia cel·lular MDA-MB-231).

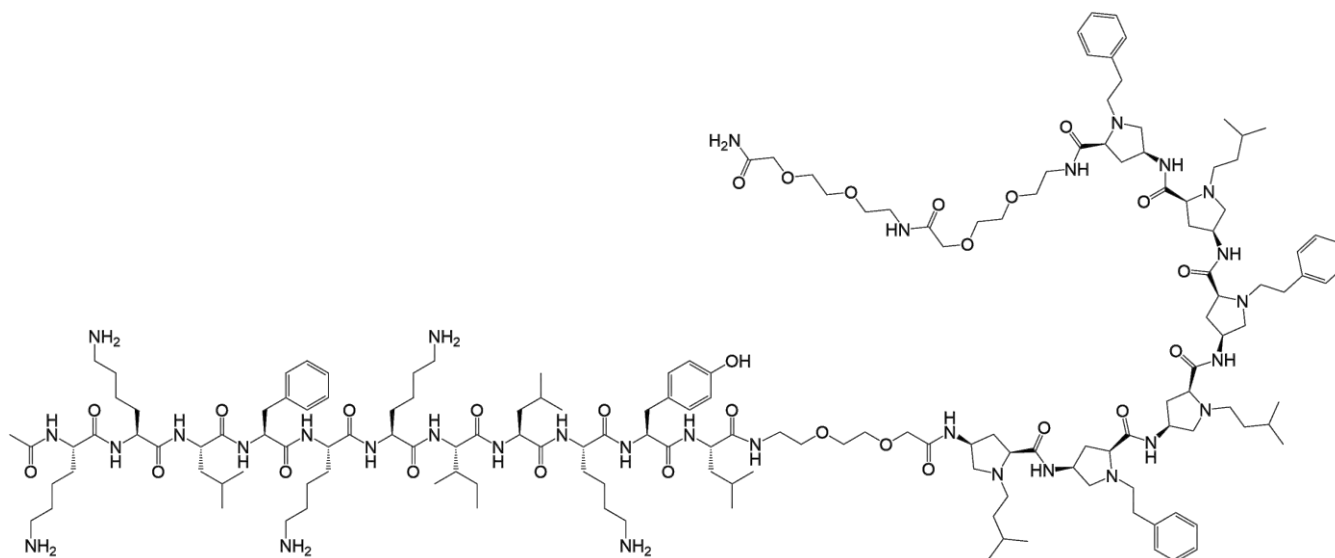


Figura 29. Estructura del pèptid conjugat **BP101-PEG-1**.

D'altra banda, Soler *et al.* van assajar **BP100**, **BP76** i altres seqüències de la quimioteca **CECMEL11** com a pèptids antitumorals. **BP100** va presentar una activitat moderada amb una IC₅₀ entre 34,3 i 62,5 μM enfront línies cel·lulars de càncer de mama (MCF-7), càncer de pàncreas (CAPAN-1) o de fibroblastoma (3T3).¹³⁷

Posteriorment, Zhang *et al.* varen preparar tres famílies de pèptids derivats de **BP100** amb activitat antitumoral. La primera família va consistir en 10 pèptids anàlegs de **BP100**, substituint la Tyr de la posició 10 per diferents aminoàcids apolars, polars, àcids o bàsics. Tots ells van resultar ser seqüències lleugerament més hemolítiques que **BP100**, però dintre d'aquesta família van destacar KKLFKKILKLL-NH₂ (**A2**) i KKLFKKILKHL-NH₂ (**A10**) per la seva activitat antitumoral

elevada.¹³⁸ La segona família va incloure 9 pèptids resultants de la truncació o l'allargament de la seqüència de **BP100** tant per l'extrem C- com N-terminal. En varen destacar LKKLFKKILKYL-NH₂ (**B4**) i LKKLFKKILKY-NH₂ (**B8**) amb una alta activitat antitumoral i una hemòlisi lleugerament superior a **BP100**.¹³⁹ Per últim, la tercera família es va basar en la incorporació d'un fragment acil d'entre 10 i 18 carbonis a l'extrem N-terminal de **BP100**. Els compostos més actius van correspondre als lipopèptids que contenen les cadenes lipídiques més llargues, de 16 i de 18 carbonis, **C4** i **C5**, respectivament (Taula 15).¹³⁵

Taula 15. Pèptids derivats de **BP100** amb activitat antitumoral.

Pèptid	Seqüència	Activitat antitumoral ^a	Activitat hemolítica ^a	Ref.
BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂			
A2	KKLFKKILKLL-NH ₂	✓	✗	138
A10	KKLFKKILKHL-NH ₂	✓	✗	
B4	LKKLFKKILKYL-NH ₂	✓	✗	139
B8	LKKLFKKILKY-NH ₂	✓	✗	
C4	C ₁₅ H ₃₁ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	✓	-	135
C5	C ₁₇ H ₃₅ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	✓	-	

^a Els símbols ≈, ✓ i ✗ indiquen una activitat similar, millor o pitjor que **BP100**, respectivament.

1.5.4.3 Capacitat d'actuar com a pèptid penetrador de cèl·lules (CPP)

Els pèptids penetradors de cèl·lules (CPPs) són pèptids curts que contenen normalment una certa càrrega neta positiva, tot i que també n'hi ha de descrits que presenten únicament aminoàcids apolars. Els CPPs faciliten la introducció de compostos a l'interior de la cèl·lula, ja siguin nanopartícules, molècules petites o fragments proteics o d'ADN. Aquests compostos solen estar units al CPP mitjançant un enllaç de tipus covalent o a través d'interaccions no covalents.¹⁴⁰

El 2011 Eggenberger *et al.* varen descriure la capacitat de **BP100** d'internalitzar-se en cèl·lules de tabac BY2 amb una gran eficiència.¹⁴¹ El mecanisme pel qual **BP100** penetra a l'interior de la cèl·lula no és ben conegut, tot i això els resultats indiquen que aquest no es dona per endocitosi. Per tal de provar la capacitat de **BP100** d'introduir compostos a l'interior de cèl·lules, Eggenberger *et al.* van preparar 2 pèptids conjugats contenint la seqüència MGVADLIKKFESISKEE (**Lifeact**) a l'extrem N- o C-terminal de **BP100** (**Lifeact-BP100**, **BP100-Lifeact**, respectivament). Van observar que, tot i que ambdós s'internalitzaven eficientment, la seva distribució a l'interior de la cèl·lula va resultar ser completament diferent. Mentre que el conjugat **BP100-Lifeact** s'acumulava a les vacuoles, **Lifeact-BP100** es localitzava pròxim a proteïnes pròpies del citoesquelet. En un estudi posterior del mateix grup, es va observar que **BP100** no és del tot innocu per la planta ja que la seva internalització va seguida d'un augment de la concentració d'espècies reactives d'oxigen en el citoplasma (Taula 16).^{141,142}

D'altra banda, Gao *et al.* van demostrar que **BP100** pot internalitzar de manera eficient subdominis peptídics de la proteïna antifúngica ginkbilobina-2 en cèl·lules de tabac. Ara bé, a diferència de **BP100**, els conjugats varen resultar ser tòxics per la planta (Taula 16).¹⁴³

Finalment, el grup de Numata va descriure en diversos estudis l'ús de **BP100** i els derivats **BP100(KH)₉**, **(KH)₉BP100**, **R₉-BP100** i **(BP100)₂K₈** com a CPPs (Taula 16). Aquests pèptids conjugats es basen en utilitzar **BP100** com a CPP i **(KH)₉**, **R₉** o **K₈** un fragment policatiónic que interacciona electroestàticament amb una molècula amb una càrrega neta negativa, formant un complex binòmic. D'aquesta manera es varen internalitzar fragments d'ADN, d'ARN o proteïnes en cèl·lules vegetals (*Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana benthamiana*)¹⁴⁴⁻¹⁵¹ i bacterianes (*E. coli*, *Rhodovulum sulfidophilum* o *Roseospira marina*).^{152,153}

Taula 16. **BP100** i pèptids derivats de **BP100** utilitzats com a CPP.

Pèptid	Molècula transportada	Objectiu	Ref.
BP100 KKLFKKILKYL-NH ₂	Fragment peptídic	Tabac (cèl·lules)	141,143
	Fragment d'ADN	<i>Arabidopsis thaliana</i> (mitocondris)	147
		<i>Nicotiana benthamiana</i> (cloroplasts)	151
R₉-BP100 RRRRRRRRR-KKLFKKILKYL-NH ₂	Fragment d'ADN	<i>Arabidopsis thaliana</i> i <i>Nicotiana benthamiana</i> (cèl·lules)	144
(KH)₉-BP100 KHKHKHKHKHKHKHKHKH-KKLFKKILKYL-NH ₂	Fragment d'ADN	<i>Escherichia coli</i>	152
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (cèl·lules)	144
	Doble cadena d'ARN	<i>Nicotiana benthamiana</i> (cèl·lules i cloroplasts)	144,151
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (fulles)	146
		<i>Nicotiana benthamiana</i> (fulles)	148
BP100-(KH)₉ KKLFKKILKYL-KHKHKHKHKHKHKHKHKH-NH ₂	Proteïnes	<i>Arabidopsis thaliana</i> (fulles)	145
	Fragment d'ADN	<i>Arabidopsis thaliana</i> (mitocondris i arrels)	147,149
		<i>Nicotiana benthamiana</i> (arrels i cloroplasts)	149,151
(BP100)₂-K₈ KKLFKKILKYL-KKLFKKILKYL-KKKKKKKK-NH ₂	Fragment d'ADN	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> i <i>Roseospira marina</i>	153
	Proteïnes	<i>Arabidopsis thaliana</i> (fulles)	145

Numata *et al.* també van descriure la formació de complexos trinòmics, formats per una unitat de CPP (**BP100** o derivats), un fragment d'ADN i una seqüència peptídica selectiva. Aquests complexos van transportar eficientment els fragments d'ADN a zones concretes de l'interior de

les cèl·lules com ara cloroplasts o mitocondries.^{147,151} D'altra banda, van demostrar que l'eficiència dels CPPs depèn de les cèl·lules a penetrar, havent-se d'optimitzar espècie a espècie.^{154,155}

1.5.4.4 Capacitat elicitora de defenses

Alguns pèptids han sigut descrits com a estimuladors del sistema immune de les plantes. Aquests pèptids promouen mecanismes relacionats amb l'alcalinització del medi, la producció d'espècies reactives d'oxigen i la sobreexpressió de certs gens. En aquest sentit, **BP100** i altres pèptids de la quimioteca **CECMEL11** es varen estudiar com a elicitors de defenses (Taula 17). D'aquests pèptids en varen destacar **BP13**, **BP100** i **BP143** que varen provocar, tot i que lleugerament, tant l'alcalinització del medi com la producció d'H₂O₂ en cèl·lules de tabac. A més, també varen induir una lleu sobreexpressió d'alguns gens relacionats amb els sistemes de defensa de plantes de tomatera.¹⁵⁶

Taula 17. Pèptids de la quimioteca **CECMEL11** estudiats com a elicitors de defenses de plantes

Pèptid	Seqüència	Ref.
BP13	FKLFKKILKVL-NH ₂	
BP14	YKLFKKILKVL-NH ₂	
BP15	KYKLFKKILKVL-NH ₂	156
BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂	
BP143	KKLfKKILKYL-NH ₂ ^a	

^a Les lletres minúscules són D-aminoàcids.

Aquesta gran versatilitat i àmplia activitat biològica de **BP100** i dels seus derivats, fan de **BP100** un pèptid *lead* ideal per a la cerca de noves seqüències amb activitat antimicrobiana que podrien ser útils per al control de malalties de plantes.

2 Objectius

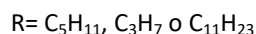
Els objectius plantejats per aquesta tesi doctoral es varen centrar en la síntesi de lipopèptids i de pèptids conjugats derivats de **BP100**, així com en la caracterització estructural de lipopèptids lineals i cíclics.

1. Disseny i síntesi de lipopèptids derivats de **BP100**

Tal com s'ha explicat a la introducció, el grup LIPPSO, en col·laboració amb el grup CIDSAV, va identificar el pèptid *lead* KKLFFKILKYL-NH₂ (**BP100**) amb activitat enfront bacteris i fongs d'interès econòmic (*E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *F. oxysporum*) amb CMI < 7,5 µM i una hemòlisi del 22% a 150 µM.

Tenint en compte que la incorporació d'una cadena d'àcid gras a un pèptid li pot proporcionar un millor perfil biològic, el primer objectiu que es va plantejar en aquesta tesi doctoral va consistir en la síntesi de lipopèptids derivats de **BP100**. Aquest objectiu es va dividir en dues parts.

En primer lloc, per tal d'avaluar la influència de la posició de la cadena d'àcid gras en l'activitat biològica, es va proposar la síntesi de seqüències contenint el grup acil a l'extrem N-terminal o a la cadena lateral d'una lisina situada a cadascuna de les posicions de la seqüència. Així mateix, amb l'objectiu d'avaluar la influència de la llargada del grup acil, es va plantejar la síntesi de lipopèptids derivats de **BP100** amb grups acil de diferent llargada.



En segon lloc, es va proposar l'optimització dels lipopèptids derivats de **BP100** amb un millor perfil d'activitat biològica per incorporació de D-aminoàcids o de residus d'His a la seqüència. Aquest estudi es va considerar perquè és conegut que la introducció d'aquest tipus de residus en un pèptid està relacionada amb una disminució de la seva activitat hemolítica.

2. Disseny i síntesi de pèptids conjugats derivats de **BP100**

El segon objectiu d'aquesta tesi va consistir en la síntesi de pèptids conjugats derivats de **BP100**.

D'una banda, es va plantejar la síntesi de pèptids híbrids per conjugació d'un lipopèptid antimicrobià derivat de **BP100** amb pèptids prèviament descrits a la bibliografia. La conjugació de dos pèptids, amb activitats biològiques semblants o diferents, per generar un pèptid híbrid és una estratègia efectiva per tal d'intentar sumar les propietats de cadascuna d'aquestes unitats.

D'altra banda, es va plantejar la síntesi de pèptids conjugats derivats de **BP100** mitjançant la unió covalent d'un antibiòtic o d'un fungicida convencional. Aquest tipus de conjugació és una aproximació descrita per aconseguir compostos més efectius. A més, les propietats de **BP100** com a CPP podrien afavorir l'activitat biològica d'aquests pesticides. Aquest objectiu va implicar la necessitat de dissenyar i sintetitzar derivats dels pesticides convencionals que poguessin ser conjugats a **BP100**, així com de desenvolupar estratègies sintètiques per assolir aquesta conjugació.

3. Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN

El tercer objectiu d'aquesta tesi va ser, d'una banda, l'anàlisi conformacional mitjançant RMN de lipopèptids derivats de **BP100** amb un millor perfil d'activitat biològica. D'altra banda, també es va plantejar la caracterització mitjançant RMN de ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines i d'un anàleg del ciclolipopèptid arilomicina A. En estudis previs, el grup LIPPSO va desenvolupar metodologies per sintetitzar aquests tipus de compostos, però la seva caracterització per RMN no havia estat possible.

3 Lipopèptids antimicrobians derivats de BP100

Ferre *et al.* varen dissenyar i sintetitzar una quimioteca de 125 undecapèptids amb estructura general $R-X^1KLFKKILKX^{10}L-NH_2$ (X^1 i X^{10} = Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr o Val; R = H, Ac, Ts, Bz o Bn). D'aquesta col·lecció es va identificar el pèptid *lead* KLFKKILKYL-NH₂ (**BP100**) amb activitat enfront bacteris i fongs d'interès econòmic (*E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *F. oxysporum*) amb CMI < 7,5 µM i una hemòlisi del 22% a 150 µM.^{114,115}

D'altra banda, és conegut que la incorporació d'una cadena d'àcid gras a un pèptid li proporciona una millor estabilitat enfront proteases i una millor activitat antimicrobiana. De fet, s'han descrit diverses famílies de lipopèptids amb una activitat biològica interessant (secció 1.4).

En base a totes aquestes consideracions, en aquesta tesi doctoral es va plantejar la síntesi de lipopèptids derivats de **BP100**. Aquest objectiu i aquest capítol es va dividir en dues parts: en la primera es va plantejar la síntesi lipopèptids derivats de **BP100** i, en la segona part, es va plantejar l'optimització d'aquests mitjançant la incorporació de D-aminoàcids o residus d'His a la seqüència.

3.1 Lipopèptids derivats de BP100 contenint L-aminoàcids

3.1.1 Disseny dels lipopèptids

En base a l'estructura de **BP100** (KLFKKILKYL-NH₂) i per tal d'avaluar la influència de la posició de la cadena d'àcid gras en l'activitat biològica, es varen dissenyar lipopèptids en els que aquesta cadena es troba a la posició N-terminal o a la cadena lateral d'una Lys que es va incorporar a cadascuna de les 11 posicions de la seqüència (Figura 30).

A més, amb l'objectiu d'avaluar la influència de la llargada del grup acil, es varen escollir els grups hexanoil, butanoil o lauroil per acilar les posicions anteriors. Aquests grups van ser seleccionats, perquè varen ser els que varen proporcionar la millor activitat biològica en estudis anteriors centrats en ciclolipodecapèptids antimicrobians (secció 1.4.2).¹⁰⁷

H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ **BP100**

RCO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys(COR)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys(COR)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Lys(COR)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COR)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COR)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COR)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COR)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COR)-Lys-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COR)-Tyr-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COR)-Leu-NH₂

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COR)-NH₂

R = C₅H₁₁, C₃H₇ o C₁₁H₂₃

Figura 30. Estructura dels lipopèptids antimicrobians derivats de BP100.

3.1.2 Síntesi dels lipopèptids

Els lipopèptids es varen sintetitzar seguint una estratègia de síntesi en fase sòlida (9-fluorenil)metoxicarbonil (Fmoc)/*tert*-butil (^tBu). La síntesi en fase sòlida de pèptids consisteix en utilitzar un suport sòlid sobre el qual tenen lloc les reaccions corresponents fins a obtenir la seqüència peptídica desitjada la qual, posteriorment, es desancora del suport. El suport sòlid ha de presentar una bona estabilitat mecànica, ser inert a les condicions utilitzades en síntesi i ser insoluble en els dissolvents utilitzats. A aquest suport se li pot unir un *linker*. El *linker* és un compost bifuncional que s'acobla, per una banda, al suport sòlid i, per l'altra, al primer aminoàcid de la seqüència peptídica. La unió del *linker* al suport ha de ser estable a les condicions de síntesi i al posterior desancorament, mentre que la unió entre el *linker* i el pèptid ha de ser, també, estable a les condicions de síntesi però ha de permetre el desancorament del pèptid del suport al final de la síntesi.^{157,158} Concretament, en aquest treball, es van utilitzar com a suport sòlid una resina 4-metilbenzihidrilamina (MBHA) que és un polímer entrecruat de poliestirè-divinilbenzè (Figura 31A), i com a *linker* l'àcid 4'-{[*R,S*]- α -[1-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacètic (Fmoc-Rink-amida) (Figura 31B).

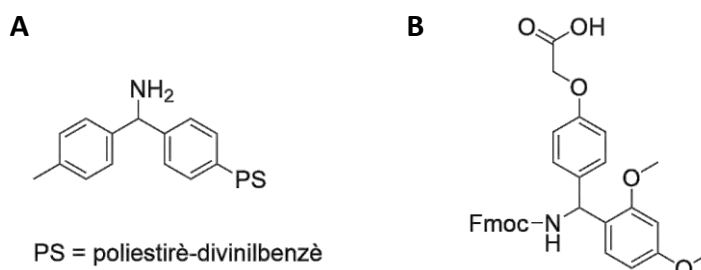
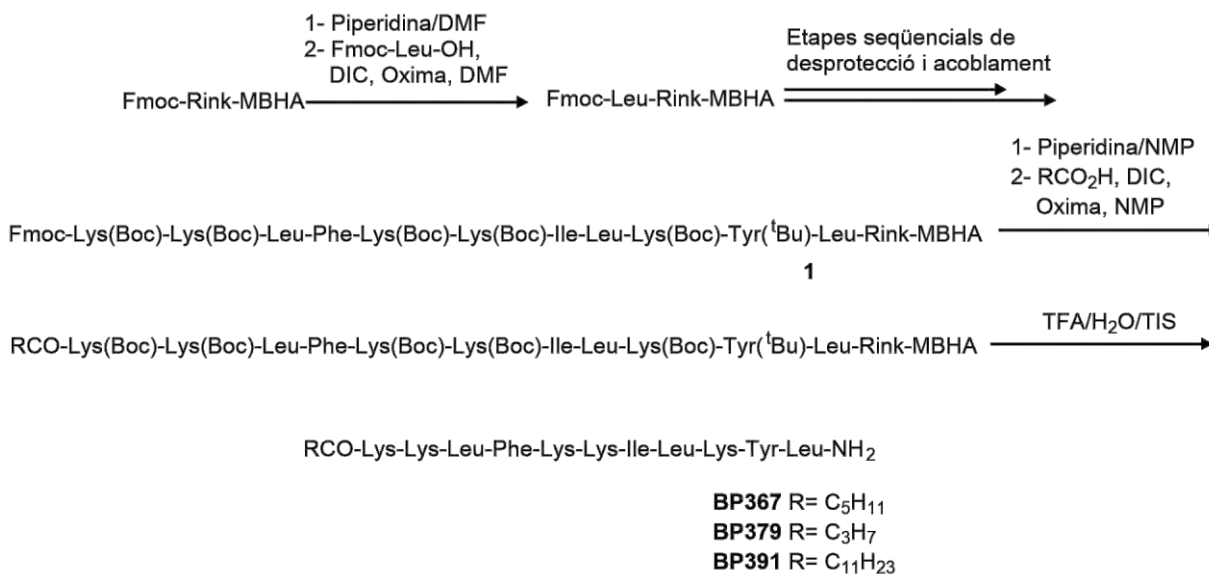


Figura 31. A, Resina MBHA; B, *linker* Fmoc-Rink-amida.

La síntesi dels lipopèptids **BP367**, **BP379** i **BP391**, amb el fragment acil a l'extrem N-terminal, va implicar: (i) la preparació de la peptidil resina **1**; (ii) l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem N-terminal i l'acilació amb l'àcid gras corresponent i (iii) el desancorament del pèptid (Esquema 1).

Així, es va partir de la resina MBHA que incorpora el *linker* Fmoc-Rink-amida. Es va eliminar el grup Fmoc mitjançant un tractament amb piperidina/*N,N*-dimetilformamida (DMF) (3:7) i, posteriorment, es va acoblar el primer aminoàcid emprant *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) com a reactiu d'acoblament, 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetat d'etil (Oxima) com a additiu i DMF com a dissolvent. Mitjançant etapes successives d'eliminació del grup Fmoc i acoblament dels aminoàcids corresponents es va obtenir la peptidil resina **1**. A continuació, aquesta peptidil resina **1** es va tractar amb piperidina/*N*-metil-2-pirrolidona (NMP) (3:7) i, posteriorment, s'hi va acoblar àcid butíric, àcid hexanoic o àcid làuric emprant DIC i Oxima en NMP durant 1 h a temperatura ambient (Esquema 1).

Finalment, les peptidil resines resultants es van tractar amb àcid trifluoroacètic (TFA)/H₂O/triisopropilsilà (TIS) (95:2,5:2,5) i els lipopèptids obtinguts es van purificar per cromatografia flash en fase reversa. Aquests lipopèptids es van analitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i es van caracteritzar per espectrometria de masses. Tots ells es van obtenir amb una puresa excel·lent >99% (Taula 18).

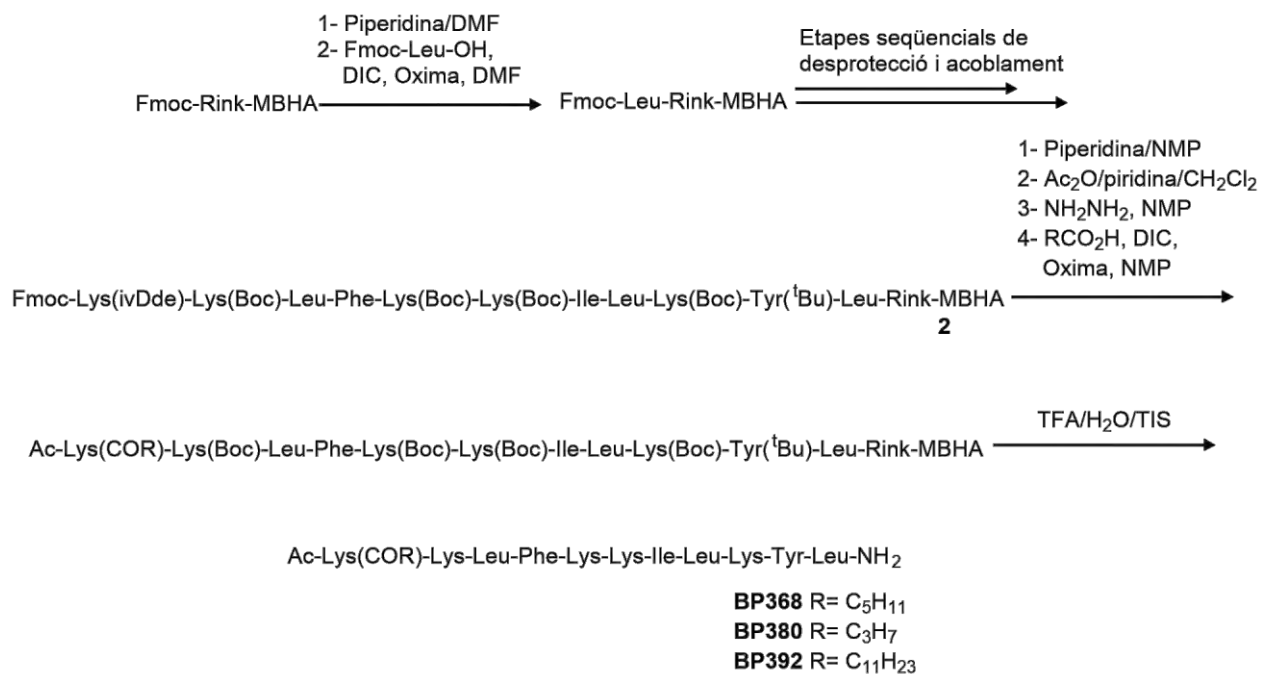


Esquema 1. Síntesi dels lipopèptids BP367, BP379 i BP391.

D'altra banda, per a la síntesi de la resta de lipopèptids, que contenen el fragment acil a la cadena lateral d'un residu de Lys, aquest aminoàcid es va incorporar amb el grup *N*^E-amino protegit amb un grup 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil (ivDde).¹⁵⁹ Es va seleccionar aquest grup, perquè és estable a les condicions d'eliminació del grup Fmoc i es pot eliminar selectivament en condicions suaus, amb hidrazina, sense afectar els altres grups protectors presents a la seqüència.

La síntesi en fase sòlida d'aquests lipopèptids s'exemplifica a l'Esquema 2 per **BP368**, **BP380** i **BP392**, que contenen el grup acil a la cadena lateral de la Lys¹. Aquesta síntesi va implicar: (i) la preparació de la peptidil resina **2** que incorpora una Lys(ivDde) a la posició 1; (ii) l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem N-terminal; (iii) l'acetilació del grup amino lliure resultant; (iv) l'eliminació selectiva del grup ivDde; (v) l'acilació del grup amino lliure resultant amb l'àcid gras corresponent i (vi) el desancorament del pèptid.

Finalment, les peptidil resines resultants es varen tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i els lipopèptids es van purificar per cromatografia flash en fase reversa. Aquests lipopèptids es van analitzar mitjançant HPLC i es van caracteritzar per espectrometria de masses. Tots ells es van obtenir amb una puresa excel·lent d'entre 92 i >99% (Taula 18).



Esquema 2. Síntesi dels lipopèptids BP368, BP380, BP392.

Taula 18. Seqüències, temps de retenció, puresa i caracterització dels lipopeptids derivats de BP100.

Pèptid	Seqüència ^a	t _R (min) ^b	Puresa (%) ^c	HRMS (ESI)		
					Calculada	Trobada
BP367	C ₅ H ₁₁ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	7,77	>99	C ₇₈ H ₁₃₇ N ₁₇ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	760,0285	760,0270
BP368	Ac-K(COC ₅ H ₁₁)KLFKKILKYL-NH ₂	7,91	>99	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	781,0338	781,0319
BP369	Ac-KK(COC ₅ H ₁₁)LFKKILKYL-NH ₂	7,53	92	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	781,0338	781,0316
BP370	Ac-KKK(COC ₅ H ₁₁)FKKILKYL-NH ₂	7,06	>99	C ₈₀ H ₁₄₀ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	788,5393	788,5380
BP371	Ac-KKLC(COC ₅ H ₁₁)KKILKYL-NH ₂	7,11	>99	C ₇₇ H ₁₄₂ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	771,5471	771,5471
BP372	Ac-KKLFK(COC ₅ H ₁₁)KILKYL-NH ₂	7,64	>99	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	781,0338	781,0336
BP373	Ac-KKLFKK(COC ₅ H ₁₁)ILKYL-NH ₂	7,94	>99	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	781,0338	781,0330
BP374	Ac-KKLFKKK(COC ₅ H ₁₁)LKYL-NH ₂	6,91	>99	C ₈₀ H ₁₄₀ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	788,5393	788,5393
BP375	Ac-KKLFKKIK(COC ₅ H ₁₁)KYL-NH ₂	7,17	>99	C ₈₀ H ₁₄₀ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	788,5393	788,5383
BP376	Ac-KKLFKKILK(COC ₅ H ₁₁)YL-NH ₂	7,48	>99	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	781,0338	781,0311
BP377	Ac-KKLFKKILKK(COC ₅ H ₁₁)L-NH ₂	7,58	>99	C ₇₇ H ₁₄₂ N ₁₈ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	763,5496	763,5486
BP378	Ac-KKLFKKILKYK(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂	6,96	>99	C ₈₀ H ₁₄₀ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	788,5393	788,5396
BP379	C ₃ H ₇ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	7,52	>99	C ₇₆ H ₁₃₃ N ₁₇ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	746,0129	746,0102
BP380	Ac-K(COC ₃ H ₇)KLFKKILKYL-NH ₂	7,79	>99	C ₇₈ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0158
BP381	Ac-KK(COC ₃ H ₇)LFKKILKYL-NH ₂	6,96	>99	C ₇₈ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0160
BP382	Ac-KKK(COC ₃ H ₇)FKKILKYL-NH ₂	6,91	>99	C ₇₈ H ₁₃₆ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	774,5236	774,5220
BP383	Ac-KKLC(COC ₃ H ₇)KKILKYL-NH ₂	6,41	>99	C ₇₅ H ₁₃₈ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	757,5314	757,5312
BP384	Ac-KKLFK(COC ₃ H ₇)KILKYL-NH ₂	6,91	>99	C ₇₈ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0158
BP385	Ac-KKLFKK(COC ₃ H ₇)ILKYL-NH ₂	7,02	>99	C ₇₈ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0189
BP386	Ac-KKLFKKK(COC ₃ H ₇)LKYL-NH ₂	6,25	>99	C ₇₈ H ₁₃₆ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	774,5236	774,5234
BP387	Ac-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂	6,49	>99	C ₇₈ H ₁₃₇ N ₁₈ O ₁₄ [M + 3H] ³⁺	516,6848	516,6839
BP388	Ac-KKLFKKILK(COC ₃ H ₇)YL-NH ₂	6,80	>99	C ₇₈ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0160
BP389	Ac-KKLFKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂	6,73	>99	C ₇₅ H ₁₃₈ N ₁₈ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	749,5340	749,5328
BP390	Ac-KKLFKKILKYK(COC ₃ H ₇)-NH ₂	6,27	>99	C ₇₈ H ₁₃₆ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	774,5236	774,5216
BP391	C ₁₁ H ₂₃ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	8,06	>99	C ₈₄ H ₁₄₉ N ₁₇ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	802,0755	802,0738
BP392	Ac-K(COC ₁₁ H ₂₃)KLFKKILKYL-NH ₂	8,25	>99	C ₈₆ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	823,0808	823,0808
BP393	Ac-KK(COC ₁₁ H ₂₃)LFKKILKYL-NH ₂	7,68	>99	C ₈₆ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	823,0808	823,0789
BP394	Ac-KKK(COC ₁₁ H ₂₃)FKKILKYL-NH ₂	7,32	97	C ₈₆ H ₁₅₂ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5847
BP395	Ac-KKLC(COC ₁₁ H ₂₃)KKILKYL-NH ₂	7,39	>99	C ₈₃ H ₁₅₄ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	813,5940	813,5911
BP396	Ac-KKLFK(COC ₁₁ H ₂₃)KILKYL-NH ₂	7,76	>99	C ₈₆ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	823,0808	823,0791
BP397	Ac-KKLFKK(COC ₁₁ H ₂₃)ILKYL-NH ₂	8,10	97	C ₈₆ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	823,0808	823,0806
BP398	Ac-KKLFKKK(COC ₁₁ H ₂₃)LKYL-NH ₂	7,26	>99	C ₈₆ H ₁₅₂ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5852
BP399	Ac-KKLFKKIK(COC ₁₁ H ₂₃)KYL-NH ₂	7,38	>99	C ₈₆ H ₁₅₂ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5847
BP400	Ac-KKLFKKILK(COC ₁₁ H ₂₃)YL-NH ₂	7,60	>99	C ₈₆ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	823,0808	823,0796
BP401	Ac-KKLFKKILKK(COC ₁₁ H ₂₃)L-NH ₂	7,77	>99	C ₈₃ H ₁₅₄ N ₁₈ O ₁₃ [M + 2H] ²⁺	805,5966	805,5955
BP402	Ac-KKLFKKILKYK(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂	7,29	99	C ₈₆ H ₁₅₂ N ₁₈ O ₁₄ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5866

^a COC₃H₇, butanoil; COC₅H₁₁, hexanoil; COC₁₁H₂₃, lauroil^b Temps de retenció per HPLC^c Percentatge determinat mitjançant HPLC a 220 nm després de la purificació

3.1.3 Activitat biològica dels lipopeptids

Els 36 lipopeptids resultants es varen assajar enfront 8 fitopatògens bacterians i fúngics. A més, es va analitzar la seva activitat hemolítica, el seu efecte en fulles de tabac i la seva capacitat d'inducció de defenses en tomatera. Tots aquests assajos es varen realitzar en el grup CIDSAV de la UdG. Paral·lelament, també es va estudiar la seva estabilitat enfront la degradació proteolítica.

3.1.3.1 Activitat antimicrobiana

L'activitat antimicrobiana *in vitro* dels lipopeptids es va analitzar enfront els bacteris *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae*, i els fongs *F. oxysporum* i *P. expansum* a 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,2, 12,5 i 25 µM (Figura 32).

Els lipopeptids varen mostrar una activitat antimicrobiana elevada. De fet, 19 de les 36 seqüències varen presentar una CMI <12,5 µM enfront tots els patògens analitzats. A més, es va observar que tant els fongs com els bacteris presentaven diferent sensibilitat als lipopeptids i que aquesta depenia de la llargada de l'àcid gras. Aquesta influència de la llargada de l'àcid gras en l'activitat antimicrobiana ja ha estat descrita en diferents estudis presents a la bibliografia.^{93,98,100,101,103,106,160-162} S'ha demostrat que, en general, la presència d'un grup acil d'entre 8 i 16 carbonis confereix una activitat antimicrobiana elevada. Tanmateix, estudis realitzats per Vilà *et al.* o Kihara *et al.* varen revelar que la incorporació d'una cadena hidrofòbica llarga provocava una disminució de l'activitat. Concretament, els lipopeptids més actius varen ser els que contenien un grup acil entre 4 i 9 carbonis.^{100,106} De forma similar, en el present treball, els lipopeptids que contenen un grup butanoil o hexanoil van ser els més actius enfront tots els patògens analitzats.

L'anàlisi de l'activitat antibacteriana va mostrar que els bacteris del gènere *Xanthomonas* (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae* i *X. arboricola* pv. *pruni*) varen ser els més sensibles a aquests compostos. De fet, excepte **BP386**, els 35 lipopeptids restants varen mostrar una CMI <12,5 µM. D'aquests, 14 lipopeptids varen presentar una CMI entre 0,7 i 3,1 µM enfront dos d'aquests tres bacteris, sent els lipopeptids amb un grup butanoil o lauroil els més actius. En el cas de *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae*, 29 i 31 seqüències varen mostren una CMI <12,5 µM respectivament, i 12 lipopeptids una CMI entre 3,1 i 6,2 µM enfront ambdós bacteris. A diferència dels bacteris del gènere *Xanthomonas*, en general, els lipopeptids més actius varen ser els que contenen un grup hexanoil. *E. amylovora* va resultar ser el bacteri menys sensible. Concretament, 24 lipopeptids varen mostrar una CMI <12,5 µM, 17 dels quals varen presentar una CMI entre 3,1 i 6,2 µM. Contra aquest bacteri, els lipopeptids més actius varen ser els que incorporaven un grup butanoil o hexanoil.

D'altra banda, l'activitat antifúngica dels lipopeptids va resultar ser considerablement més elevada enfront *F. oxysporum* que enfront *P. expansum*, amb 34 i 20 seqüències amb una CMI <12,5 µM, respectivament. Concretament, enfront *F. oxysporum*, 23 lipopeptids varen mostrar una CMI <3,1 µM i, d'aquests, 4 una CMI entre 0,4 i 0,8 µM. En el cas de *P. expansum*, 11 de les seqüències varen presentar una CMI <6,2 µM. En general, els lipopeptids amb un grup hexanoil varen resultar ser els més actius enfront aquests dos fongs i, en canvi, els que contenen un grup lauroil varen presentar les CMIs més elevades. En general, els lipopeptids **BP367**, **BP379** i **BP391**, que contenen l'extrem N-terminal acilat varen ser lleugerament menys actius que els lipopeptids

que contenen el fragment acil a la cadena lateral d'una Lys i l'extrem N-terminal acetilat. Entre aquests darrers destaquen **BP368**, **BP369**, **BP373**, **BP375**, **BP376** i **BP381**.

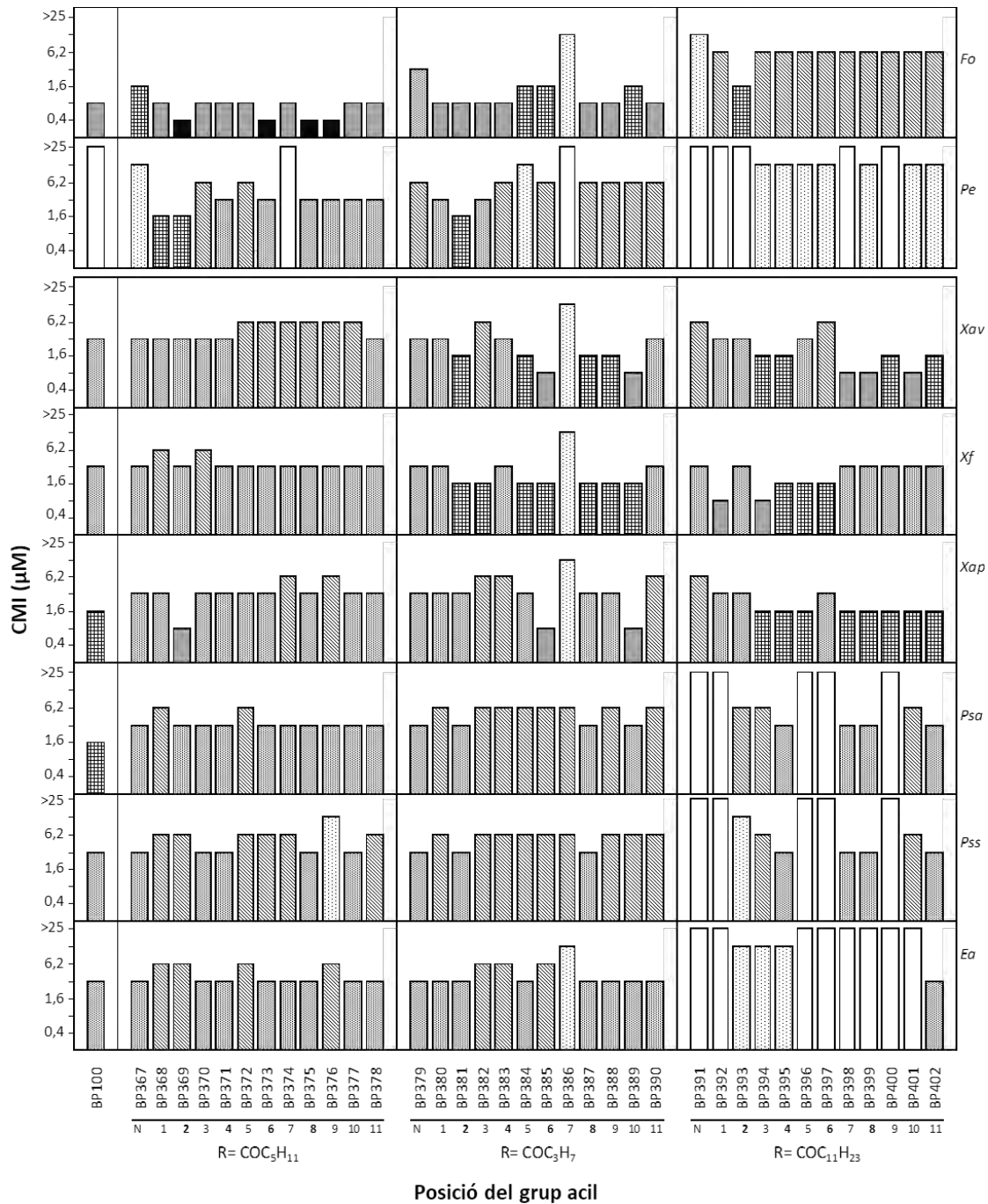


Figura 32. CMI dels lipopèptids BP367-BP402 enfront els bacteris *E. amylovora* (Ea), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *X. fragariae* (Xf), *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap), *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) i *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa) i els fongs *F. oxysporum* (Fo) i *P. expansum* (Pe). S'indica el valor més baix de la CMI. La posició de l'àcid gras a l'extrem N-terminal s'indica amb una N i la posició de la lisina acilada amb els números 1-11. El tipus de grup acil es representa com a R= COC₅H₁₁ (hexanoil), R= COC₃H₇ (butanoil) i R= COC₁₁H₂₃ (lauroil). S'inclou BP100 com a comparació.

A més de la llargada de la cadena, en aquest estudi es va observar que la posició de la cadena d'àcid gras també influeix en l'activitat antimicrobiana dels lipopèptids. Així, els millors lipopèptids enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *X. fragariae* varen resultar ser els que contenen el grup acil a les posicions 2, 8 o 10, mentre que els més actius enfront les espècies de *Pseudomonas* i *E. amylovora* varen ser els que contenen el grup acil a les posicions 8 i 11, respectivament. En canvi, no es va observar una relació clara entre la posició del grup acil i l'activitat antifúngica, tot i que sí que es va observar que, en general, els lipopèptids acilats a la posició 7 varen presentar una menor activitat.

3.1.3.2 Activitat hemolítica

La toxicitat dels lipopèptids enfront cèl·lules eucariotes es va avaluar determinant la seva activitat hemolítica, és a dir, la seva capacitat de lisar eritròcits. Aquestes cèl·lules s'utilitzen habitualment com a model de cèl·lules animals. En aquest estudi es va utilitzar com a referència la melitina que és un pèptid descrit com a molt hemolític i es va incloure **BP100** a l'assaig per a poder-ne comparar els resultats (Figura 33). Els lipopèptids es varen assajar a 50, 150, 250 i 375 μM .

En general, la incorporació d'una cadena hidrofòbica en un pèptid està relacionada amb un augment de la seva hemòlisi. Els resultats obtinguts segueixen aquesta tendència general. Així, els lipopèptids que contenen un grup lauroil a la seva seqüència varen resultar ser els més hemolítics, amb una hemòlisi del 100% a 250 μM . D'altra banda, la incorporació d'un grup butanoil o hexanoil va resultar en lipopèptids menys hemolítics, essent els que contenen un grup butanoil els que varen presentar, en general, valors d'hemòlisi més baixos. Concretament, 6 seqüències varen mostrar una hemòlisi <50% a 250 μM .

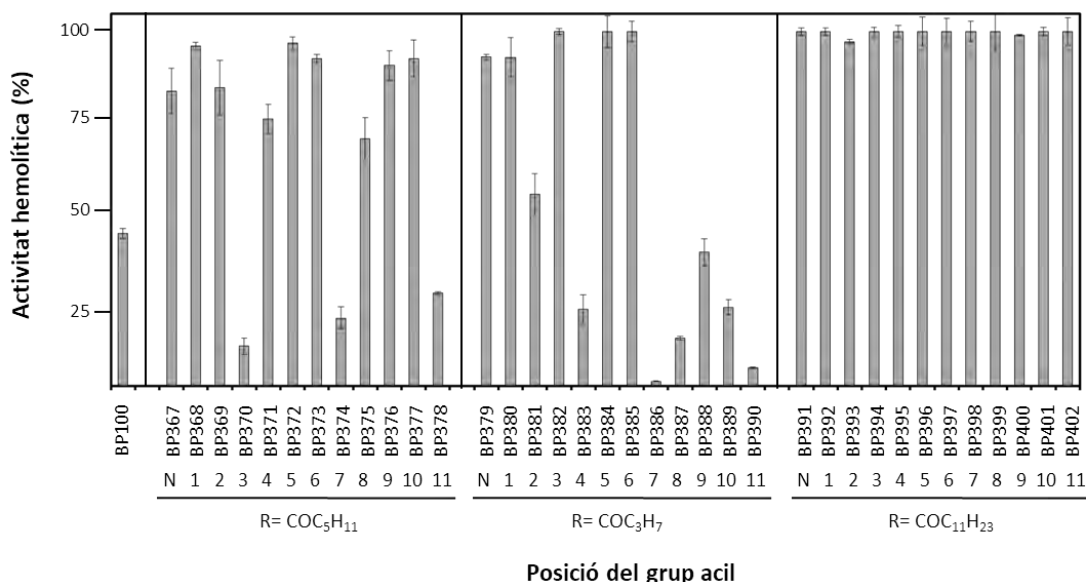


Figura 33. Activitat hemolítica dels lipopèptids BP367-BP402 a 250 μM . Les barres verticals en cada columna indiquen l'interval de confiança. La posició de l'àcid gras a l'extrem N-terminal s'indica amb una N i la posició de la lisina acilada amb els números 1-11. El tipus de grup acil es representa com a R = COC₅H₁₁ (hexanoil), R = COC₃H₇ (butanoil) i R = COC₁₁H₂₃ (lauroil). S'inclou **BP100** com a comparació.

Tenint en compte l'estructura amfipàtica de **BP100** (Figura 34) i els resultats anteriors, es dedueix que quan es substitueix un dels aminoàcids de la cara apolar (posició 3, 4, 7, 8, 10 i 11) per una lisina acilada amb butanoïl o hexanoïl, l'activitat hemolítica dels lipopèptids resultants és, en general, menor que la de **BP100**. En canvi, quan s'introdueix una lisina d'aquest tipus a la cara polar (posició N-terminal, 1, 2, 5, 6 i 9), s'obtenen lipopèptids més hemolítics que **BP100**. En el cas d'incorporar una lisina derivatitzada amb un grup lauroïl a qualsevol de les cares de **BP100**, l'activitat hemolítica dels lipopèptids obtinguts sempre és pròxima al 100% a 250 μ M. Aquest fet podria ser degut a que, mentre que els lipopèptids resultants d'incorporar la lisina acilada a la cara apolar, la càrrega neta del pèptid disminueix de +6 a +5 a causa de l'acetilació de l'extrem N-terminal, pels lipopèptids en que la lisina acilada s'incorpora a la cara polar del pèptid, la càrrega es veu reduïda a +4 (o +5 per **BP367**, **BP379** i **BP391**, amb el grup acil a l'extrem N-terminal) alhora que s'augmenten els grups hidrofòbics presents a l'estructura del pèptid. A més, es va realitzar un estudi similar, relacionant l'activitat antimicrobiana dels lipopèptids i la cara on s'introdueix la lisina acilada, però no es va observar una tendència clara.

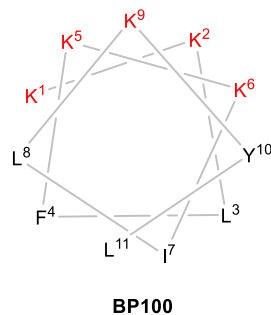


Figura 34. Projecció d'Edmunson de l'estructura de **BP100**. Els aminoàcids polars es troben representats en vermell i els hidrofòbics en negre.

3.1.3.3 Efecte dels lipopèptids en fulles de tabac

Per tal d'analitzar l'efecte dels lipopèptids en un sistema vegetal model es va avaluar la toxicitat dels lipopèptids derivats de **BP100** en ser infiltrats en fulles de tabac (Figura 35). Aquests lipopèptids es varen assajar a 50, 150 i 250 μ M. A l'assaig també s'hi varen incloure **BP100**, per motius comparatius, i la melitina, com a control positiu. Després de l'assaig es va mesurar el diàmetre de l'àrea necròtica produïda.

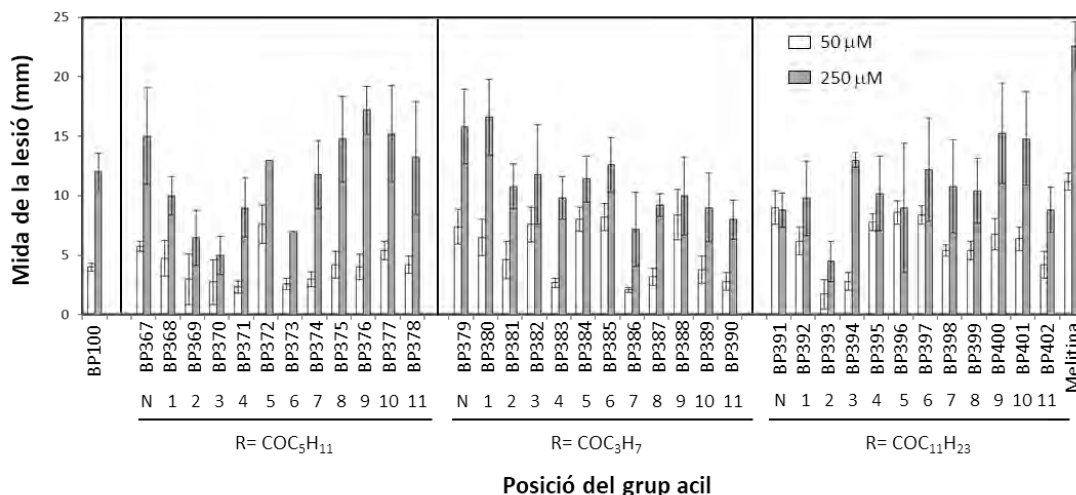


Figura 35. Efecte dels lipopeptids BP367-BP402 en fulles de tabac a 50 i 250 µM. Les barres verticals en cada columna indiquen l'interval de confiança. La posició de l'àcid gras a l'extrem N-terminal s'indica amb una N i la posició de la lisina acilada amb els números 1-11. El tipus de grup acil es representa com a R= CO₅H₁₁ (hexanoïl), R= CO₃H₇ (butanoïl) i R= CO₁₁H₂₃ (lauròil). S'inclou **BP100** com a comparació.

Tots els lipopeptids varen causar l'aparició d'una àrea necròtica inferior a la de la melitina (11 i 23 mm a 50 i 250 µM, respectivament) a concentracions entre 16 i 80 vegades més elevades que la CMI. Concretament, a 50 µM, tots els lipopeptids varen provocar una lesió inferior a 9 mm i 22 d'ells una lesió inferior a 6 mm. A més, 16 lipopeptids varen produir una àrea necròtica inferior a 10 mm a 250 µM. També es pot destacar que 24 dels 36 lipopeptids varen presentar una fitotoxicitat igual o inferior a **BP100** a 250 µM. De tota manera, no s'observa una relació clara entre la fitotoxicitat i la llargada o la posició de l'àcid gras.

3.1.3.4 Efecte dels lipopeptids en la inducció de defenses en tomatera

Alguns lipopeptids han sigut descrits com a estimuladors del sistema immune de les plantes, amb la qual cosa, no només actuen directament enfront dels patògens, sinó que també actuen de forma indirecta, estimulants la resposta sistèmica de defensa de la pròpia planta hoste.¹⁰⁴

La capacitat dels lipopeptids derivats de **BP100** d'induir les defenses de les plantes es va determinar a partir de l'anàlisi de la sobreexpressió de gens relacionats amb les defenses de plantes de tomatera (Taula 19). Es varen seleccionar 9 lipopeptids que presentaven una elevada activitat antimicrobiana i diferents percentatges d'hemòlisi. A l'anàlisi s'hi varen incloure flagelina 15 (**fig 15**), àcid jasmònic (JA) i acibenzolar-*S*-metil (ASM) com a controls positius, i també **BP100** per a comparar els resultats.⁴⁹

Els resultats varen mostrar que els controls positius sobreexpressaven clarament la majoria de gens analitzats (Taula 19). **BP100** va sobreexpressar els gens *PPO* i *PinII*. Pel que fa als lipopeptids, en general, varen sobreexpressar pocs dels gens estudiats. Concretament, dels 11 gens analitzats, 6 no varen ser sobreexpressats per cap dels lipopeptids i 5 únicament per 2 o 3 lipopeptids cadascun. Així, **BP381**, **BP385**, **BP390** i **BP400** varen sobreexpressar *Osm2*, *Tas14* o *BCB*; **BP389**, *PinII* i *BCB*; i **BP378**, *PinII*, *Osm2* i *Tas14*. Aquest resultat suggereix que la incorporació d'un grup

acil en **BP100** no afecta la sobreexpressió de gens relacionats amb defenses de plantes ja que els lipopèptids presenten un efecte similar a **BP100**. Aquest comportament contrasta amb la capacitat d'inducció de defenses d'altres lipopèptids descrits a la literatura. Per exemple, Brotman *et al.*, en un estudi amb lipopèptids ultracurts, va descriure els lipopèptids $C_{15}H_{31}CO-KKKK-NH_2$ (**C16-KKKK**) i $C_{15}H_{31}CO-KLLK-NH_2$ (**C16-KLLK**) com a inductors de defenses en cogombrera i *Arabidopsis thaliana*.¹⁰⁴

Taula 19. Expressió de gens relacionats amb la inducció de defenses en plantes de tomatera.^a

Gens	Productes de referència ^b			Pèptids ^c									
	flg15	JA	ASM	BP100	BP371	BP374	BP378	BP381	BP385	BP387	BP389	BP390	BP400
<i>Harp</i>	3,3	1,9	6,3	0,5	0,9	0,9	1,2	0,7	2,3	1,2	0,9	0,5	1,4
<i>PR1a</i>	30,4	2,9	4,8	2	0,7	0,5	2,0	0,2	3,2	0,4	0,3	0,2	0,1
<i>GluA</i>	12,7	0,2	5,9	1,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,3	0,6	0,1
<i>PPO</i>	4,3	>50	2,9	3,2	0,6	0,7	1,7	1,3	1,7	1,3	0,5	0,9	1,4
<i>LOX</i>	1,6	9,7	3,3	1,2	1,1	1,9	1,5	0,8	1,1	0,7	1,2	1,2	1,1
<i>PinII</i>	5,2	>50	0,5	4,9	1,7	1,7	5,8	0,4	7,1	0,9	2,8	0,2	1,1
<i>Sub1</i>	12,3	3,9	11,6	1,8	0,8	0,8	0,9	0,5	1,0	0,8	0,5	0,7	0,5
<i>ERT3</i>	3,6	41,3	2,9	1,0	0,9	2,0	1,0	0,7	0,2	0,2	0,1	0,7	0,2
<i>BPC</i>	11,3	6,6	12,1	0,8	1,0	1,0	1,3	1,2	4,2	1,7	2,1	0,6	0,6
<i>Osm2</i>	11,3	48,4	8,7	1,0	0,9	1,6	2,9	2,1	1,2	1,0	1,0	3,0	0,9
<i>Tas14</i>	2,3	0,88	10,7	1,4	0,7	1,2	3,5	3,4	0,7	1,0	0,7	1,0	8,3

^a Un valor superior a 2 és indicatiu de sobreexpressió. Els valors significatius estan en negreta.

^b Els productes de referència es varen assajar a 125 µM (**flg15**), 2,5 mM (JA) i 300 mg/L (ASM).

^c Els pèptids es varen testar a 125 µM.

3.1.3.5 Estabilitat dels lipopèptids a la degradació per proteases

La degradació del pèptids per part de proteases en redueix la biodisponibilitat, amb la qual cosa, és interessant conèixer l'estabilitat dels pèptids enfront aquests enzims. L'estabilitat dels lipopèptids a la degradació per proteases es va analitzar utilitzant proteïnasa K. Es varen seleccionar 16 lipopèptids amb activitat antimicrobiana i que presentaven un grup hexanoïl o butanoïl a diferents posicions. L'assaig es va realitzar tractant cadascun dels lipopèptids amb proteïnasa K durant 60 min a temperatura ambient i la degradació es va monitoritzar mitjançant HPLC (Figura 36). Es va incloure **BP100** per a poder comparar.

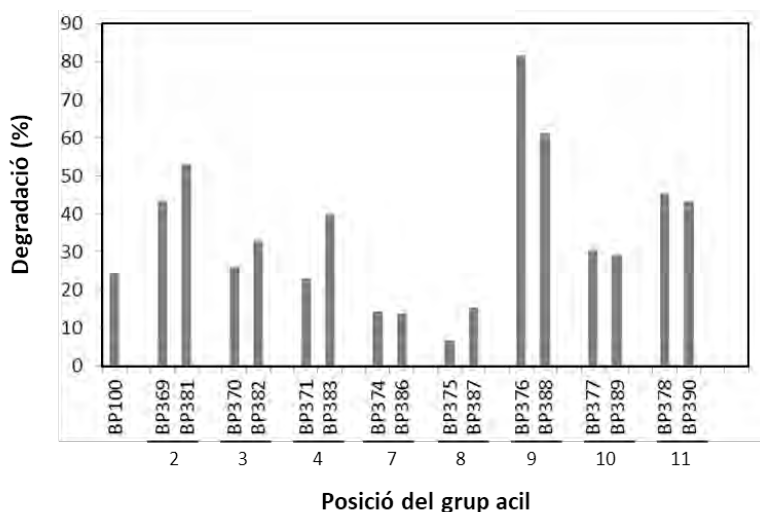


Figura 36. Percentatge de degradació de BP100 i dels lipopèptids seleccionats enfront proteïnasa K.

Es va observar que 6 dels 16 lipopèptids seleccionats van mostrar una estabilitat enfront proteïnasa K similar a **BP100** (23-33% de degradació) i 4 van resultar més estables (7-15 % de degradació). Els lipopèptids més estables a la degradació per proteïnasa K varen ser els que incorporen la lisina acilada a la posició 7 o 8, mentre que, els menys estables la contenen a la posició 9. A més, no s'observa una tendència clara entre l'estabilitat i l'àcid gras incorporat a la seqüència.

3.1.3.6 Lipopèptids derivats de BP100 contenen L-aminoàcids amb un millor perfil biològic

Els resultats d'activitat mostren que els lipopèptids derivats de **BP100** contenen L-aminoàcids amb un millor perfil van ser **BP370**, **BP378**, **BP381**, **BP387** i **BP389**, que incorporen un grup butanoil o hexanoil. Aquests lipopèptids van mostrar una CMI entre 0,8 i 12,5 μ M enfront tots els patògens testats i van presentar una activitat hemolítica i fitotòxica baixa. A més, **BP378** va induir la sobreexpressió de 3 gens relacionats amb la defensa sistèmica en tomatera. **BP381** i **BP387** van ser més actius que el pèptid de partida **BP100** enfront *X. fragariae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *P. expansum*. **BP387**, també va ser més estable que **BP100** enfront proteïnasa K. Pel que fa a **BP389**, aquest lipopèptid va presentar una activitat major que **BP100** enfront les tres espècies de *Xanthomonas* i enfront *P. expansum*, i una estabilitat a la degradació per proteases similar.

3.2 Lipopèptids derivats de BP100 contenint D-aminoàcids o una histidina

3.2.1 Disseny i síntesi dels lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His

Tal com s'ha comentat a la introducció, la incorporació de D-aminoàcids està directament relacionada amb un descens de l'activitat hemolítica, mentre que es manté l'activitat antimicrobiana. De fet, Güell *et al.* varen estudiar la incorporació de D-aminoàcids en la seqüència de **BP100**. D'entre els diferents pèptids sintetitzats en va destacar KKLfKKILKYL-NH₂ (**BP143**), que conté una D-Phe a la posició 4 i que va presentar una activitat antimicrobiana similar a **BP100**, però una menor hemòlisi.^{82-85,129}

D'altra banda, Ng-Choi *et al.* va estudiar l'efecte de la substitució de residus de Phe per residus d'His en pèptids de la família **CECMEL11**, observant que la presència de l'anell d'imidazole de la His enlloc de l'anell de benzè de la Phe, tot i que no millorava l'activitat antimicrobiana, reduïa l'activitat hemolítica.¹⁶³

Els 36 lipopèptids derivats de **BP100** preparats en aquest treball, **BP367-BP402**, varen mostrar una activitat antimicrobiana elevada però 27 de les seqüències varen presentar una hemòlisi >50% a 250 µM. Per això, en base a les observacions anteriors, en aquesta tesi doctoral es va plantejar estudiar la incorporació de D-aminoàcids o d'una His en 18 lipopèptids seleccionats d'entre els descrits a l'apartat anterior. Per a la selecció d'aquests lipopèptids es va tenir en compte que tots ells presentessin una activitat antimicrobiana elevada i diferents graus d'hemòlisi. Es van escollir 4 lipopèptids amb un grup hexanoïl, 8 amb un grup butanoïl i 6 amb un grup lauroïl. En tots ells es va incorporar un D-aminoàcid a la posició 4, emulant el pèptid derivat de **BP100**, **BP143**. A més, es van dissenyar els lipopèptids **BP501** i **BP502**, derivats de **BP384** i **BP389**, en els que es va substituir el residu de Phe⁴ per una His. Per últim, es va sintetitzar el lipopèptid **BP503**, derivat de **BP384** incorporant 2 D-aminoàcids, una D-Phe a la posició 4 i una D-lisina acilada (Taula 20).

Taula 20. Lipopèptids derivats de BP100 contenint L-aminoàcids i els seus anàlegs contenint D-aminoàcids o una His.

Lipopèptids contenint L-aminoàcids			Lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His		
Pèptid	Seqüència ^a	Codi	Pèptid	Seqüència ^a	Codi
BP367	C ₅ H ₁₁ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	C ₅ H ₁₁ CO-F ⁴	BP472	C ₅ H ₁₁ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	C ₅ H ₁₁ CO-D-F ⁴
BP371	Ac-KKlK(COC ₅ H ₁₁)KKILKYL-NH ₂	K ⁴ (COC ₅ H ₁₁)	BP484	Ac-KKlK(COC ₅ H ₁₁)KKILKYL-NH ₂	D-K ⁴ (COC ₅ H ₁₁)
BP374	Ac-KKlFKKK(COC ₅ H ₁₁)LKYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁷ (COC ₅ H ₁₁)	BP494	Ac-KKlFKKK(COC ₅ H ₁₁)LKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁷ (COC ₅ H ₁₁)
BP378	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂	F ⁴ -K ¹¹ (COC ₅ H ₁₁)	BP495	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂	D-F ⁴ -K ¹¹ (COC ₅ H ₁₁)
BP379	C ₃ H ₇ CO-KKLFKKILKYL-NH ₂	C ₃ H ₇ CO-F ⁴	BP485	C ₃ H ₇ CO-KKlFKKILKYL-NH ₂	C ₃ H ₇ CO-D-F ⁴
BP381	Ac-KK(COC ₃ H ₇)LFKILKYL-NH ₂	F ⁴ -K ² (COC ₃ H ₇)	BP486	Ac-KK(COC ₃ H ₇)LfkKILKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ² (COC ₃ H ₇)
BP384	Ac-KKlFK(COC ₃ H ₇)KILKYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁵ (COC ₃ H ₇)	BP498	Ac-KKlFK(COC ₃ H ₇)KILKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁵ (COC ₃ H ₇)
BP385	Ac-KKlFKK(COC ₃ H ₇)ILKYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁶ (COC ₃ H ₇)	BP502	Ac-KKlHK(COC ₃ H ₇)KILKYL-NH ₂	H ⁴ -K ⁵ (COC ₃ H ₇)
BP387	Ac-KKlFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁸ (COC ₃ H ₇)	BP503	Ac-KKlfk(COC ₃ H ₇)KILKYL-NH ₂	D-F ⁴ -D-K ⁵ (COC ₃ H ₇)
BP388	Ac-KKlFKKILK(COC ₃ H ₇)YL-NH ₂	F ⁴ -K ⁹ (COC ₃ H ₇)	BP473	Ac-KKlFKK(COC ₃ H ₇)ILKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁶ (COC ₃ H ₇)
BP389	Ac-KKlFKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂	F ⁴ -K ¹⁰ (COC ₃ H ₇)	BP474	Ac-KKlFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁸ (COC ₃ H ₇)
BP390	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₃ H ₇)-NH ₂	F ⁴ -K ¹¹ (COC ₃ H ₇)	BP499	Ac-KKlFKKILK(COC ₃ H ₇)YL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁹ (COC ₃ H ₇)
BP394	Ac-KKK(COC ₁₁ H ₂₃)FKKILKYL-NH ₂	F ⁴ -K ³ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP475	Ac-KKlFKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂	D-F ⁴ -K ¹⁰ (COC ₃ H ₇)
BP395	Ac-KKlK(COC ₁₁ H ₂₃)KKILKYL-NH ₂	K ⁴ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP501	Ac-KKlHKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂	H ⁴ -K ¹⁰ (COC ₃ H ₇)
BP398	Ac-KKlFKKK(COC ₁₁ H ₂₃)LKYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁷ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP496	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₃ H ₇)-NH ₂	D-F ⁴ -K ¹¹ (COC ₃ H ₇)
BP399	Ac-KKlFKKIK(COC ₁₁ H ₂₃)KYL-NH ₂	F ⁴ -K ⁸ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP500	Ac-KKK(COC ₁₁ H ₂₃)fKKILKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ³ (COC ₁₁ H ₂₃)
BP400	Ac-KKlFKKILK(COC ₁₁ H ₂₃)YL-NH ₂	F ⁴ -K ⁹ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP488	Ac-KKlK(COC ₁₁ H ₂₃)KKILKYL-NH ₂	D-K ⁴ (COC ₁₁ H ₂₃)
BP402	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂	F ⁴ -K ¹¹ (COC ₁₁ H ₂₃)	BP489	Ac-KKlFKKK(COC ₁₁ H ₂₃)LKYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁷ (COC ₁₁ H ₂₃)
			BP490	Ac-KKlFKKIK(COC ₁₁ H ₂₃)KYL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁸ (COC ₁₁ H ₂₃)
			BP497	Ac-KKlFKKILK(COC ₁₁ H ₂₃)YL-NH ₂	D-F ⁴ -K ⁹ (COC ₁₁ H ₂₃)
			BP476	Ac-KKlFKKILKYK(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂	D-F ⁴ -K ¹¹ (COC ₁₁ H ₂₃)

^a COC₃H₇, butanoïl; COC₅H₁₁, hexanoïl; COC₁₁H₂₃, lauroïl. Les lletres minúscules indiquen D-aminoàcids. Les posicions modificades s'indiquen en negreta.

La síntesi dels lipopèptids derivats de **BP100** contenint D-aminoàcids o un residu d'His es va realitzar seguint dues estratègies diferents.

D'una banda, la síntesi dels lipopèptids **BP472** i **BP485**, amb el fragment acil a l'extrem N-terminal i una D-Phe a la posició 4, va implicar: (i) la preparació de la peptidil resina **3**; (ii) l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem N-terminal i l'acilació amb l'àcid gras corresponent i (iii) el desancorament del pèptid.

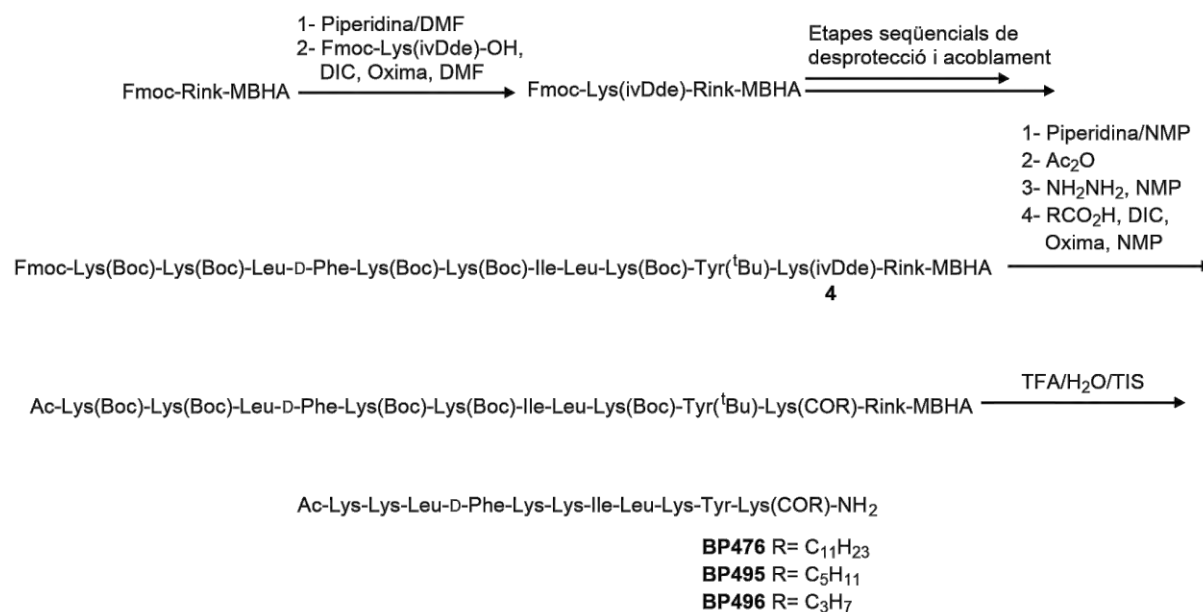
Es va partir d'una resina MBHA que incorpora el *linker* Fmoc-Rink-amida. Es va eliminar el grup Fmoc mitjançant un tractament amb piperidina/DMF (3:7) i, posteriorment, es va acoblar el primer aminoàcid emprant DIC i Oxima en DMF. Mitjançant etapes successives d'eliminació del grup Fmoc i acoblament dels aminoàcids corresponents es va obtenir la peptidil resina **3** (Esquema 3). A continuació, la peptidil resina **3** es va tractar amb piperidina/NMP (3:7) i, posteriorment, s'hi va acoblar àcid butíric o àcid hexanoic emprant DIC i Oxima en NMP durant 1

h a temperatura ambient (Esquema 3). Finalment, les peptidil resines resultants es van tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i es van purificar per cromatografia flash en fase reversa. Els lipopèptids es van analitzar mitjançant HPLC i es van caracteritzar per espectrometria de masses. Tots ells es van obtenir amb una puresa excel·lent >99% (Taula 21).



Esquema 3. Síntesi dels lipopèptids BP472 i BP485.

D'altra banda, per a la preparació de la resta de lipopèptids que contenen D-aminoàcids o una His i el fragment acil a la cadena lateral d'un residu de Lys, aquest aminoàcid es va incorporar amb el grup N^ε-amino protegit amb un grup ivDde.¹⁵⁹ La síntesi en fase sòlida d'aquests lipopèptids s'exemplifica per **BP476**, **BP495** i **BP496**, que contenen una D-Phe a la posició 4 i el grup acil a la cadena lateral de la Lys¹¹ (Esquema 4). Aquesta síntesi va implicar (i) la preparació de la peptidil resina **4**; (ii) l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem N-terminal; (iii) l'acetilació del grup amino lliure resultant; (iv) l'eliminació selectiva del grup ivDde; (v) l'acilació del grup amino lliure resultant amb l'àcid gras corresponent i (vi) el desancorament del pèptid.



Esquema 4. Síntesi dels lipopèptids BP476, BP495 i BP496.

Així, per a la síntesi d'aquests lipopèptids, un cop preparada la peptidil resina **4**, es va eliminar el grup Fmoc de l'extrem N-terminal i, aquesta posició es va acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1:1:1). A continuació, es va eliminar el grup ivDde amb NH₂NH₂·H₂O/NMP (2:98) i es va acoblar l'àcid gras corresponent (àcid butíric, hexanoic o làuric) (Esquema 4). Finalment, les peptidil resines resultants es varen tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i es varen purificar per cromatografia flash en fase reversa. Els lipopèptids es varen analitzar mitjançant HPLC i es varen caracteritzar per espectrometria de masses. Tots ells es varen obtenir amb una puresa excel·lent >99% (Taula 21).

Taula 21. Temps de retenció, pureses i caracterització dels lipopèptids derivats de BP100 que contenen D-aminoàcids o una histidina.

Pèptid	t_R (min) ^a	Puresa (%) ^b		HRMS (ESI)	
				Calculada	Trobada
BP472	6,14	>99	$C_{78}H_{137}N_{17}O_{13}$ [M + 2H] ²⁺	760,0285	760,0260
BP473	5,99	>99	$C_{78}H_{135}N_{17}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0158
BP474	5,36	>99	$C_{78}H_{136}N_{18}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	774,5236	774,5208
BP475	5,69	>99	$C_{75}H_{138}N_{18}O_{13}$ [M + 2H] ²⁺	749,5340	749,5343
BP476	6,67	>99	$C_{86}H_{152}N_{18}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5839
BP484	6,45	>99	$C_{77}H_{142}N_{18}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	771,5471	771,5477
BP485	6,79	>99	$C_{76}H_{133}N_{17}O_{13}$ [M + 2H] ²⁺	746,0129	746,0097
BP486	6,17	>99	$C_{78}H_{134}N_{17}O_{14}$ [M + H] ⁺	1533,0291	1533,0266
BP488	6,80	>99	$C_{83}H_{153}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1626,1808	1626,1787
BP489	6,76	>99	$C_{86}H_{152}N_{18}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	830,5862	830,5825
BP490	7,12	>99	$C_{86}H_{151}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1660,1652	1660,1635
BP494	5,42	>99	$C_{80}H_{139}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1576,0713	1576,0683
BP495	5,44	>99	$C_{80}H_{139}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1576,0713	1576,0683
BP496	5,11	>99	$C_{78}H_{135}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1548,0400	1548,0367
BP497	7,21	>99	$C_{86}H_{150}N_{17}O_{14}$ [M + H] ⁺	1645,1543	1645,1516
BP498	6,12	>99	$C_{78}H_{135}N_{17}O_{14}$ [M + 2H] ²⁺	767,0182	767,0147
BP499	5,89	>99	$C_{78}H_{134}N_{17}O_{14}$ [M + H] ⁺	1533,0291	1533,0269
BP500	6,80	>99	$C_{86}H_{151}N_{18}O_{14}$ [M + H] ⁺	1661,1684	1661,1667
BP501	4,63	>99	$C_{72}H_{135}N_{20}O_{13}$ [M + H] ⁺	1488,0512	1488,0511
BP502	4,92	>99	$C_{75}H_{132}N_{19}O_{14}$ [M + H] ⁺	1523,0196	1523,0191
BP503	5,87	>99	$C_{78}H_{134}N_{17}O_{14}$ [M + H] ⁺	1533,0291	1533,0319

^a Temps de retenció per HPLC.^b Percentatge determinat per HPLC a 220 nm després de la purificació.

3.2.2 Activitat biològica dels lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His

Es va analitzar l'activitat antimicrobiana, la fitotoxicitat en fulles de tabac i l'activitat hemolítica dels 21 lipopèptids que incorporen D-aminoàcids o un residu d'His.

3.2.2.1 Activitat antimicrobiana

L'activitat antimicrobiana es va avaluar enfront els bacteris *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae*, i els fongs *F. oxysporum* i *P. expansum* a concentracions 0,8, 1,6, 3,1, 6,2, 12,5 i 25 µM (Figura 37).

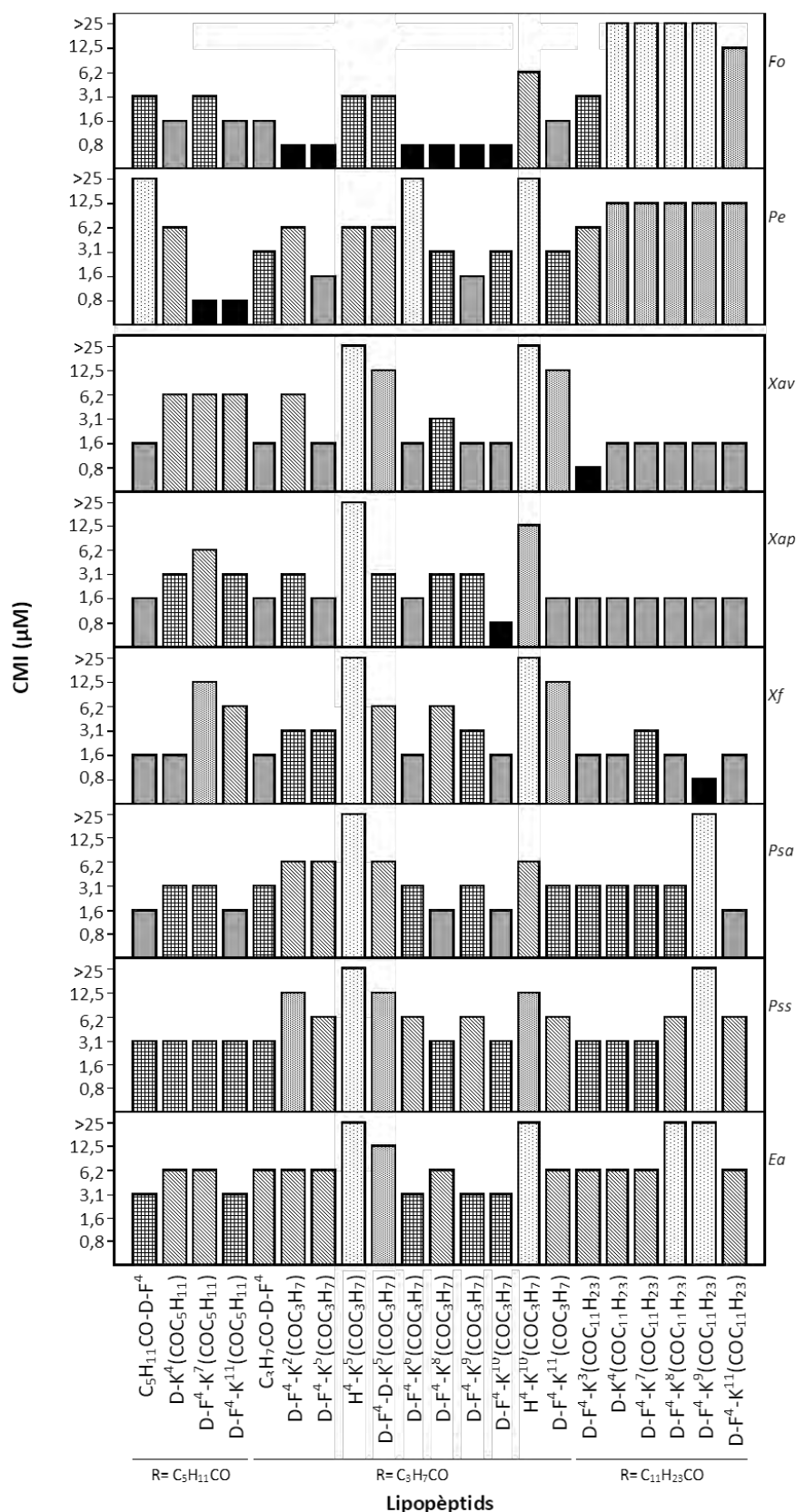


Figura 37. CMI dels lipopeptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His enfront *E. amylovora* (Ea), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *X. fragariae* (Xf), *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap), *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *F. oxysporum* (Fo) i *P. expansum* (Pe). S'indica el valor més baix de la CMI. El tipus de grup acil s'indica com a R = COC₅H₁₁ (hexanoil), R = COC₅H₇ (butanoil) i R = COC₁₁H₂₃ (lauroil).

Els resultats varen mostrar que la col·lecció de 18 lipopèptids que contenen un D-aminoàcid a la posició 4 varen presentar una activitat antimicrobiana elevada (Figura 37). Pel que fa a l'activitat antibacteriana, per a 13 d'aquestes seqüències es va obtenir una CMI $<12,5 \mu\text{M}$ enfront els sis bacteris assajats. A més, en general, varen resultar ser més actius enfront les tres espècies de *Xanthomonas* que enfront *E. amylovora* o les espècies de *Pseudomonas*. Concretament, 12 lipopèptids varen mostrar una CMI $<6,2 \mu\text{M}$ enfront les tres espècies de *Xanthomonas* i 9 d'ells una CMI $<3,1 \mu\text{M}$. Pel que fa a l'activitat enfront les espècies de *Pseudomonas*, varen ser més actius enfront *P. syringae* pv. *actinidiae* (15 seqüències amb CMI $<6,2 \mu\text{M}$) que enfront *P. syringae* pv. *syringae* (10 seqüències amb CMI $<6,2 \mu\text{M}$). A més, 5 de les seqüències varen mostrar una CMI entre 1,6 i 3,1 μM enfront *P. syringae* pv. *actinidiae*. *E. amylovora* va ser el bacteri menys sensible enfront aquests lipopèptids. Tot i això, 16 seqüències varen presentar una CMI $<12,5 \mu\text{M}$ i 5 d'elles una CMI entre 3,1 i 6,2 μM . Tenint en compte el tipus d'àcid gras present en aquestes seqüències, no es va observar una tendència general en l'activitat. Ara bé, sí que es desprèn que les tres espècies de *Xanthomonas* varen resultar ser més sensibles als lipopèptids que incorporen un grup lauroil.

En referència a l'activitat antifúngica, aquests 18 lipopèptids, que contenen un D-aminoàcid a la posició 4, varen ser més actius enfront *F. oxysporum* que enfront *P. expansum* (13 vs. 8 seqüències amb una CMI $<6,2 \mu\text{M}$, respectivament) (Figura 37). Cal destacar que 6 de les 8 seqüències que contenen un grup butanoil varen presentar una CMI entre 0,8 i 1,6 μM enfront *F. oxysporum* i 2 de les 4 seqüències que contenen un grup hexanoil una CMI entre 0,8 i 1,6 μM enfront *P. expansum*. En canvi, els lipopèptids amb un grup lauroil a la seva estructura varen mostrar, en general, una menor activitat enfront aquests dos fongs.

En el cas dels lipopèptids **BP501** ($\text{H}^4\text{-K}^{10}(\text{COC}_3\text{H}_7)$) i **BP502** ($\text{H}^4\text{-K}^5(\text{COC}_3\text{H}_7)$), que contenen un residu d'His⁴ en comptes d'una Phe⁴, varen presentar una activitat antimicrobiana baixa o nul·la. Concretament, **BP501** va mostrar una CMI entre 6,2 i 25 μM enfront tres dels bacteris testats. D'altra banda, **BP502** no va ser actiu enfront cap dels sis bacteris (CMI $>25 \mu\text{M}$). Aquests lipopèptids varen mostrar una CMI $<12,5 \mu\text{M}$ enfront *F. oxysporum* i **BP502** també va ser actiu enfront *P. expansum* amb una CMI entre 6,2 i 12,5 μM . Pel que fa al pèptid **BP503** ($\text{D-F}^4\text{-D-K}^5(\text{COC}_3\text{H}_7)$), amb dos D-aminoàcids a la seva estructura, va mostrar una activitat antimicrobiana moderada, amb una CMI $<25 \mu\text{M}$ enfront els vuit patògens estudiats.

L'activitat biològica dels lipopèptids contenint D-aminoàcids o una His es va comparar amb la dels corresponents lipopèptids de partida (Figura 38). En referència a les seqüències que incorporen un D-aminoàcid, es va observar que la diferència d'activitat d'aquestes seqüències respecte als lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L depenia de la llargada del grup acil. Així, les seqüències amb un D-aminoàcid i una cadena de lauroil varen presentar una activitat igual o superior a la dels corresponents anàlegs amb tots els aminoàcids L enfront tots els patògens excepte *F. oxysporum*.

En canvi, pels lipopèptids amb un D-aminoàcid i un grup butanoil o hexanoil aquest comportament es va observar enfront les dues espècies de *Pseudomonas*, *X. arboricola* pv. *pruni* i els dos fongs. D'aquesta anàlisi comparativa també es va poder deduir que la incorporació de dos D-aminoàcids o d'una His va resultar, en general, en lipopèptids menys actius.

Els lipopeptids amb una activitat antibacteriana més elevada varen ser **BP472** ($C_5H_{11}CO-D-F^4$), **BP473** ($D-F^4-K^6(COC_3H_7)$), **BP475** ($D-F^4-K^{10}(COC_3H_7)$), **BP476** ($D-F^4-K^{11}(COC_{11}H_{23})$), **BP485** ($C_3H_7CO-D-F^4$), **BP488** ($D-K^4(COC_{11}H_{23})$) i **BP500** ($D-F^4-K^3(COC_{11}H_{23})$). D'altra banda, **BP495** ($D-F^4-K^{11}(COC_5H_{11})$), **BP498** ($D-F^4-K^5(COC_3H_7)$) i **BP499** ($D-F^4-K^9(COC_3H_7)$) són els més actius enfront els dos fongs amb CMI's entre 0,8 i 3,1 μM .

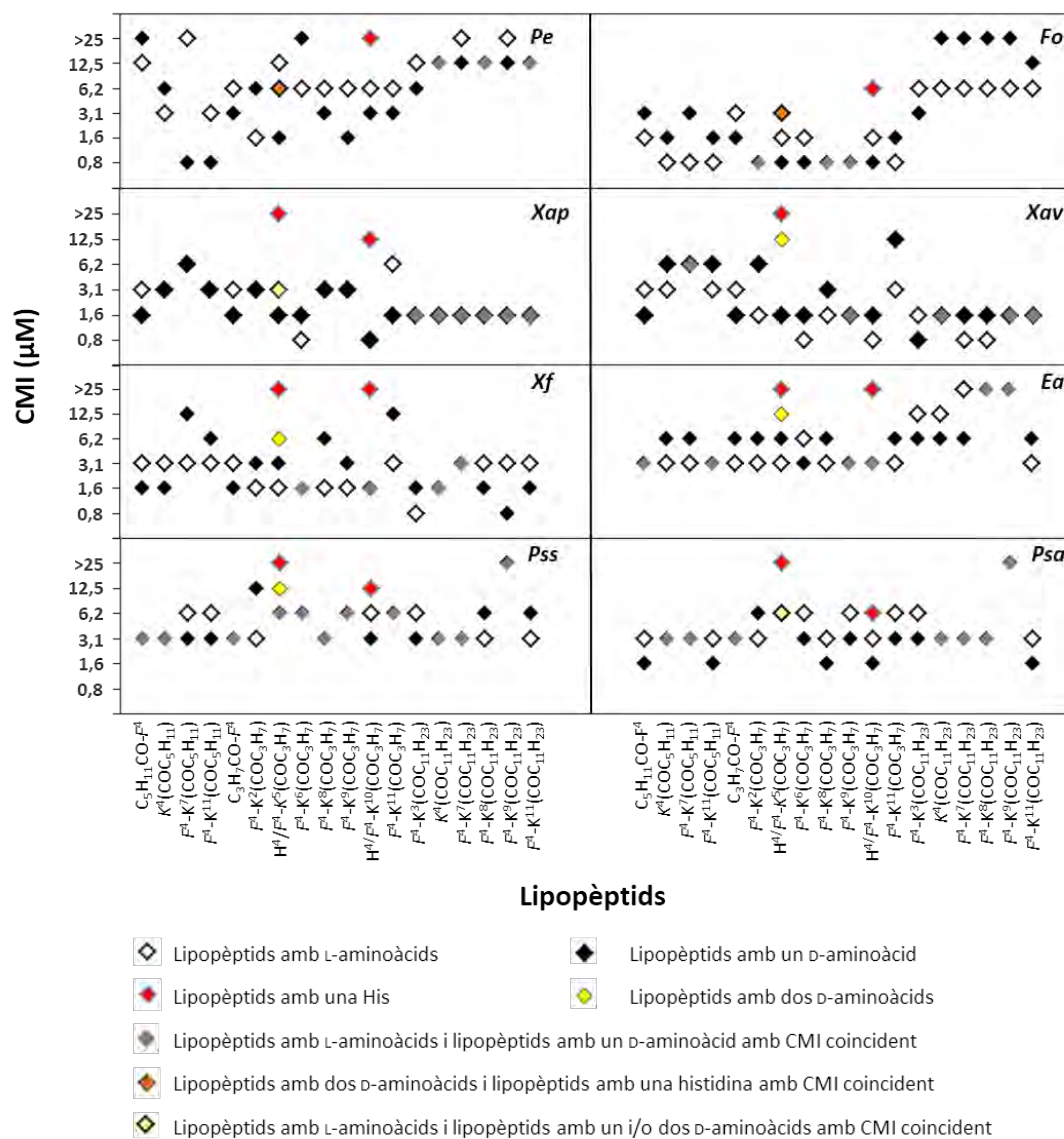


Figura 38. Comparació de l'activitat antimicrobiana dels 21 lipopeptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopeptids amb tots els aminoàcids de tipus L. L'activitat antimicrobiana s'indica com a CMI i es representa a l'eix de les y en escala logarítmica. Per a cada pèptid s'indica el valor més baix del rang de CMI. L'eix de les x inclou el codi per cada lipopeptid. Els residus que s'indiquen en cursiva poden ser L- o D-aminoàcids.

3.2.2.2 Toxicitat

Per a avaluar la toxicitat dels 21 lipopeptids que contenen un residu d'His, o un o dos D-aminoàcids es va determinar l'activitat hemolítica (Figura 40). Aquests lipopeptids es varen assajar a 50, 150, 250 i 375 μM , i es va utilitzar la melitina com a control positiu. Els resultats

varen mostrar que 13 dels 21 lipopeptids varen presentar una activitat hemolítica $\leq 24\%$ a 250 μM . Cal destacar que l'hemòlisi de 9 d'aquestes seqüències va ser $\leq 10\%$ a aquesta concentració.

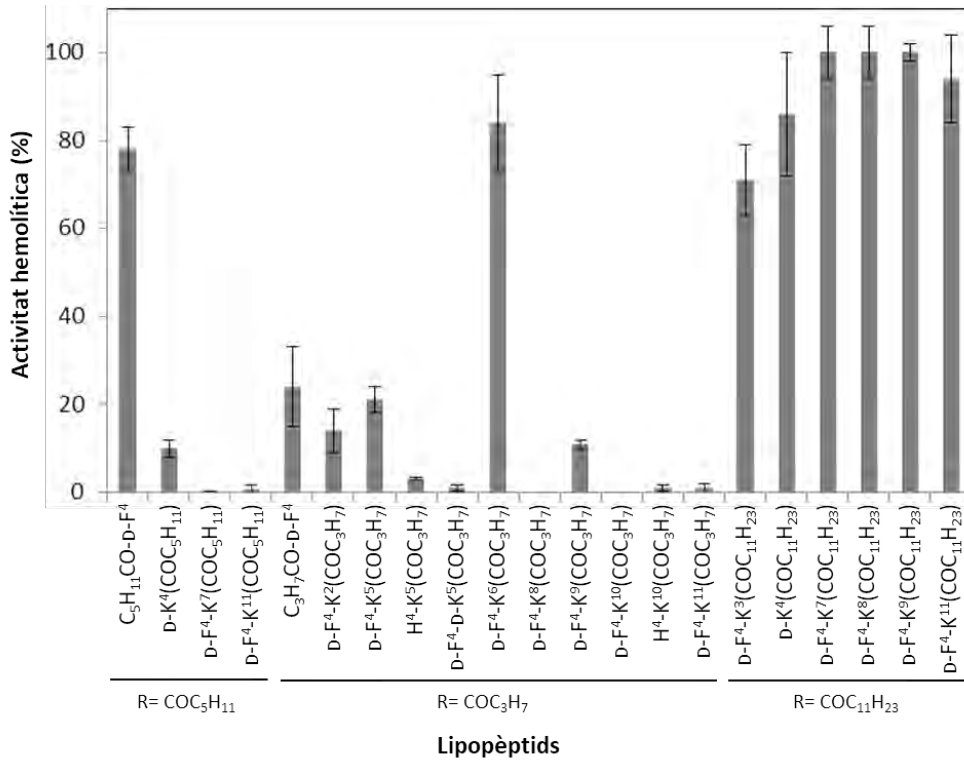


Figura 39. Activitat hemolítica dels lipopeptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His a 250 μM . El tipus de grup acil s'indica com a R= $\text{COC}_5\text{H}_{11}$ (hexanoil), R= COC_3H_7 (butanoil) i R= $\text{COC}_{11}\text{H}_{23}$ (lauròil).

En comparar l'hemòlisi dels lipopeptids que contenen un D-aminoàcid amb la dels corresponents anàlegs amb tots els aminoàcids de tipus L, es va observar, tal com s'esperava, que la presència del D-aminoàcid va resultar en una disminució de l'activitat hemolítica de tots els lipopeptids que incorporen un grup butanoil o hexanoil (Figura 40). Cal remarcar que, en alguns casos, aquesta disminució va ser considerable. En canvi, la incorporació d'un D-aminoàcid en els lipopeptids derivatitzats amb un grup lauroil no es va traduir en una disminució de l'hemòlisi. En aquest cas, probablement, el benefici d'incorporar un D-aminoàcid no és suficient per a contrarestar la hidrofobicitat del grup lauroil.

D'altra banda, la incorporació d'una histidina o de dos D-aminoàcids en el lipopeptid **BP384** ($\text{F}^4\text{-K}^5(\text{COC}_3\text{H}_7)$) va donar lloc a les seqüències **BP502** ($\text{H}^4\text{-K}^5(\text{COC}_3\text{H}_7)$) i **BP503** ($\text{D-F}^4\text{-D-K}^5(\text{COC}_3\text{H}_7)$), respectivament, que varen resultar ser molt poc hemolítiques. De fet, es va observar una reducció de l'hemòlisi del 100% a $\leq 3\%$ a 250 μM .

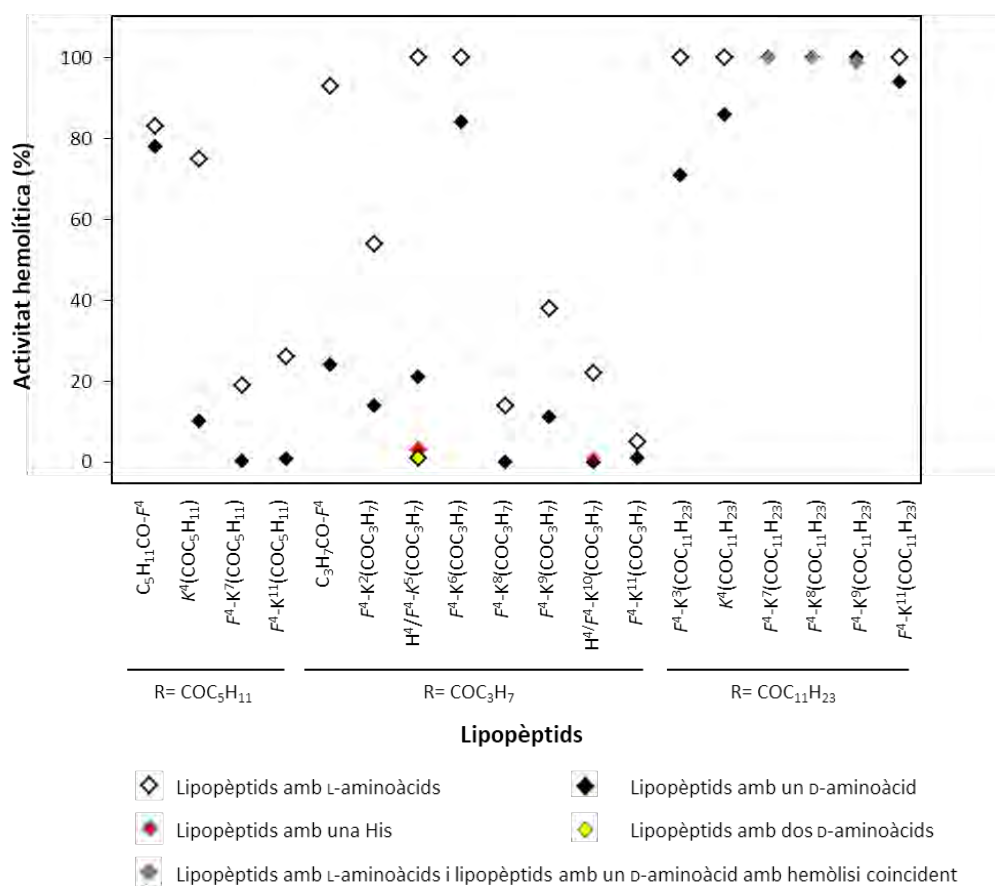


Figura 40. Comparació de l'activitat hemolítica dels 21 lipopèptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L a 250 µM. L'eix de les x inclou el codi per cada lipopèptid. Els residus que s'indiquen en cursiva poden ser L- o D-aminoàcids.

Finalment, també es va analitzar la toxicitat dels lipopèptids que incorporen D-aminoàcids o una His en fulles de tabac. Aquests lipopèptids es varen infiltrar en el mesòfil de fulles de tabac a 50, 150 i 250 µM. Com a referència, també es va incloure la melitina a l'estudi, que va provocar una necrosi de 22 mm a 250 µM. Es va observar que la majoria dels lipopèptids varen presentar una fitotoxicitat menor que la melitina. Concretament, 14 seqüències varen causar una àrea necròtica ≤10 mm a 250 µM (Figura 41).

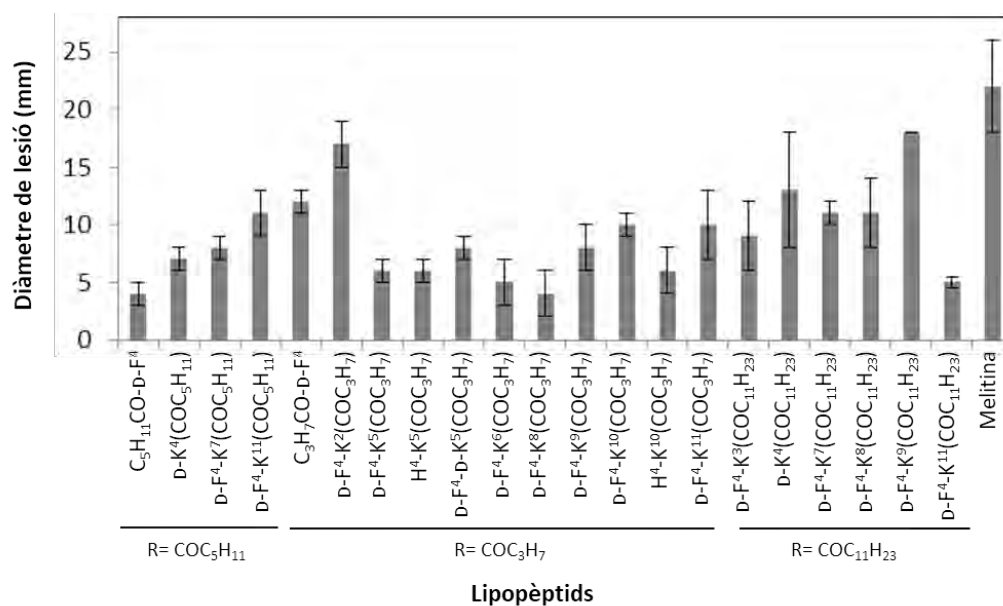


Figura 41. Efecte dels lipopeptids derivats de BP100 que incorporen D-aminoàcids o una His infiltrats en fulles de tabac a 250 μ M. El tipus de grup acil s'indica com a $R = COC_5H_{11}$ (hexanoïl), $R = COC_3H_7$ (butanoïl) i $R = COC_{11}H_{23}$ (lauròil).

A la Figura 42 es compara la fitotoxicitat dels derivats que incorporen un o dos D-aminoàcids o una His amb la dels corresponents lipopeptids de partida. Es va observar que, en general, les seqüències que contenen un o dos D-aminoàcids o una His i que estan derivatitzades amb un grup hexanoïl o butanoïl varen ser menys fitotòxiques que les que incorporen una cadena de lauroïl, i també menys fitotòxiques que els lipopeptids de partida.

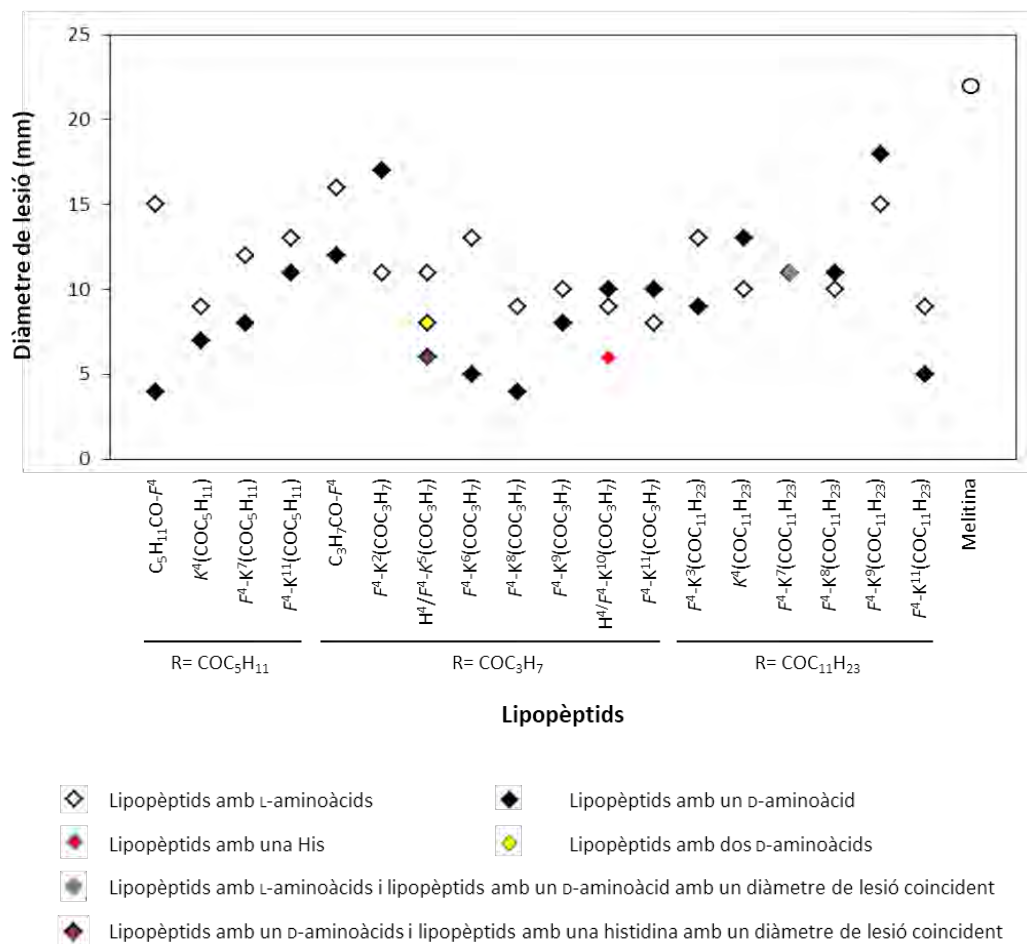


Figura 42. Comparació de l'efecte de la infiltració en fulles de tabac dels 21 lipopeptids que contenen una His o un o dos D-aminoàcids amb els lipopeptids amb tots els aminoàcids de tipus L a 250 μ M. L'eix de les x inclou el codi per cada lipopeptid. Els residus que s'indiquen en cursiva poden ser L- o D-aminoàcids.

3.2.2.3 Lipopeptids derivats de BP100 amb un millor perfil biològic.

D'aquest estudi es pot deduir que, en general, els lipopeptids derivats de **BP100** amb un millor perfil biològic contenen una D-Phe⁴ i una lisina acilada amb un grup butanoil o hexanoil situada a la cara apolar de l'hèlix. Concretament, el lipopeptid amb el millor perfil biològic és **BP475** (D-F⁴-K¹⁰(COC₃H₇)) que presenta una CMI entre 0,8 i 6,2 μ M enfront els 8 fitopatògens testats i no és hemolític a 250 μ M. També destaquen **BP387** (K⁸(COC₃H₇)), **BP474** (D-F⁴-K⁸(COC₃H₇)), **BP485** (C₃H₇CO-D-F⁴) i **BP495** (D-F⁴-K¹¹(COC₅H₁₁)) que mostren una CMI entre 0,8 i 12,5 μ M enfront els 8 fitopatògens i una hemòlisi entre 0,6 i 24% a 250 μ M. A més, tots ells són menys fitotòxics que la melitina, provocant una àrea necròtica entre 4 i 11 mm a 250 μ M.

Així, mitjançant la incorporació de la cadena d'àcid gras s'han obtingut lipopeptids amb una elevada activitat antimicrobiana. Partint d'aquesta col·lecció, la introducció d'un D-aminoàcid ha permès la obtenció de lipopeptids derivats de **BP100** amb una elevada activitat antimicrobiana i una baixa toxicitat.

4 Lipopèptids conjugats derivats de BP100

La conjugació de dos pèptids, amb activitats biològiques semblants o diferents, per generar un pèptid híbrid és una estratègia efectiva per tal d'intentar sumar les propietats de cadascuna d'aquestes unitats (secció 1.3.5.1). De fet, a la bibliografia hi ha exemples de pèptids híbrids derivats de **BP100** (secció 1.5.3.4.1). En aquest sentit, Badosa *et al.* van dissenyar i sintetitzar 38 pèptids conjugats per combinació de **BP100** i un fragment de cecropina A, magainina o melitina. En van destacar **BP178** (BP100-AGPA-magainina(1-10)-KDEL-OH), **BP209** (G-BP100-AGPA-magainina(1-10)-OH), **BP210** (S-BP100-AGPA-magainina(1-10)-OH) i **BP211** (G-BP100-AGPA-magainina(4-10)-OH), que varen presentar una activitat antimicrobiana elevada enfront *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *P. syringae* pv. *syringae*, una baixa hemòlisi i una fitotoxicitat moderada (Taula 14).¹³¹ En base a això, en aquesta tesi doctoral es va plantejar la síntesi de pèptids híbrids per conjugació d'un lipopèptid antimicrobià derivat de **BP100** amb un CPP, un pèptid elicitor de defenses de plantes o un AMP.

4.1 Disseny dels lipopèptids conjugats

Per tal de dissenyar els lipopèptids conjugats es van seleccionar, d'una banda, 3 lipopèptids derivats de **BP100** i, d'altra banda, 5 seqüències descrites a la bibliografia com a CPPs, AMPs o elicitors de defenses en planta.

Els lipopèptids derivats de **BP100** es varen escollir a partir de la col·lecció de 57 lipopèptids descrita al capítol anterior. Concretament, es van seleccionar 3 seqüències amb una elevada activitat antimicrobiana i una baixa toxicitat: **BP387** (F⁴-K⁸(COC₃H₇)), **BP474** (D-F⁴-K⁸(COC₃H₇)) i **BP475** (D-F⁴-K¹⁰(COC₃H₇)) (Taula 22), les quals varen presentar una CMI entre 0,8 i 12,5 µM enfront els bacteris testats, una hemòlisi <14% a 250 µM i varen provocar una lesió en fulles de tabac de 3,8 a 9,2 mm de diàmetre a 250 µM.

Els CPPs escollits van ser **BP16** i **BP100** (Taula 22). Com ja s'ha comentat a la secció 1.5.4.3, **BP100** va ser descrit com a CPP en cèl·lules de tabac BY2 mostrant una gran capacitat d'internalització.¹⁴¹ **BP16** és un altre pèptid de la quimioteca **CECMEL11** que mostra una baixa o nul·la toxicitat i que es comporta com a CPP en cèl·lules animals.¹³⁷ D'altra banda, com a AMP, es va seleccionar **BP143**, un anàleg de **BP100** amb una D-Phe a la posició 4, que va presentar una activitat antimicrobiana similar i una toxicitat menor que **BP100** (secció 1.5.3.1).

Com a elicitors de defenses de plantes es van seleccionar **flg15** i **Pip1** (Taula 22). **flg15** correspon al fragment 36-49 del domini N-terminal de la flagelina de *P. aeruginosa*, que va ser descrit com a elicitor de defenses en plantes de tomatera.^{164,165} **Pip1** va ser identificat d'una quimioteca d'hexapèptids, dissenyats i sintetitzats mitjançant química combinatòria, i va mostrar capacitat elicitora de defenses en plantes de tabac i tomatera.¹⁶⁶

Taula 22. Pèptids seleccionats per a la síntesi de lipopèptids conjugats.

	Pèptid	Seqüència ^a
Lipopèptids derivats de BP100	BP387	Ac-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
	BP474	Ac-KKlfKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
	BP475	Ac-KKlfKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂
CPPs	BP16	KKLFKKILKKL-NH ₂
	BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂
AMP	BP143	KKlfKKILKYL-NH ₂
Pèptids elicitors de defenses	flg15	RINSAKDDAAGLQIA-OH
	Pip1	YGIHTH-NH ₂

^a Les lletres minúscules indiquen D-aminoàcids; COC₃H₇, butanoil.

Utilitzant aquests monòmers es varen dissenyar 12 lipopèptids conjugats diferents (Taula 23). Tenint en compte que l'ordre de les seqüències en els conjugats pot influir en l'activitat biològica, per a cada combinació de pèptids es varen preparar dos conjugats que es distingeixen en l'ordre dels monòmers. Inicialment, es varen dissenyar 3 parelles de lipopèptids conjugats per unió del lipopèptid **BP387** amb els CPPs **BP16** o **BP100**, o amb el pèptid elicitor de defenses **flg15**. A partir dels resultats d'activitat obtinguts per aquestes 6 seqüències, es van dissenyar 2 parelles de conjugats per unió del lipopèptid **BP475** amb els pèptids elicitors de defenses **flg15** o **Pip1**. Així mateix, es va dissenyar una parella de conjugats resultants de la combinació del lipopèptid **BP474** i l'AMP **BP143**. Els conjugats obtinguts, **BP474-BP143** i **BP143-BP474**, són anàlegs de **BP387-BP100** i **BP100-BP387** contenint dues D-Phe a la seva estructura.

Taula 23. Seqüències dels lipopèptids conjugats.

	Pèptid	Seqüència ^a
Lipopèptid + CPP	BP387-BP16	Ac-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-KKLFKKILKKL-NH ₂
	BP16-BP387	Ac-KKLFKKILKKL-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
	BP387-BP100	Ac-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-KKLFKKILKYL-NH ₂
	BP100-BP387	Ac-KKLFKKILKYL-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
Lipopèptid + AMP	BP474-BP143	Ac-KKlfKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-KKlfKKILKYL-NH ₂
	BP143-BP474	Ac-KKlfKKILKYL-KKlfKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
Lipopèptid + Pèptid elicitor de defenses	BP387-flg15	Ac-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-RINSAKDDAAGLQIA-OH
	flg15-BP387	Ac-RINSAKDDAAGLQIA-KKLFKKIK(COC ₃ H ₇)KYL-NH ₂
	BP475-flg15	Ac-KKlfKKILKK(COC ₃ H ₇)L-RINSAKDDAAGLQIA-OH
	flg15-BP475	Ac-RINSAKDDAAGLQIA-KKlfKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂
	BP475-Pip1	Ac-KKlfKKILKK(COC ₃ H ₇)L-YGIHTH-NH ₂
	Pip1-BP475	Ac-YGIHTH-KKlfKKILKK(COC ₃ H ₇)L-NH ₂

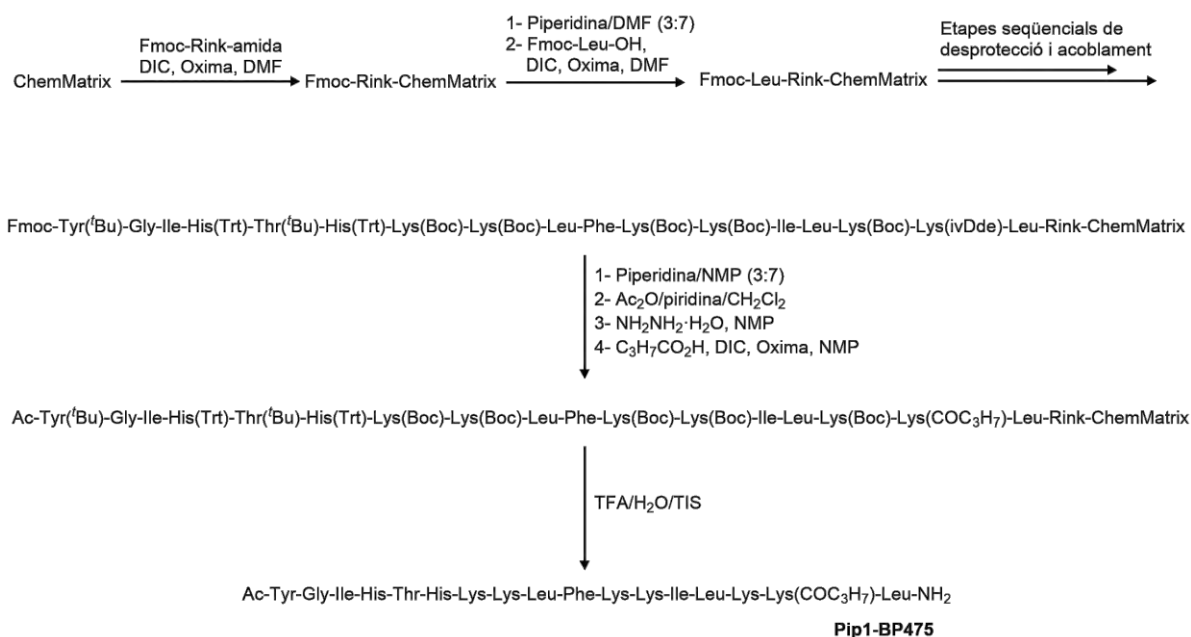
^a Les lletres minúscules indiquen D-aminoàcids; COC₃H₇, butanoil.

4.2 Síntesi dels lipopèptids conjugats

La preparació dels lipopèptids conjugats es va realitzar manualment mitjançant síntesi en fase sòlida seguint una estratègia Fmoc/*t*Bu representada a l'Esquema 5 pel lipopèptid conjugat **Pip1-BP475**. Aquesta estratègia de síntesi és similar a la descrita al capítol 3 pels lipopèptids derivats de **BP100**, però emprant com a suport sòlid una resina ChemMatrix aminometilada (0,69 mmol/g). Per obtenir els lipopèptids conjugats amb un grup amida a l'extrem C-terminal, es va acoblar al suport el *linker* Fmoc-Rink-amida. Pels lipopèptids conjugats amb un grup àcid carboxílic a l'extrem C-terminal s'hi va incorporar el *linker* àcid 3-(4-hidroxi metilfenoxi)propioníic (PAC). En aquest darrer cas, l'acoblament del primer aminoàcid es va realitzar utilitzant DIC, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) i *N*-etil diisopropilamina (DIEA). Aquest tractament es va repetir dues vegades durant 2 h, a temperatura ambient i sota agitació. La reacció es va comprovar mitjançant el test Fmoc, obtenint-se una funcionalització entre 0,30 i 0,36 mmol/g. Seguidament, la resina es va acetilar per tractament amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1,35:1,35:18).

L'elongació dels pèptids es va realitzar a través d'etapes seqüencials d'eliminació del grup Fmoc i acoblament dels aminoàcids corresponents. El grup Fmoc es va eliminar mitjançant un tractament amb piperidina/DMF (3:7) i els acoblaments es varen realitzar emprant DIC com a reactiu d'acoblament i Oxima com a additiu en DMF. El residu de Lys a acilar amb l'àcid gras es va incorporar amb el grup *N*^ε-amino protegit amb un grup ivDde. A partir del sisè aminoàcid es va substituir la DMF per NMP en les etapes d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament dels aminoàcids.

Un cop completades les seqüències, es va eliminar el grup Fmoc de l'extrem N-terminal i les peptidil resines es varen acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1:1:1). Les peptidil resines resultants es varen tractar amb NH₂NH₂·H₂O/NMP (2:98) per eliminar el grup ivDde i, seguidament, es va acoblar l'àcid butíric emprant DIC i Oxima en NMP, durant 1 h a temperatura ambient.



Esquema 5. Síntesi del lipopèptid conjugat Pip1-BP475.

Finalment, cadascuna de les peptidil resines resultants es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i els crús resultants es varen purificar per cromatografia flash en fase reversa. Els lipopèptids es varen analitzar per HPLC i es varen caracteritzar per espectrometria de masses. Tots es varen obtenir amb una puresa excel·lent compresa entre un 96 i >99% (Taula 24).

Taula 24. Càrrega neta, temps de retenció, puresa i caracterització dels lipopèptids conjugats.

	Pèptid	Càrrega neta	t _R (min) ^a	Puresa (%) ^b	HRMS (ESI)		
						Calculada	Trobada
	BP387-BP16	+11	7,93	>99	C ₁₄₇ H ₂₆₁ N ₃₅ O ₂₅ [M + 2H] ²⁺	1458,5108	1458,5071
Lipopèptid + CPP	BP16-BP387	+11	7,98	>99	C ₁₄₇ H ₂₆₁ N ₃₅ O ₂₅ [M + 2H] ²⁺	1458,5108	1458,5081
	BP387-BP100	+10	7,97	96	C ₁₅₀ H ₂₅₈ N ₃₄ O ₂₆ [M + 2H] ²⁺	1475,9950	1475,9920
	BP100-BP387	+10	7,98	>99	C ₁₅₀ H ₂₅₈ N ₃₄ O ₂₆ [M + 2H] ²⁺	1475,9950	1475,9915
	BP474-BP143	+10	7,94	>99	C ₁₅₀ H ₂₅₈ N ₃₄ O ₂₆ [M + 2H] ²⁺	1475,9950	1475,9910
Lipopèptid + AMP	BP143-BP474	+10	8,00	>99	C ₁₅₀ H ₂₅₈ N ₃₄ O ₂₆ [M + 2H] ²⁺	1475,9950	1475,9951
	BP387-flg15	+4	5,84	96	C ₁₄₂ H ₂₄₄ N ₃₈ O ₃₇ [M + 2H] ²⁺	1536,9184	1536,9152
Lipopèptid + Pèptid elicitor de defenses	flg15-BP387	+5	6,35	96	C ₁₄₂ H ₂₄₅ N ₃₉ O ₃₆ [M + 2H] ²⁺	1536,4264	1536,4212
	BP475-flg15	+4	6,03	>99	C ₁₃₉ H ₂₄₆ N ₃₈ O ₃₆ [M + 2H] ²⁺	1511,9288	1511,9271
	flg15-BP475	+5	6,79	97	C ₁₃₉ H ₂₄₇ N ₃₉ O ₃₅ [M + 2H] ²⁺	1511,4368	1511,4329
	BP475-Pip1	+7	6,28	>99	C ₁₀₈ H ₁₈₁ N ₂₈ O ₂₁ [M + H] ⁺	2206,3951	2206,3981
	Pip1-BP475	+7	5,55	>99	C ₁₀₈ H ₁₈₁ N ₂₈ O ₂₁ [M + H] ⁺	2206,3951	2206,3902

^a Temps de retenció per HPLC

^b Percentatge determinat mitjançant HPLC a 220 nm després de la purificació

4.3 Activitat biològica

Es va assajar l'activitat antibacteriana, l'hemòlisi i la fitotoxicitat dels 12 lipopèptids conjugats.

4.3.1 Activitat antibacteriana

L'activitat antibacteriana dels lipopèptids conjugats es va analitzar enfront els bacteris *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae* a 0,8, 1,6, 3,1, 6,2, 12,5 i 25 µM (Figura 43).

Tal com s'esperava, els monòmers seleccionats van mostrar diferent activitat enfront els bacteris testats. Els lipopèptids **BP387**, **BP474** i **BP475**, i els pèptids **BP16**, **BP100** i **BP143** van ser actius enfront els 6 bacteris amb una CMI <25 µM enfront 5 o 6 dels 6 bacteris, i els pèptids elicitors de defenses de plantes **flg15** i **Pip1** no van resultar actius enfront cap dels bacteris.

Pel que fa als lipopèptids conjugats, es va observar que l'activitat depenia de la seqüència i del bacteri. Els tres bacteris del gènere *Xanthomonas* (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae* i *X. arboricola* pv. *pruni*) van ser els més sensibles a l'activitat d'aquests conjugats, destacant *X.*

arboricola pv. *pruni*. De fet, tots els lipopèptids conjugats varen mostrar una CMI <12,5 µM enfront aquest bacteri.

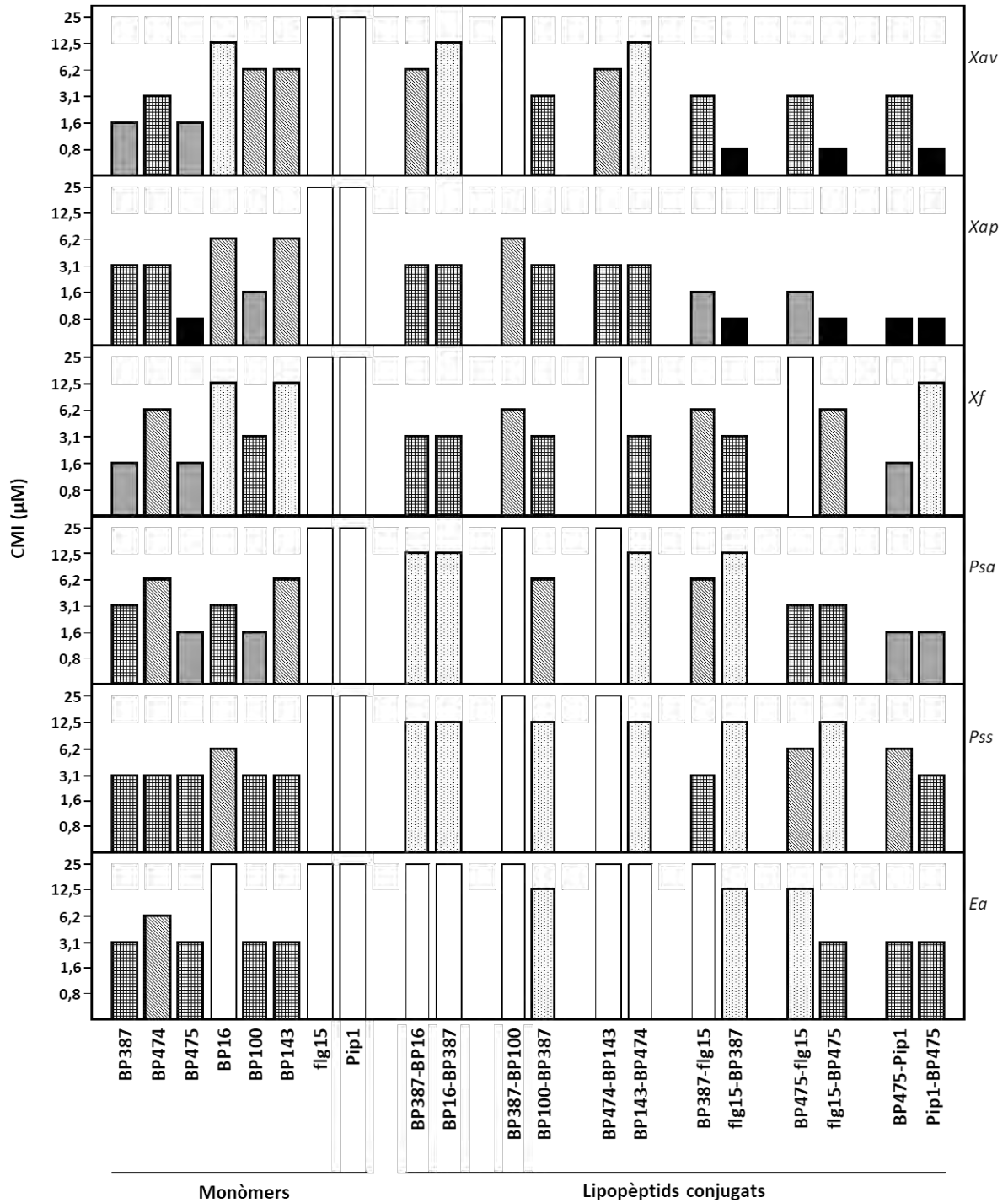


Figura 43. CMI dels lipopèptids conjugats enfront, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), *X. arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), *X. fragariae* (*Xf*), *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*) i *E. amylovora* (*Ea*). S'indica el valor més baix de la CMI. S'inclouen els monòmers a efectes comparatius.

Els lipopèptids conjugats resultants de la unió de **BP387** amb un CPP (**BP16**, **BP100**) o la unió de **BP474** amb un AMP (**BP143**) van ser menys actius que els corresponents monòmers de partida enfront els bacteris testats, principalment enfront *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae*. De fet, d'aquests 6 conjugats, només **BP100-BP387** va presentar una lleu activitat enfront *E. amylovora* (CMI 12,5-25 µM) i 4 dels 6 (**BP387-BP16**, **BP16-BP387**, **BP100-BP387** i **BP143-BP474**) van presentar una CMI entre 6,2 i 25 µM enfront les dues soques de *P. syringae*. En canvi, aquests 6 lipopèptids varen ser actius enfront les 3 espècies de *Xanthomonas*, 4 seqüències varen presentar una CMI entre 3,1 i 25 µM.

Els 6 lipopèptids conjugats resultants de la unió de **BP387** o **BP475** amb els elicitors de defenses **flg15** o **Pip1** varen ser més actius que els conjugats comentats anteriorment. En general, van presentar activitats antimicrobianes similars a la del corresponent monòmer **BP387** o **BP475**. Les 4 seqüències **flg15-BP387**, **flg15-BP475**, **BP475-Pip1** i **Pip1-BP475** van mostrar una activitat antimicrobiana <25 µM enfront tots els fitopatògens testats. A més, **flg15-BP475**, **BP475-Pip1** i **Pip1-BP475** van presentar una CMI entre 3,1 i 6,2 µM enfront *E. amylovora*. Quatre de les 6 seqüències (**BP387-flg15**, **BP475-flg15**, **BP475-Pip1** i **Pip1-BP475**) van mostrar una CMI <12,5 enfront les dues soques de *P. syringae*. El gènere *Xanthomonas* va ser el més sensible a aquest tipus de conjugats, especialment *X. arboricola* pv. *pruni* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Concretament, tots 6 lipopèptids conjugats van mostrar una CMI <6,2 µM enfront aquests dos bacteris. Cal destacar que les 3 seqüències que contenen el fragment lipopeptídic **BP387** o **BP475** a l'extrem C-terminal varen presentar una CMI entre 0,8 i 1,6 µM enfront *X. arboricola* pv. *pruni* i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. D'altra banda, **BP475-Pip1** i el seu anàleg **Pip1-BP475** van ser els lipopèptids conjugats més actius enfront els 6 fitopatògens presentant una CMI entre 0,8 i 12,5 µM, i entre 0,8 i 25 µM, respectivament.

4.3.2 Toxicitat

Per tal d'avaluar la toxicitat dels lipopèptids conjugats, es va analitzar l'activitat hemolítica i l'efecte en ser infiltrats en fulles de tabac. Aquests conjugats es van assajar a 50, 150, 250 i 375 µM per l'hemòlisi, i a 50, 150, 250 µM per la fitotoxicitat.

Pel que fa a l'activitat hemolítica, els lipopèptids conjugats es varen mostrar, en general, més hemolítics que els monòmers corresponents, que van presentar una hemòlisi moderada (**BP100**), baixa (**BP387**, **BP16** i **BP143**) o nul·la (**BP474**, **BP475**, **flg15** i **Pip1**) a 250 µM (Figura 44). A més, es va observar una clara diferència entre els lipopèptids conjugats resultants de la unió d'un lipopèptid amb un elicitor de defenses i els conjugats que contenen un lipopèptid i un CPP o un AMP. D'una banda, els lipopèptids conjugats que incorporen el lipopèptid **BP387** i un CPP (**BP16** o **BP100**), o el lipopèptid **BP474** i un AMP (**BP143**) van presentar percentatges d'hemòlisi entre 77 i 99%. D'altra banda, els 6 lipopèptids conjugats que contenen el lipopèptid **BP387** i el pèptid elicitor de defenses de plantes **flg15**, o el lipopèptid **BP475** i un pèptid elicitor de defenses de plantes (**flg15** o **Pip1**) van mostrar activitats hemolítiques entre moderades i baixes. Aquests 6 conjugats van mostrar una hemòlisi inferior a 43% i 2 seqüències (**BP387-flg15** i **BP475-flg15**) van presentar una hemòlisi inferior al 7%. A més, es va observar que els anàlegs d'aquests dos darrers conjugats, **flg15-BP387** i **flg15-BP475**, eren notablement més hemolítics (26 i 43%, respectivament).

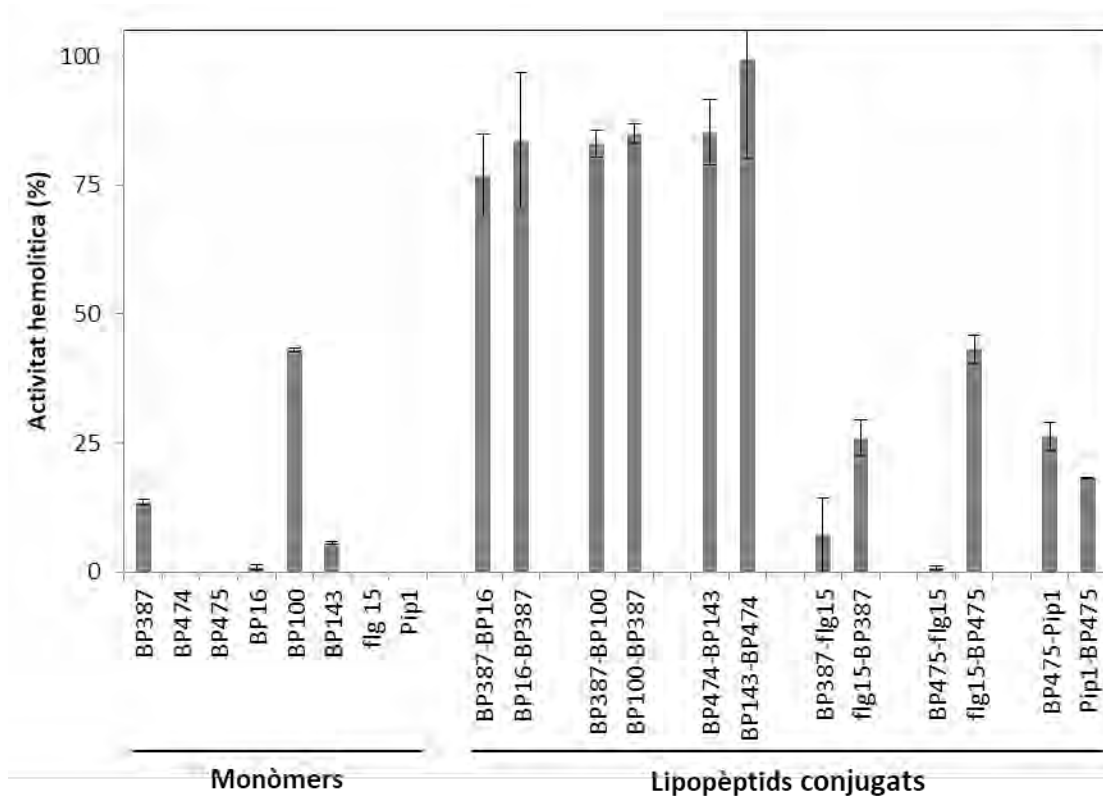


Figura 44. Activitat hemolítica dels lipopèptids conjugats a 250 µM. S'inclouen els monòmers per motius comparatius.

Pel que fa a l'efecte dels pèptids en ser infiltrats en fulles de tabac, tots els lipopèptids conjugats varen provocar una àrea necròtica inferior a la de la melitina (22 mm a 250 µM) (Figura 45). Concretament, tots els lipopèptids varen causar una lesió entre 8 i 17 mm a 250 µM. Tot i això, en general, els lipopèptids conjugats varen causar una lesió necròtica major que la dels corresponents monòmers. **flg15** i **Pip1** no varen generar lesió; **BP474**, **BP16** i **BP143** varen ser poc fitotòxics amb una lesió entre 2,6 i 6,5 mm; **BP387**, **BP475** i **BP100** varen mostrar una fitotoxicitat moderada entre 9,2 i 12 mm. Els 4 lipopèptids conjugats de **BP387** amb **BP100** o **flg15** varen ser els que varen presentar una menor fitotoxicitat, provocant una lesió ≤10 mm a 250 µM. En aquest cas, però, no es va observar una diferència clara entre els lipopèptids conjugats resultants de la unió d'un lipopèptid amb un CPP o un AMP i els lipopèptids conjugats resultants de la unió d'un lipopèptid amb un pèptid elicitor de defenses en planta.

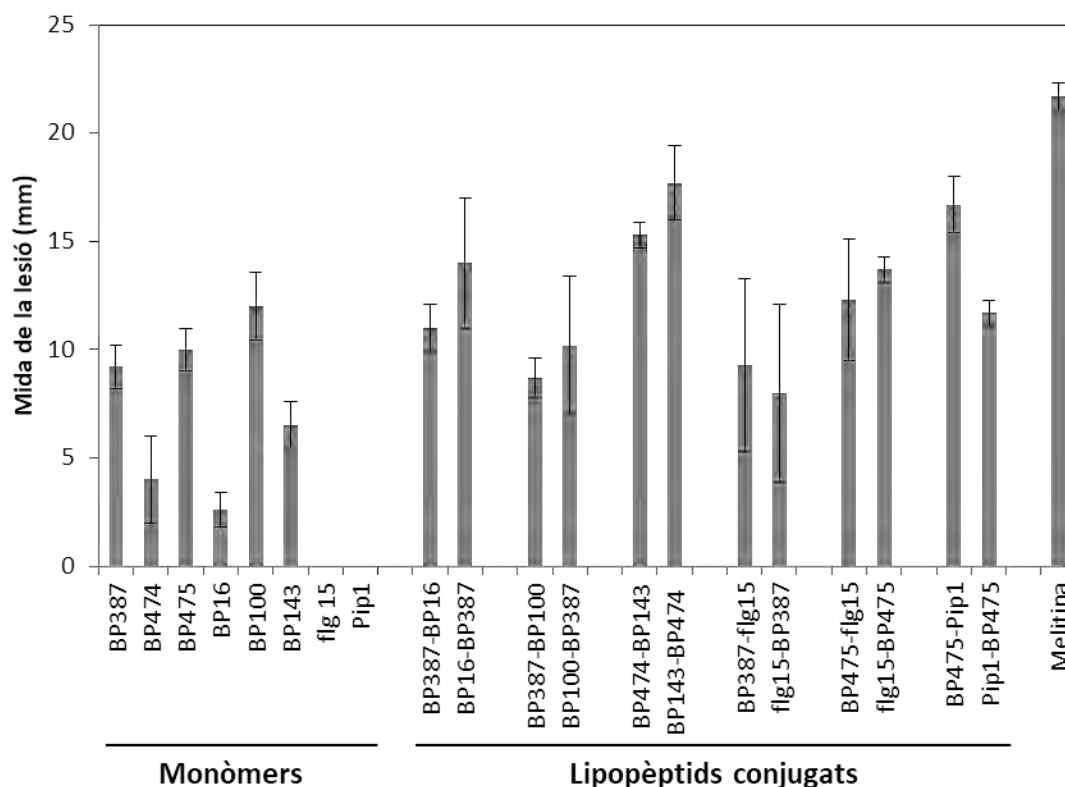


Figura 45. Efecte de la infiltració dels lipopèptids conjugats a 250 µM en fulles de tabac. S'inclouen els monòmers i la melitina per motius comparatius.

4.3.3 Influència de la seqüència en l'activitat biològica dels lipopèptids conjugats

Es va analitzar la influència en l'activitat biològica de l'ordre de la conjugació de les seqüències i del tipus de pèptids que incorporen els conjugats derivats de **BP100** preparats en aquest estudi.

Pel que fa a l'ordre de les seqüències, es va observar que, en general, els lipopèptids conjugats que contenen el fragment lipopeptídic a l'extrem C-terminal varen ser lleugerament més actius que els que l'incorporen a l'extrem N-terminal. Aquesta diferència és més evident en el cas dels conjugats que contenen un pèptid elicitor de defenses, sobretot enfront els bacteris del gènere *Xanthomonas*. Tanmateix, els conjugats amb el lipopèptid a l'extrem C-terminal també varen ser més tòxics. Concretament, en 5 de les 6 parelles de conjugats, la seqüència que presenta el lipopèptid a l'extrem C-terminal va ser la més hemolítica, i en 4 de les 6 parelles aquesta seqüència va provocar una lesió necròtica major en fulles de tabac.

Referent al tipus de pèptids presents en el conjugat, en general, els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP varen ser menys actius i més hemolítics que els que contenen un pèptid elicitor de defenses de plantes (CMI entre 3,1 i >25 µM vs. 0,8 i >25 µM; hemòlisi >77% vs. <43% a 250 µM). Aquestes diferències en l'activitat podrien estar relacionades amb la càrrega neta positiva d'aquests conjugats. Així, els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP presenten una càrrega neta positiva de +10 o +11, mentre que la dels que contenen un pèptid elicitor de defenses és de +4 o +7.

Anàlogament als lipopèptids conjugats d'aquesta tesi doctoral, Alves *et al.* varen observar que la baixa activitat antimicrobiana del pèptid LKRWGTIKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR (**PepR**) es podia relacionar amb una elevada càrrega positiva. Aquest fet es va atribuir a què aquesta elevada càrrega neta positiva podria neutralitzar la càrrega neta negativa de la superfície del bacteri a concentracions inferiors a la necessària per provocar la disrupció de la paret bacteriana. Un cop la càrrega ha estat neutralitzada, les interaccions electrostàtiques entre el pèptid i la paret bacteriana s'anul·larien i només s'atraurien mitjançant interaccions hidrofòbiques.¹¹⁹

Així mateix, en un estudi previ realitzat en el nostre grup per la Dra. Camó es varen preparar pèptids conjugats per unió de dos monòmers de la quimioteca **CECMEL11**. Aquests pèptids també presentaven una càrrega neta positiva de +10 o +11 i varen mostrar un perfil d'activitat biològica similar a la dels lipopèptids conjugats d'aquesta tesi doctoral (Taula 25). Concretament, varen presentar una activitat antimicrobiana moderada, baixa o nul·la i, a més, van ser actius enfront bacteris del gènere *Xanthomonas*, però no van presentar activitat enfront *E. amylovora* o les espècies de *Pseudomonas*.¹⁶⁷

Taula 25. Seqüència, càrrega neta, activitat antibacteriana i hemòlisi de pèptids conjugats resultants de la unió de dos pèptids de la quimioteca CECMEL11.¹⁶⁷

Pèptid	Seqüència ^a	Càrrega neta	CMI (μM) ^b						Hemòlisi ^c (%)
			<i>Ea</i>	<i>Pss</i>	<i>Psa</i>	<i>Xap</i>	<i>Xf</i>	<i>Xav</i>	
BP13-BP100	FKLFKKILKVL-KKLFKKILKYL-NH ₂	+10	>50	>50	25-50	12,5-25	6,2-12,5	12,5-25	100 ± 4,8
BP100-BP13	KKLFKKILKYL-FKLFKKILKVL-NH ₂	+10	>50	>50	25-50	12,5-25	6,2-12,5	6,2-12,5	100 ± 9,4
BP13-BP16	FKLFKKILKVL-KKLFKKILKYL-NH ₂	+11	>50	>50	>50	6,2-12,5	6,2-12,5	12,5-25	86 ± 13,2
BP16-BP13	KKLFKKILKYL-FKLFKKILKVL-NH ₂	+11	>50	12,5-25	25-50	6,2-12,5	12,5-25	1,6-3,1	100 ± 4,0
BP13-BP143	KKLFKKILKYL-FKLFKKILKVL-NH ₂	+10	>50	>50	>50	6,2-12,5	12,5-25	1,6-3,1	100 ± 0,6
BP143-BP13	FKLFKKILKVL-KKLFKKILKYL-NH ₂	+10	>50	>50	25-50	12,5-25	6,2-12,5	6,2-12,5	100 ± 6,1

^a Les lletres minúscules indiquen D-aminoàcids.

^b *Ea*, *E. amylovora*; *Pss*, *P. syringae* pv. *syringae*; *Psa*, *P. syringae* pv. *actinidiae*; *Xap*, *X. arboricola* pv. *pruni*; *Xf*, *X. fragariae*; *Xav*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

^c Activitat hemolítica a 50 μM .

Pel que fa a l'activitat hemolítica, a la bibliografia es poden trobar alguns exemples en els que es descriu que un augment de la càrrega neta positiva d'un pèptid està relacionat amb un augment de l'hemòlisi. Concretament, Jiang *et al.* varen preparar una quimioteca de derivats del pèptid Ac-KWKSFLKTFKSAKKTVLHTALKAISS-NH₂ (**V13K**) que presenten una càrrega neta entre -5 i +10. Van constatar que, tot i que no s'observava una relació lineal entre la càrrega neta i l'hemòlisi, en augmentar la càrrega neta per sobre de +8 augmentava considerablement l'activitat hemolítica.^{168,169} Cal comentar que els pèptids conjugats desenvolupats per la Dra. Camó, amb una càrrega neta positiva de +10 o +11, també varen presentar una activitat hemolítica elevada (>86% a 50 μM).

Els diferents lipopèptids conjugats derivats de **BP100** es varen representar mitjançant projeccions d'Edmunson (Apartat 3 de l'Annex). Com a exemple, a la Figura 46 es mostren les projeccions dels lipopèptids conjugats **BP387-BP16**, **BP16-BP387**, **BP475-flg15**, **flg15-BP475**, **BP475-Pip1** i **Pip1-**

BP475. A partir de l'anàlisi d'aquestes projeccions es va observar que els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP presenten una estructura amfipàtica perfecta (Figura 46 A i B per **BP16-BP387** i **BP387-BP16**, respectivament). En canvi, els lipopèptids conjugats que incorporen un pèptid elicitor de defenses presenten una estructura menys amfipàtica. Dintre d'aquests conjugats, els que incorporen **flg15** a l'extrem C-terminal mostren una estructura lleugerament més amfipàtica que els que l'incorporen a l'extrem N-terminal (Figura 46 C i D per **BP475-flg15** i **flg15-BP475**, respectivament). En canvi, el lipopèptid conjugat **Pip1-BP475**, que conté el pèptid elicitor de defenses a l'extrem N-terminal, mostra un caràcter amfipàtic major que el seu anàleg **BP475-Pip1** (Figura 46 F i E, respectivament). Cal comentar que les seqüències que mostren un major caràcter amfipàtic presenten una activitat hemolítica menor que la dels seus derivats amb un menor caràcter amfipàtic. Així, els lipopèptids conjugats resultants de la unió d'un lipopèptid i un pèptid elicitor de defenses amb un major caràcter amfipàtic (**BP387-flg15**, **BP475-flg15** i **Pip-BP475**) varen presentar una hemòlisi <18% a 250 µM, mentre que **flg15-BP387**, **flg15-BP475** i **BP475-Pip1** varen mostrar una activitat hemolítica entre 26 i 43% a 250 µM. Tanmateix, no es va observar cap tendència clara que relacionés el caràcter amfipàtic i l'activitat antimicrobiana.

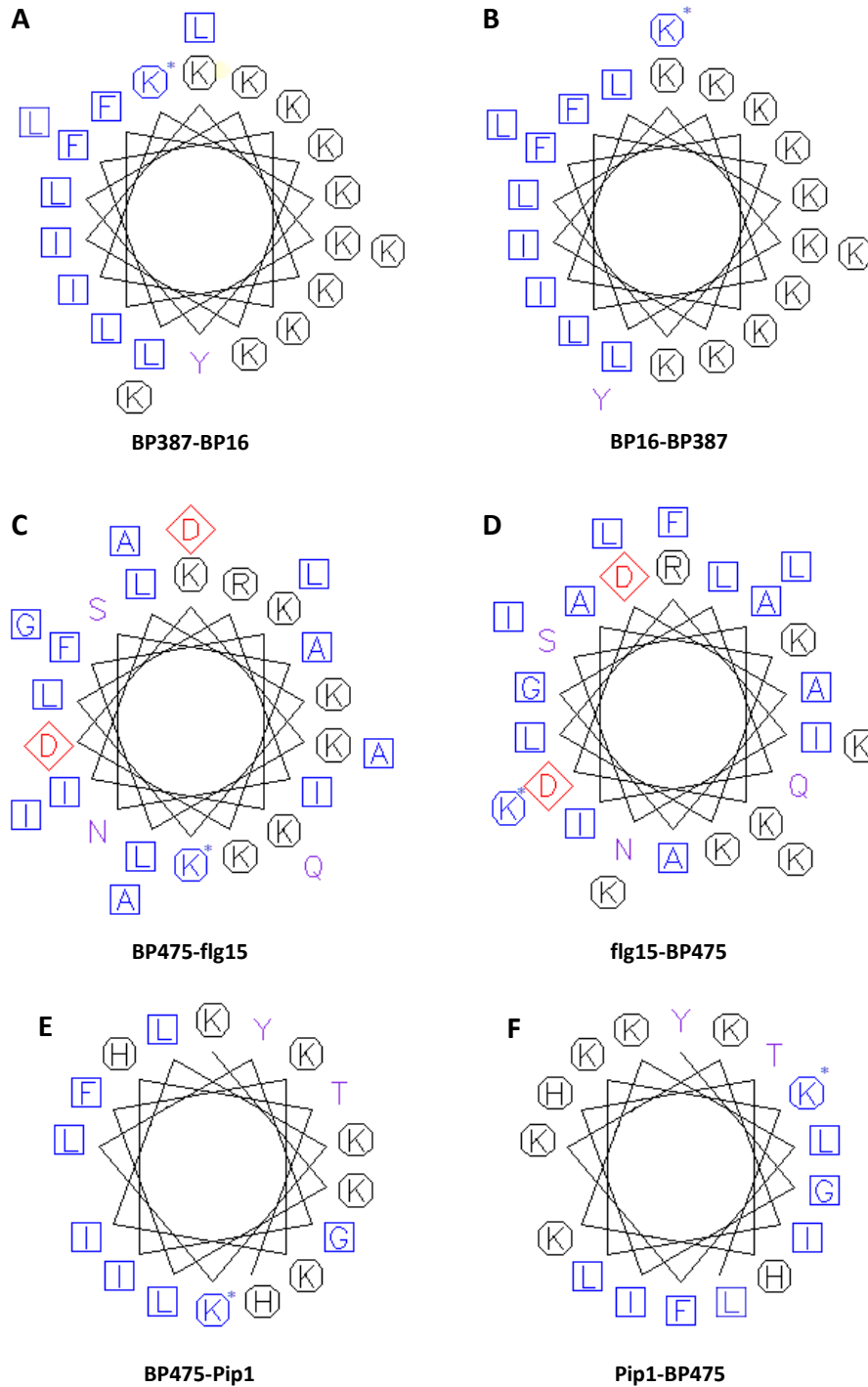


Figura 46. Projectió d'Edmunson de l'estructura de: **A**, BP387-BP16; **B**, BP16-BP387; **C**, BP475-flg15; **D**, flg15-BP475; **E**, BP475-Pip1; **F**, Pip1-BP475. Els aminoàcids polars positius es troben representats en negre, els polars negatius en vermell, el polars ense càrrega en lila i els hidrofòbics en blau. La lisina acilada es troba representada en blau i remarcada amb un asterisc.

4.3.4 Lipopèptids conjugats derivats de BP100 amb un millor perfil biològic

D'aquest estudi es pot deduir que, en general, els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP provinent de la quimioteca **CECMEL11** presenten una activitat antibacteriana baixa i una activitat hemolítica alta. En canvi, els lipopèptids conjugats que incorporen un pèptid elicitor de defenses de plantes mostren una activitat antibacteriana moderada o elevada, sobretot enfront els bacteris del gènere *Xanthomonas*, i una toxicitat baixa o moderada. Els lipopèptids conjugats que presenten el millor perfil són **Pip1-475** i **BP475-Pip1**, amb una CMI entre 0,8 i 6,2 µM enfront 5 dels 6 fitopatògens testats, una activitat hemolítica <26% a 250 µM i una fitotoxicitat menor que la melitina.

5 Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals

La unió covalent d'un antibiòtic o un fungicida a una seqüència peptídica és una estratègia descrita per aconseguir compostos més efectius (secció 1.3.5). En aquest sentit, en aquesta tesi es va plantejar la conjugació de **BP100** amb l'antibiòtic estreptomicina, i els fungicides valifenalat i quinoxifèn. Les propietats de **BP100** com a CPP podrien afavorir l'activitat biològica d'aquests pesticides.

5.1 Els pesticides estreptomicina, valifenalat i quinoxifèn

L'estreptomicina és un antibiòtic del grup dels aminoglicòsids que el 1944 va ser aïllat d'*Streptomyces griseus* (Figura 47). Inicialment, se'n va descriure el seu ús pel tractament de la tuberculosi i en els anys 50, la seva utilitat enfront fitopatògens bacterians gramnegatius i grampositius, i fongs oomicets. En va destacar la seva eficàcia enfront *E. amylovora*, agent causal del foc bacterià. Aquest antibiòtic actua a nivell del ribosoma, bloquejant la traducció i, per tant, interferint en la biosíntesi de proteïnes. L'any 1971 a Califòrnia, es van detectar les primeres soques d'*E. amylovora* resistents a l'acció de l'estreptomicina. Aquestes soques presentaven la diana ribosomal alterada o produïen enzims capaços d'inactivar l'estreptomicina.¹⁷⁰ A causa d'aquesta ràpida aparició de resistència bacteriana, l'ús de l'estreptomicina no està permès a la Unió Europea des del 31 de març del 2004.⁴

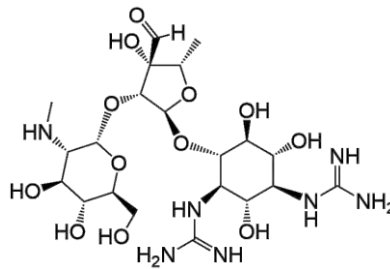


Figura 47. Estructura de l'estreptomicina.

L'iprovalicarb i el valifenalat són dipèptids antifúngics de la classe de les valinamides (Figura 48).¹⁷⁰ L'iprovalicarb va ser el primer fungicida d'aquesta família i va ser desenvolupat per Bayer el 1988 a partir de l'estructura general **3**. Es va observar que els productes més eficaços presentaven una cadena alquílica o un grup aromàtic a R¹, un isopropil o un sec-butil a R² corresponent a una valina o una isoleucina, respectivament, i una (1-arietil)amina a l'extrem C-terminal.

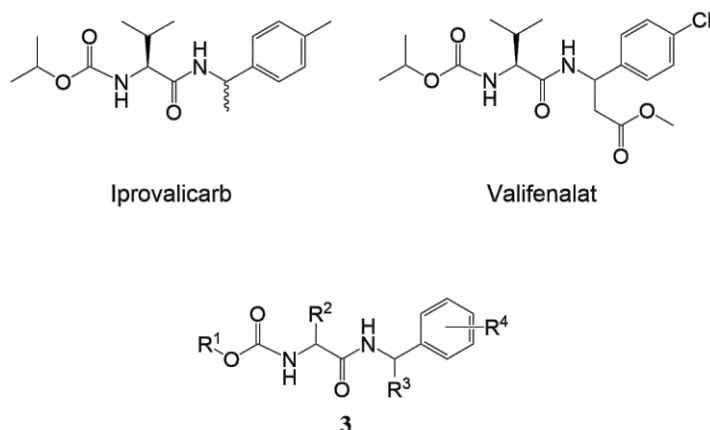
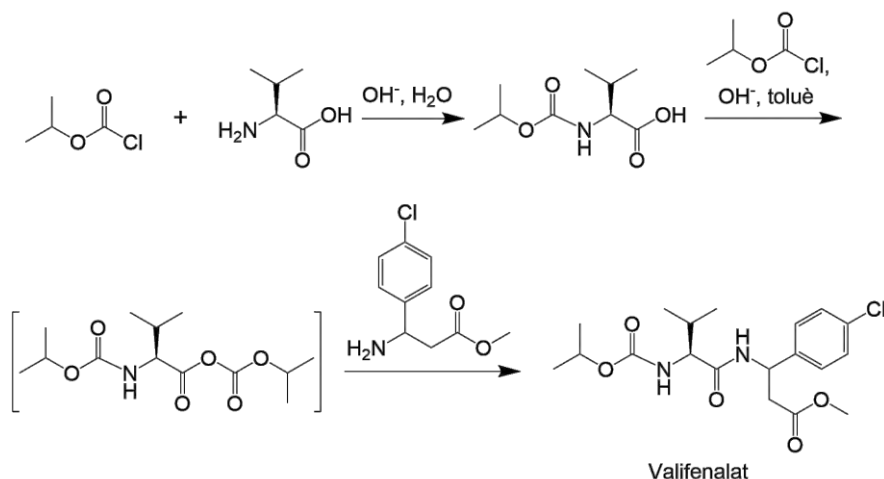


Figura 48. Estructura dels fungicides valifenalat i iprovalicarb, i de l'estructura general 3.

El valifenalat va ser descrit el 2008 per la companyia Isagro. La seva estructura consta d'una β -Phe(4-Cl)-OMe, una Val i un grup isopropiloxicarbonil. És un compost molt actiu enfront oomicets. S'usa en el control de malalties com el mildiu de la patatera i la tomatera, causat per *Phytophthora infestans*, o el mildiu de la vinya, causat per *Plasmopara viticola*, entre altres. Actua inhibint la biosíntesi de la paret cel·lular dels oomicets.^{4,170,171} La síntesi del valifenalat parteix del tractament de Val amb clorformat d'isopropil i, a continuació, el carbamat resultant es tracta novament amb clorformat d'isopropil (Esquema 6). Una posterior reacció amb β -Phe(4-Cl)-OMe proporciona el valifenalat.



Esquema 6. Síntesi del valifenalat.

El quinoxifèn és una quinolina fungicida desenvolupada per Dow-Elanco a principis dels anys 90 (Figura 49).^{170,172,173} Actua interferint la germinació de conidis (espores) i impeding que el patogen desenvolupi apresoris, uns òrgans que utilitza per fixar-se a les plantes. Per aquest motiu, el quinoxifèn és útil en el tractament preventiu de l'oïdi de la vinya, el blat, l'ordi o les cogombres, entre d'altres plantes. Dow-Elanco va començar a comercialitzar el quinoxifèn el 1997.^{170,172} Tanmateix, a partir del març de 2020 va ser retirat del mercat europeu a causa de la seva

persistència en el medi i la seva toxicitat per diversos organismes aquàtics, com les puces d'aigua.⁴

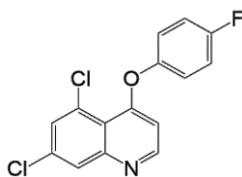
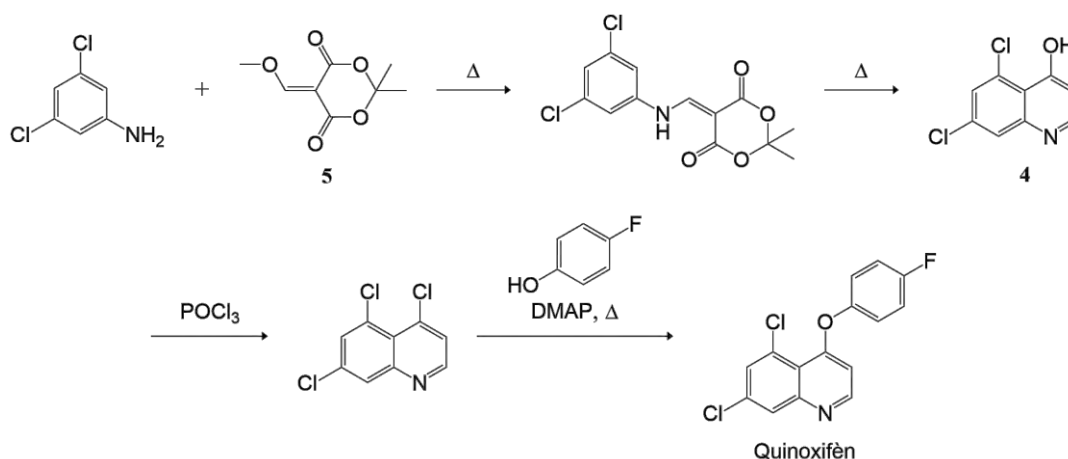


Figura 49. Estructura del quinoxifèn.

La síntesi del quinoxifèn implica la preparació de 5,7-dicloro-4-hidroxiquinolina (**4**) a través de l'addició conjugada de 3,5-dicloroanilina a **5** i posterior ciclació per generar l'anell de quinolina (Esquema 7). La cloració de la quinolina **4** seguida d'una S_NAr amb 4-fluorofenol proporciona el quinoxifèn.^{170,173}



Esquema 7. Síntesi del quinoxifèn.

5.2 Pèptids conjugats derivats de BP100 i de pesticides convencionals

Per a l'obtenció de pèptids conjugats de **BP100** amb pesticides convencionals, es va plantejar la conjugació a l'extrem N-terminal de **BP100** de l'antibiòtic estreptomicina, així com de derivats dels fungicides valifenalat i quinoxifèn. L'estructura dels corresponents pèptids conjugats **STR-BP100**, **BP523** i **Q-BP100** es mostren a la Figura 50.

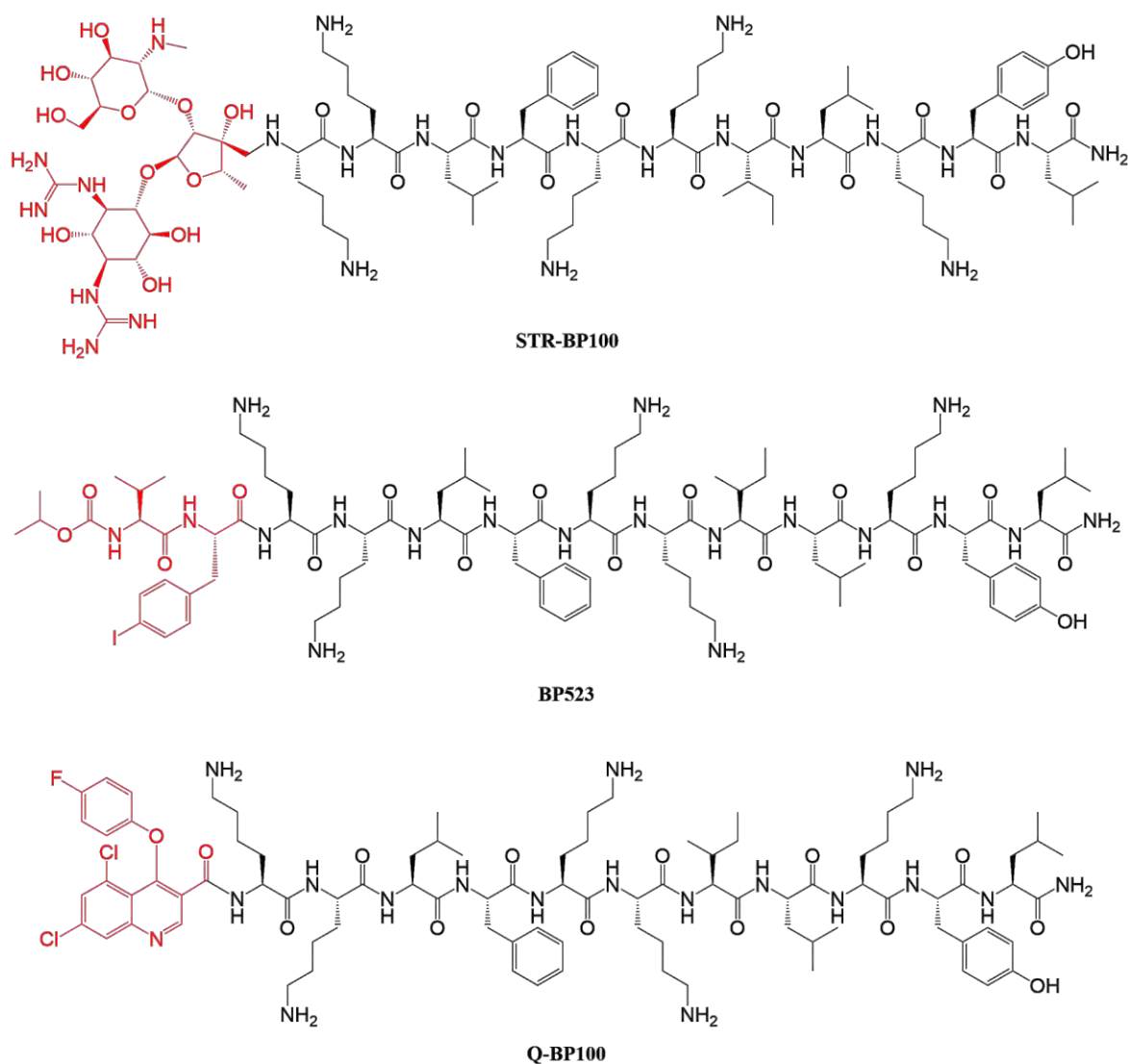
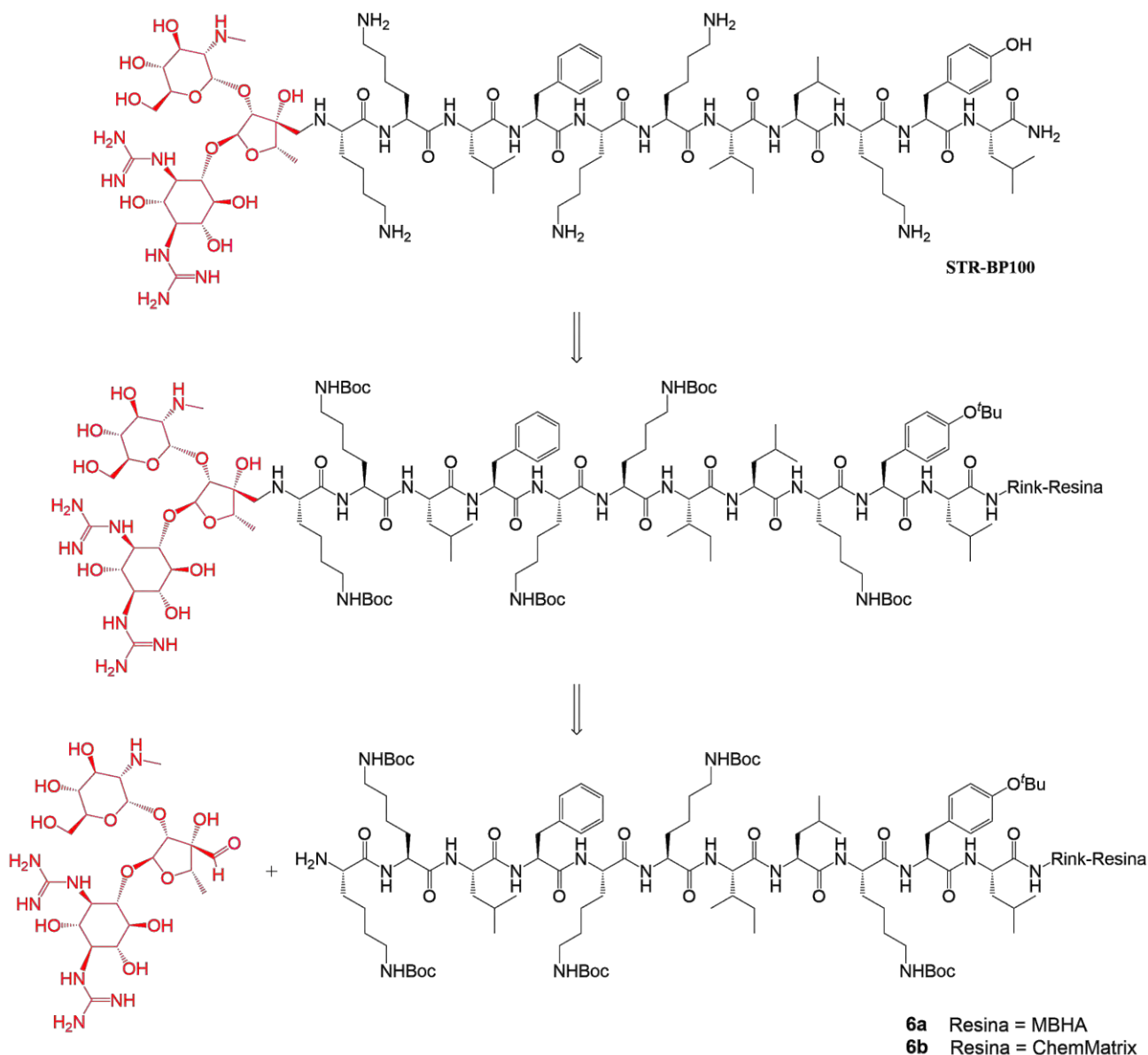


Figura 50. Estructura dels pèptids conjugats STR-BP100, BP523 i Q-BP100.

5.2.1 Conjugació d'estreptomicina a BP100

Recentment, s'ha descrit la conjugació d'estreptomicina a biopolímers com l'àcid hialurònic i el quitosan. En ambdós casos es va aprofitar la presència d'un aldehid a l'estructura de l'estreptomicina per a la seva unió al polisacàrid corresponent a través d'una aminació reductiva.^{174,175} Aquesta reacció també s'ha utilitzat per a la derivatització en fase sòlida de pèptids amb una diversitat d'aldehids.¹⁷⁶

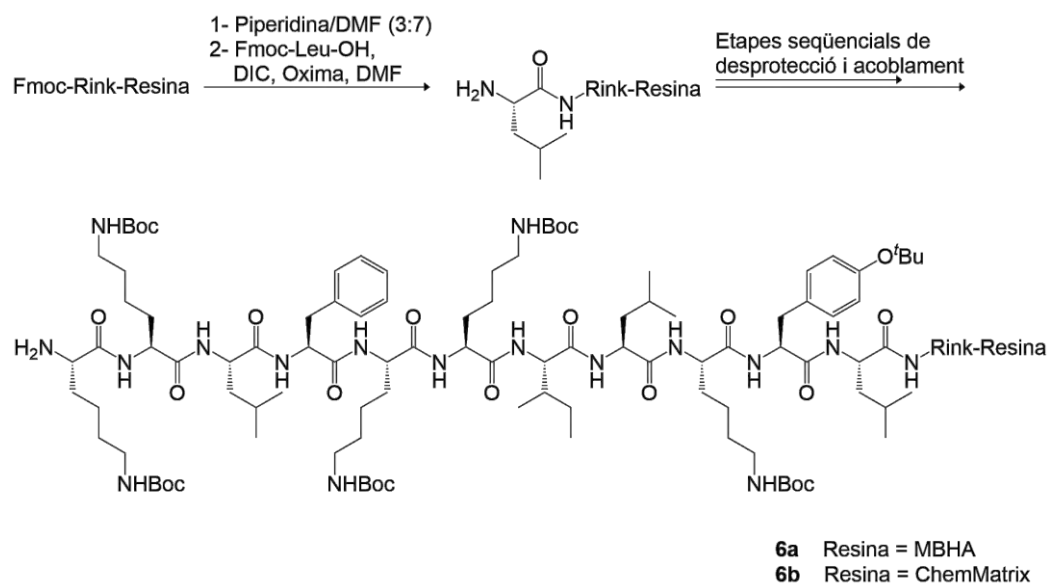
En base a aquests precedents, la síntesi del conjugat de **BP100** amb estreptomicina (**STR-BP100**) es va plantejar a través d'una ruta que inclou les etapes següents: (i) preparació de les peptidil resines protegides **6**; (ii) unió d'estreptomicina a **6** mitjançant una aminació reductiva; i (iii) desancorament del pèptid conjugat de la resina (Esquema 8).



Esquema 8. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat STR-BP100.

Per tal d'assajar l'ús d'una resina MBHA o ChemMatrix com a suport sòlid, es varen preparar les peptidil resines **6a** i **6b**. En ambdós casos la seva síntesi es duqué a terme seguint una estratègia Fmoc/^tBu similar a la descrita en els capítols anteriors (Esquema 9). La resina MBHA utilitzada incorporava el *linker* Fmoc-Rink-amida, mentre que en el cas de la resina ChemMatrix va ser necessari acoblar aquest *linker*. Aquest acoblament es va dur a terme utilitzant DIC i Oxima en DMF. L'elongació dels pèptids es va realitzar a través d'etapes seqüencials d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament dels aminoàcids corresponents. El grup Fmoc es va eliminar mitjançant un tractament amb piperidina/DMF (3:7), i els acoblaments es varen dur a terme emprant DIC i Oxima en DMF. A partir del sisè aminoàcid es va substituir la DMF per NMP en les etapes d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament dels aminoàcids. Un cop completada la seqüència, es va eliminar el grup Fmoc de l'extrem N-terminal, obtenint les peptidil resines **6**. El tractament

d'una alíquota d'aquestes peptidil resines amb TFA/H₂O/TIS va proporcionar **BP100** amb una puresa per HPLC >99% per **6a** i del 93% per **6b**.



Esquema 9. Síntesi de les peptidil resines 6.

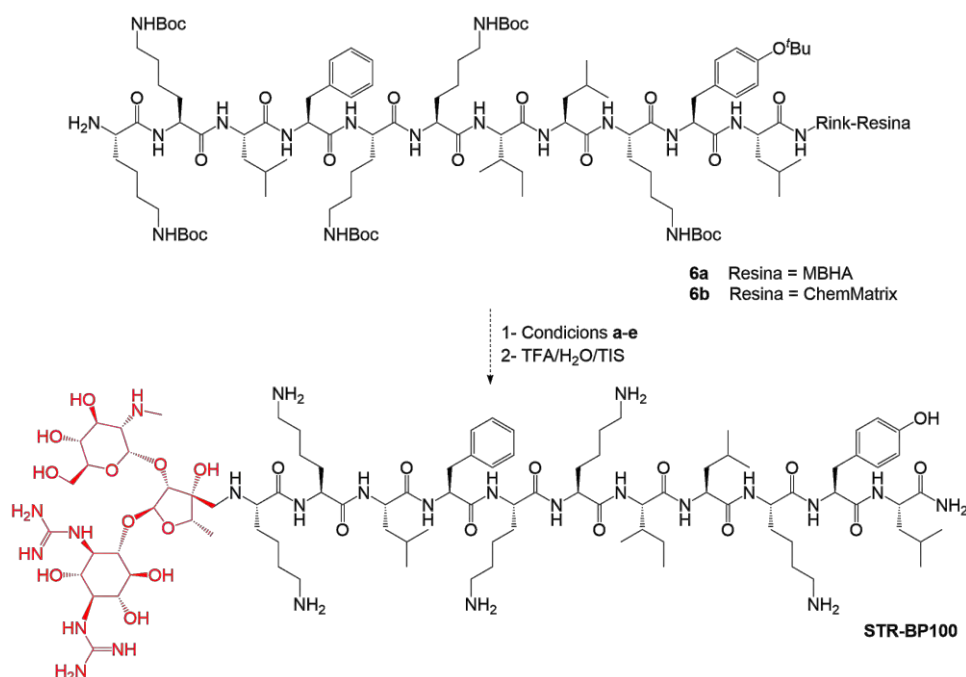
Seguidament, es va assajar l'aminació reductiva d'estreptomicina amb la peptidil resina **6a** utilitzant condicions de reacció basades en les descrites per Pels *et al.* (Taula 26, entrades a i b).¹⁷⁶ En primer lloc, es va tractar la peptidil resina **6a** amb estreptomicina (15 eq) en NMP durant 16 h (entrada a). Tanmateix, l'estreptomicina va resultar pràcticament insoluble en NMP, amb la qual cosa es va optar per tractar la peptidil resina **6a** amb la suspensió obtinguda de mesclar l'estreptomicina amb NMP. Tot seguit, es va assajar la reducció de la imina formada amb NaBH₄ en excés en CH₂Cl₂/MeOH (75:25) durant 30 min. Finalment, es va tractar la peptidil resina resultant amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i el cru obtingut es va analitzar per HPLC i espectrometria de masses. En un segon intent (entrada b) es va repetir el mateix procediment substituïnt l'NMP de la primera etapa per tetrahidrofuran (THF)/H₂O (1:3), solució en la que l'estreptomicina és soluble, però que no confereix un bon inflament de la resina MBHA.¹⁷⁷ En ambdós casos, no es va observar la presència del producte esperat **STR-BP100**, sinó que es va obtenir **BP100** amb una puresa per HPLC >90%.

Donada la necessitat d'utilitzar aigua per dissoldre l'estreptomicina es va decidir assajar aquesta reacció emprant una resina ChemMatrix com a suport sòlid, la qual presenta un bon grau d'inflament en dissolvents aquosos (Taula 26, entrades c i d).¹⁷⁸ Així, la peptidil resina **6b** es va sotmetre a les mateixes condicions anteriors, però utilitzant H₂O com a dissolvent (entrada c) o tampó citrat (pH =5) (entrada d). Es va optar per aquest darrer, ja que s'ha descrit que la formació de la imina intermèdia es veu afavorida a pH àcid.¹⁷⁹ En aquests dos casos tampoc es va detectar la formació del producte desitjat **STR-BP100**.

Finalment, es va avaluar si aquest resultat era degut al fet que la imina formada entre l'estreptomicina i les peptidil resines **6** no era estable. Per això, l'aminació reductiva es va realitzar en una única etapa (Taula 26, entrada e). Així, la peptidil resina **6b** es va tractar amb

estreptomina (2 eq) i NaBH_3CN (5 eq) en H_2O durant 72 h. Malauradament, aquestes condicions tampoc varen portar a l'obtenció de **STR-BP100**.

Taula 26. Condicions assajades per a la conjugació de l'estreptomina a les peptidil resines 6.



Entrada	Peptidil resina	Condicions
a	6a	(i) Estreptomina (15 eq), NMP, 16 h
		(ii) NaBH_4 (excés), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75:25), 30 min
b	6a	(i) Estreptomina (15 eq), THF/ H_2O (1:3), 16 h
		(ii) NaBH_4 (excés), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75:25), 30 min
c	6b	(i) Estreptomina (15 eq), H_2O , 16 h
		(ii) NaBH_4 (excés), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75:25), 30 min
d	6b	(i) Estreptomina (15 eq), tampó citrat pH = 5, 16 h
		(ii) NaBH_4 (excés), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75:25), 30 min
e	6b	Estreptomina (2 eq), i NaBH_3CN (5 eq), H_2O , 72 h

La dificultat de la formació d'imines derivades d'estreptomina en aigua també havia estat descrita anteriorment per Fuentes-Martinez *et al.*, els quals varen optar per utilitzar un substrat més bàsic com les hidrazines.¹⁸⁰ En un altre estudi, Millington *et al.* varen descriure l'ús de *linkers* de tipus aril hidrazina en la síntesi en fase sòlida de pèptids.¹⁸¹ Així, per facilitar la unió d'estreptomina a **BP100** es va optar per emprar l'àcid 4-hidrazinobenzoic com a *linker*. Amb aquest objectiu es va assajar la síntesi de **7** (Figura 51).

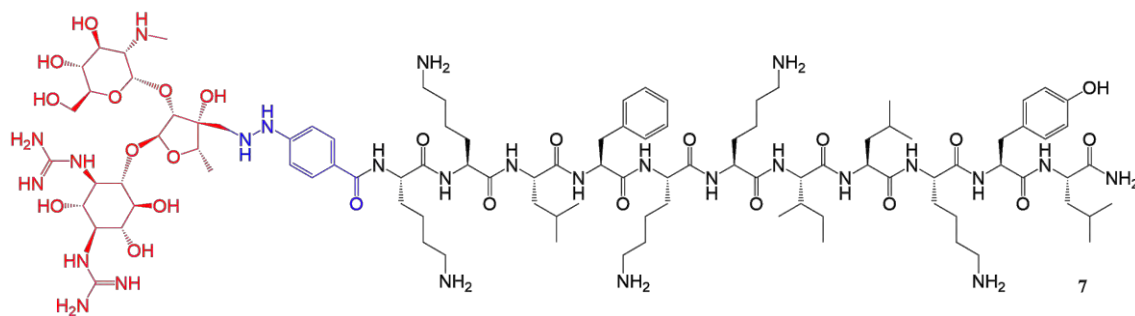


Figura 51. Estructura de 7.

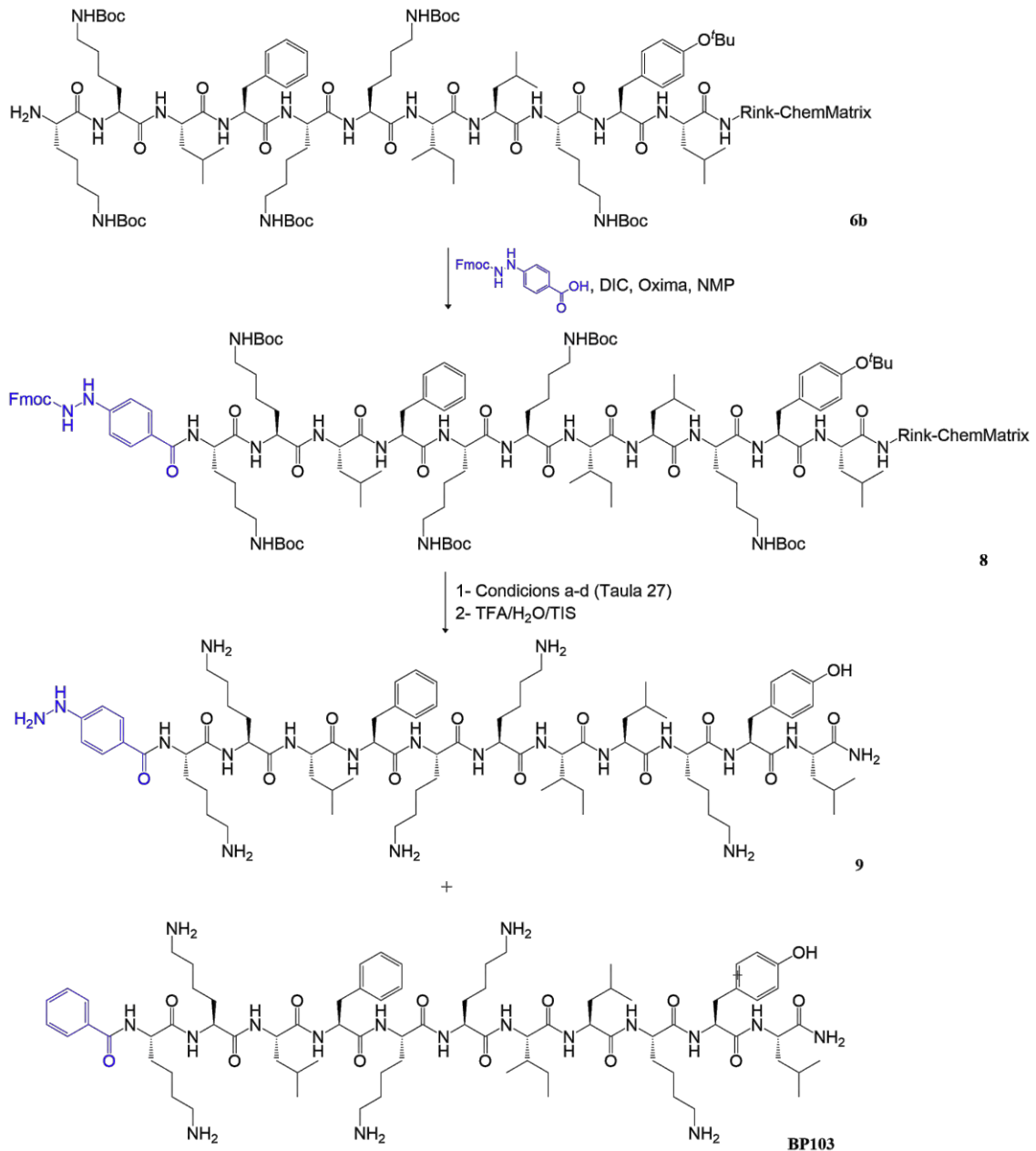
La preparació de **7** requeria obtenir la peptidil resina **8**, incorporant el *linker* àcid 4-hidrazinobenzoic (Esquema 10). Per aquest fi, primerament, la peptidil resina anterior **6b** es va tractar amb àcid 4-[2-(9-fluorenilmetoxicarbonil)hidrazino]benzoic, DIC i Oxima en NMP durant 12 h. Aquest tractament es va repetir durant 24 h addicionals. A continuació, es va assajar l'eliminació del grup Fmoc de la peptidil resina resultant **8** mitjançant piperidina/NMP (3:7) segons les condicions descrites a la Taula 27 en les que es va variar el temps de reacció i la temperatura. Seguidament, una alíquota de la peptidil resina obtinguda es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5), i el cru corresponent es va analitzar mitjançant HPLC.

En tots els assajos es va observar el producte esperat **9**, juntament amb **BP103** (Taula 27). Aquest darrer compost prové de la pèrdua del grup hidrazino durant la síntesi. El millor resultat es va obtenir en tractar **8** amb piperidina/NMP (3:7) dues vegades durant 2 min a temperatura ambient, proporcionant **9** amb un 74% de puresa per HPLC (Taula 27, entrada b).

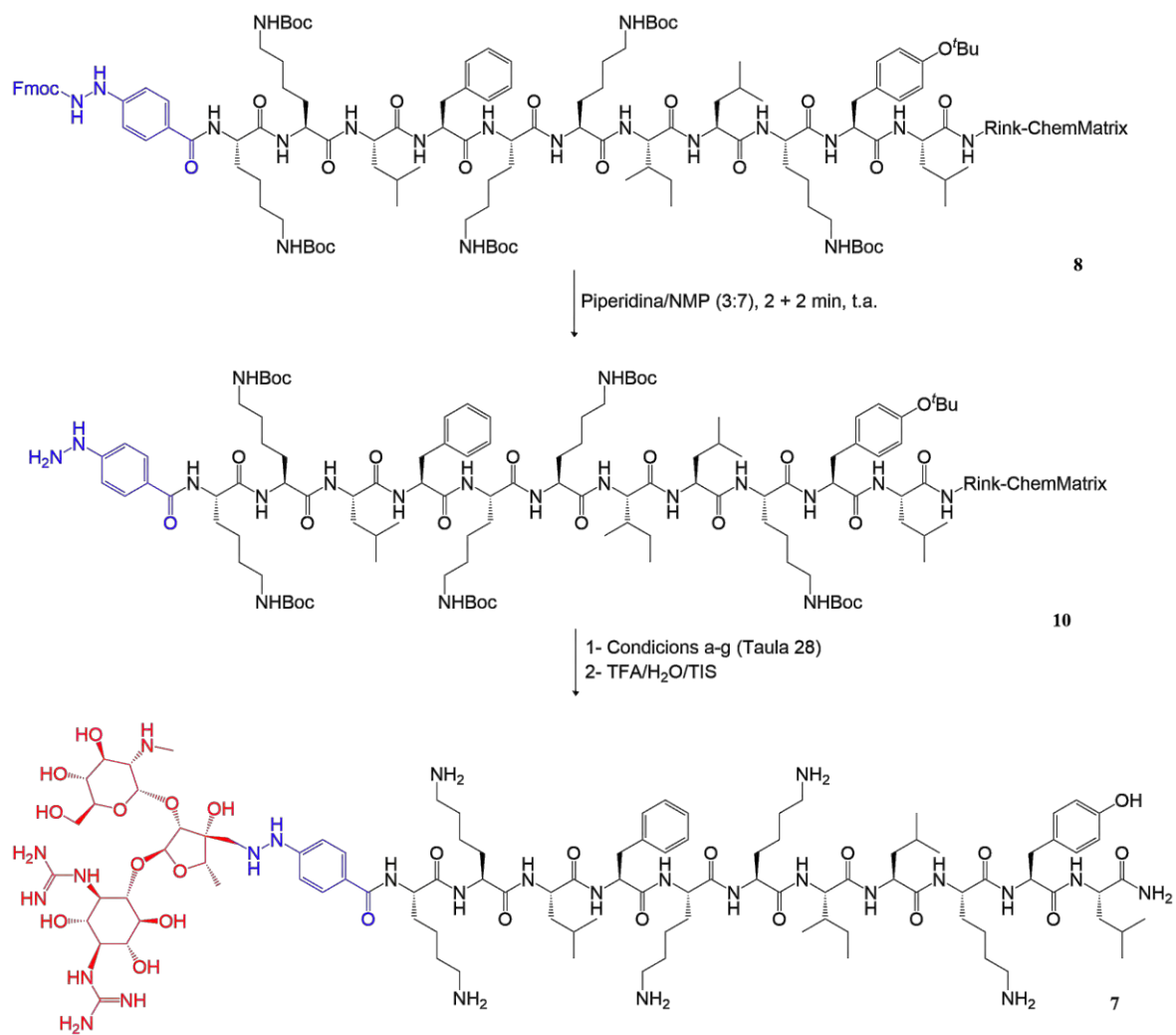
Taula 27. Optimització de l'eliminació del grup Fmoc de la peptidil resina **8**.

Entrada	Condicions	Puresa (%) ^a	
		9	BP103
a	Piperidina/NMP (3:7) i) 2 min, t.a.; ii) 3 min, 40° C	60	22
b	Piperidina/NMP (3:7) i) 2 min, t.a.; ii) 2 min, t.a.	74	14
c	Piperidina/NMP (3:7) i) 2 min, t.a.; ii) 5 min, t.a.	66	13
d	Piperidina/NMP (3:7) i) 2 min, t.a.; ii) 8 min, t.a.	70	13

^a Percentatge determinat mitjançant HPLC a 220 nm.

Esquema 10. Síntesi de la peptidil resina **8** i eliminació del grup Fmoc.

Un cop eliminat el grup Fmoc de la peptidil resina **8**, es va procedir a optimitzar l'acoblament de l'estreptomicina (Esquema 11). Es varen assajar les condicions indicades a la Taula 28. D'una banda, es va estudiar la formació de la hidrazona entre la peptidil resina **10** i l'estreptomicina, i la seva posterior reducció amb NaBH₄. Es varen analitzar els equivalents d'estreptomicina i el temps de les dues etapes (Taula 28, entrades a-f). D'altra banda, es va avaluar la reducció de la hidrazona *in situ* utilitzant NaBH₃CN (Taula 28, entrada g). Les peptidil resines resultants es varen tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) i el corresponent cru obtingut es va analitzar mitjançant HPLC i espectrometria de masses.



Esquema 11. Assajos per a la síntesi de 7.

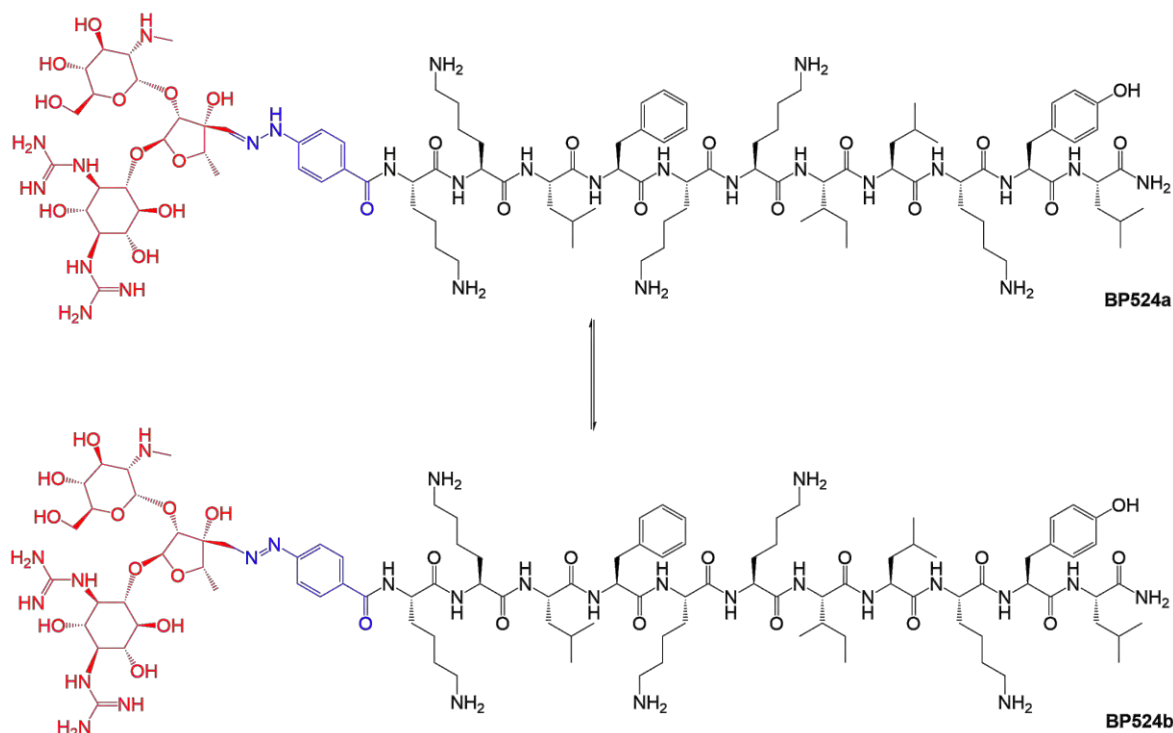
Taula 28. Assajos per a la síntesi de **7**.

Entrada	Condicions	Puresa (%) ^a		
		Pèptid amb <i>m/z</i> = 2118,27	9	BP103
a	i) Estreptomycina (1 eq), H ₂ O, 16 h	5	25	49
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 min			
b	i) Estreptomycina (5 eq), H ₂ O, 16 h	18	11	65
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 min			
c	i) Estreptomycina (10 eq), H ₂ O, 16 h	13	20	50
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 min			
d	i) Estreptomycina (1 eq), H ₂ O, 72 h	15	15	58
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 min			
e	i) Estreptomycina (1 eq), H ₂ O, 16 h	8	29	46
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 + 30 min			
f	i) Estreptomycina (5 eq), H ₂ O, 72 h	41	15	27
	ii) NaBH ₄ (excés), CH ₂ Cl ₂ /MeOH (75:25), 30 min			
g	Estreptomycina (1 eq) i NaBH ₃ CN (3 eq), H ₂ O, 72 h	0	58	31

^a Percentatge determinat mitjançant HPLC a 220 nm.

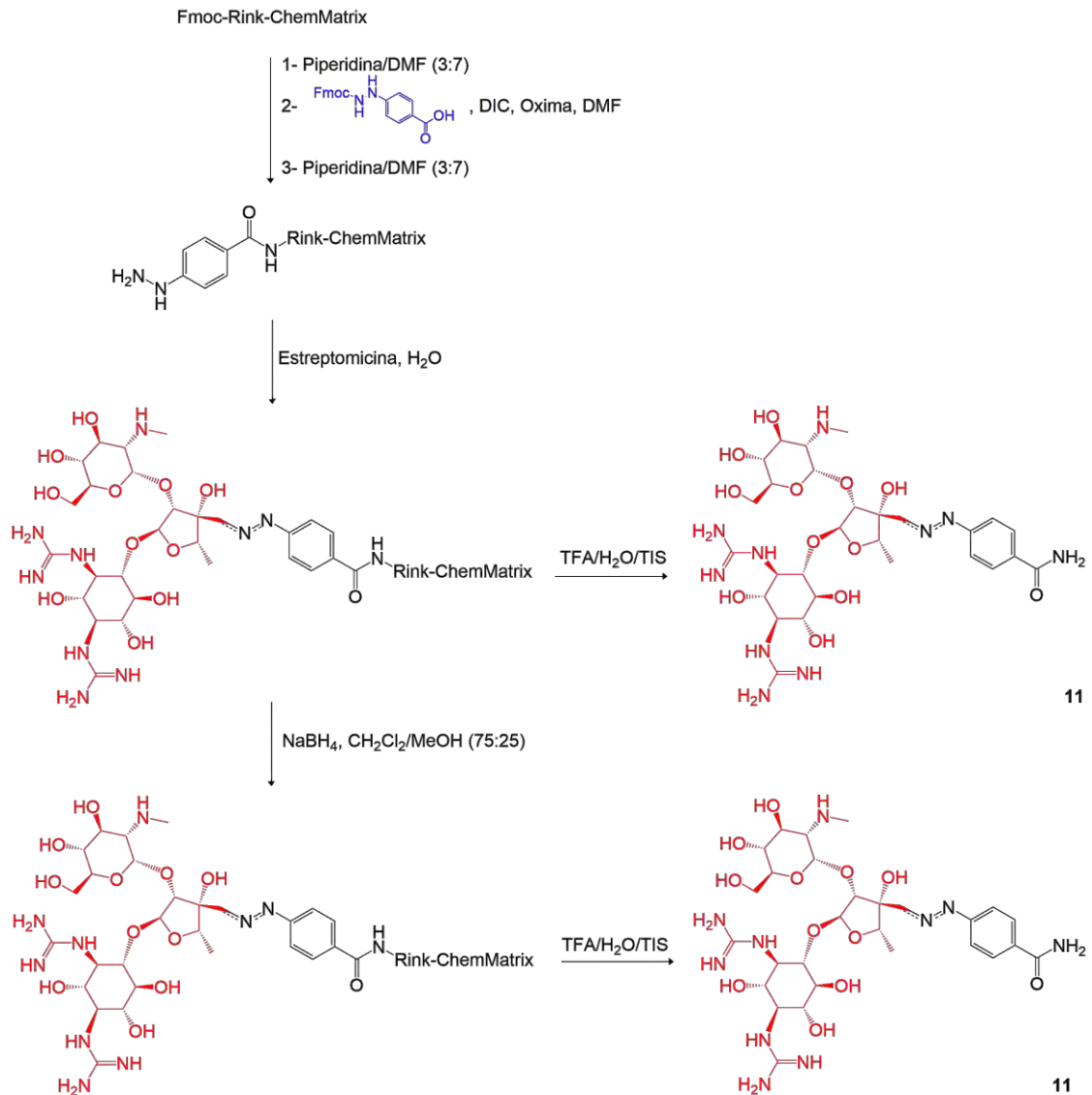
En el cas de les condicions a-f (Taula 28), per HPLC es va observar la presència dels pèptids **9** i **BP103** juntament amb un producte que podria correspondre a la seqüència **7** esperada incorporant estreptomycina. Els millors resultats es varen obtenir en tractar la peptidil resina **10** amb estreptomycina (5 eq) durant 72 h seguit de la reducció posterior de la hidrazona amb NaBH₄ en excés en CH₂Cl₂/MeOH (75:25) durant 30 min (entrada f). El cru obtingut va mostrar el producte assignat tentativament com a **7** amb un 41% de puresa per HPLC. La purificació d'aquest cru per cromatografia flash en fase reversa va permetre aïllar aquest compost amb un 94% de puresa. Malauradament, la caracterització mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) d'aquest producte va mostrar una massa de 2118,27, que era dues unitats inferior a l'esperada per al pèptid conjugat **7**.

En base a aquests resultats es va postular la possibilitat de que sota les condicions de reducció utilitzades no s'hagués reduït la hidrazona i que, per tant, s'hagués obtingut el pèptid **BP524a** (Esquema 12). També es va plantejar que **BP524a** estigués en equilibri amb el ser tautòmer **BP524b** contenint un grup azo. Tot i desconèixer l'estructura exacta d'aquest pèptid, es va decidir assajar la seva activitat biològica.



Esquema 12. Equilibri tautomèric proposat per BP524.

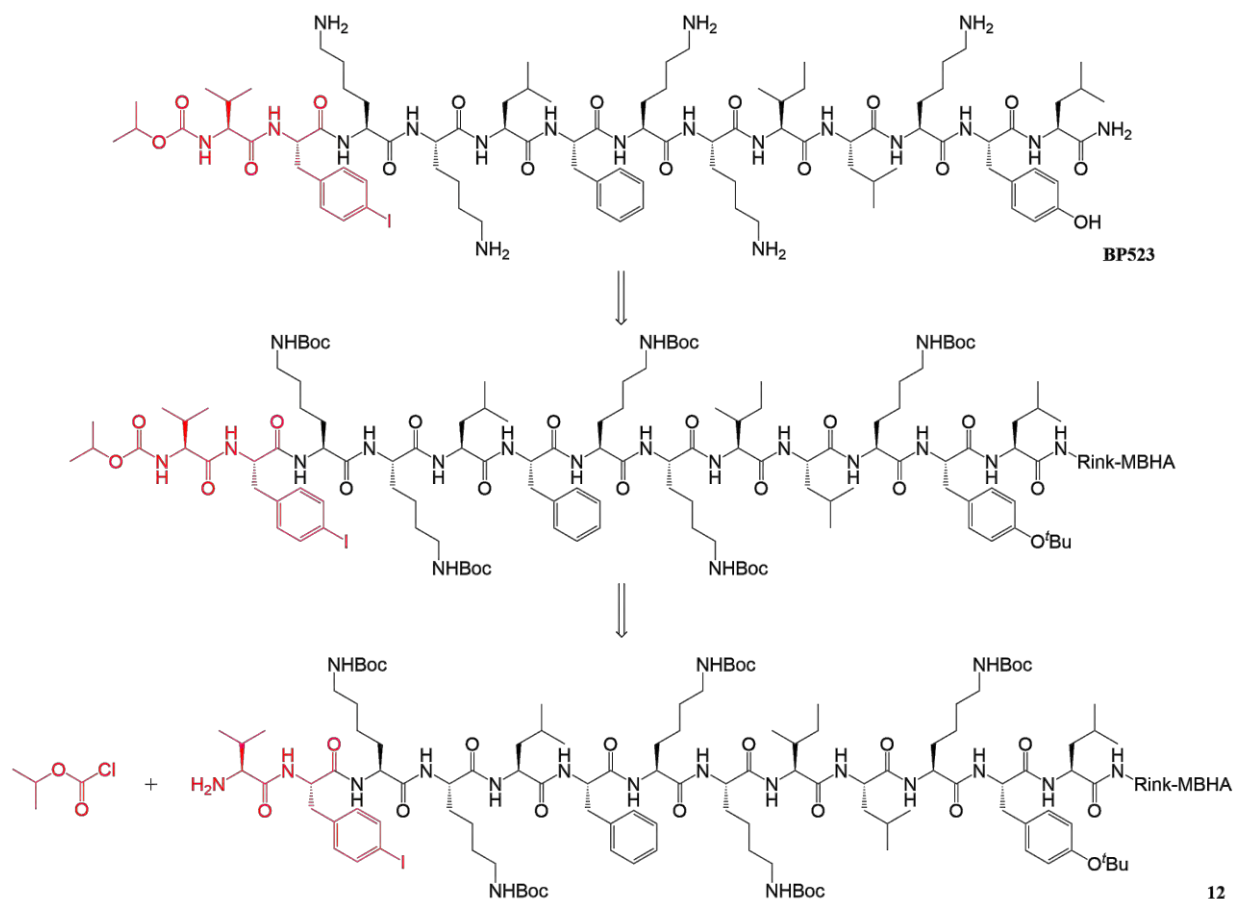
Per tal de comprovar l'eficiència de les condicions de reducció de la hidrazona resultant de la reacció de la peptidil resin **10** amb l'estreptomicina es va utilitzar un sistema model més simple (Esquema 13). Concretament, l'àcid 4-[2-(9-fluorenilmetoxicarbonil)hidrazino]benzoic es va acoblar a una resina Rink-ChemMatrix i, després d'eliminar el grup Fmoc, la resina es va tractar amb estreptomicina (5 eq) durant 72 h. Una alíquota de la resina resultant es va sotmetre a condicions acidolítiques. A la resta de la resina s'hi va addicionar NaBH_4 en excés en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75:25) durant 30 min i, a continuació, es va tractar amb $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$ (95:2,5:2,5). L'anàlisi per HPLC i espectrometria de masses va mostrar que, tant abans com després del tractament amb NaBH_4 , s'obtenia el mateix compost representat com a **11** a l'Esquema 13. Aquest resultat va indicar que, igual que per la síntesi de **BP524**, en aquest cas tampoc s'havia produït la reducció. Tenint en compte que aquesta hidrazona podria estar en equilibri amb el corresponent grup azo, en **11** els enllaços implicats en aquest tautomerisme també s'han indicat amb línies discontinues.



Esquema 13. Síntesi del compost 11.

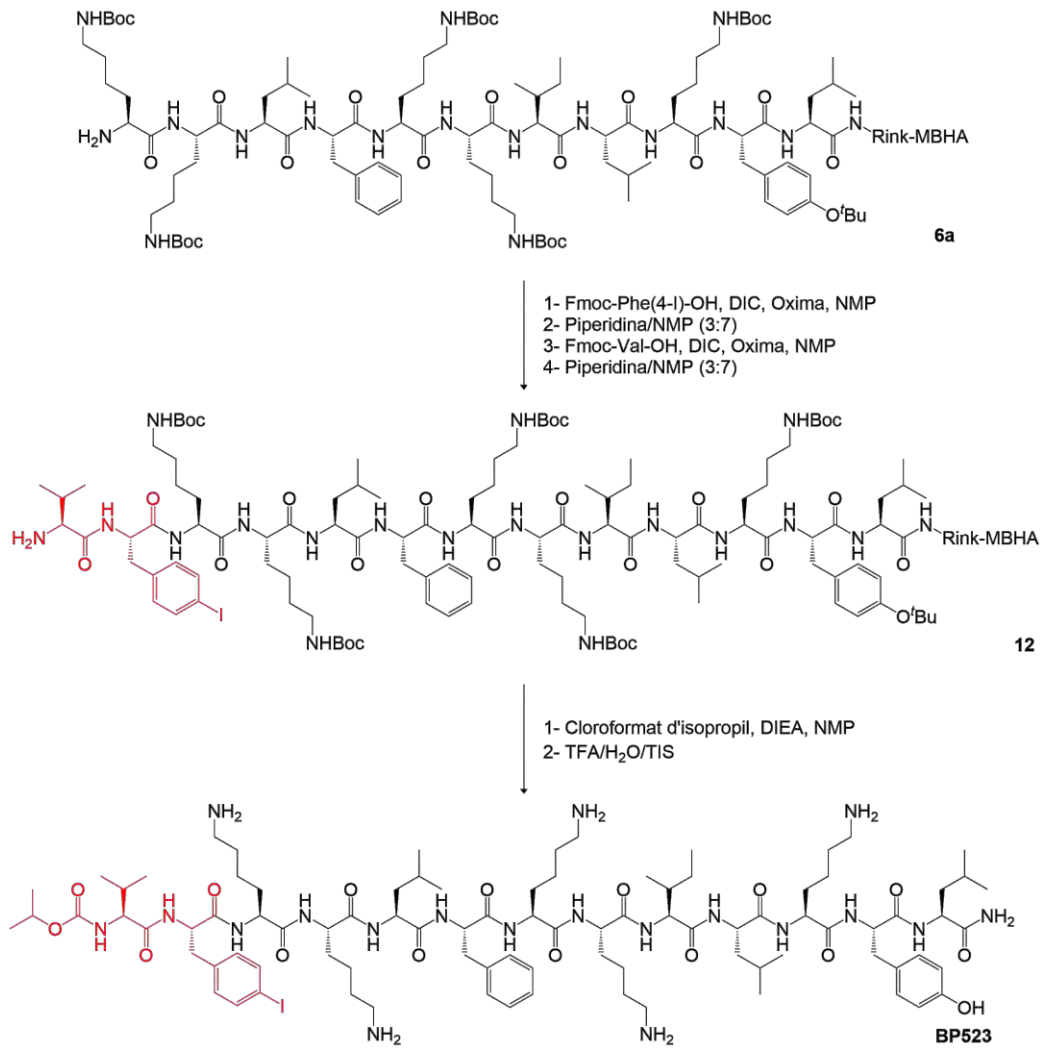
5.2.2 Conjugació d'un derivat del valifenalat a BP100

En aquesta tesi doctoral també es va plantejar la conjugació a l'extrem N-terminal de **BP100** d'un derivat de valifenalat que incorpora una 4-iodofenilalanina en comptes d'una 4-cloro-β-fenilalanina (Figura 50). L'anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat corresponent **BP523** es mostra a l'Esquema 14 i inclou la preparació de la peptidil resina **12** i la seva posterior derivatització amb cloroformat d'isopropil.



Esquema 14. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat BP523.

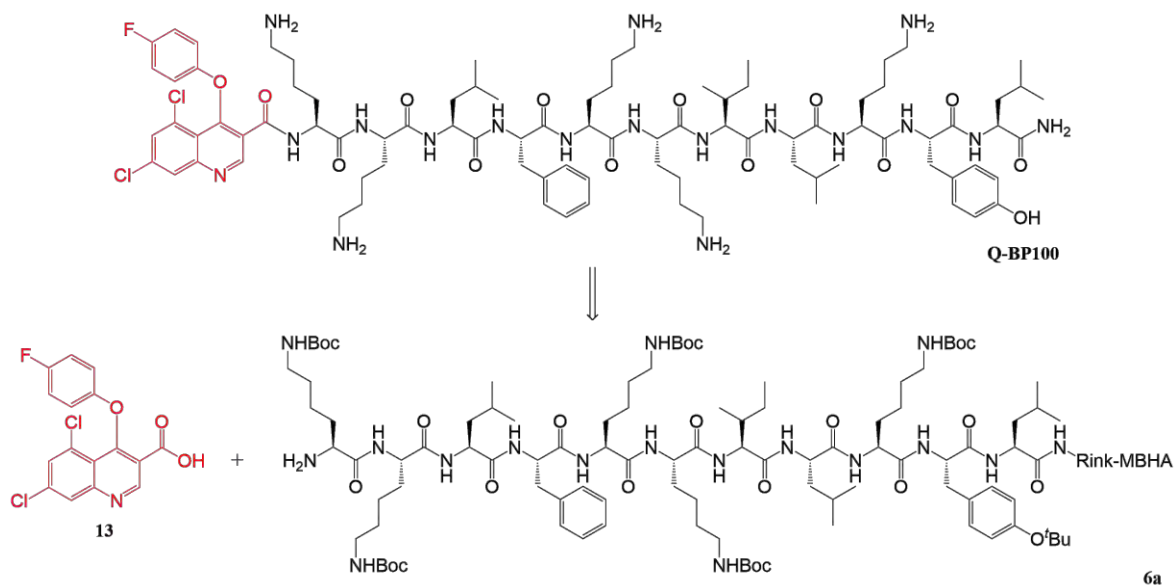
La síntesi de **BP523** es va iniciar a partir de la peptidil resina **6a** sintetitzada prèviament (Esquema 15). Després de l'acoblament successiu de Fmoc-Phe(4-I)-OH i Fmoc-Val-OH, i subsegüent eliminació del grup Fmoc N-terminal, la peptidil resina resultant **12** es va tractar amb cloroformat d'isopropil i DIEA en NMP durant tota la nit. El tractament amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) de la peptidil resina obtinguda i la posterior purificació del cru per cromatografia flash en fase reversa va proporcionar **BP523** amb una puresa excel·lent, >99%. **BP523** es va caracteritzar per espectrometria de masses.



Esquema 15. Síntesi del pèptid BP523.

5.2.3 Conjugació d'un derivat de quinoxifèn a BP100

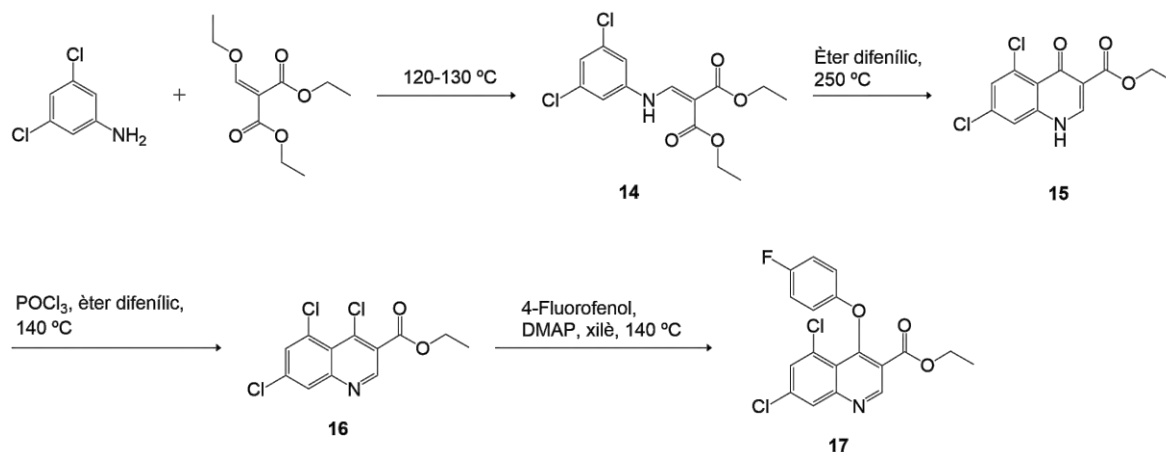
Un altre objectiu d'aquest treball va ser la síntesi del conjugat **Q-BP100** que conté quinoxifèn unit a l'extrem N-terminal de **BP100**. D'acord amb l'anàlisi retrosintètica mostrada a l'Esquema 16, per assolir aquest objectiu va ser necessària la preparació del derivat de quinoxifèn **13**. Aquest derivat incorpora un grup àcid carboxílic a la posició 3 de l'anell de quinolina per permetre la seva unió a la peptidil resina **6a** per formació d'un enllaç amida.



Esquema 16. Anàlisi retrosintètica del pèptid conjugat Q-BP100.

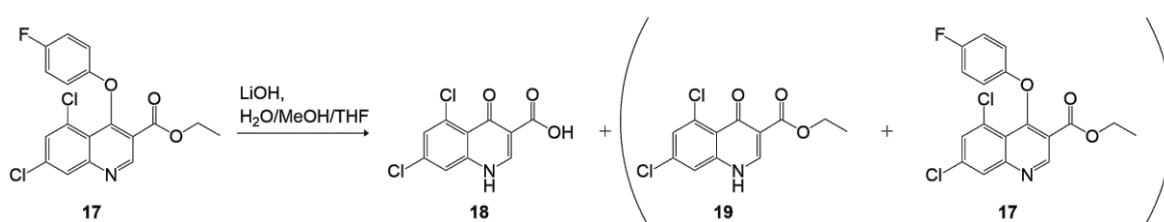
La síntesi de **13** es va iniciar amb la condensació de 3,5-dicloroanilina amb etoximetilenmalonat de dietil a 120-130 °C durant 4 h (Esquema 17). El cru resultant es va cristal·litzar amb hexà, obtenint-se **14** amb un rendiment del 87%. A continuació, **14** es va sotmetre a una acilació de Friedel-Crafts intramolecular, a 250 °C en èter difenílic durant 2 h, generant la quinolona **15** amb un 88% de rendiment.¹⁸² Per aconseguir la cloració de la posició 4 de **15**, aquesta quinolona es va tractar amb POCl₃ en èter difenílic a 140 °C durant 1,5 h.¹⁸³ Després de neutralitzar el cru amb NaHCO₃ i realitzar extraccions amb CH₂Cl₂, es va obtenir la 4-cloroquinolona **16** juntament amb èter difenílic. Aquesta mescla es va utilitzar directament a la següent etapa, en la que es va procedir a introduir el substituent 4-fluorofenoxi a la posició 4 de **16**. La mescla es va tractar amb 4-fluorofenol, en presència de quantitats catalítiques de DMAP en xilè a 140 °C durant tota la nit. El cru obtingut es va purificar mitjançant cromatografia flash, proporcionant **17** amb un 67% de rendiment.¹⁸⁴

Els productes **14**, **15** i **17** es varen caracteritzar per ressonància magnètica de protó (¹H-RNM) i espectrometria de masses. La formació de **14** es va confirmar per la presència dels dos triplets (1,32 i 1,35 ppm) i els dos quadruplets (4,25 i 4,28 ppm) corresponents als grups etoxi, a més del doblet a 8,35 ppm corresponent al CH del grup enamino. En **15** es va observar la desaparició d'un grup etoxi i, a més, el CH metilenmalonat present a **14** (8,35 ppm) es va desplaçar fins a 9,12 ppm (CH-2 de la quinolina **15**). En **17** es va observar l'aparició de dos multiplets entre 6,70 i 7,00 ppm corresponents al grup 4-fluorofenoxi.



Esquema 17. Síntesi del derivat de quinoxifèn 17.

Finalment, es va assajar la hidròlisi del grup èster de **17** per tractament amb LiOH (3 eq) en H₂O/MeOH/THF (1:1:1) a temperatura ambient durant 5 h (Esquema 18). La reacció es va controlar mitjançant cromatografia de capa fina (TLC). El cru resultant es va acidificar fins a pH 3, es va filtrar i es va assecat al buit. El sòlid resultant es va caracteritzar mitjançant ¹H-RNM. Tanmateix, a l'espectre no es varen observar els senyals entre 6,70 i 7,00 ppm corresponents al grup 4-fluorofenoxi. Per tant, es va deduir que el producte obtingut corresponia a la quinolona **18**, resultant de la hidròlisi de l'èster i, també, de la pèrdua del grup fluorofenoxi. En assajos posteriors, la quinolina **17** es va sotmetre a les condicions anteriors, però durant 1,5 h. En aquest cas, es va obtenir una mescla de la quinolina de partida **17** amb les quinolones **18** i **19**. Aquesta última tampoc conté el grup fluorofenoxi però, en canvi, manté el grup èster. Aquest resultat indica que el grup fenoxi és més susceptible a ser hidrolitzat en aquestes condicions que l'èster etílic. Aquest fet es va confirmar en reduir el temps de la reacció a 10 s, que va proporcionar la quinolina **17** juntament amb la quinolona **19**.

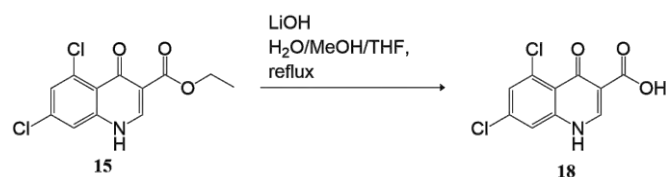


Esquema 18. Assajos d'hidròlisi del grup èster de 17.

Per últim, es varen provar les condicions d'hidròlisi proposades per Mattson *et al.*, en les quals **17** es va tractar amb trimetilamina (3 eq), bromur de liti (10 eq) en H₂O/THF (6:94) durant 6,5 h a temperatura ambient.¹⁸⁵ Tanmateix, en aquestes condicions no es va hidrolitzar cap dels dos grups, recuperant-se únicament el producte de partida **17**.

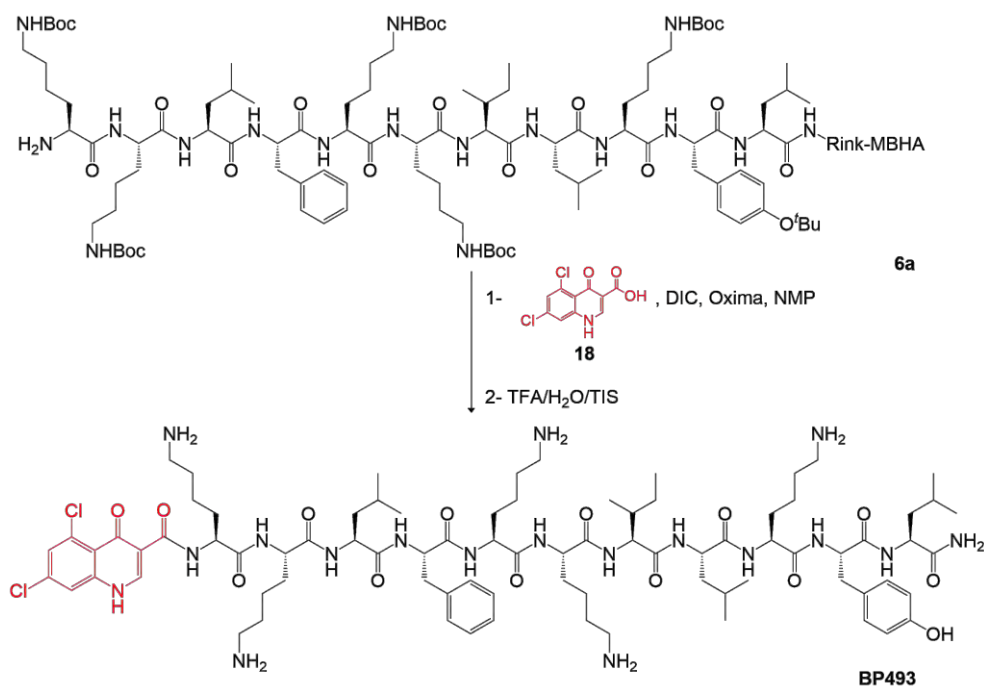
En base a aquests resultats, es va decidir conjuguar la quinolona **18** a l'extrem N-terminal de **BP100**. Aquesta quinolona es va obtenir per hidròlisi de la quinolona **15** sintetitzada anteriorment (Esquema 19). D'aquesta manera, **15** es va tractar amb LiOH en H₂O/MeOH/THF (1:1:1) a reflux

durant 6,5 h, proporcionant la quinolona **18** substituïda a la posició 3 amb un grup àcid carboxílic (rendiment del 86%).



Esquema 19. Síntesi de **18** per hidròlisi de la quinolona **15**.

Seguidament, la quinolona **18** es va conjugar a la peptidil resina **6a**, emprant DIC i Oxima en NMP durant tota la nit (Esquema 20). El cru obtingut del tractament de la peptidil resina resultant amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) es va purificar per cromatografia flash en fase reversa, obtenint-se el pèptid conjugat **BP493** amb una puresa excel·lent, >99%, el qual es va caracteritzar per espectrometria de masses.



Esquema 20. Síntesi del pèptid conjugat **BP493**.

5.3 Activitat biològica dels pèptids conjugats BP493, BP523 i BP524

Pels 3 pèptids conjugats **BP493**, **BP523** i **BP524** es va assajar l'activitat antimicrobiana, l'hemòlisi i la fitotoxicitat.

5.3.1 Activitat antimicrobiana dels pèptids conjugats BP493, BP523 i BP524

L'activitat antimicrobiana dels pèptids conjugats **BP493**, **BP523** i **BP524** es va analitzar enfront els bacteris *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae*, i enfront els fongs *P. expansum* i *F. oxysporum* a 0,8, 1,6, 3,1, 6,2, 12,5 i 25 µM (Figura 52). A més, també es va assajar l'activitat antimicrobiana de **BP100** i de l'estreptomicina a efectes comparatius.

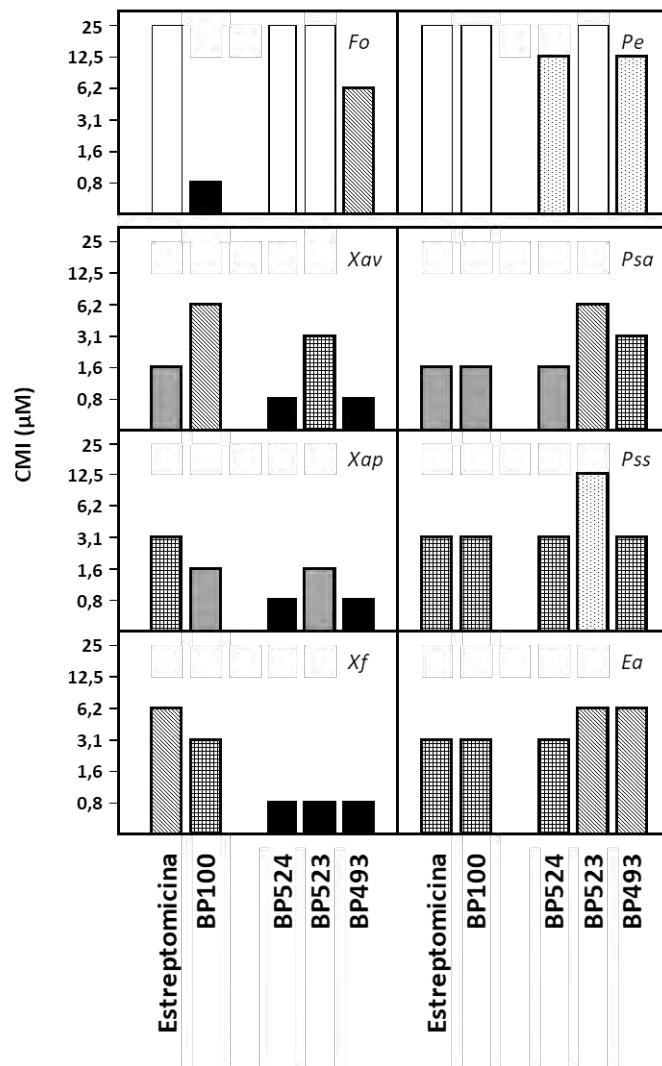


Figura 52. CMI dels pèptids conjugats enfront *F. oxysporum* (*Fo*), *P. expansum* (*Pe*), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *X. arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*), *X. fragariae* (*Xf*) i *E. amylovora* (*Ea*). S'indica el valor més baix de la CMI. S'inclouen **BP100** i l'estreptomicina a efectes comparatius.

En el cas de **BP100** i l'estreptomina, es varen observar valors de CMI <12,5 µM enfront els 6 bacteris testats. D'altra banda, **BP100** va presentar una CMI entre 0,8 i 1,6 µM enfront *F. oxysporum* i va ser inactiu enfront *P. expansum* (CMI >25 µM). L'estreptomina no va mostrar activitat enfront les dues espècies fúngiques.

En relació a l'activitat antibacteriana dels pèptids conjugats, **BP493**, **BP523** i **BP524** varen presentar una CMI <25 µM enfront els 6 bacteris. A més, en general, varen ser més actius enfront els bacteris del gènere *Xanthomonas* (CMI <6,2 µM) que enfront *E. amylovora* (CMI <12,5 µM) i els bacteris del gènere *Pseudomonas* (CMI <25 µM). Cal destacar que **BP493** i **BP524** varen mostrar una CMI <1,6 µM enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae* i *X. arboricola* pv. *pruni*. En general, l'activitat antibacteriana d'aquests 3 pèptids conjugats enfront les espècies de *Xanthomonas* va ser més elevada que la de **BP100** i la d'estreptomina. A més, **BP524** va presentar una activitat similar a la d'estreptomina i a la de **BP100** enfront *E. amylovora* i els bacteris del gènere *Pseudomonas* (CMI <6,2 µM). En canvi, en general, **BP523** i **BP493** varen ser lleugerament menys actius que **BP100** enfront aquests 3 darrers bacteris. Així doncs, **BP524**, resultant de la unió de **BP100** i de l'estreptomina, va resultar ser el conjugat amb una activitat antibacteriana més elevada.

Pel que fa a l'activitat antifúngica, **BP493**, **BP523** i **BP524** varen ser menys actius enfront *P. expansum* i *F. oxysporum* que enfront els bacteris. De fet, **BP493** i **BP524** varen presentar una CMI entre 12,5 i 25 µM enfront *P. expansum*, mentre que **BP523** no va mostrar activitat enfront aquest fong (CMI >25 µM). Enfront *F. oxysporum*, **BP523** i **BP524** no varen ser actius (CMI >25 µM), mentre que **BP493** va mostrar una CMI entre 6,2 i 12,5 µM.

5.3.2 Toxicitat dels pèptids conjugats BP493, BP523 i BP524

La toxicitat dels pèptids conjugats **BP493**, **BP523** i **BP524**, es va determinar avaluant l'activitat hemolítica i l'efecte en ser infiltrats en fulles de tabac (Taula 29). Concretament, l'activitat hemolítica d'aquests pèptids es va assajar a 50, 150, 250 i 375 µM. Per a la determinació de la fitotoxicitat, els pèptids es varen infiltrar en el mesòfil de fulles de tabac a 50, 150 i 250 µM. En ambdós assajos, es va incloure la melitina com a control positiu i **BP100** a efectes comparatius.

Taula 29. Activitat hemolítica i fitotoxicitat dels pèptids conjugats BP493, BP523 i BP524.

Pèptid ^a	Hemòlisi (%) ^b		Fitotoxicitat (mm) ^c	
	50 µM	250 µM	50 µM	250 µM
Melitina	100	100	7 ± 0	22 ± 0,7
BP100	3 ± 0,1	43 ± 0,3	4 ± 0,3	12 ± 2
BP524	57 ± 1	98 ± 8	8 ± 1	15 ± 0,6
BP523	91 ± 2	100 ± 5	6 ± 2	11 ± 1
BP493	81 ± 4	100 ± 8	5 ± 2	14 ± 4

^a S'inclou **BP100** a efectes comparatius.

^b Percentatge d'hemòlisi més l'interval de confiança ($\alpha = 0.05$).

^c Fitotoxicitat determinada com a diàmetre de la lesió provocada per la infiltració dels pèptids en fulles de tabac més l'interval de confiança.

BP493, **BP523** i **BP524** varen presentar una elevada activitat hemolítica ($\geq 98\%$ a 250 µM). A 50 µM, **BP524** va ser substancialment menys hemolític que **BP493** i **BP523** (57% versus 81 i 91%, respectivament). De tota manera, aquesta hemòlisi és clarament superior a la de **BP100** (3% a 50 µM).

Pel que fa a l'efecte dels pèptids en ser infiltrats en fulles de tabac, en general, els 3 pèptids conjugats varen provocar una àrea necròtica menor que la melitina. Concretament, a 50 µM, aquests pèptids varen causar una lesió entre 5 i 8 mm, essent lleugerament més fitotòxics que **BP100**.

5.3.3 Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals amb un millor perfil biològic

Com a resum d'aquest capítol es pot concloure que el pèptid conjugat **BP524**, resultant de la unió de **BP100** amb estreptomycina, va ser el que va presentar un millor perfil d'activitat biològica amb una CMI $< 6,2$ µM enfront els 6 bacteris testats i una hemòlisi del 57% a 50 µM, concentració que és 8 vegades superior a la seva CMI.

6 Caracterització estructural de lipopèptids derivats de fengicines, arilomicines i BP475

De forma complementària als resultats obtinguts en els capítols anteriors, en aquest capítol es va plantejar l'anàlisi conformacional mitjançant RMN de lipopèptids derivats de **BP100**. Concretament, es va estudiar el lipopèptid amb un millor perfil biològic, **BP475**.

A més, en estudis previs, el grup LIPPSO va desenvolupar metodologies per sintetitzar ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines i ciclolipopèptids anàlegs d'arilomicines. Tanmateix, tot i haver desenvolupat les metodologies i haver caracteritzat els productes obtinguts mitjançant HPLC i HRMS, en aquesta tesi doctoral es va proposar la caracterització complementària mitjançant RMN de 6 ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines i d'un anàleg de l'arilomicina A.

Així, aquest capítol es va dividir en 3 parts diferenciades: l'anàlisi conformacional del lipopèptid **BP475**, la caracterització dels 6 ciclolipodepsipeptids derivats de fengicines i la caracterització de l'anàleg de l'arilomicina A.

6.1 Anàlisi estructural del lipopèptid antimicrobià BP475

En el capítol 3 s'ha descrit la síntesi i l'activitat biològica de lipopèptids derivats de **BP100**. El lipopèptid amb el millor perfil biològic va resultar ser **BP475** que és un anàleg del lipopèptid **BP389**, contenint una D-Phe a la posició 4. Ambdós pèptids, derivats del pèptid antimicrobià **BP16**, de la quimioteca **CECMEL11**, incorporen un grup acetil a l'extrem N-terminal i una lisina acilada amb un grup butanoïl a la posició 10 (Figura 53).

H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH ₂	BP16
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂	BP389
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂	BP475

Figura 53. Estructura dels pèptids **BP16**, **BP389** i **BP475**.

Tanmateix, tot i aquestes semblances estructurals, **BP16**, **BP389** i **BP475** presenten activitats biològiques diferents (Figura 54). **BP16** és menys actiu enfront els patògens testats (CMI entre 0,8 i >25 µM) que **BP389** (CMI entre 0,8 i 12,5 µM) i **BP475** (CMI entre 0,8 i 6,2 µM), no és hemolític (0,8% a 250 µM) i és poc fitotòxic (lesió de 3 mm a 250 µM). En canvi, **BP389** presenta una major activitat hemolítica (22% a 250 µM) i una fitotoxicitat moderada (lesió de 9 mm a 250 µM), mentre que **BP475** no és hemolític (0% a 250 µM), però presenta una major fitotoxicitat (lesió de 10 mm a 250 µM).

En base a això, es va postular que les diferències estructurals d'aquests pèptids podrien influir en la seva estructura secundària i, en conseqüència, en la seva activitat biològica. En aquesta tesi doctoral es va decidir estudiar per RMN l'estructura secundària del lipopèptid **BP475**.

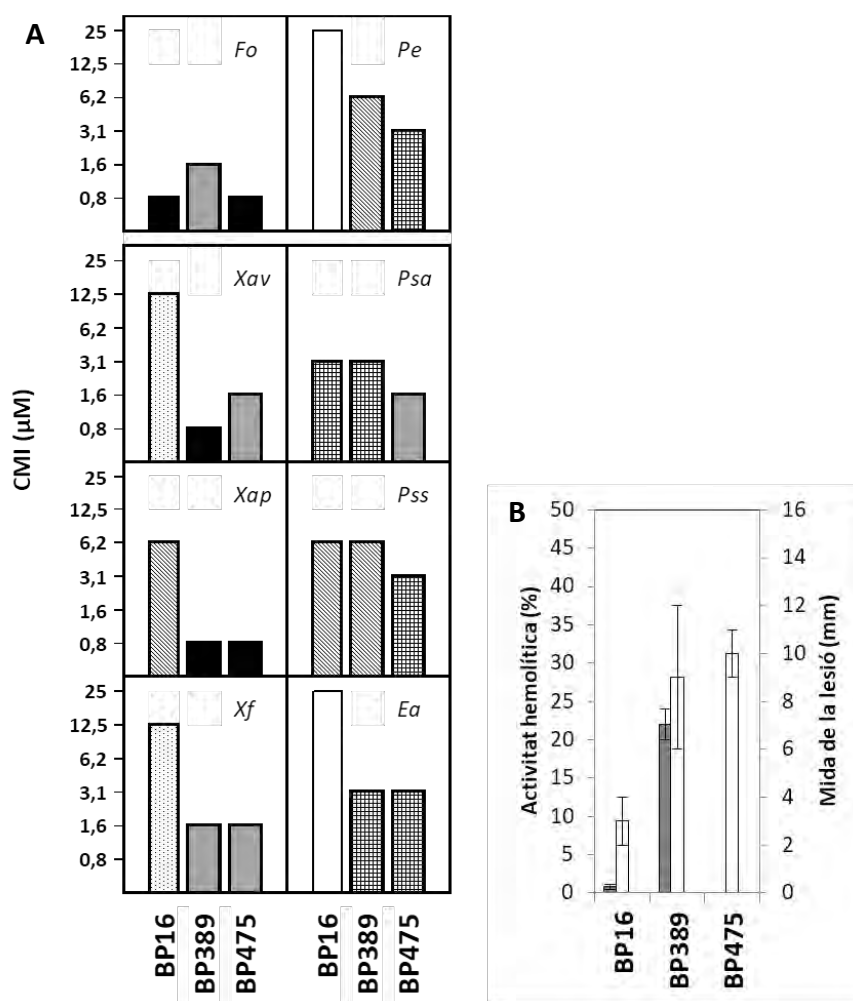


Figura 54. A, CMI dels pèptids BP16, BP389 i BP475 enfront *E. amylovora* (*Ea*), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), *X. fragariae* (*Xf*), *X. arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*), *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *F. oxysporum* (*Fo*) i *P. expansum* (*Pe*). B, Activitat hemolítica (en gris) i efecte en ser infiltrats en fulles de tabac (en blanc) dels pèptids BP16, BP389 i BP475 a 250 µM.

6.1.1 Caracterització mitjançant RMN del lipopeptid antimicrobià BP475

Amb l'objectiu de deduir l'estructura secundària del pèptid **BP475** es varen realitzar experiments 1D i 2D de ^1H -RMN, HSQC-TOCSY, HSQC ^1H - ^{15}N i NOESY. En primer lloc, els experiments es varen realitzar a 10 °C en tampó fosfat a pH = 6,5 en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10). En aquestes condicions el pèptid probablement no presentaria una estructura secundària concreta. Seguidament, es varen repetir els experiments afegint un 30% de $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$, per tal d'induir que el pèptid adoptés una estructura secundària. A més, tots els experiments es varen realitzar irradiant el senyal corresponent a l'aigua per tal de suprimir-lo. A partir d'aquest punt, s'anomena **BP475**_{desestructurat} per fer referència als experiments realitzats sense $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$ i **BP475**_{estructurat} per fer referència als experiments amb $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$.

En primer lloc, es comenta l'assignació dels senyals **BP475**_{desestructurat}. El grup acetil es va observar com un singlet a 1,98 ppm. Pel que fa al grup butanoil, els protons del grup α -CH₂-butanoil varen aparèixer com un triplet a 2,15 ppm que a l'espectre HSQC-TOCSY va correlacionar amb els senyals corresponents a β -CH₂-butanoil (1,25-1,82 ppm) i a CH₃-butanoil (0,75-0,90 ppm) (Figura 55).

Els senyals corresponents als diferents aminoàcids es varen assignar a partir d'experiments HSQC-TOCSY, tot i que en alguns casos no es va poder identificar exactament a quin residu corresponien (Figura 55). Els residus de Lys varen aparèixer en dos grups de senyals. Un grup es va poder assignar a la Lys¹⁰ que, en estar acilada a la cadena lateral, els protons ϵ -CH₂-Lys¹⁰ es troben més desapantallats (3,06-3,16 ppm). L'altre grup de senyals es va assignar a les altres 5 Lys, els protons de les quals varen mostrar desplaçaments químics molt similars.

El residu d'Ile⁷ es va identificar fàcilment per la correlació dels 5 senyals corresponents als grups α -CH-Ile (4,06-4,13 ppm); β -CH-Ile i γ -CH₂-Ile (1,25-1,82 ppm); γ -CH₃-Ile (0,99-1,16 ppm) i δ -CH₃-Ile (0,75-0,90 ppm). Els residus Leu³, Leu⁸ i Leu¹¹ varen mostrar desplaçaments químics molt similars. Els 6 grups δ -CH₃-Leu varen aparèixer a 0,75-0,90 ppm i a partir d'aquests senyals es varen poder assignar els senyals corresponents a α -CH-Leu (4,15-4,34 ppm), β -CH₂-Leu (1,25-1,82 ppm) i γ -CH-Leu (1,25-1,82 ppm).

El residu de Phe⁴ va presentar el senyal α -CH a un desplaçament químic més gran (4,54-4,57 ppm) que va quedar pràcticament suprimit per la irradiació del senyal de l'aigua. Tot i això, es va poder observar la seva correlació amb els dos senyals de β -CH₂-Phe (2,85-3,00 ppm i 3,06-3,16 ppm, respectivament).

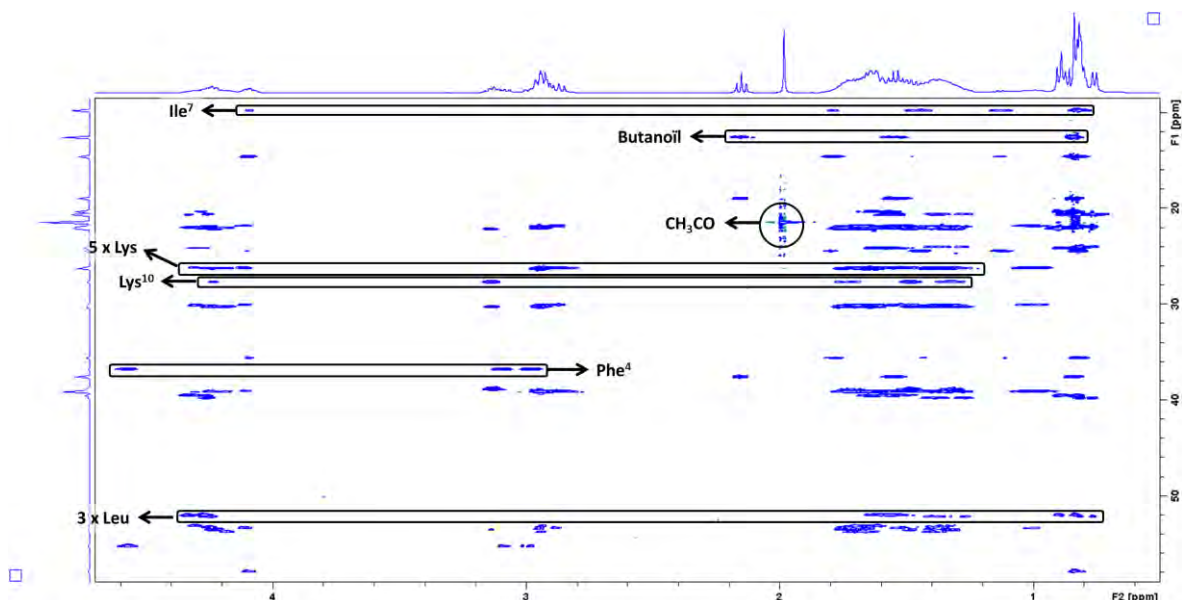


Figura 55. Ampliació de l'espectre HSQC-TOCSY del lipopèptid **BP475**_{desestructurat}. Apareixen remarcats alguns conjunts de senyals característics dels diversos aminoàcids.

A continuació, amb els protons α -CH de tots els aminoàcids identificats, es varen poder assignar tots els senyals corresponents als HN (Figura 56).

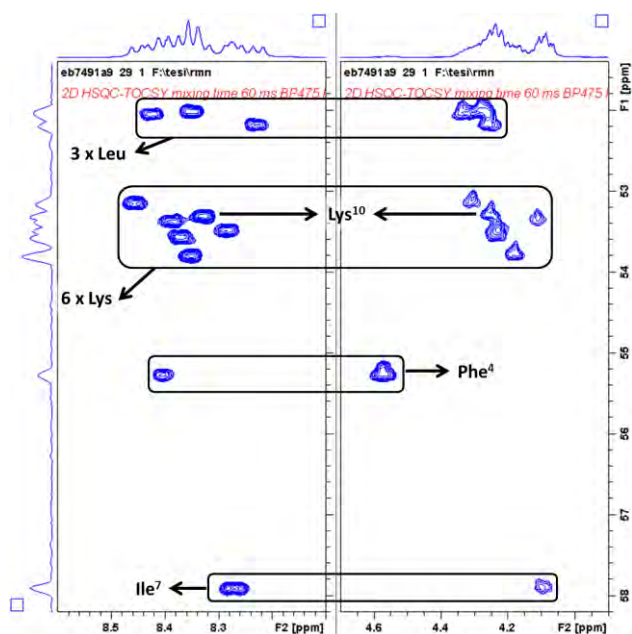


Figura 56. Ampliació de l'espectre HSQC-TOCSY del lipopèptid BP475_{desestructurat}. Apareixen remarcats alguns conjunts de senyals característics dels diversos aminoàcids.

A l'espectre NOESY de BP475_{desestructurat} no es varen observar correlacions rellevants entre els grups NH de l'esquelet peptídic (Figura 57). Aquesta absència de correlacions es va atribuir a què, en les condicions en què varen ser registrats aquests experiments, el lipopèptid no presentava una estructura concreta, sinó que es trobava desestructurat.

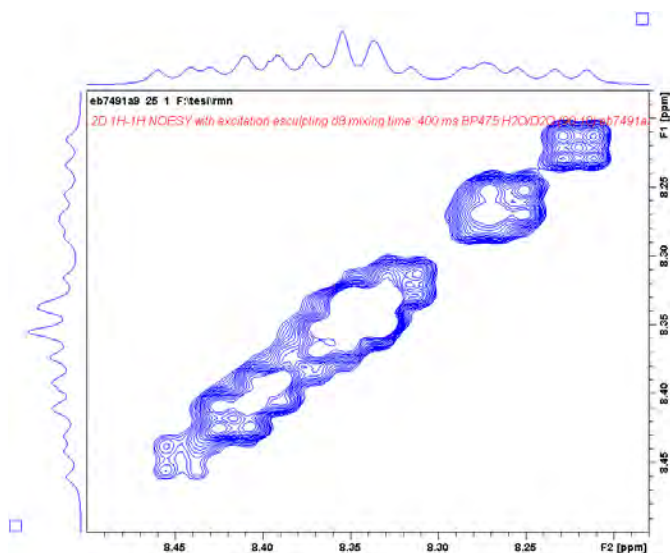


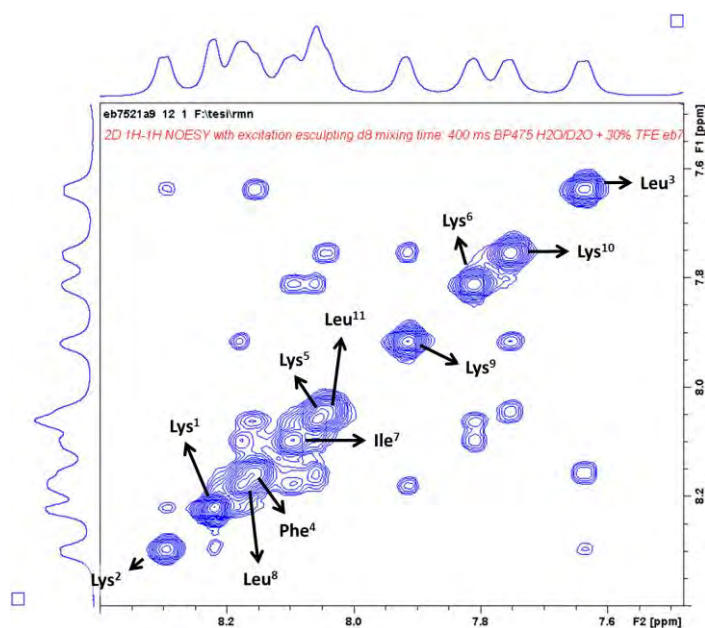
Figura 57. Ampliació de l'espectre NOESY del lipopèptid BP475_{desestructurat}.

Els espectres HSQC-TOCSY i HSQC ¹H-¹⁵N varen permetre assignar els senyals corresponents als protons, carbonis i nitrogens dels grups amida i de les posicions α i β (Taula 30).

Taula 30. Assignació dels senyals de protó, carboni i nitrogen dels grups amida i de les posicions α i β de BP475_{desestructurat}.

Aminoàcid	δ (ppm)					
	CO-NH	CO-NH	α -CH	α -CH	β -CH	β -CH
Phe⁴	8,40	122,01	4,56	55,27	3,08 i 2,98	36,78
Ile⁷	8,26	122,34	4,08	57,91	1,79	35,59
Lys¹⁰	8,32	122,91	4,24	53,35	1,72	30,31
	8,27	122,66	4,22	53,47	1,68	30,18
	8,34	123,99	4,17	53,79	1,72	30,26
5 × Lys	8,38	124,22	4,10	53,36	1,49	30,05
	8,39	122,67	4,22	53,59	1,72	38,28
	8,45	122,27	4,29	53,15	1,68	30,12
	8,22	123,54	4,25	52,19	1,39	39,79
3 × Leu	8,34	121,04	4,27	52,01	1,62	39,58
	8,42	127,79	4,33	52,05	1,54	39,51

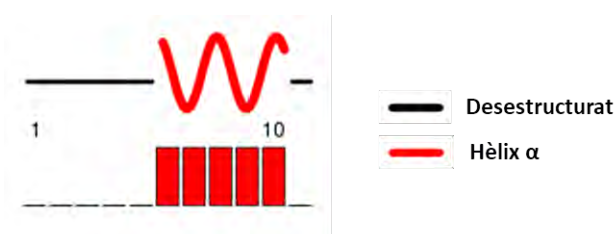
Pel que fa a **BP475_{estructurat}**, l'anàlisi de l'espectre HSQC-TOCSY va permetre fer una assignació dels diferents senyals de manera similar a la de **BP475_{desestructurat}**. En aquest cas, però, l'espectre NOESY va mostrar la correlació entre tots els protons HN de la seqüència (Figura 58), cosa que va permetre assignar la majoria dels senyals de protó, carboni i nitrogen dels grups amida i de les posicions α i β dels onze aminoàcids (Taula 31).


Figura 58. Ampliació de l'espectre NOESY del lipopèptid BP475_{estructurat}. Apareixen remarcades les assignacions dels senyals HN corresponents als diversos aminoàcids.

Taula 31. Assignació dels senyals de protó, carboni i nitrogen dels grups amida i de les posicions α i β de BP475_{estructurat}.

Aminoàcid	δ (ppm)					
	CO-NH	CO-NH	α -CH	α -CH	β -CH	β -CH
Lys ¹	8,22	125,65	3,89	55,84		
Lys ²	8,30	117,50	4,10	55,54	1,94	29,33
Leu ³	7,64	119,97	4,13	54,20		
Phe ⁴	8,16	116,01	4,04	55,46	2,99 i 3,15	38,89
Lys ⁵	8,07	119,43	4,03	55,11		
Lys ⁶	7,81	118,83	4,01	56,63	1,78	29,42
Ile ⁷	8,09	118,72	3,77	61,44	2,08	34,58
Leu ⁸	8,18	119,01	4,01	56,63	1,71	
Lys ⁹	7,92	117,78	4,06	55,55		
Lys ¹⁰	7,76	119,39	4,08	55,87	1,95	30,14
Leu ¹¹	8,04	118,42	4,17	52,96	1,83	

A partir d'aquestes dades, es va realitzar l'anàlisi estructural de BP475_{estructurat} mitjançant el programari *Chemical Shift Index 3.0*.^{186,187} Aquest programari, dissenyat per D. S. Wishart *et. al.*, permet identificar estructures secundàries de cadenes peptídiques i proteiques a partir del desplaçament químic corresponent als protons, carbonis i nitrògens dels grups amida i de les posicions α i β . Aquesta anàlisi va mostrar que el pèptid presentava una estructura d'hèlix α entre els aminoàcids Lys⁶ i Lys¹⁰. En canvi, de la Lys¹ a la Lys⁵ i la Leu¹¹ no va mostrar una estructura concreta (Figura 59). Cal destacar que la Lys¹⁰, tot i presentar un grup butanoil a la cadena lateral, forma part de l'hèlix α . Així, la presència d'aquest grup no dificulta la formació de l'hèlix. A més, s'observa que, aquesta hèlix es trenca en aproximar-se a la D-Phe⁴. Aquest aminoàcid podria distorsionar l'estructura i impedir la formació de l'hèlix.

Figura 59. Estructura secundària adoptada pel lipopèptid BP475_{estructurat}. Els números indiquen la posició dels aminoàcids.

A més, estudis mecanístics de **BP100** descrits a la literatura i comentats a la secció 1.5.2, revelen que **BP100** actua situant-se paral·lelament a la membrana bacteriana i amb l'extrem C-terminal lleugerament inserit en aquesta. Si s'assumeix que **BP475** presenta un mecanisme similar a **BP100**, es pot pensar que l'extrem C-terminal, que presenta estructura d'hèlix α , també podria inserir-se en la membrana bacteriana.

En estudis posteriors es preveu realitzar estudis similars amb els pèptids **BP389** i **BP16** per tal de poder dur a terme una anàlisi més exhaustiva de l'efecte de la introducció d'una D-Phe, un grup butanoil i un grup acetil.

6.2 Ciclolipodepsipèptids derivats de fengícines

Els ciclolipodepsipèptids són un grup de pèptids no ribosomals produïts per diversos bacteris i fongs, com ara *Pseudomonas* o *Bacillus*. Aquesta classe de pèptids són interessants ja que presenten una gran diversitat d'activitats biològiques, com, per exemple, activitat antimicrobiana o la capacitat d'induir les defenses de les plantes. Les principals característiques estructurals d'aquests pèptids són la presència d'un enllaç èster entre la cadena lateral d'un aminoàcid i l'extrem C-terminal de la seqüència, a més d'una cadena lipídica a l'extrem N-terminal.

Entre els ciclolipodepsipèptids naturals descrits fins al moment hi trobem les fengícines (Figura 60). Aquesta família de ciclolipodepsipèptids, aïllats de diverses soques de *Bacillus*, presenten una activitat antifúngica elevada i són capaços d'estimular les defenses de les plantes, alhora que mostren una hemòlisi relativament baixa.^{94,188} La seva estructura conté, d'una banda, un macrocicle de vuit aminoàcids amb un enllaç èster entre el grup fenol d'una Tyr i el grup α -carboxílic d'una Ile i, d'altra banda, una cadena lipopeptídica de dos aminoàcids i un grup β -hidroxiacil de 14 a 18 carbonis. Les fengícines més comunes són l'A i la B que difereixen en l'aminoàcid de la posició 6, sent una D-Ala en la fengicina A i una D-Val en la fengicina B. A més, també s'ha descrit la fengicina S que conté una D-Ser a la posició 4 en comptes de la D-*allo*-Thr present en les fengícines A i B.

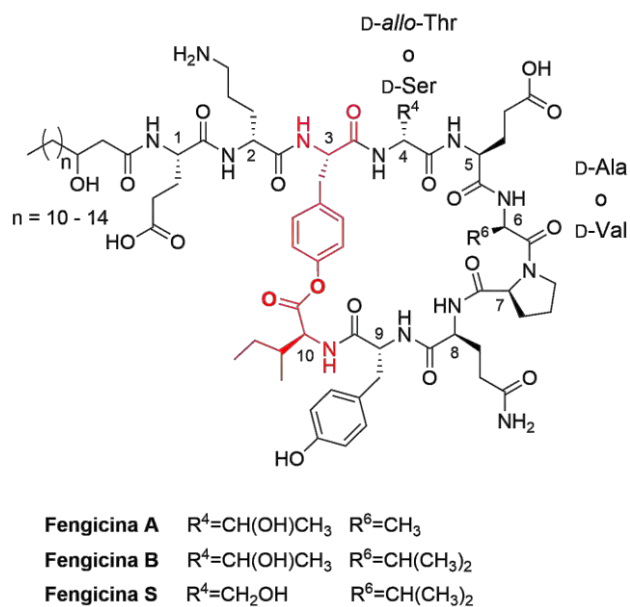
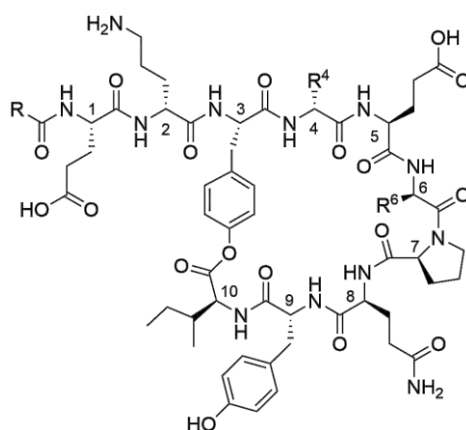


Figura 60. Estructura de les fengícines.

La Dra. Cristina Rosés, en la seva tesi doctoral realitzada en el grup LIPPSO, va posar a punt la primera metodologia per a la síntesi en fase sòlida de dehidroderivats de fengícines. Seguint aquesta metodologia, va preparar i caracteritzar mitjançant HPLC i HRMS els ciclolipodepsipèptids **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856** (Figura 61).^{189,190}



Pèptid	R	R ⁴	R ⁶
BPC838	C ₇ H ₁₅	CH(OH)CH ₃	CH(CH ₃) ₂
BPC840	C ₇ H ₁₅	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂
BPC842	C ₇ H ₁₅	CH(OH)CH ₃	CH ₃
BPC844	C ₇ H ₁₅	CH ₂ OH	CH ₃
BPC854	C ₁₁ H ₂₃	CH(OH)CH ₃	CH(CH ₃) ₂
BPC856	C ₁₅ H ₃₁	CH(OH)CH ₃	CH(CH ₃) ₂

Figura 61. Estructura dels ciclolipodepsipèptids BPC838, BPC840, BPC842, BPC844, BPC854 i BPC856.

En aquesta tesi doctoral, es va procedir a repetir la síntesi d'aquests ciclodepsipèptids derivats de fengícines per a poder-ne fer la seva caracterització estructural mitjançant RMN.

6.2.1 Síntesi en fase sòlida de dehidroderivats de fengícines

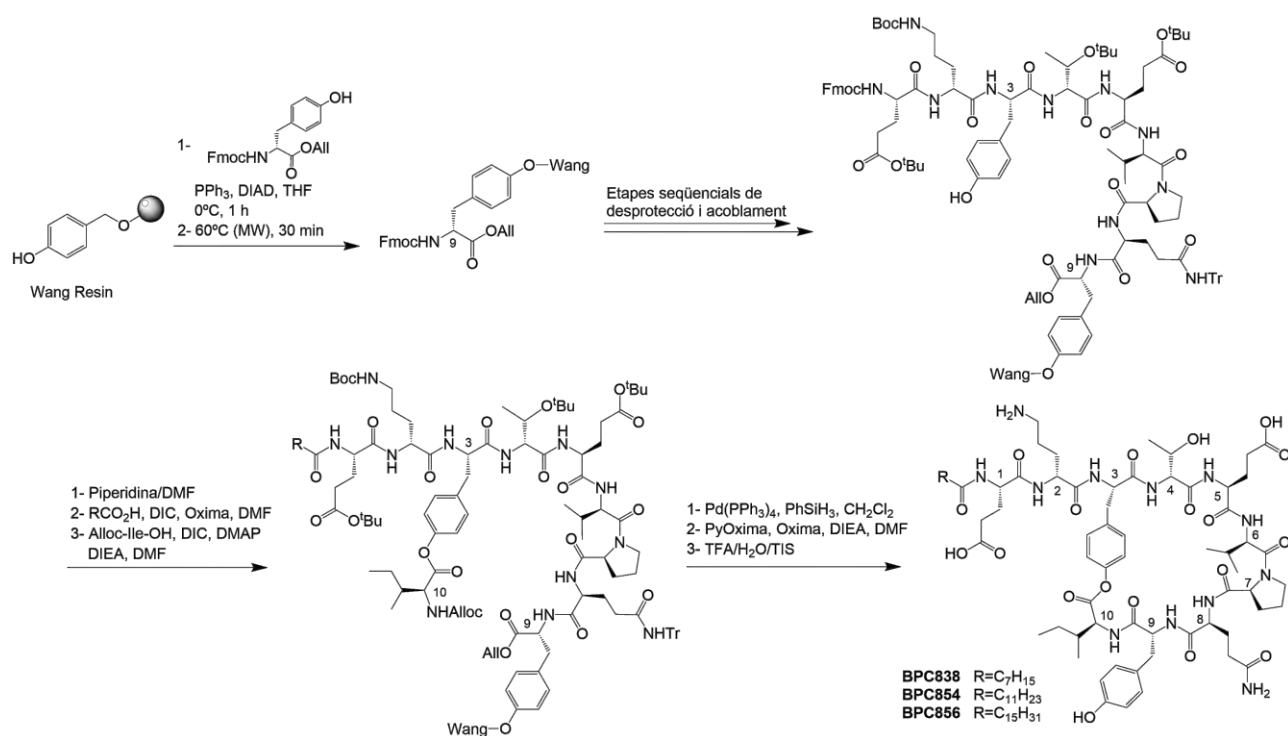
La síntesi en fase sòlida dels dehidroderivats de fengícines **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856** es va realitzar seguint la metodologia descrita prèviament per Rosés *et al.*^{189,190}

Aquesta estratègia consisteix en: (i) la unió del grup fenol de la Tyr⁹ al suport sòlid; (ii) l'elongació de la cadena lipopeptídica; (iii) l'esterificació del grup fenol de la Tyr³ amb Alloc-Ile-OH; (iv) la formació de la macrolactona per formació d'un enllaç amida; i (v) el desancorament del pèptid. A l'Esquema 21 es representa el protocol emprat pels ciclodepsipèptids **BPC838**, **BPC854** i **BPC856**.

Es va utilitzar la resina [4-(hidroximetil)fenoximetil]poliestirè (Wang) com a suport sòlid, perquè permet la unió del pèptid per formació d'un enllaç èter i presenta una funcionalització inicial elevada (1,1 mmol/g). La síntesi es va iniciar amb l'acoblament de Fmoc-Tyr⁹-OAll al suport mitjançant una reacció de Mitsunobu emprant PPh₃ i azodicarboxilat de diisopropil (DIAD) en THF anhidre. Es va escollir el grup All com a grup protector de l'àcid carboxílic de la Tyr⁹, perquè aquest grup és estable a les condicions d'eliminació del grup Fmoc i de l'acoblament dels aminoàcids, i es pot eliminar selectivament mitjançant un tractament amb Pd(PPh₃)₄.

L'elongació de la seqüència peptídica es va realitzar a través d'etapes seqüencials d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament dels aminoàcids corresponents. El grup Fmoc es va eliminar mitjançant un tractament amb piperidina/DMF (3:7), i els acoblaments es varen realitzar emprant DIC i Oxima en DMF. Un cop completada la seqüència, es va eliminar el grup Fmoc de l'extrem N-terminal i es va acilar el grup amino lliure amb l'àcid gras corresponent.

Seguidament, es va procedir a l'esterificació del grup fenol de la Tyr³ amb Alloc-Ile-OH en presència de DIEA, DIC i DMAP en DMF. Com a grup protector del grup amino de la Ile¹⁰ es va emprar l'al·liloxycarbonil (Alloc), perquè és estable a les condicions d'acoblament d'aquest aminoàcid i es pot eliminar en les mateixes condicions que el grup All de la Tyr⁹. Així, les peptidil resines resultants es varen tractar amb Pd(PPh₃)₄ i PhSiH₃ en CH₂Cl₂ i, a continuació, es va realitzar la ciclació en presència d'hexafluorofosfat d'O-[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetiliden)amino]-oxitris(pirrolidin-1-il)fosfoni (PyOxima), Oxima i DIEA en DMF. Finalment, les peptidil resines es varen tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5). Els crus resultants es varen purificar per cromatografia flash en fase reversa, es varen analitzar per HPLC i es varen caracteritzar per espectrometria de masses, obtenint-se **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856** amb pureses entre un 92 i >99%.



Esquema 21. Síntesi dels dehidroxiderivats de fengicines BPC838, BPC854 i BPC856.

6.2.2 Caracterització mitjançant RMN de ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines

Els ciclolipodepsipèptids **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856** es varen caracteritzar mitjançant experiments 1D i 2D de ¹H-RMN, COSY i TOCSY, a temperatura ambient en DMSO-d⁶, on s'hi van afegir dues gotes de D₂O (Taula 32-Taula 37).

En els apartats següents s'explica l'assignació dels senyals característics de l'estructura d'aquests ciclolipodepsipèptids.

6.2.2.1 Caracterització dels ciclolipodepsipèptids BPC838, BPC854 i BPC856

La seqüència dels ciclolipopeptids **BPC838**, **BPC854** i **BPC856** és RCO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-&, on & representa l'enllaç èster entre el grup α-carboxílic de la Ile i el grup fenoxi de la Tyr³. Aquests 3 ciclolipopeptids es diferencien pel grup acil de l'extrem N-terminal: octanoïl per **BPC838**, lauroïl per **BPC854** i palmitoïl per **BPC856**.

L'assignació dels protons del residu d'Ile es va aconseguir a partir dels espectres TOCSY i COSY. Per exemple, en el cas de **BPC838** es va observar que el senyal d'α-CH-Ile (3,97-4,00 ppm) correlacionava amb 4 senyals corresponents a δ-CH₃-Ile i γ-CH₃-Ile (0,72-0,87 ppm), γ-CH₂-Ile (1,15-1,20 ppm) i β-CH-Ile (1,69-1,80 ppm) (Figura 62 i Taula 32). En l'espectre COSY, la correlació entre β-CH-Ile i γ-CH₃-Ile va permetre diferenciar aquest últim de δ-CH₃-Ile, lleugerament menys desafortunat.

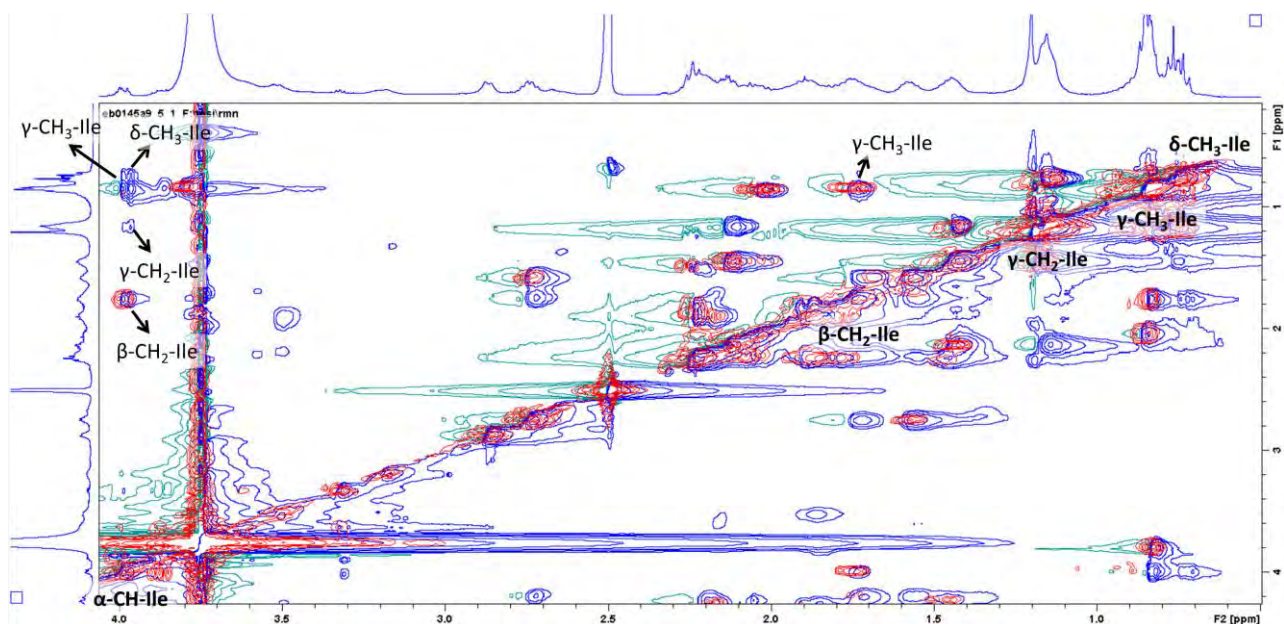


Figura 62. Finestra des de 0,5 ppm a 4,1 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopeptid BPC838. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu d'Ile respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Els senyals dels residus de Tyr es varen assignar, d'una banda, a partir de la correlació entre els α -CH-Tyr i els β -CH₂-Tyr. Així, en el cas de BPC838 es va observar la correlació entre els senyals dels α -CH-Tyr, a 4,31-4,39 ppm i 4,55-4,63, respectivament, amb els dos senyals corresponents als protons diastereotòpics β -CH₂-Tyr que apareixen a 1,82-1,98 ppm i 2,06-2,26 ppm per una Tyr, i a 2,67-2,77 ppm i 3,16-3,27 ppm per l'altra Tyr (Figura 63 i Taula 32).

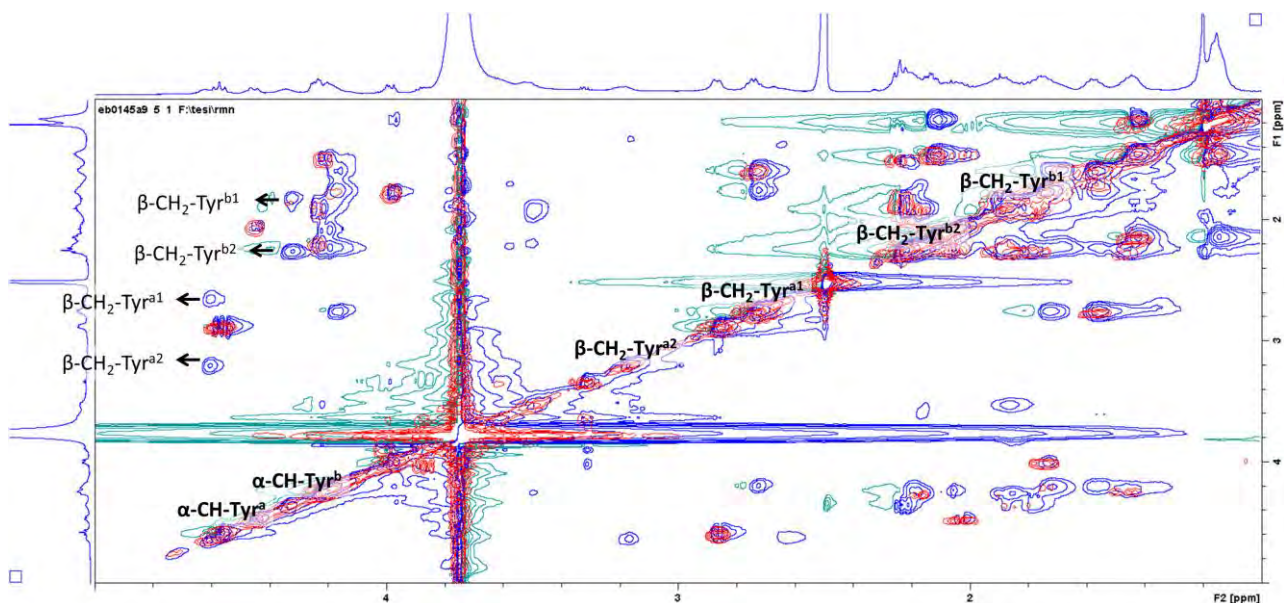


Figura 63. Finestra des d'1 ppm a 5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopeptid BPC838. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Tyr respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

D'altra banda, els senyals aromàtics de les Tyr del ciclolipodepsipèptid **BPC838** es varen mostrar parcialment superposats observant-se dos doblets amb J de 8,0 Hz a 6,63 i 6,84 ppm, que varen correlacionar amb un multiplet a 6,99-7,04 ppm (Figura 64 A i B). En canvi, el ciclolipodepsipèptid **BPC856** va mostrar 4 doblets amb J de 8,0 Hz, observant-se correlacions entre dos doblets centrals i entre els dos doblets més i menys desapantallats (Figura 64 C i D).

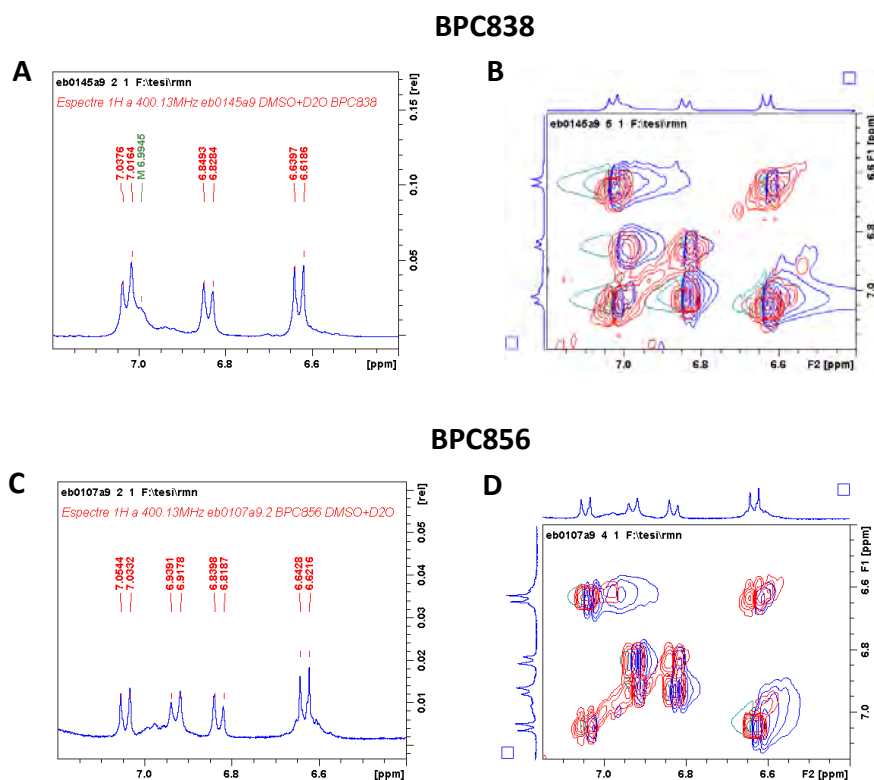


Figura 64. Finestra des de 6,4 ppm a 7,2 ppm de: A, espectre ^1H -RMN del ciclolipodepsipèptid BPC856; B, espectre TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC856; C, espectre ^1H -RMN del ciclolipodepsipèptid BPC838; D, espectre TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC838.

L'assignació dels dos residus de Glu i del de Gln va ser la més difícil, ja que els senyals dels 3 aminoàcids varen aparèixer solapats entre ells i a desplaçaments molt pròxims dels d'altres aminoàcids. Concretament, en el cas de **BPC838**, els senyals d' α -CH-Glu/Gln (4,17-4,26 ppm) varen aparèixer juntament amb els senyals d' α -CH-Orn i α -CH-Pro (Figura 65 i Taula 32). Tanmateix, es va observar la correlació entre α -CH-Glu/Gln i β -CH₂-Glu/Gln (1,41-1,45 ppm) i γ -CH₂-Glu/Gln (2,06-2,26 ppm).

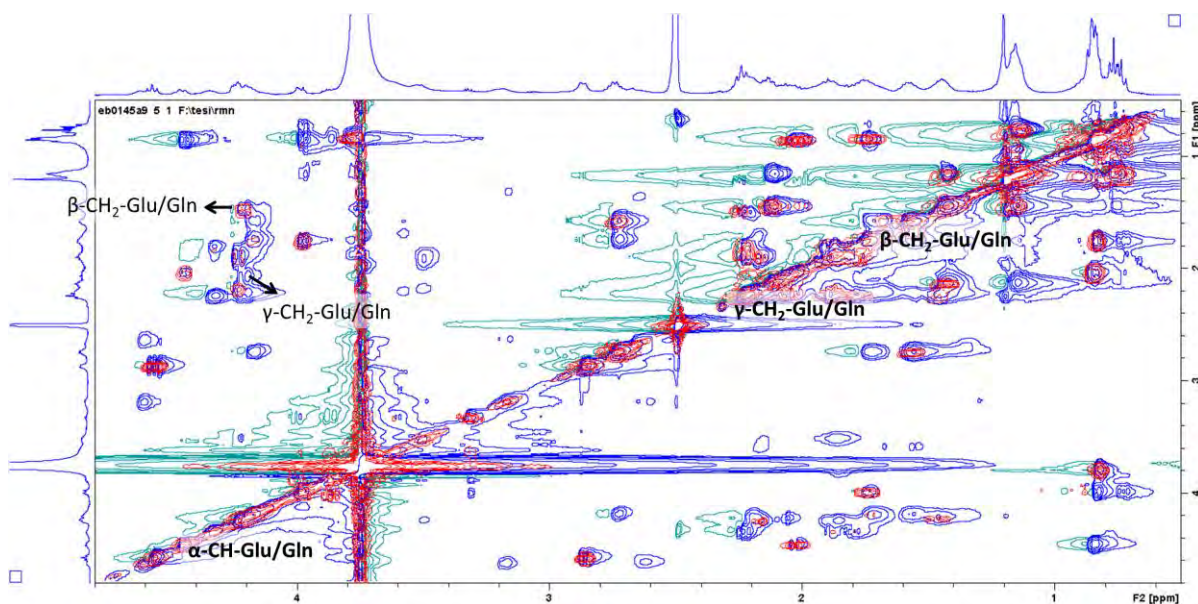


Figura 65. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclopeptid BPC838. Les correlacions més rellevants per a l'assignació dels residus de Glu i Gln respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Per al residu de Pro es varen observar les correlacions esperades entre els senyals dels diferents protons d'aquest aminoàcid. Concretament, l'espectre TOCSY de **BPC838** va mostrar que el senyal d' α -CH-Pro (4,17-4,26 ppm) correlacionava amb β -CH₂-Pro (2,06-2,26 ppm), γ -CH₂-Pro (1,82-1,98 ppm) i, molt dèbilment, amb δ -CH₂-Pro (3,50-3,53 ppm) (Figura 66 i Taula 32). Aquest últim senyal es va confirmar a partir de la seva correlació amb γ -CH₂-Pro.

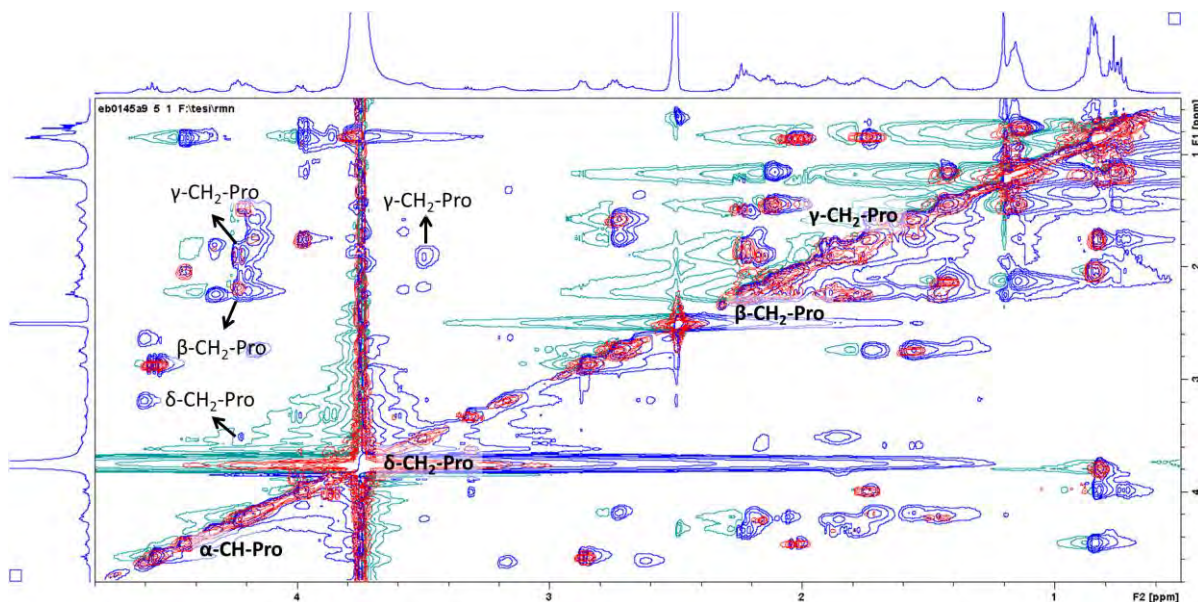


Figura 66. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclopeptid BPC838. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de la Pro respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

En el cas del residu de Val també es varen caracteritzar les correlacions esperades entre els protons de la seva estructura. Per exemple, el senyal α -CH-Val de **BPC838**, a 4,44-4,47 ppm va correlacionar amb els senyals de β -CH-Val (2,06-2,26 ppm) i dels dos γ -CH₃-Val (0,72-0,87 ppm). També es va observar la correlació entre β -CH₂-Val i γ -CH₃-Val (Figura 67 i Taula 32).

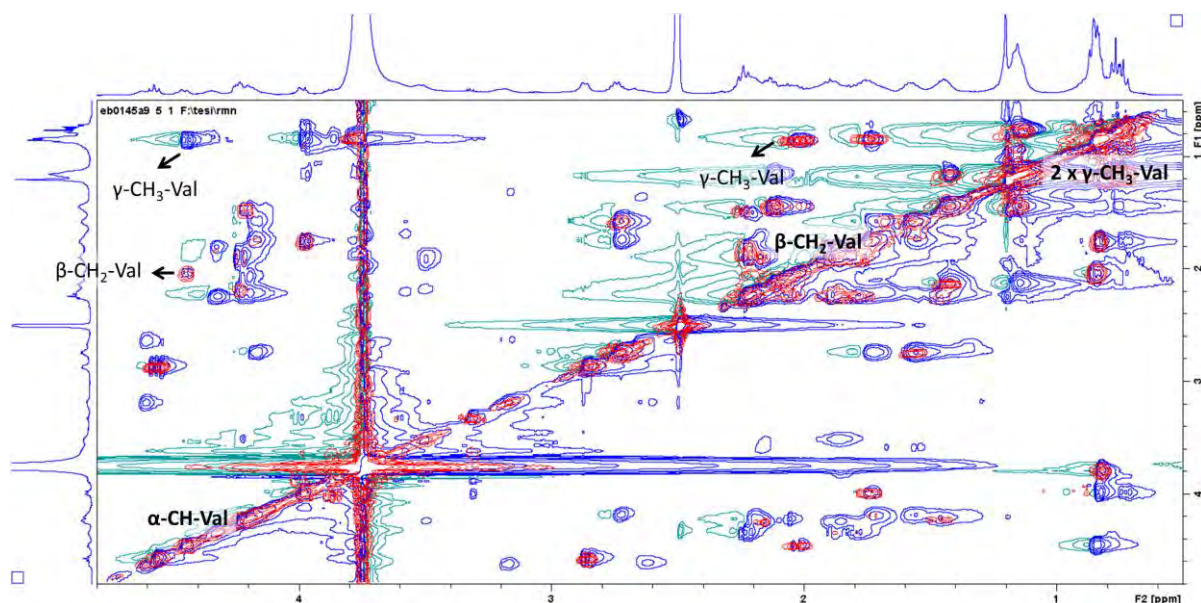


Figura 67. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid **BPC838**. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de la Val respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

L'assignació dels senyals del residu de Thr va ser més difícil. Es pren com a exemple **BPC856**, per a mostrar com es va fer l'assignació (Figura 68 i Taula 34). El senyal d' α -CH-Thr va aparèixer superposat amb el d' α -CH-Ile. Tanmateix es va observar la seva correlació amb el senyal de β -CH-Thr, que, alhora, va correlacionar amb el senyal de γ -CH₃-Thr. La correlació entre el senyal d' α -CH-Thr amb el de γ -CH₃-Thr es trobava superposat amb el senyal de la Ile.

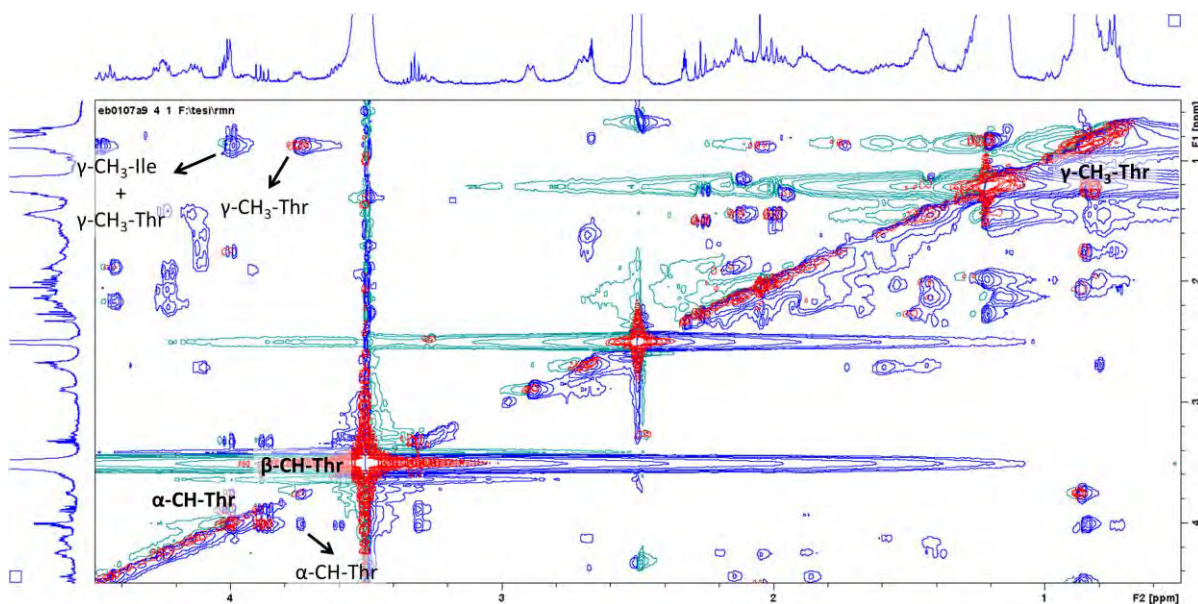


Figura 68. Finestra des de 0,5 ppm a 4,5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclilopodepsipèptid BPC856. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de la Thr respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

L'assignació dels senyals del residu d'Orn també s'exemplifica amb **BPC838** (Figura 69 i Taula 32). El senyal d' α -CH-Orn (4,17-4,26 ppm) va correlacionar amb els senyals de γ -CH₂-Orn (1,55-1,60 ppm), β -CH₂-Orn (1,69-1,80 ppm) i δ -CH₂-Orn (2,67-2,77 ppm). Alhora, es va identificar fàcilment la correlació d'aquest últim senyal amb els corresponents a β -CH₂-Orn i δ -CH₂-Orn.

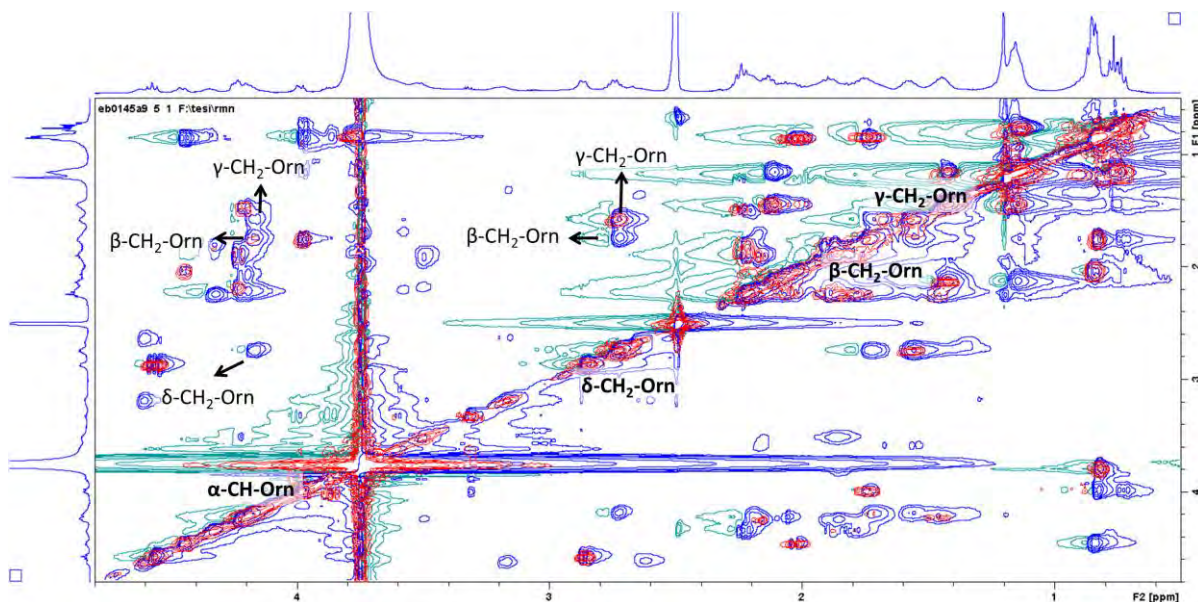


Figura 69. Finestra des de 0,5 ppm a 4,8 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclilopodepsipèptid BPC838. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de la Orn respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Finalment, els senyals del grup octanoïl de **BPC838** es varen assignar a partir de la correlació entre β -CH₂-octanoïl (1,41-1,45 ppm), α -CH₂-octanoïl (2,06-2,26 ppm), la resta de CH₂ d'aquest grup que varen aparèixer entre 1,15 i 1,20 ppm, i el CH₃-octanoïl (0,72-0,87 ppm)(Figura 70 i Taula 32). Els grups lauroïl i palmitoïl dels ciclolipodepsipèptids **BPC854** i **BPC856**, respectivament, varen mostrar un patró semblant. En aquests dos compostos, els senyals corresponents a les posicions α -CH₂ i β -CH₂ varen aparèixer més desapantallats i la resta de CH₂ junts (Taula 33-Taula 34).

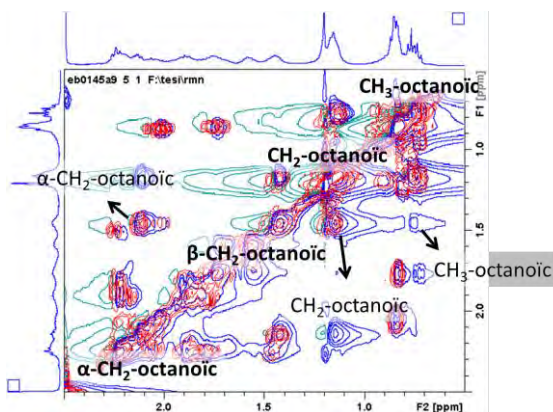


Figura 70. Finestra des de 0,5 ppm a 2,5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid **BPC838**. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de l'àcid octanoïc respecte l'eix horitzontal s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Taula 32. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC838.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,72-0,87 (m, 18 H)	δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Thr 2 × γ-CH ₃ -Val CH ₃ -octanoil	γ-CH ₂ -Ile β-CH-Ile β-CH-Thr β-CH-Val CH ₂ -octanoil	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile, β-CH-Ile α-CH-Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile, β-CH-Ile β-CH-Thr β-CH-Val, α-CH-Val CH ₂ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil
1,15-1,20 (m, 14 H)	4 × CH ₂ -octanoil γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil δ-CH ₃ -Ile	CH ₃ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil, α-octanoil α-CH-Ile, β-CH-Ile
1,41-1,45 (m, 4 H)	β-CH ₂ -octanoil β-CH ₂ -Glu/Gln	CH ₂ -octanoil, α-CH ₂ -octanoil α-CH-Glu/Gln	CH ₃ -octanoil, CH ₂ -octanoil, α-CH ₂ -octanoil α-CH-Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln
1,55-1,60 (m, 3 H)	γ-CH ₂ -Orn	δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn	δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn
1,69-1,80 (m, 4 H)	β-CH-Ile, β-CH ₂ -Orn	γ-CH ₃ -Ile, α-CH-Ile α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn
1,82-1,98 (m, 4 H)	β-CH ₂ -Tyr ^b γ-CH ₂ -Pro	β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b δ-CH ₂ -Pro	α-CH-Tyr ^b α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro
2,06-2,26 (m, 10 H)	β-CH-Val γ-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH ₂ -octanoil	γ-CH ₃ -Val, α-CH-Val β-CH ₂ -Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln α-CH-Pro β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -octanoil	γ-CH ₃ -Val, α-CH-Val β-CH ₂ -Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln α-CH-Pro, δ-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b β-CH ₂ -octanoil, α-CH ₂ -octanoil
2,67-2,77 (m, 3 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a δ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Tyr ^a γ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a α-CH-Orn, β-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn
2,86-2,88 (m, 2 H)			
3,16-3,27 (m, 2 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a
3,50-3,53 (m, 1 H)	δ-CH ₂ -Pro	γ-CH ₂ -Pro	α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro
3,86-3,90 (m, 1 H)	β-CH-Thr	γ-CH ₃ -Thr	γ-CH ₃ -Thr
3,97-4,00 (m, 1 H)	α-CH-Ile	β-CH-Ile	β-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile
4,17-4,26 (m, 3 H)	α-CH-Pro α-CH-Orn α-CH-Glu/Gln	β-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Glu/Gln	δ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn γ-CH ₂ -Glu/Gln, β-CH ₂ -Glu/Gln
4,31-4,39 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b
4,44-4,47 (m, 1 H)	α-CH-Val	β-CH-Val	β-CH-Val, γ-CH ₃ -Val
4,55-4,63 (m, 2 H)	α-CH-Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a
6,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,84 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,99-7,04 (m, 4 H)	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom} , CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom} , CH-Tyr ^b _{arom}

Taula 33. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC854.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,71-0,85 (m, 18 H)	δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Thr CH ₃ -lauroïl 2 × γ-CH ₃ -Val	γ-CH ₂ -Ile β-CH-Ile β-CH-Thr CH ₂ -lauroïl β-CH-Val	γ-CH ₂ -Ile, α-CH-Ile, β-CH-Ile β-CH-Ile, α-CH-Ile β-CH-Thr CH ₂ -lauroïl, β-CH ₂ -lauroïl β-CH-Val, α-CH-Val
1,14-1,19 (m, 18 H)	8 × CH ₂ -lauroïl γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -lauroïl, β-CH ₂ -lauroïl δ-CH ₃ -Ile	CH ₃ -lauroïl, β-CH ₂ -lauroïl, α-CH ₂ -lauroïl δ-CH ₃ -Ile, β-CH ₂ -Ile
1,40-1,58 (m, 6 H)	γ-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -lauroïl	δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn CH ₂ -lauroïl, α-CH ₂ -lauroïl	δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn CH ₂ -lauroïl, α-CH ₂ -lauroïl, CH ₃ -lauroïl
1,61-1,79 (m, 4 H)	β-CH-Ile β-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile γ-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn
1,87-2,25 (m, 14 H)	β-CH-Val γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Pro α-CH ₂ -lauroïl	α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val β-CH ₂ -Pro γ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro β-CH ₂ -lauroïl	α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro γ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro β-CH ₂ -lauroïl, CH ₂ -lauroïl
2,65-2,76 (m, 3 H)	δ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn	α-CH-Orn, β-CH ₂ -Orn
2,80-2,85 (m, 2 H)			
3,02-3,21 (m, 2 H)			
3,26-3,34 (m, 1 H)			
3,48-3,50 (m, 1 H)	δ-CH ₂ -Pro		α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro
3,80-3,87 (m, 2 H)	β-CH-Thr	γ-CH ₃ -Thr	γ-CH ₃ -Thr
3,96-4,02 (m, 2 H)	α-CH-Ile	β-CH-Ile	β-CH-Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₃ -Ile
4,11-4,25 (m, 4 H)	α-CH-Pro α-CH-Orn	β-CH ₂ -Pro	β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro δ-CH ₂ -Orn
4,42-4,46 (m, 1 H)	α-CH-Val	β-CH-Val	β-CH-Val, γ-CH ₃ -Val
4,56-4,60 (m, 2 H)			
6,61 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,83 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,99-7,03 (m, 4 H)	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom} , CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom} , CH-Tyr ^a _{arom}

Taula 34. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC856.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,79-0,89 (m, 18 H)	δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Thr CH ₃ -palmitoil 2 × γ-CH ₃ -Val	γ-CH ₂ -Ile β-CH-Ile β-CH-Thr CH ₂ -palmitoil β-CH-Val	γ-CH ₂ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile β-CH-Ile, α-CH-Ile β-CH-Thr, α-CH-Thr CH ₂ -palmitoil, β-CH ₂ -palmitoil β-CH-Val, α-CH-Val
1,14-1,22 (m, 28 H)	12 × CH ₂ -palmitoil γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -palmitoil, β-CH ₂ -palmitoil δ-CH ₃ -Ile	CH ₃ -palmitoil, β-CH ₂ -palmitoil δ-CH ₃ -Ile, β-CH-Ile
1,40-1,50 (m, 6 H)	β-CH ₂ -Glu/Gln	α-CH-Glu/Gln	α-CH-Glu/Gln
1,56-1,63 (m, 2 H)	γ-CH ₂ -Pro	β-CH ₂ -Pro	α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro
1,69-1,77 (m, 2 H)	β-CH-Ile γ-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile δ-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn
1,84-2,33 (m, 14 H)	β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH-Val β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Pro γ-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -palmitoil	α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val α-CH-Orn α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln CH ₂ -palmitoil	α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val α-CH-Orn, δ-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln, α-CH-Glu/Gln CH ₂ -palmitoil, CH ₃ -palmitoil
2,46-2,50*	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a
2,68-2,73 (m, 4 H)	δ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, β-CH ₂ -Orn
2,88-2,90 (m, 2 H)			
3,26-3,37 (m, 2 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a
3,60-3,63 (m, 1 H)			
3,74-3,76 (m, 1H)	β-CH-Thr	α-CH-Thr, γ-CH ₃ -Thr	α-CH-Thr, γ-CH ₃ -Thr
4,00-4,04 (m, 2 H)	α-CH-Thr α-CH-Ile	β-CH-Thr, γ-CH ₃ -Thr β-CH-Ile	β-CH-Thr, γ-CH ₃ -Thr β-CH-Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₃ -Ile
4,11-4,17 (m, 2 H)	α-CH-Orn α-CH-Glu/Gln	β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Glu/Gln	β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Glu/Gln
4,23-4,28 (m, 2 H)	α-CH-Pro α-CH-Glu/Gln	β-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln	β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln
4,43-4,46 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b
4,48-4,51 (m, 1 H)	α-CH-Val	β-CH-Val	β-CH-Val, γ-CH ₃ -Val
4,56-4,60 (m, 1 H)			
4,70-4,73 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a
6,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}
6,83 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
6,93 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
7,04 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}

* Senyal sota el pic de dissolvent, δ (ppm) deduït a partir dels espectres COSY i/o TOCSY.

6.2.2.2 Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC840

El ciclolipodepsipèptid $C_7H_{15}CO$ -Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (**BPC840**) es diferencia dels ciclolipodepsipèptids comentats a l'apartat anterior per la presència d'una D-Ser⁴ en substitució de la D-Thr⁴. Els protons β -CH₂-Ser diastereotòpics es varen assignar a 3,19-3,33 ppm i 3,44-3,54 ppm, respectivament. Aquest últim senyal va aparèixer parcialment ocult pel pic de l'aigua. Tot i això, es varen observar correlacions entre els dos senyals de β -CH₂-Ser i el corresponent a α -CH-Ser (4,12-4,26 ppm) (Figura 71 i Taula 35).

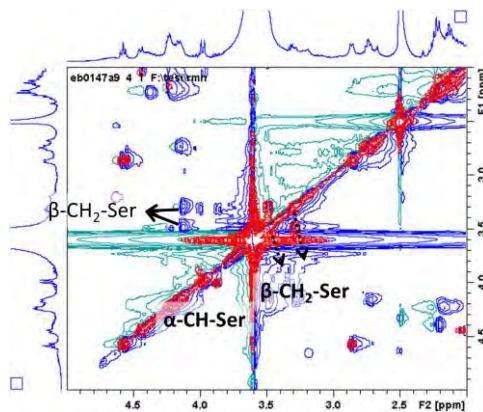


Figura 71. Finestra des de 2 ppm a 5 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC840. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Ser respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Taula 35. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC840.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,73-0,86 (m, 15 H)	δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Ile 2 × γ-CH ₃ -Val CH ₃ -octanoïl	β-CH-Val CH ₂ -octanoïl	β-CH-Ile β-CH-Ile β-CH-Val, α-CH-Val β-CH ₂ -octanoïl, CH ₂ -octanoïl
1,14-1,21 (m, 12 H)	4 × CH ₂ -octanoïl γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl	α-CH ₂ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl α-CH-Ile
1,41-1,48 (m, 4 H)	β-CH ₂ -octanoïl	α-CH ₂ -octanoïl, CH ₂ -octanoïl	α-CH ₂ -octanoïl, CH ₂ -octanoïl, CH ₃ -octanoïl
1,55-1,61 (m, 3 H)	γ-CH ₂ -Orn	δ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn	δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, β-CH ₂ -Orn
1,68-1,90 (m, 10 H)	β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH-Ile γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Orn	α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn	α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn
2,00-2,33 (m, 8 H)	β-CH-Val β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -Pro α-CH ₂ -octanoïl	α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -octanoïl	α-CH-Val, γ-CH ₃ -Val α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -octanoïl, CH ₂ -octanoïl
2,50-2,57*	β-CH ₂ -Tyr ^a		α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b
2,67-2,77 (m, 2 H)	δ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn
2,85-2,87 (m, 2 H)			
3,19-3,33 (m, 4 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a α-CH-Ser, β-CH ₂ -Ser
3,44-3,54*	β-CH ₂ -Ser δ-CH ₂ -Pro	α-CH-Ser, β-CH ₂ -Ser γ-CH ₂ -Pro	α-CH-Ser, β-CH ₂ -Ser α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro
3,97-3,99 (m, 1 H)	α-CH-Ile	β-CH-Ile	β-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₂ -Ile
4,12-4,26 (m, 6 H)	α-CH-Pro α-CH-Ser α-CH-Orn	γ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Ser β-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Ser β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn
4,35-4,46 (m, 2 H)	α-CH-Tyr ^b α-CH-Val	β-CH-Val	β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH-Val, γ-CH ₃ -Val
4,56-4,60 (m, 1 H)			
4,64-4,75 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^a		β-CH ₂ -Tyr ^a
6,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,86 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^{a i b} _{arom}	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}
6,95-7,04 (m, 4 H)	CH-Tyr ^{a-b} _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom} , CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom} , CH-Tyr ^a _{arom}

* Senyal sota el pic de dissolvent, δ (ppm) deduït a partir dels espectres COSY i/o TOCSY.

6.2.2.3 Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC844

El ciclolipodepsipèptid $C_7H_{15}CO-Glu-D-Orn-Tyr(\&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-\&$ (**BPC844**) es diferencia dels ciclolipodepsipèptids anteriors per la presència d'un residu d'Ala a la posició 6 en comptes d'un residu de Val. Aquest residu es va identificar a través de la correlació, tant en l'espectre COSY com TOCSY, entre els senyals d' α -CH-Ala a 4,86-4,87 ppm i β -CH₃-Ala a 1,10-1,20 ppm (Figura 72 i Taula 36). A més, en aquests espectres, també es varen poder observar els senyals característics de la Ser i l'absència dels senyals característics dels residus de Thr i Val presents en **BPC838**, **BPC854** i **BPC856**.

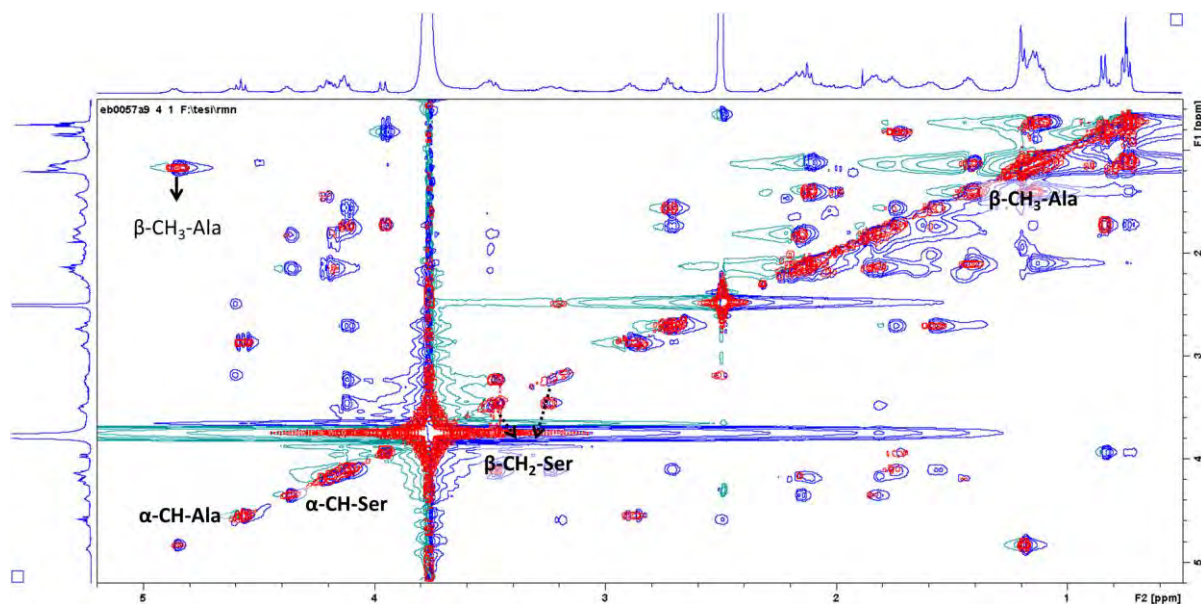


Figura 72. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC844. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Ala respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Taula 36. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC844.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,73-0,76 (m, 6 H)	δ-CH ₃ -Ile CH ₃ -octanoïl	γ-CH ₂ -Ile CH ₂ -octanoïl	γ-CH ₂ -Ile, γ-CH ₃ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile CH ₂ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl, α-CH ₂ -octanoïl
0,83-0,85 (m, 3 H)	γ-CH ₃ -Ile		γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile
1,10-1,20 (m, 15 H)	4 × CH ₂ -octanoïl β-CH ₃ -Ala γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl α-CH-Ala γ-CH ₃ -Ile	CH ₃ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl α-CH-Ala γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile
1,40-1,45 (m, 4 H)	β-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -octanoïl	α-CH-Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln CH ₂ -octanoïl	α-CH-Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln CH ₃ -octanoïl, CH ₂ -octanoïl, α-CH ₂ -octanoïl
1,56-1,62 (m, 3 H)	γ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn
1,73-1,88 (m, 8 H)	β-CH-Ile β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Tyr ^b γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Tyr ^b	γ-CH ₃ -Ile, α-CH-Ile α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Tyr ^b	γ-CH ₃ -Ile, α-CH-Ile, γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b
2,07-2,24 (m, 10 H)	β-CH ₂ -Pro γ-CH ₂ -Glu/Gln α-CH ₂ -octanoïl	α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -octanoïl	α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln, α-CH-Glu/Gln CH ₂ -octanoïl, β-CH ₂ -octanoïl, CH ₃ -octanoïl
2,46-2,55*	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a
2,71-2,74 (m, 2 H)	δ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn, β-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn
2,87-2,91 (m, 2 H)			
3,19-3,33 (m, 2 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Tyr ^a β-CH ₂ -Ser	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser
3,47-3,53 (m, 2 H)	δ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Ser	γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser	β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser
3,95-3,97 (m, 1 H)	α-CH-Ile	β-CH-Ile	β-CH-Ile, γ-CH ₂ -Ile, δ-CH ₃ -Ile, γ-CH ₃ -Ile
4,11-4,24 (m, 5 H)	α-CH-Ser α-CH-Orn α-CH-Glu/Gln α-CH-Pro	β-CH ₂ -Ser β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -Pro	β-CH ₂ -Ser β-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro
4,36-4,40 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b
4,56-4,62 (m, 2 H)	α-CH-Tyr ^a		β-CH ₂ -Tyr ^a
4,86-4,87 (m, 1 H)	α-CH-Ala	β-CH ₃ -Ala	β-CH ₃ -Ala
6,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}
6,86 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
6,94 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
7,06 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}

* Senyal sota el pic de dissolvent, δ (ppm) deduït a partir dels espectres COSY i/o TOCSY.

6.2.2.4 Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC842

El ciclolipodepsipèptid $C_7H_{15}CO-Glu-D-Orn-Tyr(\&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-\&$ (**BPC842**) presenta un residu de Thr a la posició 4, com **BPC838**, **BPC854** i **BPC856**, i un residu d'Ala a la posició 6, com **BPC844**. En aquest cas, però, els senyals corresponents a la Thr varen aparèixer parcialment ocults pel senyal de l'aigua, observant-se únicament la correlació entre els senyals de β -CH-Thr (3,72-3,80 ppm) i de γ -CH₃-Thr (0,71-0,89 ppm) (Figura 73 i Taula 37). A més, també es varen observar els senyals característics corresponents als altres aminoàcids presents a l'estructura, com ara les dues Tyr, els dos Glu i la Gln, la Pro, l'Orn i la Ile.

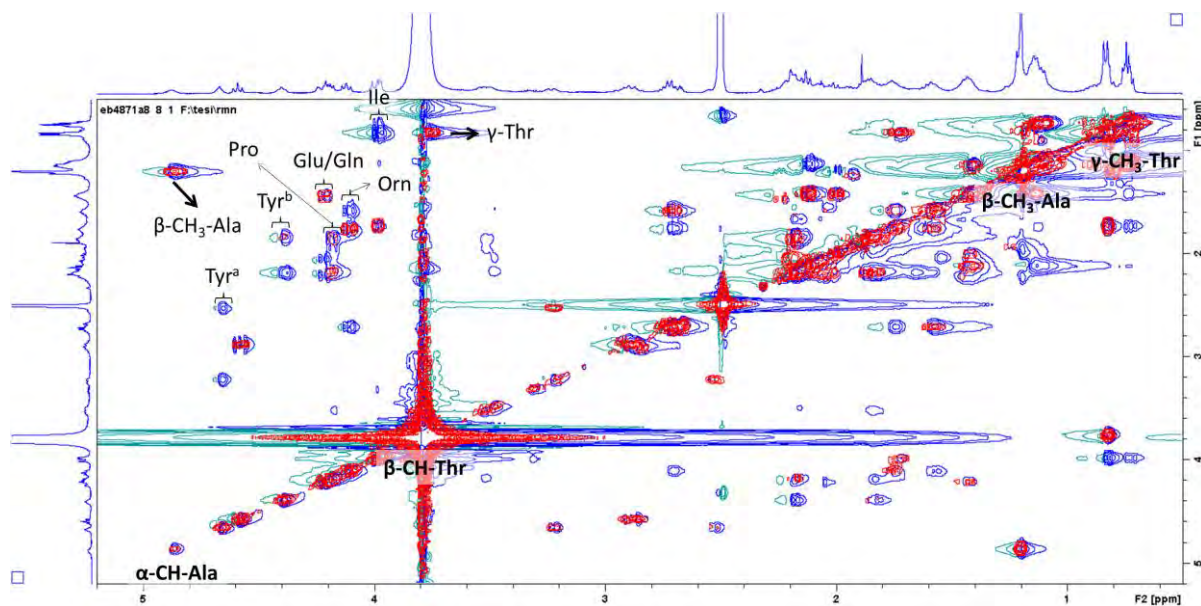


Figura 73. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipodepsipèptid BPC842. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu d'Ile respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal. A més, s'assenyalen amb claus les zones on apareixen els senyals característics per a l'assignació dels residus d'Ile, Orn, Pro, Glu i/o Gln i Tyr respecte els corresponents senyals α -CH.

Taula 37. Caracterització del ciclolipodepsipèptid BPC842.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,71-0,89 (m, 12 H)	δ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Ile γ-CH ₃ -Thr CH ₃ -octanoil	γ-CH ₂ -Ile β-CH-Ile β-CH-Thr CH ₂ -octanoil	γ-CH ₂ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile γ-CH ₂ -Ile, β-CH-Ile, α-CH-Ile β-CH-Thr CH ₂ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil
1,10-1,22 (m, 15 H)	4 × CH ₂ -octanoil β-CH ₃ -Ala γ-CH ₂ -Pro γ-CH ₂ -Ile	CH ₃ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil α-CH-Ala β-CH ₂ -Pro δ-CH ₃ -Ile	CH ₃ -octanoil, β-CH ₂ -octanoil α-CH-Ala α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro β-CH-Ile, α-CH-Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile
1,43-1,45 (m, 4 H)	β-CH ₂ -octanoil β-CH ₂ -Glu/Gln	α-CH ₂ -octanoil, CH ₂ -octanoil α-CH-Glu/Gln	α-CH ₂ -octanoil, CH ₂ -octanoil, CH ₃ -octanoil α-CH-Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln
1,57-1,61 (m, 2 H)	γ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn	δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, β-CH ₂ -Orn
1,71-1,89 (m, 8 H)	β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH-Ile γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Orn β-CH ₂ -Tyr ^b	α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b γ-CH ₃ -Ile δ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b	α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b α-CH-Ile, γ-CH ₂ -Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile α-CH-Pro, β-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro δ-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn α-CH-Tyr ^b , β-CH ₂ -Tyr ^b
1,99-2,22 (m, 10 H)	β-CH ₂ -Pro γ-CH ₂ -Glu/Gln α-CH ₂ -octanoil	γ-CH ₂ -Pro, α-CH-Pro β-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -octanoil	α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro, δ-CH ₂ -Pro α-CH-Glu/Gln, β-CH ₂ -Glu/Gln β-CH ₂ -octanoil
2,51-2,59*	β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a
2,69-2,76 (m, 2 H)	δ-CH ₂ -Orn	γ-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, α-CH-Orn, γ-CH ₂ -Orn
2,84-2,95 (m, 2 H)			
3,22-3,25 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a	α-CH-Tyr ^a , β-CH ₂ -Tyr ^a
3,50-3,55 (m, 2 H)	δ-CH ₂ -Pro	γ-CH ₂ -Pro	α-CH-Pro, γ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro
3,72-3,80*	β-CH-Thr	γ-CH ₃ -Thr	γ-CH ₃ -Thr
3,98-4,01 (m, 2 H)	α-CH-Ile	β-CH-Ile	β-CH-Ile, γ-CH ₂ -Ile, γ-CH ₃ -Ile, δ-CH ₃ -Ile
4,10-4,14 (m, 1 H)	α-CH-Orn	β-CH ₂ -Orn	β-CH ₂ -Orn, δ-CH ₂ -Orn, γ-CH ₂ -Orn
4,18-4,24 (m, 2 H)	α-CH-Pro α-CH-Glu/Gln	β-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln	δ-CH ₂ -Pro, β-CH ₂ -Pro, γ-CH ₂ -Pro β-CH ₂ -Glu/Gln, γ-CH ₂ -Glu/Gln
4,38-4,42 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b
4,57-4,61 (m, 1 H)			
4,62-4,69 (m, 1 H)	α-CH-Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a
4,81-4,90 (m, 1 H)	α-CH-Ala	β-CH ₃ -Ala	β-CH ₃ -Ala
6,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}
6,84 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
6,94 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}	CH-Tyr ^b _{arom}
7,05 (d, 2 H, J = 8,0 Hz)	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}	CH-Tyr ^a _{arom}

* Senyal sota el pic de dissolvent, δ (ppm) deduït a partir dels espectres COSY i/o TOCSY.

6.3 Ciclolipopèptids biarílics derivats d'arilomicines

Les arilomicines A i B són ciclolipopèptids naturals, aïllats de soques de *Streptomyces*, que són actius enfront bacteris grampositius i que, a més, mostren una lleu activitat antifúngica (Figura 74).⁹⁵ Estructuralment, aquests ciclolipopèptids presenten un anell format per tres aminoàcids, l'extrem N-terminal del qual es troba metilat i derivatitzat amb un tripèptid acilat amb un àcid gras de 14 a 16 carbonis. Dos dels tres aminoàcids de l'anell es troben units mitjançant un enllaç biarílic. Concretament, el grup fenol d'una 4-hidroxifenilglicina es troba unit al grup fenol d'una Tyr, en el cas de l'arilomicina A, o d'una Tyr(3-NO₂), en el cas de l'arilomicina B.

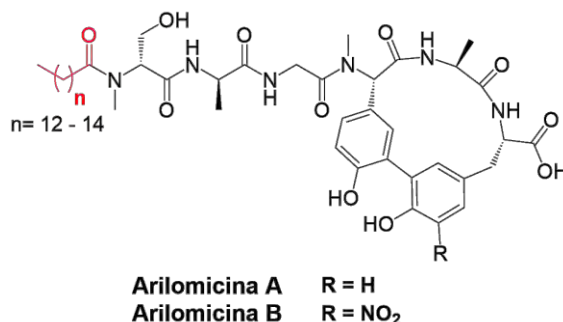


Figura 74. Estructura de les arilomicines A i B.

A la bibliografia es troben pocs exemples de síntesis d'arilomicines. D'una banda, Romesberg *et al.* varen descriure una estratègia per a la preparació en dissolució d'arilomicines basada en la síntesi d'un tripèptid biarílic lineal que posteriorment es cicla per formació d'un enllaç amida.¹⁹¹ D'altra banda, Zhu *et al.* varen descriure la preparació d'arilomicines a través de la síntesi de la cadena peptídica lineal seguida de la seva ciclació per formació d'un enllaç biarílic mitjançant una reacció de Suzuki-Miyaura intermolecular.¹⁹² L'etapa clau d'ambdues estratègies és la formació de l'enllaç biarílic. Posteriorment, aquestes dues aproximacions varen ser utilitzades per sintetitzar anàlegs d'arilomicines.¹⁹³⁻¹⁹⁶

La Dra. Ng-Choi, en la seva tesi doctoral realitzada en el grup LIPPSO, va desenvolupar una estratègia sintètica per a la preparació en fase sòlida de derivats d'arilomicines. En particular, va preparar el ciclolipopèptid **20**, anàleg de l'arilomicina A (Figura 75). Aquest derivat **20**, a diferència de l'arilomicina A, conté a la seva estructura un residu de Lys a l'extrem N-terminal i una Tyr en comptes d'una 4-hidroxifenilglicina, i, a més, presenta els grups fenol dels residus de Tyr metilats. La Lys es va incorporar, perquè es va observar que el derivat d'arilomicina sense aquest residu presentava un caràcter lipofílic molt elevat que dificultava la seva anàlisi per HPLC, així com la seva purificació i caracterització per espectrometria de masses.

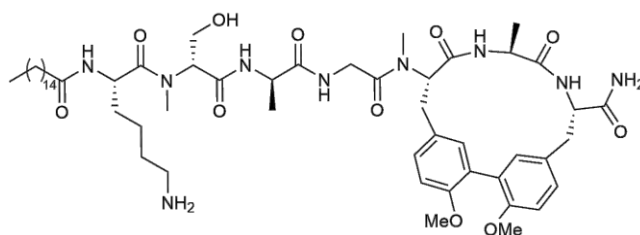


Figura 75. Estructura del derivat d'arilomicina 20.

En aquesta tesi doctoral es va tornar a sintetitzar el ciclolipopèptid **20**, anàleg de l'arilomicina A, per a poder-ne fer la seva caracterització estructural per RMN.

6.3.1.1 Síntesi del ciclolipopèptid **20** anàleg de l'arilomicina A

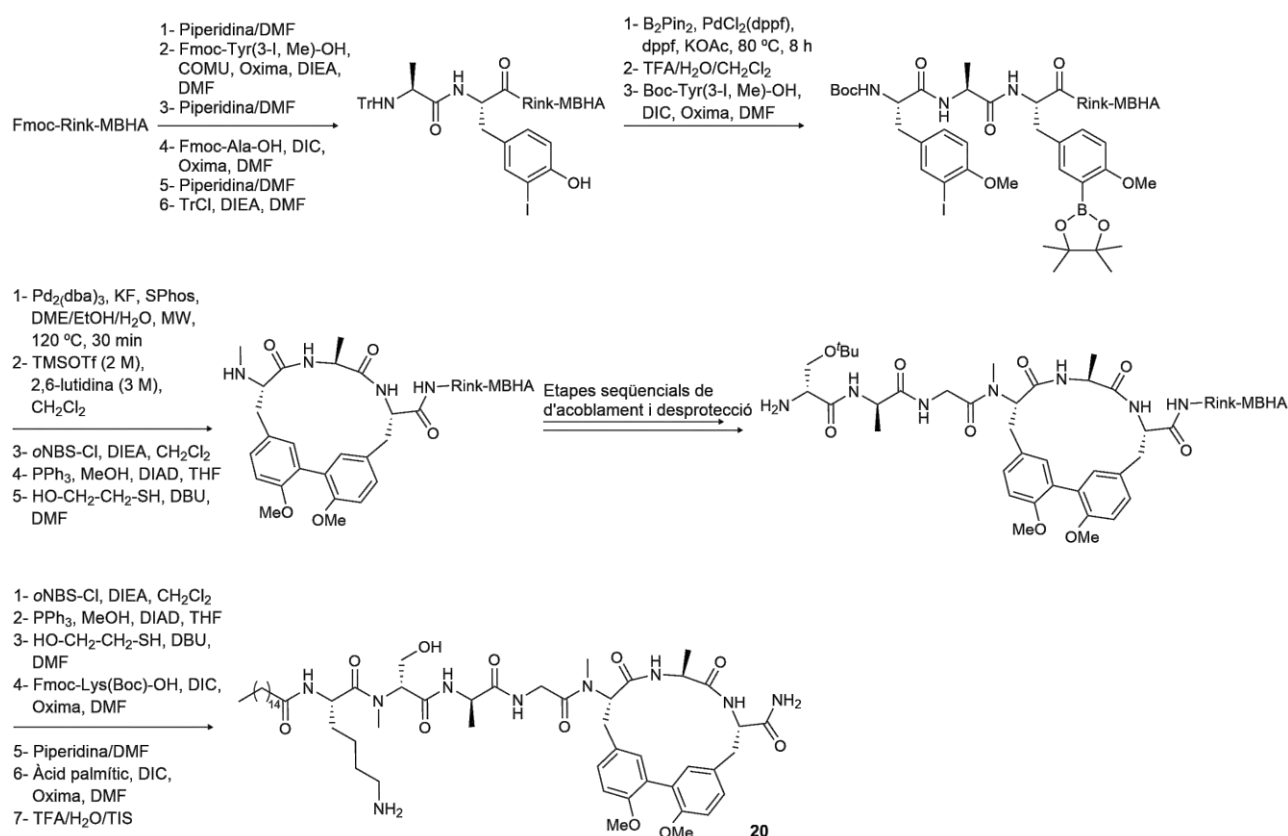
La síntesi en fase sòlida del ciclolipopèptid **20** anàleg de l'arilomicina A es va realitzar seguint la metodologia descrita prèviament per Ng-Choi.¹⁹⁷

Aquesta estratègia consisteix en: (i) l'acoblament seqüencial de Fmoc-Tyr(3-I, Me)-OH i Fmoc-Ala-OH; (ii) la substitució del grup Fmoc de l'extrem N-terminal per trifenilmetil (Tr); (iii) la borilació de Miyaura; (iv) l'eliminació del grup Tr N-terminal i l'acoblament de Boc-Tyr(3-I, Me)-OH; (v) la ciclació del tripèptid mitjançant una reacció de Suzuki-Miyaura intermolecular; (vi) l'eliminació del grup Boc N-terminal i la metilació del grup amino resultant; (vii) l'elongació del tripèptid lineal; (viii) la metilació del grup amino de la D-Ser; (ix) l'acoblament seqüencial de la Lys i de l'àcid palmític; (x) el desancorament del pèptid (Esquema 22).

Així doncs, es va partir d'una resina Fmoc-Rink-MBHA i, després d'eliminar el grup Fmoc amb piperidina/DMF (3:7), es va acoblar Fmoc-Tyr(3-I,Me)-OH per tractament amb hexafluorofosfat d'1-[1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino]uroni (COMU), Oxima i DIEA en DMF. A continuació, es va eliminar el grup Fmoc i es va acoblar Fmoc-Ala-OH en presència de DIC i Oxima. Seguidament, el grup Fmoc es va substituir pel grup Tr, ja que aquest últim és estable a les condicions de reacció de l'etapa següent. Aquest grup es va incorporar per tractament amb TrCl i DIEA en DMF. La iodopeptidil resina resultant es va sotmetre a les condicions de borilació de Miyaura que inclouen l'ús de bis(pinacol)diborà (B_2Pin_2), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocè (dppf), $PdCl_2(dppf)$ i KOAc en DMSO.¹⁹⁸ Tot seguit, es va eliminar el grup Tr N-terminal emprant una solució de TFA/ H_2O/CH_2Cl_2 (0,2:1:98,2) i es va acoblar Boc-Tyr(3-I,Me)-OH.

A continuació, la peptidil resina obtinguda, que incorpora un iodo i un borono aril aminoàcid, es va ciclar mitjançant una reacció de Suzuki-Miyaura intramolecular per tractament amb tris(dibenzilidenacetona)dipal·ladi (0) ($Pd_2(dba)_3$), 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenil (SPhos) i KF (4 eq) en dimetoxietà (DME)/EtOH/ H_2O . Seguidament, es va eliminar el grup Boc N-terminal amb trifluorometansulfonat de trimetilsilil (TMSOTf) i 2,6-lutidina en CH_2Cl_2 , i el grup amino resultant es va metilar emprant una reacció de Mitsunobu. Aquesta metilació va consistir en tres etapes seqüencials: (i) protecció del grup amino amb el grup 2-nitrobenzensulfonil (oNBS) utilitzant oNBS-Cl i DIEA en CH_2Cl_2 ; (ii) metilació amb PPh_3 , DIAD i MeOH en THF; i (iii) eliminació del grup oNBS amb β -mercaptoetanol i 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) en DMF.

Seguidament, es varen realitzar etapes seqüencials d'acoblament dels aminoàcids Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH i Fmoc-Ser(^tBu)-OH, i d'eliminació del grup Fmoc terminal amb piperidina/DMF (3:7). Després de la metilació del grup amino de la Ser terminal mitjançant el procediment descrit anteriorment, es va acoblar seqüencialment Fmoc-Lys(Boc)-OH i àcid palmític. Finalment, la peptidil resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5), es va purificar el cru per cromatografia flash en fase reversa, es va analitzar per HPLC i es va caracteritzar per espectrometria de masses. El ciclolipopeptid **20**, anàleg de l'arilomicina A, es va obtenir amb una puresa del 96%.



Esquema 22. Síntesi del derivat d'arilomicina **20**.

6.3.2 Caracterització mitjançant RMN del ciclolipopeptid biarílic cíclic **20** derivat de l'arilomicina A

El derivat d'arilomicina **20** es va caracteritzar mitjançant experiments 1D i 2D de ¹H-RMN, COSY i TOCSY a temperatura ambient en MeOD (Taula 38). A continuació es comenta l'assignació dels senyals característics d'aquest peptid.

Pel que fa al grup palmitoíl, el CH₃ va aparèixer com un triplet (0,92 ppm) que a l'espectre TOCSY va correlacionar amb un multiplet (1,27-1,47 ppm) corresponent, entre d'altres senyals, a 12 CH₂ d'aquest grup palmitoíl (Figura 76). Aquest senyal va correlacionar amb els senyals corresponents a β-CH₂-palmitoíl (1,58-1,73 ppm) i a α-CH₂-palmitoíl (2,18-2,29 ppm), més desapantallats per la

seva proximitat al grup carbonil. A més, es va observar una correlació COSY entre aquests dos darrers senyals.

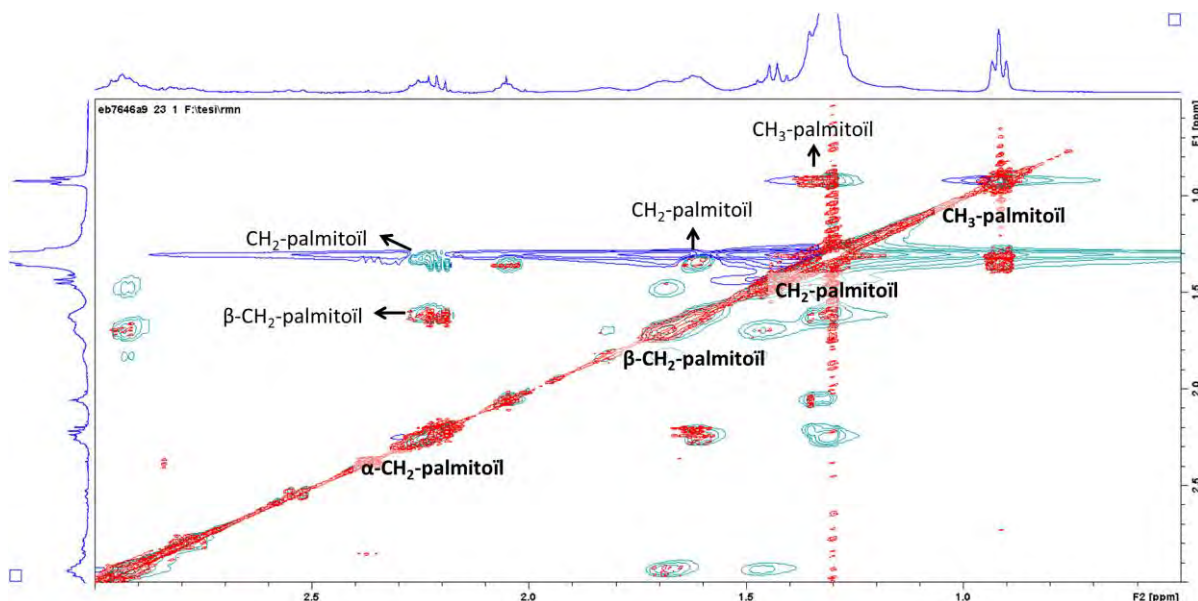


Figura 76. Finestra des de 0,5 ppm a 3 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic **20** derivat de l'arilomicina **A**. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del grup palmitoil respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

En l'assignació dels senyals del residu de Lys es va observar que el senyal d' α -CH-Lys (4,72-4,83, m, 4 H) es trobava pràcticament ocult pel senyal de l'aigua (Figura 77). Tot i això, es va identificar la seva correlació a l'espectre TOCSY amb els senyals de β -CH₂-Lys (1,81-1,90 ppm), γ -CH₂-Lys (1,27-1,47 ppm), δ -CH₂-Lys (1,58-1,73 ppm) i ϵ -CH₂-Lys (2,89-2,98 ppm). A més, a l'espectre COSY, es va observar la correlació entre aquest últim senyal i el de δ -CH₂-Lys.

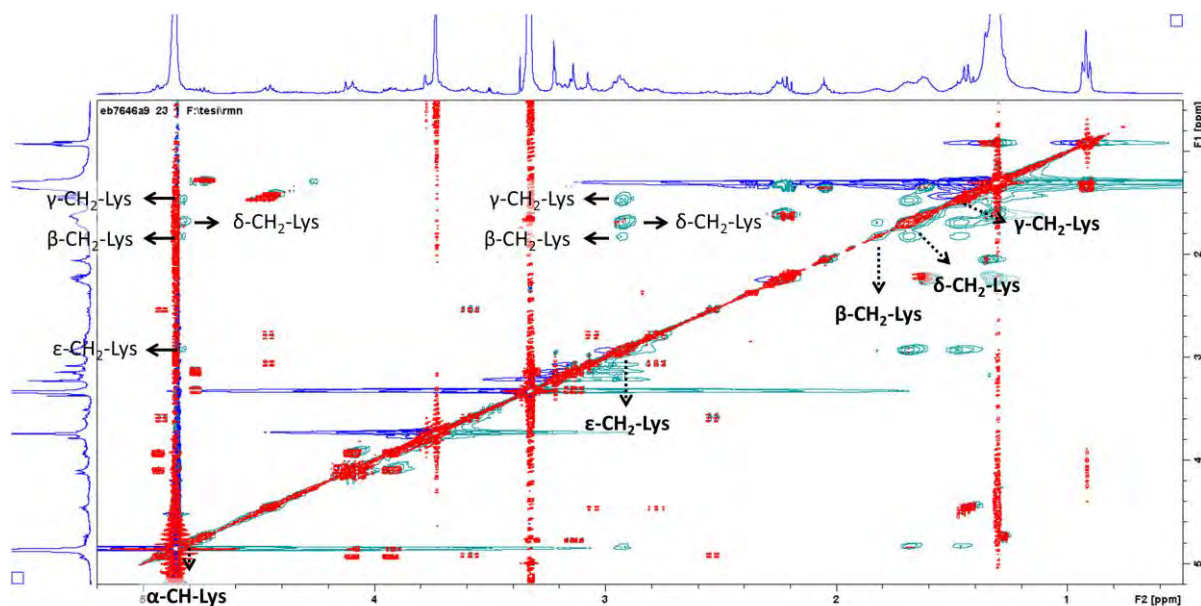


Figura 77. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Lys respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

En referència al residu de Ser, el senyal d' α -CH-Ser, dins del multiplet a 4,91-4,95 ppm, va correlacionar amb els dos senyals diastereotòpics β -CH₂-Ser a 3,91-3,96 ppm i 4,08-4,12 ppm. A més, també es va observar la correlació COSY entre els dos senyals corresponents als protons β -CH₂-Ser.

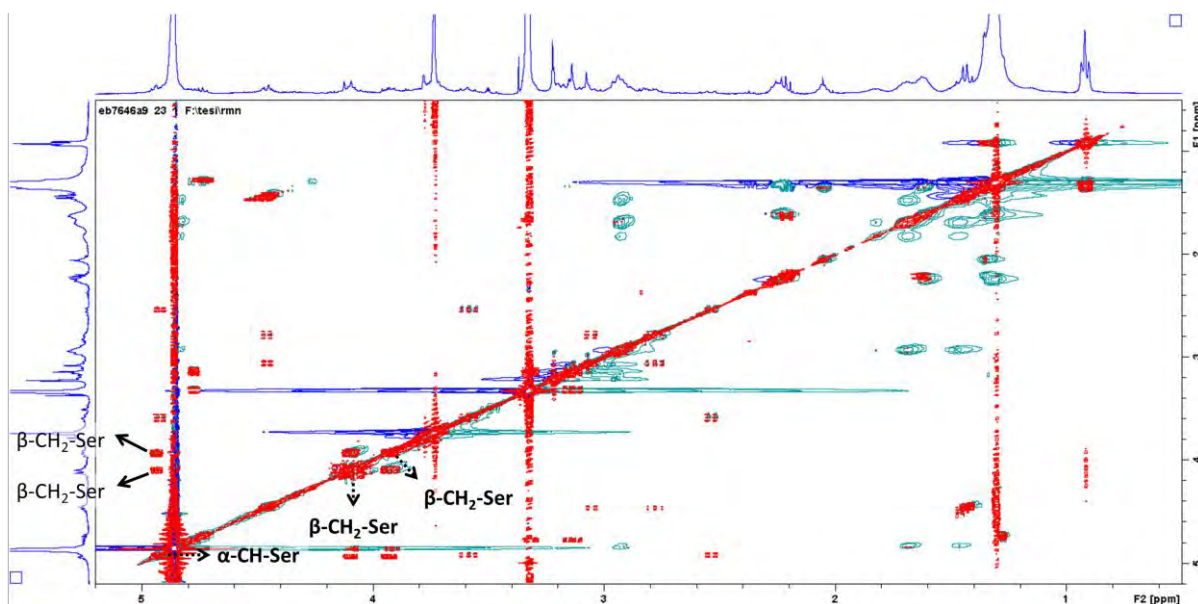


Figura 78. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Ser respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

Els senyals corresponents a les dues Ala varen ser fàcilment identificables a partir dels senyals α -CH-Ala a 4,44-4,50 ppm i a 4,72-4,83 ppm que varen correlacionar als espectres COSY i TOCSY amb els senyals corresponents als dos β -CH₃-Ala localitzats dins del multiplet a 1,27-1,47 ppm (Figura 79).

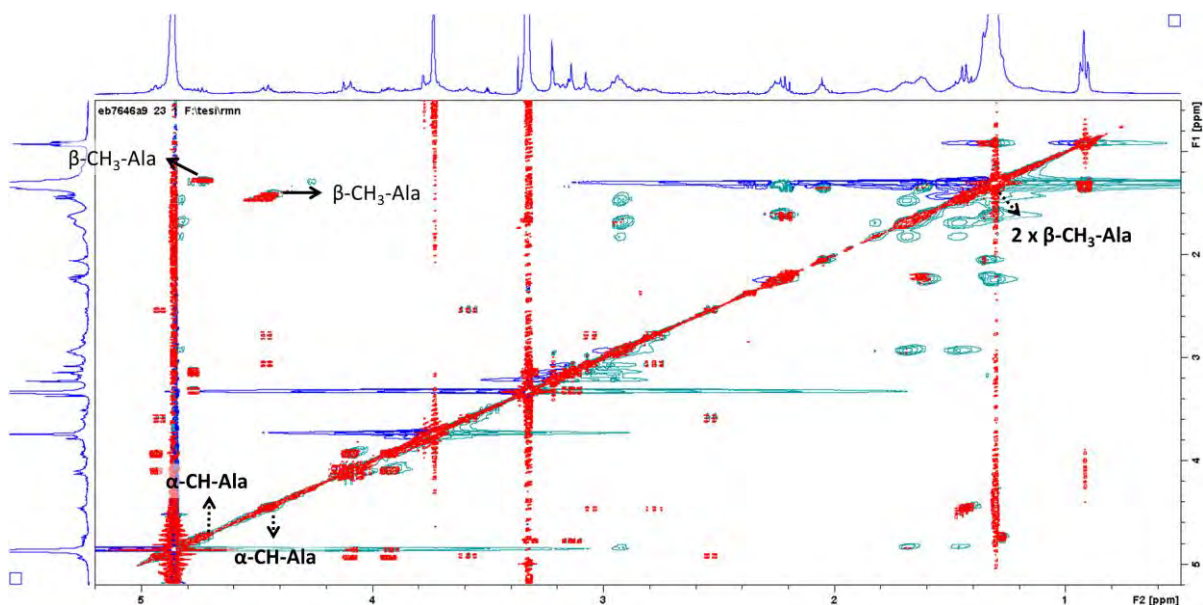


Figura 79. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu d'Ala respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

En relació a les dues Tyr, d'una banda, es varen assignar els senyals dels dos α -CH-Tyr a 4,44-4,50 ppm i 4,72-4,83 ppm que varen correlacionar amb els dos senyals diastereotòpics corresponents a β -CH₂-Tyr a 2,75-2,84 ppm i 3,07-3,10 ppm per a la primera Tyr, i a 3,13-3,16 ppm i 3,29-3,34 ppm (senyal oculta pel MeOD) per a la segona Tyr (Figura 80). A més, es varen observar les correlacions entre les respectives senyals de β -CH₂-Tyr.

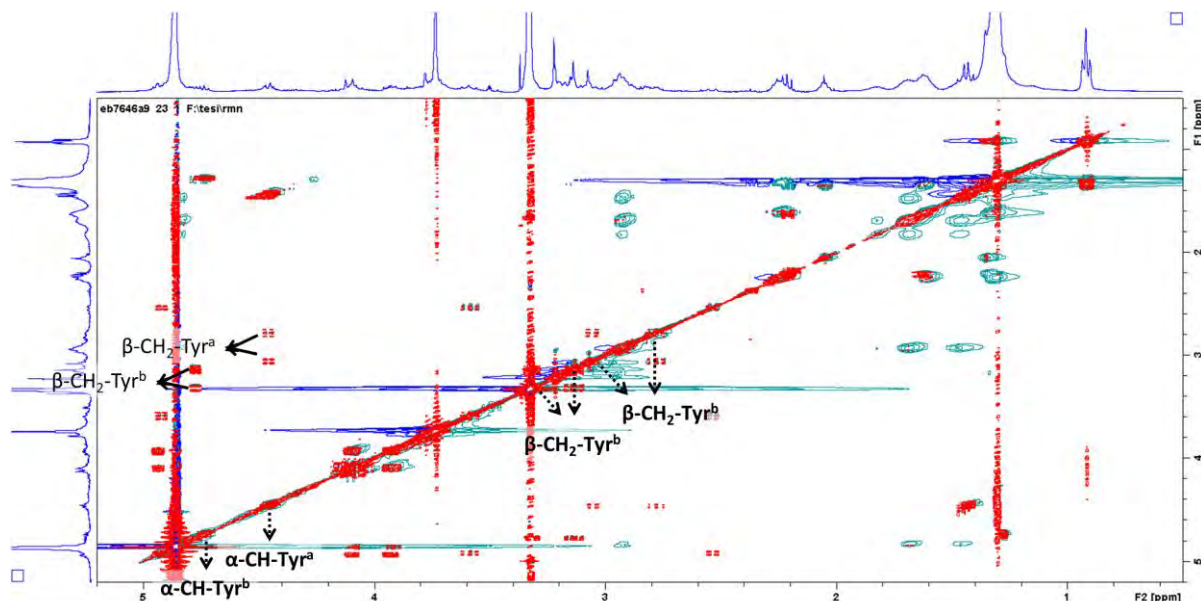


Figura 80. Finestra des de 0,5 ppm a 5,2 ppm dels espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell) del ciclolipopèptid biarílic cíclic **20** derivat de l'arilomicina **A**. Les correlacions més rellevants per a l'assignació del residu de Tyr respecte l'eix vertical s'indiquen amb fletxes. S'indica en negreta la seva assignació sobre la diagonal.

D'altra banda, la part aromàtica dels residus de Tyr va resultar més confusa (Figura 82). Es va descriure com a dos multiplets a 6,68-6,95 ppm (4 H) i a 7,13-7,29 ppm (2 H) que correlacionen entre ells. Es va postular que el segon multiplet, més desapantallat, pogués correspondre als protons aromàtics de la posició 2, i que els protons 5 i 6 es trobessin situats al primer multiplet (Figura 81).

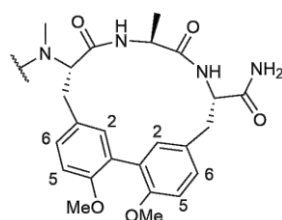


Figura 81. Fragment biarílic cíclic del ciclolipopèptid **20** derivat de l'arilomicina **A**.

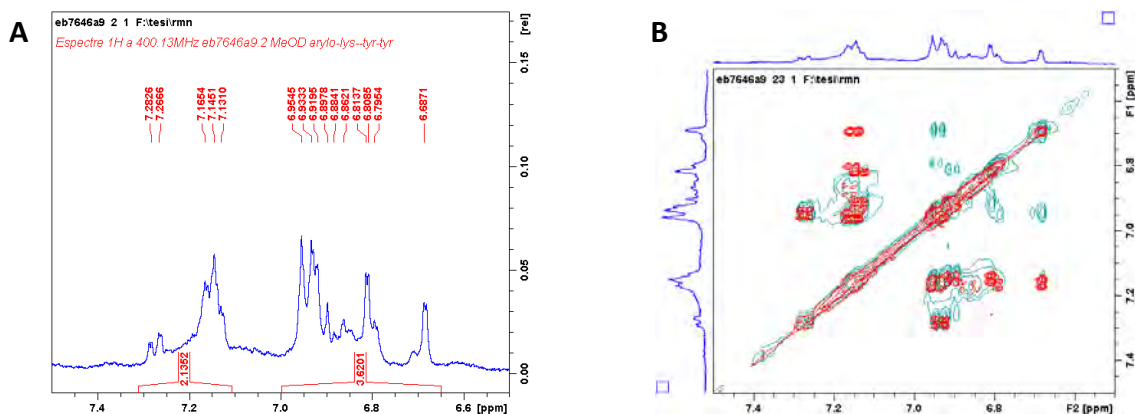


Figura 82. Finestra des de 6,5 ppm a 7,5 ppm del ciclipopèptid biarílic cíclic 20 derivat de l'arilomicina A corresponent a: A, espectre ^1H -RMN; B, espectres TOCSY (en blau) i COSY (en vermell).

Per últim, els dos grups metoxi, situats a les cadenes laterals de les dues Tyr, es varen assignar a un doblet aparent (3,73-3,78 ppm) intens. Es va postular que, conjuntament amb aquests dos grups, els $\alpha\text{-CH}_2\text{-Gly}$ també es troben dins aquest multiplet, ja que tant el desplaçament com la integració corresponen amb l'esperada. D'altra banda, els dos grups N-CH_3 es varen assignar a dos singlets a 3,22 ppm (3 H) i 3,36 ppm (3 H), no assignats a cap altre protó fins el moment.

Taula 38. Caracterització del ciclolipopèptid biarílic 20.

¹ H-RMN δ (ppm)	Protons	COSY ¹ H → ¹ H	TOCSY ¹ H → ¹ H
0,92 (t, 3 H, J = 6,34 Hz)	CH ₃ -palmitoïl	CH ₂ -palmitoïl	CH ₂ -palmitoïl
1,27-1,47 (m, 32 H)	12 x CH ₂ -palmitoïl 2 x β-CH ₃ -Ala γ-CH ₂ -Lys	CH ₃ -palmitoïl α-CH-Ala δ-CH ₂ -Lys, β-CH ₂ -Lys	CH ₃ -palmitoïl, β-CH ₂ -palmitoïl, α-CH ₂ -palmitoïl α-CH-Ala β-CH ₂ -Lys, δ-CH ₂ -Lys, α-CH-Lys, ε-CH ₂ -Lys
1,58-1,73 (m, 4 H)	β-CH ₂ -palmitoïl δ-CH ₂ -Lys	CH ₂ -palmitoïl, α-CH ₂ -palmitoïl γ-CH ₂ -Lys, ε-CH ₂ -Lys	CH ₃ -palmitoïl, α-CH ₂ -palmitoïl, CH ₂ -palmitoïl γ-CH ₂ -Lys, β-CH ₂ -Lys, α-CH-Lys, ε-CH ₂ -Lys
1,81-1,90 (m, 2H)	β-CH ₂ -Lys	γ-CH ₂ -Lys, α-CH-Lys	γ-CH ₂ -Lys, δ-CH ₂ -Lys, α-CH-Lys, ε-CH ₂ -Lys
2,18-2,29 (m, 2 H)	α-CH ₂ -palmitoïl	β-CH ₂ -palmitoïl	CH ₃ -palmitoïl, β-CH ₂ -palmitoïl, CH ₂ -palmitoïl
2,75-2,84 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a
2,89-2,98 (m, 2 H)	ε-CH ₂ -Lys	δ-CH ₂ -Lys	β-CH ₂ -Lys, δ-CH ₂ -Lys, α-CH-Lys, γ-CH ₂ -Lys
3,04-3,10 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a	β-CH ₂ -Tyr ^a , α-CH-Tyr ^a
3,13-3,16 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b
3,22 (s, 3 H)	N-CH ₃		
3,29-3,34*	β-CH ₂ -Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b	β-CH ₂ -Tyr ^b , α-CH-Tyr ^b
3,37 (s, 3 H)	N-CH ₃		
3,73-3,78 (m, 8 H)	2 x O-CH ₃ α-CH ₂ -Gly		
3,91-3,96 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser	β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser
4,08-4,12 (m, 1 H)	β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser	β-CH ₂ -Ser, α-CH-Ser
4,44-4,50 (m, 2 H)	α-CH-Ala ^b α-CH-Tyr ^a	β-CH ₃ -Ala ^b β-CH ₂ -Tyr ^a	β-CH ₃ -Ala ^b β-CH ₂ -Tyr ^a
4,72-4,83 (m, 3 H)	α-CH-Ala ^a α-CH-Tyr ^b α-CH-Lys	β-CH ₃ -Ala ^a β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -Lys	β-CH ₃ -Ala ^a β-CH ₂ -Tyr ^b β-CH ₂ -Lys, δ-CH ₂ -Lys, ε-CH ₂ -Lys, γ-CH ₂ -Lys
4,91-4,95 (m, 1 H)	α-CH-Ser	β-CH ₂ -Ser	β-CH ₂ -Ser
6,68-6,95 (m, 4 H)	4 x CH-Tyr _{arom} ^a	Tyr _{arom} ^b	Tyr _{arom} ^b
7,13-7,29 (m, 2 H)	2 x CH-Tyr _{arom} ^b	Tyr _{arom} ^a	Tyr _{arom} ^a

* Senyal sota el pic de dissolvent, δ (ppm) deduït a partir dels espectres COSY i/o TOCSY.

Així doncs, els experiment NMR es varen mostrar útils per a la caracterització i l'anàlisi de lipopèptids. Concretament, l'estudi estructural del lipopèptid **BP475** va revelar que es troba desestructurat en aigua. En canvi, en presència d'un 30% de $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$, aquest lipopèptid presenta una estructura d'hèlix α entre els aminoàcids Lys⁶ i Lys¹⁰.

A més, es varen identificar i assignar la majoria dels senyals esperats dels ciclolipodepsipèptids **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856** i del ciclolipopèptid biarílic **20** confirmant així que les estratègies sintètiques desenvolupades per la Dra. Rosés i la Dra. Ng-Choi són útils per a la síntesi de ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines i de derivats d'arilomicines, respectivament.

7 Conclusions

Les conclusions extretes dels diferents capítols d'aquesta tesi doctoral es detallen a continuació:

1. Lipopèptids antimicrobians derivats de **BP100**

Lipopèptids amb tots els aminoàcids de tipus L

- Els 36 lipopèptids antimicrobians derivats de **BP100** contenint L-aminoàcids es varen obtenir amb pureses elevades compreses entre un 92 i >99%.
- L'anàlisi de l'activitat antibacteriana va mostrar que els bacteris del gènere *Xanthomonas* varen ser els més sensibles a aquests compostos. A més, la llargada de la cadena de l'àcid gras i la seva posició influeixen en l'activitat antimicrobiana d'aquests lipopèptids derivats de **BP100** i aquesta influència depèn del patogen.
 - Pel que fa a la llargada del grup acil, els lipopèptids que incorporen un grup butanoïl o lauroïl varen ser els més actius enfront els tres bacteris del gènere *Xanthomonas*. En canvi, els bacteris del gènere *Pseudomonas* testats, i els fongs *P. expansum* i *F. oxysporum* varen ser més sensibles als lipopèptids amb un grup hexanoïl a la seva estructura. En el cas d'*E. amylovora* els lipopèptids més actius varen ser el que incorporen un grup hexanoïl o butanoïl.
 - En relació a la posició del grup acil, els millors lipopèptids enfront *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *X. fragariae* varen resultar ser els que contenen el grup acil a les posicions 2, 8 o 10, mentre que els més actius enfront *E. amylovora* i les espècies de *Pseudomonas* i varen ser els que contenen el grup acil a les posicions 11 i 8, respectivament. En canvi, no es va observar una relació clara entre la posició del grup acil i l'activitat antifúngica, tot i que sí que es va observar que, en general, els lipopèptids acilats a la posició 7 varen presentar una activitat menor.
- L'anàlisi de l'activitat hemolítica va mostrar que, en general, la incorporació d'una cadena hidrofòbica a **BP100** està relacionada amb un augment de la seva hemòlisi. Tanmateix, tant la llargada de la cadena de l'àcid gras com la seva posició influeixen en l'activitat hemolítica dels lipopèptids derivats de **BP100**.
 - Els lipopèptids que contenen un grup lauroïl a la seva seqüència varen resultar ser els més hemolítics, amb una hemòlisi del 100% a 250 µM. D'altra banda, la incorporació d'un grup butanoïl o hexanoïl va proporcionar en lipopèptids menys hemolítics que els anteriors, essent els que contenen un grup butanoïl els que varen presentar, en general, valors d'hemòlisi més baixos. Concretament, 6 seqüències varen mostrar una hemòlisi <50% a 250 µM
 - Pel que fa a la posició del fragment acil, es va observar que quan es substitueix un dels aminoàcids de la cara apolar (posició 3, 4, 7, 8, 10 o 11) per una Lys acilada amb butanoïl o hexanoïl, l'activitat hemolítica dels lipopèptids resultants és, en general, menor que la de **BP100**. D'altra banda, quan s'introdueix aquesta Lys a la cara polar (posició N-terminal, 1, 2, 5, 6 o 9) s'obtenen lipopèptids més hemolítics que **BP100**. En canvi, la totalitat dels lipopèptids derivats de **BP100** incorporant un grup lauroïl varen mostrar una elevada activitat hemolítica.

- En general, les seqüències que incorporen un grup butanoil o hexanoil varen ser les que varen presentar un millor perfil biològic, essent les seqüències més actives les que incorporen un grup butanoil. En canvi, els lipopèptids amb un grup lauroil varen ser menys actius i més hemolítics.
- A partir de l'avaluació de la capacitat elicitora de 9 dels 57 lipopèptids derivats de **BP100**, es va concloure que, en general, aquests lipopèptids no varen provocar la sobreexpressió de la majoria dels gens estudiats. Únicament 5 dels 11 gens analitzats varen ser sobreexpressats per 2 o 3 lipopèptids cadascun. Aquest resultat suggereix que la incorporació d'un grup acil en **BP100** no afecta la sobreexpressió de gens relacionats amb les defenses de plantes, ja que els lipopèptids presenten un efecte similar a **BP100**.
- Tot i que no es va observar una tendència clara entre l'estabilitat d'aquests lipopèptids enfront proteïnasa K i l'àcid gras incorporat a la seqüència, sí que es va apreciar una relació entre aquesta estabilitat i la posició de l'àcid gras. Així, els lipopèptids derivats de **BP100** més estables varen ser els que incorporen la lisina acilada a la posició 7 o 8, mentre que els menys estables la contenen a la posició 9.

Lipopèptids contenint D-aminoàcids o una histidina

- Els 21 lipopèptids antimicrobians derivats de **BP100** contenint un o dos D-aminoàcids o un residu d'His es varen obtenir amb pureses elevades >99%.
- L'anàlisi de l'activitat antimicrobiana i l'hemòlisi dels lipopèptids derivats de **BP100** que contenen un D-aminoàcid va mostrar que aquestes depenen de la llargada del grup acil.
 - Els lipopèptids amb una cadena de lauroil varen presentar una activitat igual o superior a la dels corresponents anàlegs amb tots els aminoàcids L enfront tots els patògens, excepte *F. oxysporum*. Tanmateix, aquesta incorporació no es va traduir en una disminució de l'hemòlisi. En aquest cas, probablement, el benefici d'incorporar un D-aminoàcid no és suficient per a contrarestar la hidrofobicitat del grup lauroil.
 - Pels lipopèptids amb un D-aminoàcid i un grup butanoil o hexanoil es va observar un augment o un manteniment de l'activitat antimicrobiana enfront les dues espècies de *Pseudomonas*, *X. arboricola* pv. *pruni* i els dos fongs. A més, aquesta incorporació va resultar en una disminució de l'activitat hemolítica.
- La incorporació de dos D-aminoàcids o d'una His va resultar, en general, en lipopèptids menys actius, però molt poc hemolítics.
- Concretament, el lipopèptid amb el millor perfil biològic va resultar ser **BP475** (D-F⁴-K¹⁰(COC₃H₇)), que va presentar una CMI entre 0,8 i 6,2 µM enfront els 8 fitopatògens testats i una activitat hemolítica nul·la a 250 µM. També en van destacar **BP387** (K⁸(COC₃H₇)), **BP474** (D-F⁴-K⁸(COC₃H₇)), **BP485** (C₃H₇CO-D-F⁴) i **BP495** (D-F⁴-K¹¹(COC₅H₁₁)) amb valors de CMI entre 0,8 i 12,5 µM enfront els 8 fitopatògens, i una hemòlisi entre 0,6 i 24% a 250 µM. A més, tots ells varen ser menys fitotòxics que la melitina, provocant una àrea necròtica entre 4 i 11 mm.

2. Lipopèptids conjugats derivats de **BP100**

- Els 12 lipopèptids resultants de la combinació de **BP387** amb un CPP (**BP16** i **BP100**) o amb un elicitor de defenses de plantes (**flg15**), de **BP474** amb l'AMP **BP143**, i de **BP475** amb els elicitors de defenses de plantes **flg15** i **Pip1** es varen obtenir amb unes pureses entre 96 i >99%.
- El tipus de pèptid incorporat influeix en l'activitat antimicrobiana i en la toxicitat del lipopèptid conjugat resultant. Així, els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP provinent de la quimioteca **CECMEL11** varen presentar una activitat antibacteriana baixa i una activitat hemolítica alta. En canvi, els lipopèptids conjugats que incorporen un pèptid elicitor de defenses de plantes varen mostrar una activitat antibacteriana moderada o elevada, sobretot enfront els bacteris del gènere *Xanthomonas*, i una toxicitat baixa o moderada.
- L'ordre de la conjugació influeix en l'activitat antimicrobiana i en l'hemòlisi dels lipopèptids conjugats derivats de **BP100**. Així, els lipopèptids conjugats que contenen el fragment lipopeptídic a l'extrem C-terminal varen ser lleugerament més actius que els que l'incorporen a l'extrem N-terminal. Aquesta diferència és més evident en el cas dels conjugats que contenen un pèptid elicitor de defenses, sobretot enfront els bacteris del gènere *Xanthomonas*. Tanmateix, els conjugats amb el lipopèptid a l'extrem C-terminal també varen ser més tòxics.
- La diferència d'activitat entre els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP i els que contenen un pèptid elicitor de defenses de plantes podria estar relacionada amb la seva càrrega neta positiva. Els lipopèptids conjugats que incorporen un CPP o un AMP presenten una càrrega neta positiva de +10 o +11 i varen ser, en general, menys actius i més hemolítics que els que contenen un pèptid elicitor de defenses de plantes, amb una càrrega neta positiva de +4 o +7.
- Els lipopèptids conjugats derivats de **BP100** que varen presentar el millor perfil biològic varen ser **Pip1-475** i **BP475-Pip1**, amb valors de CMI entre 0,8 i 6,2 μM enfront 5 dels 6 fitopatògens testats, una activitat hemolítica inferior a 26% a 250 μM i una fitotoxicitat menor que la melitina.

3. Pèptids conjugats de **BP100** amb pesticides convencionals

- Els pèptids conjugats **BP493**, **BP523** i **BP524**, que incorporen un derivat de quinoxifèn, un derivat de valifenalat i estreptomycina a l'extrem N-terminal de **BP100**, respectivament, es varen obtenir amb pureses entre 94 i >99%.
- El pèptid conjugat **BP524**, contenint **BP100** i estreptomycina, va ser el que va presentar el millor perfil biològic, amb una CMI <6,2 μM enfront els 6 bacteris testats i una hemòlisi del 57% a 50 μM , concentració que és 8 vegades superior a la seva CMI.

4. Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN

- Es varen identificar i assignar la majoria dels senyals esperats dels ciclolipodepsipèptids **BPC838**, **BPC840**, **BPC842**, **BPC844**, **BPC854** i **BPC856**, confirmant així que l'estratègia sintètica desenvolupada per la Dra. Rosés és útil per a la síntesi de ciclolipodepsipèptids derivats de fengicines.
- Es varen identificar i assignar la majoria dels senyals esperats del ciclolipopèptid biarílic **20**, confirmant així que l'estratègia sintètica desenvolupada per la Dra. Ng-Choi és útil per a la síntesi de derivats d'arilomicines.
- L'estudi estructural del lipopèptid **BP475** va revelar que es troba desestructurat en aigua. En canvi, en presència d'un 30% de trifluoroetanol, Aquest lipopèptid presenta una estructura d'hèlix α entre els aminoàcids Lys⁶ i Lys¹⁰.

8 Procediment experimental

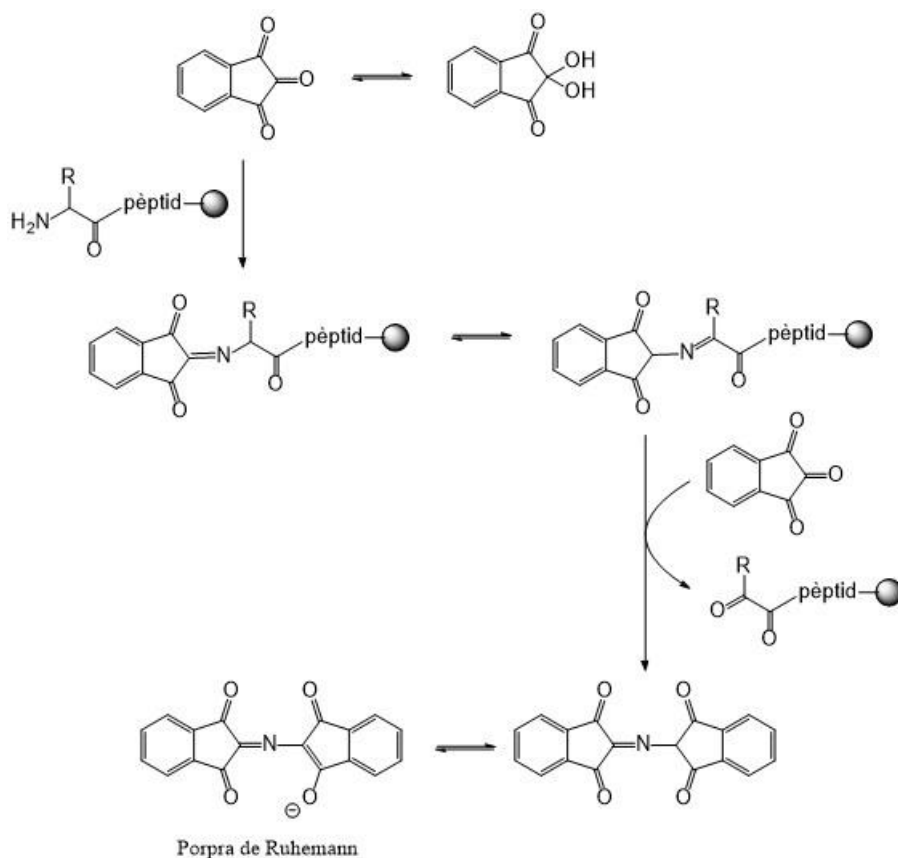
8.1 Material i mètodes

8.1.1 Reactius i dissolvents

Els dissolvents i els reactius generals es varen adquirir a Sigma-Aldrich, Panreac, Scharlab o ServiQuimia i es varen utilitzar sense purificar. Els aminoàcids utilitzats, els reactius d'acoblament i les resines es varen adquirir a Iris Biotech o Sigma-Aldrich.

8.1.2 Test de ninhidrina o de Kaiser

El test de ninhidrina o de Kaiser és un assaig colorimètric qualitatiu que permet detectar la presència d'amines primàries lliures unides a un suport sòlid. Aquest test es va utilitzar per comprovar si l'acoblament dels diferents aminoàcids s'havia 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 23).¹⁹⁹



Esquema 23. Test de ninhidrina.

Per realitzar l'assaig es necessiten els següents reactius:

- **Reactiu A:** dissolució de ninhidrina (2,5 g) en etanol absolut (50 mL).
- **Reactiu B:** dissolució de fenol (200 mg) en etanol absolut (50 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 i, 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 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).

8.1.3 Instrumentació general

8.1.3.1 Espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier (FT-IR)

Els espectres d'IR es varen enregistrar amb un espectrofotòmetre FT-IR d'Agilent Technologies *Cary 630* equipat amb un sistema ATR MK-II *Golden Gate Single Reflection* controlat pel programari *MicroLabPC*. Els resultats es varen analitzar amb el programari *ResolutionsPro 5.2.0*.

8.1.3.2 Espectroscòpia ultraviolat-visible (UV/VIS)

Els espectres d'UV/VIS es varen enregistrar amb un espectrofotòmetre *Cary 50 Scan* de Varian amb una cel·la de quars d'1 cm.

8.1.3.3 Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

Els experiments de RMN es varen realitzar a la Unitat d'Anàlisi Química i Estructural dels Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona (STR-UdG), a temperatura ambient amb un instrument *Ultrashield Avance III 400 (9.4T)* de Bruker (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz), equipat amb una sonda BBI i una unitat de control de temperatura (BCU Xtreme). Els resultats es varen analitzar amb el programari Bruker TopSpin 3.2. Els desplaçaments químics (δ) s'expressen en parts per milió (ppm) i les constants d'acoblament (*J*) en hertzs (Hz). En la descripció dels senyals d'RMN es fa ús de les abreviatures següents: s (singlet), d (doblet), td (triple doblat), m (multiplet) i ba (banda ampla).

8.1.3.4 Espectrometria de masses amb ionització per electrospai (ESI-MS)

Els experiments d'ESI-MS es varen realitzar a la Unitat d'Espectrometria de Masses dels STR-UdG, amb un espectròmetre de masses *Esquire 6000* de Bruker *Daltonics* de precisió ± 0.2 *m/z*, integrat per una font d'ionització d'electrospai, un analitzador de trampa d'ions i un detector multiplicador d'electrons. Es va treballar en mode d'ionització negatiu o positiu, en un rang de 50 a 2000 *m/z*. Les mostres es varen dissoldre en CH₃CN/H₂O (80:20) i es varen introduir a l'instrument mitjançant un injector i una bomba d'HPLC 1200 Series d'*Agilent Technologies*, a un flux de 0,1 mL/min. El voltatge a la sortida del capil·lar va ser d'entre 110 i 130 V, el voltatge al con *skimmer* va ser de 40 V i el gas de nebulització i assecatge va ser nitrogen. Els resultats es varen analitzar amb el programari Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

8.1.3.5 Espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS)

Els experiments d'HRMS es varen realitzar als STR-UdG en les mateixes condicions que els d'ESI-MS utilitzant un instrument *Bruker micrOTOF-Q IITM* integrat per un analitzador híbrid quadrupol-temps de vol. Les mostres es varen introduir a l'espectròmetre de masses per infusió directa i es varen calibrar externament utilitzant format de sodi. Es va treballar en mode d'ionització positiu ESI(+).

8.1.3.6 Cromatografia en capa fina (TLC)

L'anàlisi per TLC es va portar a terme sobre cromatofolis de gel de sílice 60 F₂₅₄ de *Merck*, de 20 x 20 cm i 0,2 mm de gruix. La detecció es va realitzar per UV a $\lambda = 254$ nm, o utilitzant dissolució aquosa de permanganat potàssic a l'1,5%.

8.1.3.7 Cromatografia en columna

La cromatografia *flash* en columna en fase normal es va realitzar utilitzant gel de sílice de tipus 60 de *Merck* (diàmetre de partícules 0,040-0,063 mm) com a fase estacionària.

La cromatografia *flash* en fase reversa es va dur a terme en un aparell CombiFlash®R_f 200. La detecció es va realitzar a 220 i 254 nm. La fase mòbil utilitzada va ser H₂O amb 0,1% TFA (dissolvent A) i CH₃CN amb 0,1% TFA (dissolvent B). Les mostres es varen purificar utilitzant com a fase estacionària una columna C₁₈ RediSep®R_f Gold (20-40 µm, 100 Å) de 5,5 g i un flux de 18 mL/min o una columna C₁₈ RediSep®R_f Gold (20-40 µm, 100 Å) de 50 g i un flux de 40 mL/min.

8.1.3.8 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

L'anàlisi per HPLC es va dur a terme en un equip *Dionex* que incorpora un injector automàtic ASI-100, una bomba binària *P680* i un detector espectrofotomètric UV/VIS *UVD170U* de longitud d'ona variable. Els resultats es varen analitzar amb el programari *Chromeleon 6.60*. Mètode A: L'anàlisi es va fer en fase reversa amb una columna *TracerExcel 120 ODS-A C₁₈* (3 µm, 4,6 mm x 40 mm), una fase mòbil constituïda per H₂O amb 0,1% TFA (dissolvent A) i CH₃CN amb 0,1% TFA (dissolvent B), i un flux d'1 mL/min. Per a l'elució dels analits, es va aplicar un gradient lineal de 2 a 100% de B en 7 min.

L'anàlisi per HPLC també es va realitzar en un equip *1260 Infinity II* d'Agilent Technologies integrat per un detector *Diode Array HS*, una bomba quaternària *Pump VL* i un mostrejador *1260 Vial*, controlat a través del programari *OpenLab CDS ChemStation*. Mètode B: L'anàlisi es va fer en fase reversa, amb una columna *Kromasil 100 C₁₈* (3 µm, 4,6 mm x 40 mm), una fase mòbil constituïda per H₂O amb 0,1% TFA (dissolvent A) i CH₃CN amb 0,1% TFA (dissolvent B), i un flux d'1 mL/min. Per a l'elució dels analits, es va aplicar un gradient lineal de 2 a 100% de B en 12 min.

8.1.3.9 Escalfament per irradiació microones (MW)

Es va utilitzar un aparell de microones *Discover S-Class* de CEM Corporation amb una potència de 0-300 W. El temps, la temperatura i la potència màxima de l'experiment es controlen amb el programari *Synergy*. Aquest aparell de microones incorpora un sistema de control de temperatura amb un sensor d'infraroig per a mesurar la temperatura en el fons del recipient.

8.2 Síntesi de lipopèptids derivats de BP100

Els lipopèptids derivats de **BP100** es varen sintetitzar manualment mitjançant una metodologia de síntesi en fase sòlida utilitzant una estratègia Fmoc/^tBu. Com a suport sòlid es va utilitzar la resina Fmoc-Rink-MBHA (0,56 mmol/g) i com a aminoàcids es varen emprar Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-D-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH.

L'elongació del pèptid es va realitzar mitjançant etapes seqüencials d'eliminació del grup de Fmoc i d'acoblament de l'aminoàcid. El grup Fmoc es va eliminar per tractament amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 10 min). L'acoblament dels Fmoc-aminoàcids (4 eq) es va dur a terme amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF a temperatura ambient sota agitació durant 3 h. Després de cada etapa d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). La compleció de l'acoblament es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ A partir del sisè aminoàcid, es va canviar la DMF per NMP. Un cop finalitzada l'elongació del pèptid, la peptidil resina resultant es va tractar amb piperidina/NMP (3:7, 2 + 10 min), es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min).

Pels lipopèptids **BP367**, **BP379** i **BP391**, amb l'extrem N-terminal acilat, la peptidil resina obtinguda es va tractar amb l'àcid gras corresponent (3 eq), DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en NMP a temperatura ambient sota agitació durant tota la nit. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min), es va comprovar la compleció de la reacció mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹ i es va assecar la resina al buit.

En el cas dels lipopèptids que incorporen una lisina amb el grup N^ε-amino acilat, la peptidil resina sintetitzada es va acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1:1:1, 2 × 30 min), es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min), i la compleció de la reacció es va comprovar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ La peptidil resina resultant es va tractar amb NH₂NH₂·H₂O/NMP (2:98, 10 × 20 min) sota agitació i es va rentar amb NMP (2 × 1 min), CH₂Cl₂ (2 × 1 min), MeOH (2 × 1 min) i NMP (2 × 1 min). A continuació, la resina es va tractar amb l'àcid gras corresponent (3 eq), DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en NMP a temperatura ambient sota agitació durant tota la nit. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min), es va comprovar la compleció de la reacció mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹ i es va assecar la resina al buit.

Finalment, les peptidil resines resultants es varen tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h. Seguidament, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El cru es va purificar mitjançant cromatografia en fase reversa, i el lipopèptid es va analitzar per HPLC i es va caracteritzar per espectrometria de masses.

8.2.1 C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP367)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP367**) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,77 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1520,1 [M + H]⁺, 760,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₇O₁₃ [M + 2H]²⁺ 760,0285, trobada

760,0270; calculada per $C_{78}H_{138}N_{17}O_{13}$ $[M + 3H]^{3+}$ 507,0215, trobada 507,0201; calculada per $C_{78}H_{139}N_{17}O_{13}$ $[M + 4H]^{4+}$ 380,5179, trobada 380,5165.

8.2.2 Ac-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP368)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP368) amb una puresa >99%. $t_R = 7,91$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1562,1 $[M + H]^+$, 781,6 $[M + 2H]^{2+}$, 521,3 $[M + 3H]^{3+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{80}H_{139}N_{17}O_{14}$ $[M + 2H]^{2+}$ 781,0338, trobada 781,0319; calculada per $C_{80}H_{140}N_{17}O_{14}$ $[M + 3H]^{3+}$ 521,0250, trobada 521,0252.

8.2.3 Ac-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP369)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP369) amb una puresa del 92%. $t_R = 7,53$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1562,1 $[M + H]^+$, 781,1 $[M + 2H]^{2+}$, 521,4 $[M + 3H]^{3+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{80}H_{139}N_{17}O_{14}$ $[M + 2H]^{2+}$ 781,0338, trobada 781,0316; calculada per $C_{80}H_{140}N_{17}O_{14}$ $[M + 3H]^{3+}$ 521,0250, trobada 521,0263; calculada per $C_{80}H_{141}N_{17}O_{14}$ $[M + 4H]^{4+}$ 391,0205, trobada 391,0192.

8.2.4 Ac-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP370)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP370) amb una puresa >99%. $t_R = 7,06$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1576,1 $[M + H]^+$, 789,1 $[M + 2H]^{2+}$, 526,1 $[M + 3H]^{3+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{80}H_{140}N_{18}O_{14}$ $[M + 2H]^{2+}$ 788,5393, trobada 788,5380; calculada per $C_{80}H_{141}N_{18}O_{14}$ $[M + 3H]^{3+}$ 526,0286, trobada 526,0275; calculada per $C_{80}H_{142}N_{18}O_{14}$ $[M + 4H]^{4+}$ 394,7733, trobada 394,7725.

8.2.5 Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP371)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP371) amb una puresa >99%. $t_R = 7,11$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1542,2 $[M + H]^+$, 771,6 $[M + 2H]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{77}H_{142}N_{18}O_{14}$ $[M + 2H]^{2+}$ 771,5471, trobada 771,5471; calculada per $C_{77}H_{143}N_{18}O_{14}$ $[M + 3H]^{3+}$ 514,7005, trobada 514,7003; calculada per $C_{77}H_{144}N_{18}O_{14}$ $[M + 4H]^{4+}$ 386,2772, trobada 386,2768.

8.2.6 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP372)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP372) amb una puresa >99%. $t_R = 7,64$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1562,1 [M + H]⁺, 781,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₃₉N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 781,0338, trobada 781,0336; calculada per C₈₀H₁₄₀N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 521,0250, trobada 521,0247; calculada per C₈₀H₁₄₁N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 391,0205, trobada 391,0199.

8.2.7 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP373)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP373) amb una puresa >99%. $t_R = 7,94$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1561,1 [M + H]⁺, 781,6 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₃₉N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 781,0338, trobada 781,0330; calculada per C₈₀H₁₄₀N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 521,0250, trobada 521,0244.

8.2.8 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP374)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP374) amb una puresa >99%. $t_R = 6,91$ min. MS (ESI) m/z : 1598,1 [M + Na]⁺, 1576,1 [M + H]⁺, 789,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₄₀N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 788,5393, trobada 788,5393; calculada per C₈₀H₁₄₁N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 526,0286, trobada 526,0284; calculada per C₈₀H₁₄₂N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 394,7733, trobada 394,7733.

8.2.9 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP375)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP375) amb una puresa >99%. $t_R = 7,17$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1598,1 [M + Na]⁺, 1576,1 [M + H]⁺, 789,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₄₀N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 788,5393, trobada 788,5383; calculada per C₈₀H₁₄₁N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 526,0286, trobada 526,0276; calculada per C₈₀H₁₄₂N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 394,7733, trobada 394,7729.

8.2.10 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Tyr-Leu-NH₂ (BP376)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Tyr-Leu-NH₂ (BP376) amb una puresa >99%. $t_R = 7,48$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1583,1 [M +

Na^+ , 1561,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 781,6 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{80}\text{H}_{139}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 781,0338, trobada 781,0311; calculada per $\text{C}_{80}\text{H}_{140}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 521,0250, trobada 521,0233.

8.2.11 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-NH₂ (BP377)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-NH₂ (BP377) amb una puresa >99%. $t_R = 7,58$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1526,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 763,6 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{77}\text{H}_{142}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 763,5496, trobada 763,5486; calculada per $\text{C}_{77}\text{H}_{143}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 509,3689, trobada 509,3700; calculada per $\text{C}_{77}\text{H}_{144}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 382,2785, trobada 382,2791.

8.2.12 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (BP378)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (BP378) amb una puresa >99%. $t_R = 6,96$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1576,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 788,6 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{80}\text{H}_{140}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 788,5393, trobada 788,5396; calculada per $\text{C}_{80}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 526,0286, trobada 526,0308; calculada per $\text{C}_{80}\text{H}_{142}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 394,7733, trobada 394,7742.

8.2.13 C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP379)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (75:25) va proporcionar C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP379) amb una puresa >99%. $t_R = 7,52$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1513,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1491,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 746,0 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{76}\text{H}_{133}\text{N}_{17}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 746,0129, trobada 746,0102; calculada per $\text{C}_{76}\text{H}_{134}\text{N}_{17}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 497,6777, trobada 497,6770; calculada per $\text{C}_{76}\text{H}_{135}\text{N}_{17}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 373,5101, trobada 373,5104.

8.2.14 Ac-Lys(COC₃H₇)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP380)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (70:30) va proporcionar Ac-Lys(COC₃H₇)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP380) amb una puresa >99%. $t_R = 7,79$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1555,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1533,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HRMS (ESI) m/z : calculada per for $\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 767,0182, trobada 767,0158; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{136}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 511,6812, trobada 511,6805; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{137}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 384,0127, trobada 384,0117.

8.2.15 Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP381)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP381**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,96$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1555,3 [M + Na]⁺, 1533,1 [M + H]⁺, 767,5 [M + 2H]²⁺, 511,9 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₅N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 767,0182, trobada 767,0160; calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 511,6812, trobada 511,6803; calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 384,0127, trobada 384,0119.

8.2.16 Ac-Lys-Lys-Lys(COC₃H₇)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP382)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Lys(COC₃H₇)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP382**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,91$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1548,2 [M + H]⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 774,5236, trobada 774,5220; calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 516,6848, trobada 516,6845; calculada per C₇₈H₁₃₈N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 387,7654, trobada 387,7648.

8.2.17 Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₃H₇)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP383)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₃H₇)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP383**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,41$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1536,1 [M + Na]⁺, 1514,2 [M + H]⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₅H₁₃₇N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1514,0556, trobada 1514,0535; calculada per C₇₅H₁₃₈N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 757,5314, trobada 757,5312.

8.2.18 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP384)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP384**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,91$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1555,2 [M + Na]⁺, 1533,2 [M + H]⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₅N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 767,0182, trobada 767,0158; calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 511,6812, trobada 511,6821; calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 384,0127, trobada 384,0114.

8.2.19 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP385)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP385**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,02$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1555,1 [M +

Na^+ , 1533,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 767,0182, trobada 767,0189; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{136}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 511,6812, trobada 511,6818; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{137}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 384,0127, trobada 384,0140.

8.2.20 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP386)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (85:15) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP386) amb una puresa >99%. $t_R = 6,25$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1570,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1548,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{136}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 774,5236, trobada 774,5234; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 516,6848, trobada 516,6867; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{138}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 387,7654, trobada 387,7666.

8.2.21 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP387)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP387) amb una puresa >99%. $t_R = 6,49$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1548,0 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 774,5 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 516,6848, trobada 516,6839; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{138}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 387,7654, trobada 387,7648.

8.2.22 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP388)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP388) amb una puresa >99%. $t_R = 6,80$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1555.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1533,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 767,1 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{134}\text{N}_{17}\text{O}_{14}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ 778,0091, trobada 778,0070; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 767,0182, trobada 767,0160; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{17}\text{O}_{14}\text{Na}$ $[\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}]^{3+}$ 519,0085, trobada 519,0070; calculada per $\text{C}_{78}\text{H}_{136}\text{N}_{17}\text{O}_{14}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 511,6812, trobada 511,6805.

8.2.23 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP389)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP389) amb una puresa >99%. $t_R = 6,73$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1498,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $\text{C}_{75}\text{H}_{138}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 749,5340, trobada 749,5328; calculada per $\text{C}_{75}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 500,0251, trobada 500,0268; calculada per $\text{C}_{75}\text{H}_{140}\text{N}_{18}\text{O}_{13}$ $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 375,2706, trobada 375,2692.

8.2.24 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (BP390)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (BP390) amb una puresa >99%. $t_R = 6,27$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1570,1 [M + Na]⁺, 1548,2 [M + H]⁺, 774,6 [M + 2H]²⁺, 516,7 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 774,5236, trobada 774,5216; calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 516,6848, trobada 516,6843; calculada per C₇₈H₁₃₈N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 387,7654, trobada 387,7665.

8.2.25 C₁₁H₂₃CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP391)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar C₁₁H₂₃CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP391) amb una puresa >99%. $t_R = 8,06$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1604,2 [M + H]⁺, 802,6 [M + 2H]²⁺, 535,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₄H₁₄₉N₁₇O₁₃ [M + 2H]²⁺ 802,0755, trobada 802,0738; calculada per C₈₄H₁₅₀N₁₇O₁₃ [M + 3H]³⁺ 535,0528, trobada 535,0527; calculada per C₈₄H₁₅₁N₁₇O₁₃ [M + 4H]⁴⁺ 401,5414, trobada 401,5427.

8.2.26 Ac-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP392)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP392) amb una puresa >99%. $t_R = 8,25$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1645,2 [M + H]⁺, 823,1 [M + 2H]²⁺, 549,1 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 823,0808, trobada 823,0808; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 549,0563, trobada 549,0558; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 412,0440, trobada 412,0437.

8.2.27 Ac-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP393)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP393) amb una puresa >99%. $t_R = 7,68$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1667,1 [M + Na]⁺, 1645,3 [M + H]⁺, 823,5 [M + 2H]²⁺, 549,3 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 823,0808, trobada 823,0789; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 549,0563, trobada 549,0548.

8.2.28 Ac-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP394)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-

Tyr-Leu-NH₂ (**BP394**) amb una puresa del 97%. $t_R = 7,32$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1683,3 [M + Na]⁺, 1661,3 [M + H]⁺, 831,1 [M + 2H]²⁺, 554,1 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 830,5862, trobada 830,5847; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 554,0599, trobada 554,0601; calculada per C₈₆H₁₅₄N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 415,7967, trobada 415,7987.

8.2.29 Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP395)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP395**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,39$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1626,3 [M + H]⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₃H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1626,1808, trobada 1626,1755; calculada per C₈₃H₁₅₄N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 813,5940, trobada 813,5911.

8.2.30 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP396)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP396**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,76$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1645,3 [M + H]⁺, 823,1 [M + 2H]²⁺, 549,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 823,0808, trobada 823,0791; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 549,0563, trobada 549,0570; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 412,0440, trobada 412,0432.

8.2.31 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP397)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP397**) amb una puresa del 97%. $t_R = 8,10$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1645,3 [M + H]⁺, 823,1 [M + 2H]²⁺, 549,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 823,0808, trobada 823,0806; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 549,0563, trobada 549,0586; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 412,0440, trobada 412,0444.

8.2.32 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP398)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP398**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,26$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1682,3 [M + Na]⁺, 1660,3 [M + H]⁺, 830,6 [M + 2H]²⁺, 554,1 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 830,5862, trobada 830,5852; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 554,0599, trobada 554,0602; calculada per C₈₆H₁₅₄N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 415,7967, trobada 415,7972.

8.2.33 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP399)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP399) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,38 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1682,3 [M + Na]⁺, 1660,3 [M + H]⁺, 831,1 [M + 2H]²⁺, 554,1 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 830,5862, trobada 830,5847; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 554,0599, trobada 554,0593; calculada per C₈₆H₁₅₄N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 415,7967, trobada 415,7968.

8.2.34 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (BP400)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (BP400) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,60 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1667,3 [M + Na]⁺, 1645,3 [M + H]⁺, 823,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 823,0808, trobada 823,0796; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₇O₁₄ [M + 3H]³⁺ 549,0563, trobada 549,0565; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₇O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 412,0440, trobada 412,0434.

8.2.35 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-NH₂ (BP401)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-NH₂ (BP401) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,77 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1632,3 [M + Na]⁺, 1610,3 [M + H]⁺, 806,1 [M + 2H]²⁺, 537,5 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₃H₁₅₄N₁₈O₁₃ [M + 2H]²⁺ 805,5966, trobada 805,5955; calculada per C₈₃H₁₅₅N₁₈O₁₃ [M + 3H]³⁺ 537,4002, trobada 537,3999; calculada per C₈₃H₁₅₆N₁₈O₁₃ [M + 4H]⁴⁺ 403,3019, trobada 403,3019.

8.2.36 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₁₁H₂₃)-NH₂ (BP402)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₁₁H₂₃)-NH₂ (BP402) amb una puresa 99%. *t_R* = 7,29 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1661,3 [M + H]⁺, 831,1 [M + 2H]²⁺, 554,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 830,5862, trobada 830,5866; calculada per C₈₆H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + 3H]³⁺ 554,0599, trobada 554,0601; calculada per C₈₆H₁₅₄N₁₈O₁₄ [M + 4H]⁴⁺ 415,7967, trobada 415,7969.

8.2.37 C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP472)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-

Leu-NH₂ (**BP472**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,14$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1519,1 [M + H]⁺, 760,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₇O₁₃ [M + H]⁺ 1519,0498, trobada 1519,0511; calculada per C₇₈H₁₃₇N₁₇O₁₃ [M + 2H]²⁺ 760,0285, trobada 760,0260.

8.2.38 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP473)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP473**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,99$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1555,1 [M + Na]⁺, 1533,1 [M + H]⁺, 767,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1533,0291, trobada 1533,0240; calculada per C₇₈H₁₃₅N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 767,0182, trobada 767,0158.

8.2.39 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP474)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (85:15) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP474**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,36$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1570,1 [M + Na]⁺, 1548,1 [M + H]⁺, 774,6 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₅N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1548,0400, trobada 1548,0381; calculada per C₇₈H₁₃₆N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 774,5236, trobada 774,5208.

8.2.40 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP475)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (**BP475**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,69$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1520,1 [M + Na]⁺, 1498,2 [M + H]⁺, 750,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₅H₁₃₆N₁₈O₁₃Na [M + Na]⁺ 1520,0426, trobada 1520,0424; calculada per C₇₅H₁₃₇N₁₈O₁₃ [M + H]⁺ 1498,0607, trobada 1498,0610; calculada per C₇₅H₁₃₈N₁₈O₁₃ [M + 2H]²⁺ 749,5340, trobada 749,5343.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)) δ (ppm): 0,75-0,90 (m, 24 H, CH_3 -butanoïl, δ - CH_3 -Ile, 6 \times δ - CH_3 -Leu), 0,99-1,16 (m, 5 H, γ - CH_3 -Ile, δ - CH_2 -Lys), 1,25-1,82 (m, 48 H, β - CH_2 -butanoïl, β - CH_2 -Ile, γ - CH_2 -Ile, 3 \times β - CH_2 -Leu, 3 \times γ -CH-Leu, 6 \times β - CH_2 -Lys, 6 \times γ - CH_2 -Lys, 5 \times δ - CH_2 -Lys), 1,98 (s, 3 H, CH_3CO), 2,15 (t, $J = 7,48$ Hz, 2 H, β - CH_2 -butanoïl), 2,85-3,00 (m, 11 H, 5 \times ϵ - CH_2 -Lys, β - CH_2 -Phe), 3,06-3,16 (m, 3 H, ϵ - CH_2 -Lys 10 , β - CH_2 -Phe), 4,06-4,13 (m, 2 H, α -CH-Ile, α -CH-Lys), 4,15-4,34 (m, 5 H, 4 \times α -CH-Lys, α -CH-Lys 10 , 3 \times α -CH-Leu), 4,54-4,57 (m, α -CH-Phe), 7,11 (s, 1 H, CONH_2), 7,21 (d, $J = 7,16$ Hz, 2 H, 2 \times *o*-CH-Phe_{arom}), 7,26-7,36 (m, 3 H, 2 \times *m*-CH-Phe_{arom}, *p*-CH-Phe_{arom}), 7,59 (s, 1 H, CONH_2), 8,04 (t, $J = 5,82$ Hz, 1 H, ζ -NH-Lys 10), 8,21-8,29 (m, 3 H, α -NH-Ile, α -NH-Leu, α -NH-Lys), 8,32-8,46 (m, 6 H, α -NH-Lys 10 , 4 \times α -NH-Lys, α -NH-Phe, 2 \times α -NH-Leu).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 30% $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$ en tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)) δ (ppm): 0,82-0,94 (m, 24 H, CH_3 -butanoïl, 2 \times δ - CH_3 -Leu 3 , 2 \times δ - CH_3 -Leu 8 , 2 \times δ - CH_3 -Leu 11 , δ - CH_3 -Ile), 1,08-1,31 (m, 3 H, γ - CH_3 -Ile), 1,33-1,85 (m, 24 H, β - CH_2 -butanoïl, β - CH_2 -Lys 6 , β - CH_2 -Leu 8 , β - CH_2 -Leu 11 , δ - CH_2 -Lys 1 , δ - CH_2 -Lys 2 , δ - CH_2 -Lys 6 , δ - CH_2 -Lys 10 , γ - CH_2 -Lys 1 , γ - CH_2 -Lys 2 , γ - CH_2 -Lys 6 , γ - CH_2 -Ile), 1,95 (s, 7 H, β - CH_2 -Lys 2 , β - CH_2 -Lys 10 , CH_3CO), 2,14 (t, $J = 7,66$ Hz, 2 H, α - CH_2 -butanoïl), 2,90-2,99 (m, 7 H, ϵ - CH_2 -Lys 1 , ϵ - CH_2 -Lys 2 , ϵ - CH_2 -Lys 6 , β - CH_2 -Phe), 3,15 (m, 3 H, ϵ - CH_2 -Lys 10 , β - CH_2 -Phe), 3,77 (b.a., 1 H, α -CH-Ile), 3,85-4,19 (m, 8 H, α -CH-Lys 1 , α -CH-Lys 2 , α -CH-Lys 6 , α -CH-Lys 10 , α -CH-Leu 3 , α -CH-Leu 8 , α -CH-Leu 11 , α -CH-Phe), 6,94 (s, 1 H, CONH_2), 7,08 (d, $J = 6,36$ Hz, 2 H, 2 \times *o*-CH-Phe_{arom}), 7,27-7,18 (m, 4 H, *p*-CH-Phe_{arom}, 2 \times *m*-CH-Phe_{arom}, CONH_2), 7,46-7,43 (m, 1 H, ζ -NH-Lys 10), 7,64 (b.a., 1 H, α -NH-Leu 3), 7,76 (b.a., 1 H, α -NH-Lys 10), 7,81 (b.a., 1 H, α -NH-Lys 6), 7,92 (b.a., 1 H, α -NH-Lys 9), 8,03-8,11 (m, 2 H, α -NH-Lys 5 , α -NH-Ile, α -NH-Leu 11), 8,15-8,19 (m, 2 H, α -NH-Phe, α -NH-Leu 8), 8,22 (b.a., 1 H, α -NH-Lys 1), 8,30 (b.a., 1 H, α -NH-Lys 2).

8.2.41 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC $_{11}$ H $_{23}$)-NH $_2$ (BP476)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC $_{11}$ H $_{23}$)-NH $_2$ (BP476) amb una puresa >99%. $t_R = 6,67$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1682,2 [M + Na] $^+$, 1660,3 [M + H] $^+$, 830,6 [M + 2H] $^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per C $_{86}$ H $_{151}$ N $_{18}$ O $_{14}$ [M + H] $^+$ 1660,1652, trobada 1660,1578; calculada per C $_{86}$ H $_{152}$ N $_{18}$ O $_{14}$ [M + 2H] $^{2+}$ 830,5862, trobada 830,5839.

8.2.42 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC $_5$ H $_{11}$)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH $_2$ (BP484)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC $_5$ H $_{11}$)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH $_2$ (BP484) amb una puresa >99%. $t_R = 6,45$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1542,0 [M + H] $^+$, 771,5 [M + 2H] $^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per C $_{77}$ H $_{141}$ N $_{18}$ O $_{14}$ [M + H] $^+$ 1542,0869, trobada 1542,0812; calculada per C $_{77}$ H $_{142}$ N $_{18}$ O $_{14}$ [M + 2H] $^{2+}$ 771,5471, trobada 771,5477.

8.2.43 C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP485)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP485) amb una puresa >99%. *t_R* = 6,79 min (Mètode A). MS (ESI) *m/z*: 1513,1 [M + Na]⁺, 1491,0 [M + H]⁺, 746,4 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₇₆H₁₃₂N₁₇O₁₃ [M + H]⁺ 1491,0185, trobada 1491,0154; C₇₆H₁₃₃N₁₇O₁₃ [M + 2H]²⁺ 746,0129, trobada 746,0097.

8.2.44 Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP486)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP486) amb una puresa >99%. *t_R* = 6,17 min (Mètode B). MS (ESI) *m/z*: 1533,1 [M + H]⁺, 767,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₇₈H₁₃₃N₁₇O₁₄Na [M + Na]⁺ 1555,0110, trobada 1555,0071; calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1533,0291, trobada 1533,0266.

8.2.45 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP488)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP488) amb una puresa >99%. *t_R* = 6,80 min (Mètode B). MS (ESI) *m/z*: 1626,2 [M + H]⁺, 814,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₃H₁₅₂N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1648,1628, trobada 1648,1600; calculada per C₈₃H₁₅₃N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1626,1808, trobada 1626,1787.

8.2.46 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP489)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP489) amb una puresa >99%. *t_R* = 6,76 min (Mètode B). MS (ESI) *m/z*: 1660,2 [M + H]⁺, 831,1 [M + 2H]²⁺, 554,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1660,1652, trobada 1660,1598; calculada per C₈₆H₁₅₂N₁₈O₁₄ [M + 2H]²⁺ 830,5862, trobada 830,5825.

8.2.47 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP490)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-

Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP490**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,12$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1660,2 [M + H]⁺, 831,1 [M + 2H]²⁺, 554,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₀N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1682,1471, trobada 1682,1449; calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1660,1652, trobada 1660,1635.

8.2.48 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP494)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP494**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,42$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1576,1 [M + H]⁺, 788,6 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₃₈N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1598,0532, trobada 1598,0490; calculada per C₈₀H₁₃₉N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1576,0713, trobada 1576,0683.

8.2.49 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (BP495)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid hexanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (**BP495**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,44$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1576,1 [M + H]⁺, 789,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₀H₁₃₈N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1598,0532, trobada 1598,0499; calculada per C₈₀H₁₃₉N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1576,0713, trobada 1576,0683.

8.2.50 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (BP496)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (**BP496**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,11$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1570,1 [M + Na]⁺, 1548,2 [M + H]⁺, 775,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1570,0219, trobada 1570,0179; calculada per C₈₆H₁₃₅N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1548,0400, trobada 1548,0367.

8.2.51 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (BP497)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (**BP497**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,21$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1645,1 [M + H]⁺, 823,1 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₄₉N₁₇O₁₄Na [M + Na]⁺ 1667,1362, trobada 1667,1311; calculada per C₈₆H₁₅₀N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1645,1543, trobada 1645,1516.

8.2.52 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP498)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP498) amb una puresa >99%. $t_R = 6,12$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1533,1 [M + H]⁺, 767,0 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₃N₁₇O₁₄Na [M + Na]⁺ 1555,0110, trobada 1555,0032; calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1533,0291, trobada 1533,0225; calculada per C₇₈H₁₃₅N₁₇O₁₄ [M + 2H]²⁺ 767,0182, trobada 767,0147.

8.2.53 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP499)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP499) amb una puresa >99%. $t_R = 5,89$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1555,1 [M + Na]⁺, 1533,4 [M + H]⁺, 766,8 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₃N₁₇O₁₄Na [M + Na]⁺ 1555,0110, trobada 1555,0097; calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1533,0291, trobada 1533,0269.

8.2.54 Ac-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP500)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP500) amb una puresa >99%. $t_R = 6,80$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 830,7 [M + 2H]²⁺, 554,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₈₆H₁₅₀N₁₈O₁₄Na [M + Na]⁺ 1683,1503, trobada 1683,1487; calculada per C₈₆H₁₅₁N₁₈O₁₄ [M + H]⁺ 1661,1684, trobada 1661,1667.

8.2.55 Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP501)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP501) amb una puresa >99%. $t_R = 4,63$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1489,1 [M + H]⁺, 744,6 [M + 2H]²⁺, 496,7 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₂H₁₃₄N₂₀O₁₃Na [M + Na]⁺ 1510,0331, trobada 1510,0324; calculada per C₇₂H₁₃₅N₂₀O₁₃ [M + H]⁺ 1488,0512, trobada 1488,0511.

8.2.56 Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP502)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-

Tyr-Leu-NH₂ (**BP502**) amb una puresa >99%. $t_R = 4,92$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1545,1 [M + Na]⁺, 762,1 [M + 2H]²⁺, 508,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₅H₁₃₁N₁₉O₁₄Na [M + Na]⁺ 1545,0015, trobada 1544,9999; calculada per C₇₅H₁₃₂N₁₉O₁₄ [M + H]⁺ 1523,0196, trobada 1523,0191.

8.2.57 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-D-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP503)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.2 utilitzant àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-D-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP503**) amb una puresa >99%. $t_R = 5,87$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1555,1 [M + Na]⁺, 767,1 [M + 2H]²⁺, 511,8 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₇₈H₁₃₃N₁₇O₁₄Na [M + Na]⁺ 1555,0110, trobada 1555,0151; calculada per C₇₈H₁₃₄N₁₇O₁₄ [M + H]⁺ 1533,0291, trobada 1533,0319.

8.3 Síntesi de lipopèptids conjugats derivats de BP100

Els lipopèptids conjugats derivats de **BP100** es varen sintetitzar manualment mitjançant una metodologia de síntesi en fase sòlida utilitzant una estratègia Fmoc/^tBu. Com a suport sòlid es va utilitzar la resina ChemMatrix aminometilada (0,69 mmol/g). Com a aminoàcids es varen emprar Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-D-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Thr(^tBu)-OH, i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH.

En primer lloc, a la resina ChemMatrix aminometilada se li va acoblar el *linker* corresponent. Pels lipopèptids amb un grup amida a l'extrem C-terminal, es va incorporar el *linker* Fmoc-Rink-amida (4 eq) amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF, sota agitació durant tota la nit. A continuació, es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min), i es va monitoritzar la reacció mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ Pels lipopèptids conjugats amb un grup àcid carboxílic a l'extrem C-terminal, es va incorporar el *linker* PAC (4 eq) emprant el mateix procediment. Seguidament, la peptidil resina es va tractar amb l'Fmoc-aminoàcid de l'extrem C-terminal (5 eq) utilitzant DIC (5 eq), DMAP (0,5 eq) i DIEA (1 eq) en DMF durant 2 h sota agitació. Aquest tractament es va repetir una segona vegada. L'eficiència de la reacció es va comprovar mitjançant el test Fmoc i, a continuació, la peptidil resina es va acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1,35:1,35:18, 2 × 30 min) i es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min).

L'elongació del pèptid es va realitzar mitjançant etapes seqüencials d'eliminació del grup de Fmoc i d'acoblament de l'aminoàcid corresponent. El grup Fmoc es va eliminar per tractament amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 10 min). L'acoblament dels Fmoc-aminoàcids (4 eq) es va dur a terme amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF a temperatura ambient sota agitació durant 3 h. Després de cada etapa d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). La compleció de l'acoblament es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹

A partir del sisè aminoàcid, es va canviar la DMF per NMP. Un cop finalitzada l'elongació del pèptid, la peptidil resina resultant es va tractar amb piperidina/NMP (3:7, 2 + 10 min), es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min).

Seguidament, la resina es va acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (1:1:1, 2 × 30 min), es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min) i la compleció de la reacció es va comprovar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ A continuació, la peptidil resina resultant es va tractar amb NH₂NH₂·H₂O/NMP (2:98, 10 × 20 min) sota agitació i es va rentar amb NMP (2 × 1 min), CH₂Cl₂ (2 × 1 min), MeOH (2 × 1 min) i NMP (2 × 1 min). L'acilació de la resina resultant es va dur a terme per tractament amb l'àcid gras corresponent (3 eq), DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en NMP a temperatura ambient sota agitació durant tota la nit. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min), es va comprovar la compleció de la reacció mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹ i es va assecar la resina al buit.

Finalment, la peptidil resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h. Seguidament, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El cru es va purificar mitjançant cromatografia en fase reversa i el lipopèptid conjugat es va analitzar per HPLC i es va caracteritzar per espectrometria de masses.

8.3.1 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂ (BP387-BP16)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂ (**BP387-BP16**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,93$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1458,5 [M + 2H]²⁺, 973,0 [M + 3H]³⁺, 730,0 [M + 4H]⁴⁺, 584,2 [M + 5H]⁵⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₄₇H₂₆₁N₃₅O₂₅ [M + 2H]²⁺ 1458,5108, trobada 1458,5071; calculada per C₁₄₇H₂₆₂N₃₅O₂₅ [M + 3H]³⁺ 972,6763, trobada 972,6735.

8.3.2 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP16-BP387)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP16-BP387**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,98$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1458,0 [M + 2H]²⁺, 973,3 [M + 3H]³⁺, 730,1 [M + 4H]⁴⁺, 584,2 [M + 5H]⁵⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₄₇H₂₆₁N₃₅O₂₅ [M + 2H]²⁺ 1458,5108, trobada 1458,5081; calculada per C₁₄₇H₂₆₂N₃₅O₂₅ [M + 3H]³⁺ 972,6763, trobada 972,6753.

8.3.3 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP387-BP100)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP387-BP100**) amb una puresa del 96%. $t_R = 7,97$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1476,0 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₅₀H₂₆₀N₃₄O₂₆ [M + 2H]²⁺ 1475,9950, trobada 1475,9920; calculada per C₁₅₀H₂₆₁N₃₄O₂₆ [M + 3H]³⁺ 984,3324, trobada 984,3291.

8.3.4 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP100-BP387)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100-BP387**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,98$ min (Mètode A). MS (ESI) m/z : 1488,0 [M + H + Na]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₅₀H₂₆₀N₃₄O₂₆ [M + 2H]²⁺ 1475,9950, trobada 1475,9915; calculada per C₁₅₀H₂₆₁N₃₄O₂₆ [M + 3H]³⁺ 984,3324, trobada 984,3313.

8.3.5 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP474-BP143)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP474-BP143**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,94$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1477,0 [M + 2H]²⁺, 984,7 [M + 3H]³⁺, 738,9 [M + 4H]⁴⁺, 591,3 [M + 5H]⁵⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₅₀H₂₆₀N₃₄O₂₆ [M + 2H]²⁺ 1475,9950, trobada 1475,9910; calculada per C₁₅₀H₂₆₁N₃₄O₂₆ [M + 3H]³⁺ 984,3324, trobada 984,3295.

8.3.6 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP143-BP474)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP143-BP474**) amb una puresa >99%. $t_R = 8,00$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 2952,1 [M + H]⁺, 1476,6 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₅₀H₂₆₀N₃₄O₂₆ [M + 2H]²⁺ 1475,9950, trobada 1475,9951; calculada per C₁₅₀H₂₆₁N₃₄O₂₆ [M + 3H]³⁺ 984,3324, trobada 984,3340.

8.3.7 Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP387-flg15)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* PAC i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (**BP387-flg15**) amb una puresa del 96%. $t_R = 5,84$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1537,5 [M + 2H]²⁺, 1025,3 [M + 3H]³⁺, 769,5 [M + 4H]⁴⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₄₂H₂₄₄N₃₈O₃₇ [M + 2H]²⁺ 1536,9184, trobada 1536,9152; calculada per C₁₄₂H₂₄₅N₃₈O₃₇ [M + 3H]³⁺ 1024,9480, trobada 1024,9477.

8.3.8 Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (flg15-BP387)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (70:30) va proporcionar Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**flg15-BP387**) amb una puresa del 96%. $t_R = 6,35$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1536,9 [M + 2H]²⁺, 1525,0 [M + 3H]³⁺, 769,2 [M + 4H]⁴⁺, 615,5 [M + 5H]⁵⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₄₂H₂₄₅N₃₉O₃₆ [M + 2H]²⁺ 1536,4264, trobada 1536,4212; calculada per C₁₄₂H₂₄₆N₃₉O₃₆ [M + 3H]³⁺ 1024,6200, trobada 1024,6166.

8.3.9 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP475-flg15)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* PAC i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (**BP475-flg15**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,03$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1512,4 [M + 2H]²⁺, 1008,7 [M + 3H]³⁺, 756,8 [M + 4H]⁴⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₃₉H₂₄₆N₃₈O₃₆ [M + 2H]²⁺ 1511,9288, trobada 1511,9271; calculada per C₁₃₉H₂₄₇N₃₈O₃₆ [M + 3H]³⁺ 1008,2883, trobada 1008,2867.

8.3.10 Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (flg15-BP475)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (**flg15-BP475**) amb una puresa del 97%. $t_R = 6,79$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1511,9 [M + 2H]²⁺, 1008,4 [M + 3H]³⁺, 756,5 [M + 4H]⁴⁺, 605,5 [M + 5H]⁵⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per

$C_{139}H_{247}N_{39}O_{35}$ $[M + 2H]^{2+}$ 1511,4368, trobada 1511,4329; calculada per $C_{139}H_{248}N_{39}O_{35}$ $[M + 3H]^{3+}$ 1007,9603, trobada 1007,9556.

8.3.11 Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH₂ (BP475-Pip1)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (75:25) va proporcionar Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH₂ (BP475-Pip1) amb una puresa >99%. t_R = 6,28 min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 2229,5 $[M + Na]^+$, 1104,3 $[M + 2H]^{2+}$, 736,5 $[M + 3H]^{3+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{108}H_{181}N_{28}O_{21}$ $[M + H]^+$ 2206,3951, trobada 2206,3981; calculada per $C_{108}H_{182}N_{28}O_{21}$ $[M + 2H]^{2+}$ 1103,7012, trobada 1103,7012.

8.3.12 Ac-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (Pip1-BP475)

Aquest lipopèptid es va preparar seguint el procediment general descrit a l'apartat 8.3 utilitzant el *linker* Fmoc-Rink-amida i àcid butíric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar Ac-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (Pip1-BP475) amb una puresa >99%. t_R = 5,55 min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 2245,4 $[M + K]^+$, 1104,3 $[M + 2H]^{2+}$, 736,5 $[M + 3H]^{3+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{108}H_{181}N_{28}O_{21}$ $[M + H]^+$ 2206,3951, trobada 2206,3902; calculada per $C_{108}H_{182}N_{28}O_{21}$ $[M + 2H]^{2+}$ 1103,7012, trobada 1103,6984.

8.4 Síntesi de pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals

8.4.1 Síntesi de les peptidil resines H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-MBHA (6a) i H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (6b)

Les peptidil resines **6** es varen sintetitzar manualment mitjançant una metodologia de síntesi en fase sòlida utilitzant una estratègia Fmoc/^tBu. Com a suport sòlid es va utilitzar la resina Fmoc-Rink-MBHA (0,56 mmol/g) o la resina ChemMatrix aminometilada (0,69 mmol/g). Com a aminoàcids es varen emprar Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH.

A la resina ChemMatrix aminometilada se li va acoblar el *linker* Fmoc-Rink-amida (4 eq) amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF sota agitació durant tota la nit. A continuació, es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min), i es va monitoritzar la reacció mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹.

L'elongació del pèptid es va realitzar a través d'etapes seqüencials d'eliminació del grup de Fmoc i d'acoblament de l'aminoàcid corresponent. El grup Fmoc es va eliminar per tractament amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 10 min). L'acoblament dels Fmoc-aminoàcids (4 eq) es va realitzar amb Oxima (4 eq) i DIC (4 eq) en DMF a temperatura ambient durant 3 h sota agitació. Després de cada etapa d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). La compleció de l'acoblament es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹. A partir del sisè aminoàcid, es va canviar la DMF per NMP. Un cop finalitzada l'elongació del pèptid, la peptidil resina es va tractar amb piperidina/NMP (3:7, 2 + 10 min) i es va rentar amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). Una alíquota d'aquesta peptidil resina es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h. Seguidament, es va evaporar el TFA, es varen realitzar extraccions amb dietil èter i el cru es va analitzar per HPLC.

8.4.1.1 H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-MBHA (6a)

Aquesta peptidil resina es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant Fmoc-Rink-MBHA com a suport sòlid. El tractament acidolític de la resina resultant va proporcionar Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100**) amb una puresa >99%. *t_R* = 5,02 min (Mètode B).

8.4.1.2 H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (6b)

Aquesta peptidil resina es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant la resina ChemMatrix aminometilada com a suport sòlid. El tractament acidolític de la resina resultant va proporcionar Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP100**) amb una puresa del 93%. *t_R* = 5,08 min (Mètode B).

8.4.2 Síntesi del pèptid conjugat BP524a/b

8.4.2.1 4-Hidrazino-benzoat-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-Rink-ChemMatrix (10)

La peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (**6b**) es va tractar amb àcid 4-[2-(9-fluorenilmetoxicarbonil)hidrazino]benzoic (3 eq), DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en NMP durant 12 h sota agitació. Aquest tractament es va repetir durant 24 h addicionals. Després, la resina es va rentar amb NMP (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min) i, a continuació, el grup Fmoc es va eliminar per tractament amb piperidina/NMP (3:7) (2 + 2 min). Després dels rentats amb NMP (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min), una alíquota de la peptidil resina 4-Hidrazino-benzoat-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-Rink-ChemMatrix (**10**) resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5). Seguidament, es va evaporar el TFA, es varen realitzar extraccions amb dietil èter i el cru obtingut es va analitzar mitjançant HPLC. Es va obtenir 4-Hidrazino-benzoat-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ amb una puresa del 74%. *t_R* = 5,75 min (Mètode B). A més, es va observar la presència de Bz-

Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP103**) amb una puresa del 14%. $t_R = 6,86$ min (Mètode B).

8.4.2.2 Pèptid conjugat BP524a/b

La peptidil resina 4-hidrazino-benzoat-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-Rink-ChemMatrix (**10**) es va tractar amb una solució aquosa d'estreptomina (5 eq) durant 72 h a temperatura ambient sota agitació. A continuació, la resina es va rentar amb H₂O (3 x 1 min), MeOH (3 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min) i es va addicionar NaBH₄ en excés en CH₂Cl₂/MeOH (75:25) durant 30 min a temperatura ambient. Finalment, la peptidil resina es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El cru resultant va contenir **BP524a/b** i **BP103** amb una puresa del 41 i del 27%, respectivament. Per últim, es va purificar per cromatografia flash en fase reversa i l'elució amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar **BP524a/b** amb una puresa del 94%. $t_R = 5,50$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 2120,3 [M + H]⁺, 1060,7 [M + 2H]²⁺, 707,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₁₀₀H₁₆₉N₂₆O₂₄ [M + H]⁺ 2118,2798, trobada 2118,2721; calculada per C₁₀₀H₁₇₀N₂₆O₂₄ [M + 2H]²⁺ 159,6435, trobada 1059,6449.

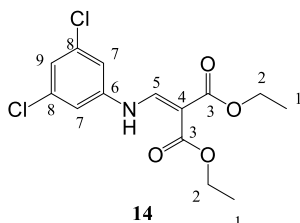
A més, es va obtenir Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (**BP103**) amb una puresa >99%. $t_R = 6,80$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1547,0 [M + Na]⁺, 1526,0 [M + H]⁺, 763,0 [M + 2H]²⁺, 509,0 [M + 3H]³⁺.

8.4.3 Síntesi del pèptid conjugat BP523 contenint BP100 i un derivat de valifenalat

La peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-MBHA (**6a**) es va tractar amb Fmoc-Phe(4-I)-OH (1,5 eq), DIC (1,5 eq) i Oxima (1,5 eq) en NMP sota agitació a temperatura ambient durant tota la nit. Després dels rentats corresponents amb NMP (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min), es va comprovar la compleció de l'acoblament amb el test de Kaiser¹⁹⁹. Seguidament, el grup Fmoc es va eliminar amb piperidina/NMP (3:7, 2 + 2 x 10 min) i es va rentar la resina amb NMP (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min). A continuació, es va acoblar Fmoc-Val-OH (4 eq) i es va eliminar el grup Fmoc utilitzant els mateixos procediments anteriors. La peptidil resina resultant es va tractar amb cloroformat d'isopropil (5 eq) i DIEA (10 eq) en NMP durant tota la nit i, passat aquest temps, es va rentar amb NMP (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min). La compleció de la reacció es va monitoritzar amb el test de Kaiser¹⁹⁹. Finalment, la peptidil resina es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El cru es va purificar per cromatografia flash en fase reversa i l'elució amb H₂O/CH₃CN (80:20) va proporcionar **BP523** amb una puresa >99%. $t_R = 7,84$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1901,0 [M + Na]⁺, 940,2 [M + 2H]²⁺, 627,4 [M + 3H]³⁺; HRMS (ESI) m/z : calculada per C₉₀H₁₄₉I_N₁₉O₁₆ [M + H]⁺ 1879,0469, trobada 1879,0401; calculada per C₉₀H₁₅₀I_N₁₉O₁₆ [M + 2H]²⁺ 940,0271, trobada 940,0238.

8.4.4 Síntesi del pèptid conjugat BP493 contenint BP100 i un derivat de quinoxifèn

8.4.4.1 Síntesi de 2-(3,5-dicloroanilinometilen)malonat de dietil (**14**)

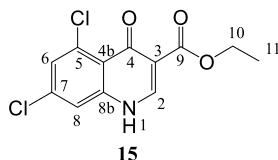


En un matràs de fons rodó de 10 mL s'hi va addicionar 3,5-dicloroanilina (3,5 g, 21,6 mmol) i etoximetilenmalonat de dietil (4,7 mL, 21,6 mmol) i la mescla es va escalfar a 120-130 °C sota agitació durant 4 h. La reacció es va monitoritzar mitjançant TLC. Passat aquest temps, es va addicionar hexà (250 mL) i es va filtrar el sòlid en calent. Les aigües mares es van deixar refredar formant-se un sòlid que es va

filtrar al buit. Aquest sòlid beix es va caracteritzar com 2-(3,5-dicloroanilinometilen)malonat de dietil (**14**) (6,27 g, 87% de rendiment).

TLC: Rf = 0,64, MeOH/CH₂Cl₂ (1:99). **FT-IR** (neat) ν (cm⁻¹): 1693, 1642, 1587, 1243, 1094, 796. **ESI-MS** *m/z*: 354,0, 356,0 [M + Na]⁺; 332,0, 334,0 [M + H]⁺; 286,0, 288,0 [M - C₂H₅O + H]⁺. **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, 1-CH₃), 1,35 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, 1-CH₃), 4,25 (q, *J* = 7,2 Hz, 2 H, 2-CH₂), 4,28 (q, *J* = 7,2 Hz, 2 H, 2-CH₂), 6,99 (d, *J* = 1,6 Hz, 2 H, 7-CH), 7,08-7,09 (m, 1 H, 9-CH), 8,35 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H, 5-CH), 10,96 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H, NH). **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14,31 (1-CH₃), 14,48 (1-CH₃), 60,83 (2-CH₂), 95,95 (4-C), 115,56 (7-CH), 124,54 (9-CH), 136,37 (8-C), 141,30 (6-C), 150,61 (5-CH), 165,32 (3-C), 168,77 (3-C).

8.4.4.2 Síntesi de 5,7-dicloro-4-oxo-quinolina-3-carboxilat d'etil (**15**)

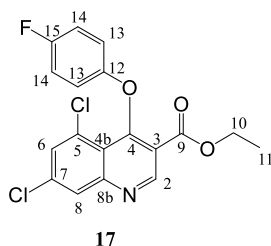


En un matràs de fons rodó de 10 mL s'hi va addicionar 2-(3,5-dicloroanilinometilen)malonat de dietil (**14**) (3,87 g, 11,6 mmol) i difenil èter (4,5 mL). La mescla es va escalfar a 250 °C durant 2 h sota agitació. La reacció es va monitoritzar mitjançant TLC. Passat aquest temps, la suspensió marró resultant es va filtrar i el sòlid es va rentar amb hexà,

proporcionant 5,7-dicloro-4-oxo-quinolina-3-carboxilat d'etil (**15**) com un sòlid beix (2,88 g, 88% de rendiment).

TLC: Rf = 0, MeOH/CH₂Cl₂ (1:99). **FT-IR** (neat) ν (cm⁻¹): 3078 (b.a.), 1697, 1584, 1176, 796. **ESI-MS** *m/z*: 286,0, 288,0 [M + H]⁺; 257,9, 259,9 [M - C₂H₅ + H]⁺. **¹H-RMN** (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm): 1,36 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, 11-CH₃), 4,51 (q, *J* = 7,2 Hz, 2 H, 11-CH₂), 7,77 (s, 1 H, 6-CH), 7,88 (s, 1 H, 8-CH), 9,12 (s, 1 H, 2-CH). **¹³C-RMN** (100 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm): 14,54 (11-CH₃), 67,53 (10-CH₂), 107,90 (3-C), 118,90 (4b-C), 120,92 (8-CH), 135,92 (6-CH), 138,81 (5-C), 144,14 (8b-C), 147,13 (7-C), 148,58 (2-CH), 170,31(9-C), 177,45 (4-C).

8.4.4.3 Síntesi de 5,7-dicloro-4-(4-fluorofenoxi)quinolina-3-carboxilat d'etil (**17**)



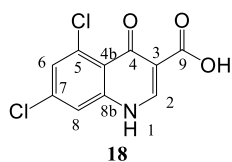
En un matràs de fons rodó de 50 mL es va resuspendre 5,7-dicloro-4-oxo-quinolina-3-carboxilat d'etil (**15**) (1,1 g, 4,3 mmol) en difenil èter (4,5 mL) i la mescla es va escalfar a 140 °C. Seguidament, es va addicionar gota a gota POCl₃ (0,8 mL, 12,8 mmol) i la mescla es va mantenir a 140 °C sota agitació durant 1 h. A continuació, es va afegir gel a la solució marró resultant, es va neutralitzar amb NaHCO₃ i es va addicionar H₂O (50 mL). La fase aquosa es va extreure amb CH₂Cl₂ (3 x 50 mL), les fases

orgàniques reunides es varen assecar amb MgSO₄ anhidre, es va filtrar el sòlid i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda en un rotavapor. El cru grogós resultant, corresponent a 4,5,7-dicloroquinolina-3-carboxilat d'etil (**16**) es va utilitzar directament en la següent etapa.

En un matràs de fons rodó de 50 mL s'hi varen afegir, seqüencialment, el cru grogós anterior, xilè (7 mL), 4-fluorofenol (0,55g, 4,9 mmol) i DMAP (64 mg, 0,5 mmol). La mescla es va escalfar a 140 °C sota agitació durant 16 h. Passat aquest temps, el cru es va neutralitzar amb NaHCO₃, es va addicionar H₂O (400 mL) i la fase aquosa es va extreure amb CH₂Cl₂ (4 × 300 mL). Les fases orgàniques reunides es varen assecar amb MgSO₄ anhidre, es va filtrar el sòlid i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda en un rotavapor, obtenint-se un oli grogós. Aquest cru es va purificar per cromatografia en columna sobre gel de sílice. Eluint amb una barreja hexà/CH₂Cl₂ (4:6) es va obtenir 5,7-dicloro-4-(4-fluorofenoxi)quinolina-3-carboxilat d'etil (**17**) com un sòlid blanc (0,89 g, 67% de rendiment).

TLC: R_f = 0,54, MeOH/CH₂Cl₂ (1:99). **FT-IR** (neat) ν (cm⁻¹): 1730, 1498, 1188, 836. **ESI-MS** *m/z*: 380,1, 382,1 [M + H]⁺. **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,13 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, 11-CH₃), 4,16 (q, *J* = 7,2 Hz, 2 H, 10-CH₂), 6,70-6,73 (m, 2 H, 13/14-CH), 6,96-7,00 (m, 2 H, 13/14-CH), 7,62 (d, *J* = 2 Hz, 1 H, 6-CH), 8,10 (d, *J* = 2 Hz, 1 H, 8-CH), 9,23 (s, 1 H, 2-CH). **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13,99 (11-CH₃), 62,08 (10-CH₂), 116,26 (13/14-CH), 116,49 (13/14-CH), 116,53 (13/14-CH), 116,62 (13/14-CH), 118,30 (3-C), 120,03 (4b-C), 128,51 (8-CH), 130,98 (5-C), 131,38 (6-CH), 137,38 (7-C), 153,21 (8b-C), 153,82 (2-CH), 154,60 (12-C), 158,86 (4-C), 159,52 (15-C), 163,86 (9-C).

8.4.4.4 Síntesi d'àcid 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxílic (**18**)



En un matràs de fons rodó de 100 mL es va pesar 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxilat d'etil (**15**) (2,41 g, 8,4 mmol) i s'hi va addicionar una solució aquosa de LiOH 1,7 M (14,8 mL, 17,3 mmol) i THF/MeOH (1:1, 14,8 mL). La suspensió blanca resultant es va agitar a reflux durant 4 h. A continuació, el cru es va neutralitzar amb HCl 1 M, obtenint-se un precipitat blanc que es va filtrar al buit i es va assecar en un dessecador amb P₂O₅. Es va obtenir 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxílic (**18**) com un sòlid blanc (1,87 g, 86% de rendiment).

FT-IR (neat) ν (cm⁻¹): 3279 (b.a.), 1439, 1385, 1255, 976. **ESI-MS** *m/z*: 279,9, 281,9 [M + Na]⁺; 257,9, 259,9 [M + H]⁺. **¹H-RMN** (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm): 7,98 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H, 6-CH), 8,07 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H, 8-CH), 9,37 (s, 1 H, 2-CH). **¹³C-RMN** (100 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm): 114,38 (3-C), 120,71 (8-CH), 122,48 (4b-C), 136,59 (6-CH), 137,70 (5-C), 143,50 (7-C), 146,53 (8b-C), 151,15 (2-CH), 168,28 (9-C), 177,23 (4-C).

8.4.4.5 Síntesi del pèptid conjugat BP493 contenint BP100 i un derivat de quinoxifèn

La peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-MBHA (**6a**) es va tractar amb àcid 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxílic (**18**) (2 eq), DIC (2 eq) i Oxima (2 eq) en NMP a temperatura ambient sota agitació durant tota la nit. Passat aquest temps, es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min) i es va comprovar la compleció de la reacció mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ La resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. La purificació del cru eluint amb H₂O/CH₃CN (85:15) va proporcionar **BP493** amb una

puresa >99%. $t_R = 6,46$ min (Mètode B). MS (ESI) m/z : 1681,9 $[M + Na]^+$, 1659,9 $[M + H]^+$, 830,5 $[M + 2H]^{2+}$; HRMS (ESI) m/z : calculada per $C_{82}H_{129}Cl_2N_{18}O_{14}$ $[M + H]^+$ 1659,9307, trobada 1659,9297; calculada per $C_{82}H_{129}Cl_2N_{18}O_{14}Na$ $[M + H + Na]^{2+}$ 841,4600, trobada 841,4588; calculada per $C_{82}H_{130}Cl_2N_{18}O_{14}$ $[M + 2H]^{2+}$ 830,4690, trobada 830,4681.

8.5 Síntesi de dehidroderivats de fengícines

Els ciclopeptidips derivats de fengícines es varen sintetitzar manualment mitjançant una metodologia de síntesi en fase sòlida utilitzant una estratègia Fmoc/^tBu/al·lil.¹⁸⁹ Com a suport sòlid es va utilitzar la resina Wang (1,1 mmol/g) que es va inflar amb THF anhidre durant 30 min en un vial de reacció de 15 ml. Seguidament, la resina es va tractar amb una solució de Fmoc-D-Tyr-OAll (4 eq) i PPh₃ (4 eq) en THF anhidre (0,25 mL/100 mg de resina) i la mescla es va refredar a 0 °C. A continuació, es va afegir gota a gota una solució d'azodicarboxilat de diisopropil (DIAD) (4 eq) en THF anhidre (0,25 mL/100 mg de resina) i la mescla es va agitar 1 h a 0 °C i 30 min a 60 °C sota irradiació microones. El cru de reacció es va transferir a una xeringa de polipropilè i la resina es va rentar amb THF (3 x 2 min), CH₂Cl₂ (3 x 2 min), DMF (3 x 2 min), DMF/H₂O (1:1, 3 x 2 min), DMF (3 x 2 min), CH₃OH (3 x 2 min) i CH₂Cl₂ (3 x 2 min). La funcionalització de la resina Fmoc-D-Tyr(Wang)-OAll resultant es va determinar mitjançant el test Fmoc, obtenint-se una funcionalització de 0,22 mmol/g. Aquesta resina es va acetilar amb Ac₂O/piridina/CH₂Cl₂ (7:7:86, 2 x 30 min) i, seguidament, es va rentar amb CH₂Cl₂ (3 x 2 min), DMF (3 x 2 min), CH₃OH (3 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 2 min).

L'elongació del pèptid es va realitzar a través d'etapes seqüencials d'eliminació del grup de Fmoc i d'acoblament de l'aminoàcid corresponent. Com a aminoàcids es varen utilitzar Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-D-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-D-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Tyr-OH, Fmoc-D-Tyr-OH i Fmoc-D-Orn(Boc)-OH. L'eliminació del grup Fmoc es va realitzar amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 10 min). L'acoblament dels Fmoc-aminoàcids (4 eq) es va dur a terme amb Oxima (4 eq) i DIC (4 eq) en DMF a temperatura ambient durant 1 h sota agitació. Després de cada etapa d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc es va rentar la resina amb DMF (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min). La compleció dels acoblaments es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser o el test de cloranil.^{199,200}

Un cop finalitzada l'elongació del pèptid, es va eliminar el grup Fmoc de l'extrem N-terminal, utilitzant les condicions descrites anteriorment, i es va acoblar l'àcid gras corresponent (3 eq) en presència de DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en DMF durant tota la nit a temperatura ambient sota agitació. La peptidil resina resultant es va rentar amb DMF (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min) i la compleció de la reacció es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹

A continuació, la lipopeptidil resina obtinguda es va tractar amb Alloc-Ile-OH (7 eq), DIEA (1,4 eq), DIC (7 eq) i DMAP (0,7 eq) en DMF durant 24 h sota agitació a temperatura ambient. Aquest tractament es va repetir dues vegades. Després de cada tractament la resina es va rentar amb DMF (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min). Seguidament, es va eliminar el grup Alloc amb Pd(PPh₃)₃ (0.1 equiv) i PhSiH₃ (10 equiv) en CH₂Cl₂ sota atmosfera de nitrogen durant 4 h. Passat aquest temps, la resina resultant es va rentar amb THF (3 x 15 s), CH₂Cl₂ (3 x 2 min), DMF (10 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 2

min). Després de l'eliminació del grup Fmoc i dels rentants corresponents, la resina es va tractar amb Oxima (5 eq), d'O-[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetiliden)amino]-oxitris(pirrolidin-1-il)fosfoni (PyOxima) (5 eq) i DIEA (10 eq) en DMF durant 24 h sota agitació a temperatura ambient. La peptidil resina resultant es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). La compleció de la reacció es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ Seguidament, la resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El ciclolipodepsipèptid resultant es va purificar mitjançant cromatografia en fase reversa, es va analitzar per HPLC i es va caracteritzar per espectrometria de masses i RMN.

A partir d'ara l'enllaç ester entre el grup fenol de la Tyr i el grup α-carboxílic de la Ile s'indica com a &.

8.5.1 C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC838)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid octanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (**BPC838**) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,45 min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,72-0,87 (m, 18 H, δ-CH₃-Ile, γ-CH₃-Ile, γ-CH₃-Thr, 2 × γ-CH₃-Val, CH₃-octanoïl), 1,15-1,20 (m, 14 H, 4 × CH₂-octanoïl, γ-CH₂-Ile), 1,41-1,45 (m, 4 H, β-CH₂-octanoïl, β-CH₂-Glu/Gln), 1,55-1,60 (m, 3 H, γ-CH₂-Orn), 1,69-1,80 (m, 4 H, β-CH-Ile, β-CH₂-Orn), 1,82-1,98 (m, 4 H, β-CH₂-Tyr^b, γ-CH₂-Pro), 2,06-2,26 (m, 10 H, β-CH-Val, γ-CH₂-Glu/Gln, β-CH₂-Pro, β-CH₂-Tyr^b, α-CH₂-octanoïl), 2,67-2,77 (m, 3 H, β-CH₂-Tyr^a, δ-CH₂-Orn), 2,86-2,88 (m, 2 H), 3,16-3,27 (m, 2 H, β-CH₂-Tyr^a), 3,50-3,53 (m, 1 H, δ-CH₂-Pro), 3,86-3,90 (m, 1 H, β-CH-Thr), 3,97-4,00 (m, 1 H, α-CH-Ile), 4,17-4,26 (m, 3 H, α-CH-Pro, α-CH-Orn, α-CH-Glu/Gln), 4,31-4,39 (m, 1 H, α-CH-Tyr^b), 4,44-4,47 (m, 1 H, α-CH-Val), 4,55-4,63 (m, 2 H, α-CH-Tyr^a), 6,63 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,84 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,99-7,04 (m, 4 H, CH-Tyr^{a-b}_{arom}); MS (ESI) *m/z* (+): 1385,8 [M + Na]⁺, 1363,8 [M + H]⁺, 693,3 [M + Na + H]²⁺, 682,3 [M + 2H]²⁺; MS (ESI) *m/z* (-): 1383,6 [M + Na - 2H]⁻, 1361,8 [M - H]⁻; HRMS (ESI) *m/z* (+): calculada per C₆₆H₉₈N₁₂O₁₉Na [M + Na]⁺ 1385,6963, trobada 1385,6934; calculada per C₆₆H₉₉N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1363,7144, trobada 1363,7130; calculada per C₆₆H₉₈N₁₂O₁₉Na₂ [M + 2Na]²⁺ 704,3428, trobada 704,3408; calculada per C₆₆H₉₉N₁₂O₁₉Na [M + Na + H]²⁺ 693,3518, trobada 693,3505.

8.5.2 C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC840)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid octanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (**BPC840**) amb una puresa >99%. *t_R* = 7,22 min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,73-0,86 (m, 15 H, δ-CH₃-Ile, γ-CH₃-Ile, 2 × γ-CH₃-Val, CH₃-octanoïl), 1,14-1,21 (m, 12 H, 4 × CH₂-octanoïl, γ-CH₂-Ile), 1,41-1,48 (m, 4 H, β-CH₂-octanoïl), 1,55-1,61 (m, 3 H, γ-CH₂-Orn), 1,68-1,90 (m, 10 H, β-CH₂-Tyr^b, β-CH-Ile, γ-CH₂-Pro, β-CH₂-Orn), 2,00-2,33 (m, 8 H, β-CH-Val, β-CH₂-Tyr^b, β-CH₂-Pro, α-CH₂-octanoïl), 2,67-2,77 (m, 2 H, δ-CH₂-Orn), 2,50-2,57

(m, β -CH₂-Tyr^a), 2,85-2,87 (m, 2 H), 3,19-3,33 (m, 4 H, β -CH₂-Tyr^a, β -CH₂-Ser), 3,44-3,54 (m, β -CH₂-Ser, δ -CH₂-Pro), 3,97-3,99 (m, 1 H, α -CH-Ile), 4,12-4,26 (m, 6 H, α -CH-Pro, α -CH-Ser, α -CH-Orn), 4,35-4,46 (m, 2 H, α -CH-Tyr^b, α -CH-Val), 4,56-4,60 (m, 1 H), 4,64-4,75 (m, 1 H, α -CH-Tyr^a), 6,63 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,86 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,95-7,04 (m, 4 H, CH-Tyr^{a-b}_{arom}); MS (ESI) m/z (+): 1349,7 [M + H]⁺, 675,3 [M + 2H]²⁺; MS (ESI) m/z (-): 1347,6 [M - H]⁻; HRMS (ESI) m/z (+): calculada per C₆₅H₉₆N₁₂O₁₉Na [M + Na]⁺ 1371,6807, trobada 1371,6804; calculada per C₆₅H₉₇N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1349,6987, trobada 1349,6962; calculada per C₆₅H₉₆N₁₂O₁₉Na₂ [M + 2Na]²⁺ 697,3350, trobada 697,3342; calculada per C₆₅H₉₇N₁₂O₁₉Na [M + Na + H]²⁺ 686,3440, trobada 686,3431.

8.5.3 C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC842)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid octanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (**BPC842**) amb una puresa >99%. $t_R = 7,26$ min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,71-0,89 (m, 12 H, δ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Thr, CH₃-octanoïl), 1,10-1,22 (m, 15 H, 4 × CH₂-octanoïl, β -CH₃-Ala, γ -CH₂-Pro, γ -CH₂-Ile), 1,43-1,45 (m, 4 H, β -CH₂-octanoïl, β -CH₂-Glu/Gln), 1,57-1,61 (m, 2 H, γ -CH₂-Orn), 1,71-1,89 (m, 8 H, β -CH₂-Tyr^b, β -CH-Ile, γ -CH₂-Pro, β -CH₂-Orn), 1,99-2,22 (m, 10 H, β -CH₂-Tyr^b, β -CH₂-Pro, γ -CH₂-Glu/Gln, α -CH₂-octanoïl), 2,51-2,59 (m, β -CH₂-Tyr^a), 2,69-2,76 (m, 2 H, δ -CH₂-Orn), 2,84-2,95 (m, 2 H), 3,22-3,25 (m, 1 H, β -CH₂-Tyr^a), 3,50-3,55 (m, 2 H, δ -CH₂-Pro), 3,72-3,80 (m, β -CH-Thr), 3,98-4,01 (m, 2 H, α -CH-Ile), 4,10-4,14 (m, 1 H, α -CH-Orn), 4,18-4,24 (m, 2 H, α -CH-Pro, α -CH-Glu/Gln), 4,38-4,42 (m, 1 H, α -CH-Tyr^b), 4,57-4,61 (m, 1 H), 4,62-4,69 (m, 1 H, α -CH-Tyr^a), 4,81-4,90 (m, 1 H, α -CH-Ala), 6,63 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,84 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,94 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 7,05 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}); MS (ESI) m/z (+): 1335,7 [M + H]⁺, 668,3 [M + 2H]²⁺; MS (ESI) m/z (-): 1333,6 [M-H]⁻; HRMS (ESI) m/z (+): calculada per C₆₄H₉₅N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1335,6831, trobada 1335,6855; calculada per C₆₄H₉₄N₁₂O₁₉ Na₂ [M + 2Na]²⁺ 690,3271, trobada 690,3301; calculada per C₆₄H₉₅N₁₂O₁₉Na [M + Na + H]²⁺ 679,3362, trobada 679,3379.

8.5.4 C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC844)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid octanoic com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (60:40) va proporcionar C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (**BPC844**) amb una puresa del 94%. $t_R = 7,12$ min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,73-0,76 (m, 6 H, δ -CH₃-Ile, CH₃-octanoïl), 0,83-0,85 (m, 3 H, γ -CH₃-Ile), 1,10-1,20 (m, 15 H, 4 × CH₂-octanoïl, β -CH₃-Ala, γ -CH₂-Ile), 1,40-1,45 (m, 4 H, β -CH₂-Glu/Gln, β -CH₂-octanoïl), 1,56-1,62 (m, 3 H, γ -CH₂-Orn), 1,73-1,88 (m, 8 H, β -CH-Ile, β -CH₂-Orn, β -CH₂-Tyr^b, γ -CH₂-Pro), 2,07-2,24 (m, 10 H, β -CH₂-Tyr^b, β -CH₂-Pro, γ -CH₂-Glu/Gln, α -CH₂-octanoïl), 2,46-2,55 (m, β -CH₂-Tyr^a), 2,71-2,74 (m, 2 H, δ -CH₂-Orn), 2,87-2,91 (m, 2 H), 3,19-3,33 (m, 2 H, β -CH₂-Tyr^a, β -CH₂-Ser), 3,47-3,53 (m, 2 H, δ -CH₂-Pro, β -CH₂-Ser), 3,95-3,97 (m, 1 H, α -CH-Ile), 4,11-4,24 (m, 5 H, α -CH-Ser, α -CH-Orn, α -CH-Glu/Gln, α -CH-Pro), 4,36-4,40 (m, 1 H, α -CH-Tyr^b), 4,56-4,62 (m, 2 H, α -CH-Tyr^a), 4,86-4,87 (m, 1 H, α -CH-Ala), 6,63 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,86 (d,

2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,94 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 7,06 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}); MS (ESI) m/z (+): 1321,7 [M + H]⁺, 661,8 [M + 2H]²⁺; HRMS (ESI) m/z (+): calculada per C₆₃H₉₂N₁₂O₁₉Na [M + Na]⁺ 1343,6494, trobada 1343,6521; calculada per C₆₃H₉₃N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1321,6674, trobada 1321,6701.

8.5.5 C₁₁H₂₃CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC854)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid làuric com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (50:50) va proporcionar C₁₁H₂₃CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC854) amb una puresa del 92%. $t_R = 7,99$ min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,71-0,85 (m, 18 H, δ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Thr, CH₃-lauròil, 2 × γ -CH₃-Val), 1,14-1,19 (m, 18 H, 8 × CH₂-lauròil, γ -CH₂-Ile), 1,40-1,58 (m, 6 H, γ -CH₂-Orn, β -CH₂-lauròil), 1,61-1,74 (m, 4 H, β -CH-Ile, β -CH₂-Orn), 1,87-2,25 (m, 14 H, β -CH-Val, γ -CH₂-Pro, β -CH₂-Pro, α -CH₂-lauròil), 2,65-2,76 (m, 3 H, δ -CH₂-Orn), 2,80-2,85 (m, 2 H), 3,02-3,21 (m, 2 H), 3,26-3,34 (m, 1 H), 3,48-3,50 (m, 1 H, δ -CH₂-Pro), 3,80-3,87 (m, 2 H, β -CH-Thr), 3,96-4,02 (m, 2 H, α -CH-Ile), 4,11-4,25 (m, 4 H, α -CH-Pro, α -CH-Orn), 4,42-4,46 (m, 1 H, α -CH-Val), 4,56-4,60 (m, 2 H), 6,61 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,83 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,99-7,03 (m, 4 H, CH-Tyr^{a-b}_{arom}); MS (ESI) m/z (+): 1419,8 [M + H]⁺; MS (ESI) m/z (-): 1417,7 [M - H]⁻; HRMS (ESI) m/z (+): calculada per C₇₀H₁₀₆N₁₂O₁₉Na [M + Na]⁺ 1441,7589, trobada 1441,7593; calculada per C₇₀H₁₀₇N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1419,7770, trobada 1419,7763.

8.5.6 C₁₅H₃₁CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC856)

Aquest ciclolipodepsipèptid es va preparar seguint el procediment general descrit anteriorment utilitzant àcid palmític com a àcid gras. El tractament acidolític de la resina resultant i la purificació eluint amb H₂O/CH₃CN (40:60) va proporcionar C₁₅H₃₁CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC856) amb una puresa del 93%. $t_R = 9,23$ min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm): 0,79-0,89 (m, 18 H, δ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Ile, γ -CH₃-Thr, CH₃-palmitoïl, 2 × γ -CH₃-Val), 1,14-1,22 (m, 28 H, 12 × CH₂-palmitoïl, γ -CH₂-Ile), 1,40-1,50 (m, 6 H, β -CH₂-Glu/Gln), 1,56-1,63 (m, 2 H, γ -CH₂-Pro), 1,69-1,77 (m, 2 H, β -CH-Ile, γ -CH₂-Orn), 1,84-2,33 (m, 14 H, β -CH₂-Tyr^b, β -CH₂-Tyr^b, β -CH-Val, β -CH₂-Orn, β -CH₂-Pro, γ -CH₂-Glu/Gln, β -CH₂-palmitoïl), 2,46-2,50 (m, β -CH₂-Tyr^a), 2,68-2,73 (m, 4 H, δ -CH₂-Orn), 2,88-2,90 (m, 2 H), 3,26-3,37 (m, 2 H, β -CH₂-Tyr^a), 3,60-3,63 (m, 1 H), 3,74-3,76 (m, 1 H, β -CH-Thr), 4,00-4,04 (m, 2 H, α -CH-Thr, α -CH-Ile), 4,11-4,17 (m, 2 H, α -CH-Orn, α -CH-Glu/Gln), 4,23-4,28 (m, 2 H, α -CH-Pro, α -CH-Glu/Gln), 4,43-4,46 (m, 1 H, α -CH-Tyr^b), 4,48-4,51 (m, 1 H, α -CH-Val), 4,56-4,60 (m, 1 H), 4,70-4,73 (m, 1 H, α -CH-Tyr^a), 6,63 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}), 6,83 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 6,93 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^b_{arom}), 7,04 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz, CH-Tyr^a_{arom}); MS (ESI) m/z (+): 1497,9 [M + Na]⁺, 1475,9 [M + H]⁺, 749,9 [M + Na + H]²⁺, 738,4 [M + 2H]²⁺; MS (ESI) m/z (-): 1495,8 [M + Na - 2H]⁻, 1473,9 [M - H]⁻; HRMS (ESI) m/z (+): calculada per C₇₄H₁₁₄N₁₂O₁₉Na [M + Na]⁺ 1497,8215, trobada 1497,8227; calculada per C₇₄H₁₁₅N₁₂O₁₉ [M + H]⁺ 1475,8396, trobada 1475,8376.

8.6 Síntesi del ciclolipopèptid biarílic **20** derivat de les arilomicines

El ciclolipopèptid biarílic $C_{15}H_{31}CO-Lys-D-(NMe)Ser-D-Ala-Gly-(NMe)Tyr(3-\&,Me)-Ala-Tyr(3-\&,Me)-NH_2$ (**20**) es va sintetitzar manualment mitjançant una metodologia de síntesi en fase sòlida Fmoc/^tBu. Es va utilitzar una resina Fmoc-Rink-MBHA (0,56 mmol/g) que es va tractar amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 10 min) i es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). A continuació, es va acoblar Fmoc-Tyr(3-I,Me)-OH (2 eq) amb COMU (2 eq), Oxima (2 eq) i DIEA (4 eq) en DMF sota agitació a temperatura ambient durant tota la nit. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). Seguidament, es va eliminar el grup Fmoc mitjançant les condicions descrites anteriorment i es va acoblar Fmoc-Ala-OH (4 eq) amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF a temperatura ambient durant 3 h sota agitació i, passat aquest temps, la resina es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). La compleció dels acoblaments es va monitoritzar amb el test de Kaiser.¹⁹⁹ Seguidament, es va eliminar el grup Fmoc i la resina es va tractar amb clorur de trifenilmetil (TrCl) (10 eq) i DIEA (10 eq) en DMF a temperatura ambient durant 4 h sota agitació. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min), i es va monitoritzar la reacció amb el test de Kaiser.¹⁹⁹

La borilació de la iodopeptidil resina resultant es va dur a terme en un matràs de fons rodó de 10 mL, al qual es va afegir la resina, bis(pinacol)diborà (B₂Pin₂) (4 eq), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocè (dppf) (0,09 eq) i PdCl₂(dppf) (0,18 eq). Paral·lelament, es va sonicar una solució de KOAc (6 eq) en DMSO anhidre prèviament desgasat (20 µL/mg de resina) i aquesta solució es va addicionar al matràs. La mescla es va agitar a 80 °C durant 8 h. Un cop completada la reacció, la resina es va traspasar novament a una xeringa de polipropilè incorporant un filtre de polietilè i es va rentar amb DMSO (6 v 1 min), MeOH (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (6 × 1 min).

La boronopeptidil resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/CH₂Cl₂ (0,2:1:98,8, 2 × 2 min + 4 × 20 min) seguit de rentats amb DMF (3 × 1 min), DIEA/CH₂Cl₂ (1:19, 3 × 1 min), CH₂Cl₂ (3 × 1 min) i DMF (3 × 1 min). Posteriorment, es va acoblar Boc-Tyr(3-I,Me)-OH (3 eq) amb DIC (3 eq) i Oxima (3 eq) en DMF a temperatura ambient durant 3 h sota agitació i, a continuació, la resina es va rentar amb DMF (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (3 x 1 min). Aquest acoblament es va monitoritzar amb el test de Kaiser.¹⁹⁹

Per a dur a terme la formació de l'enllaç biarílic, la peptidil resina resultant es va traspasar a un vial de microones de 15 mL i es va tractar amb Pd₂(dba)₃ (0,2 eq), 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenil (SPhos) (0,4 eq) i KF (4 eq) en dimetoxietà (DME)/EtOH/H₂O (9:9:2, 0,8 mL) sota atmosfera de nitrogen. La mescla es va agitar durant 30 min a 120 °C sota irradiació microones. Passat aquest temps, la mescla es va traspasar a una xeringa de polipropilè incorporant un filtre de polietilè i la resina es va rentar amb DMF (6 x 1 min), EtOH (6 x 1 min) i CH₂Cl₂ (6 x 1 min). El grup Boc de l'extrem N-terminal es va eliminar per tractament amb trifluorometansulfonat de trimetilsilil (TMSOTf) i 2,6-lutidina en CH₂Cl₂ (concentració final: 2 M TMSOTf i 3 M 2,6-lutidina) (10 x 30 min) a temperatura ambient. Després d'aquests tractaments, la resina es va rentar amb CH₂Cl₂ (5 × 1 min), MeOH (3 × 5 min) i DMF (5 × 1 min).

La N-metilació de la peptidil resina resultant es va realitzar en tres etapes. En primer lloc, la resina es va tractar amb una solució de *o*NBS-Cl (4 eq) i DIEA (10 eq) en CH₂Cl₂ sota agitació durant 1,5 h a temperatura ambient i, posteriorment, es va rentar amb DMF (3 × 0,5 min) i CH₂Cl₂ (3 × 0,5 min).

En la segona etapa, la resina es va metilar per tractament amb PPh₃ (25 eq) i MeOH (50 eq) en THF anhidre, seguit de l'addició de DIAD (25 eq) en THF anhidre. La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 1 h i, seguidament, la solució es va filtrar i la resina es va rentar amb THF (3 × 0,5 min), CH₂Cl₂ (3 × 0,5 min) i DMF (3 × 0,5 min). Finalment, el grup oNBS es va eliminar selectivament amb β-mercaptoetanol (10 eq) i 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (5 eq) en DMF (2 × 15 min) a temperatura ambient sota agitació i, seguidament, la resina es va rentar amb DMF (3 × 0,5 min), CH₂Cl₂ (3 × 0,5 min), DMF (3 × 0,5 min) i CH₂Cl₂ (3 × 0,5 min).

La seqüència peptídica es va allargar a través d'etapes seqüencials d'acoblament de l'aminoàcid corresponent i d'eliminació del grup Fmoc. L'acoblament dels aminoàcids Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Ala-OH i Fmoc-D-Ser(^tBu)-OH (4 eq) es va realitzar amb DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF a temperatura ambient durant 3 h sota agitació. L'eliminació del grup Fmoc es va dur a terme amb piperidina/DMF (3:7, 2 + 2 × 10 min). Després de cada etapa d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc es va rentar la resina amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). Els acoblaments es varen monitoritzar mitjançant el test de Kaiser.¹⁹⁹ A continuació, la peptidil resina es va metilar emprant el procediment descrit anteriorment.

Seguidament, es va procedir a l'acoblament de Fmoc-Lys(Boc)-OH (4 eq) i a l'eliminació del grup Fmoc en les condicions descrites, i la resina resultant es va tractar amb àcid palmític (4 eq), DIC (4 eq) i Oxima (4 eq) en DMF sota agitació a temperatura ambient durant tota la nit. Passat aquest temps, la resina es va rentar amb DMF (6 × 1 min) i CH₂Cl₂ (3 × 1 min). L'acilació es va monitoritzar mitjançant el test de Kaiser¹⁹⁹ i la resina es va assecar al buit.

Finalment, la peptidil resina resultant es va tractar amb TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) durant 2 h. Seguidament, es va evaporar el TFA i es varen realitzar extraccions amb dietil èter. El cru es va purificar mitjançant cromatografia en fase reversa i l'elució amb H₂O/CH₃CN (50:50) va proporcionar C₁₅H₃₁CO-Lys-D-(NMe)Ser-D-Ala-Gly-(NMe)Tyr(3-&,Me)-Ala-Tyr(3-&,Me)-NH₂ (**20**) amb una puresa del 96 %. *t_R* = 8,67 min (Mètode A); ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 0,92 (t, 3 H, *J* = 6,34 Hz, CH₃-palmitoïl), 1,27-1,47 (m, 32 H, 12 × CH₂-palmitoïl, 2 × β-CH₃-Ala, γ-CH₂-Lys), 1,58-1,73 (m, 4 H, β-CH₂-palmitoïl, δ-CH₂-Lys), 1,81-1,90 (m, 2 H, β-CH₂-Lys), 2,18-2,29 (m, 2 H, α-CH₂-palmitoïl), 2,76-2,84 (m, 1 H, β-CH₂-Tyr^a), 2,89-2,98 (m, 2 H, ε-CH₂-Lys), 3,04-3,11 (m, 1 H, β-CH₂-Tyr^a), 3,13-3,16 (m, 1 H, β-CH₂-Tyr^b), 3,22 (s, 3 H, N-CH₃), 3,29-3,34 (m, β-CH₂-Tyr^b), 3,37 (s, 3 H, N-CH₃), 3,73-3,78 (m, 8 H, α-CH₂-Gly, 2 × O-CH₃), 3,91-3,96 (m, 1 H, β-CH₂-Ser), 4,08-4,12 (m, 1 H, β-CH₂-Ser), 4,44-4,50 (m, 2 H, α-CH-Ala^b, α-CH-Tyr^a), 4,72-4,83 (m, 4 H, α-CH-Ala^a, α-CH-Tyr^b, α-CH-Lys), 4,91-4,96 (m, 1 H, α-CH-Ser), 6,69-6,95 (m, 4 H, 4 × CH-Tyr_{arom}), 7,13-7,29 (m, 2 H, 2 × CH-Tyr_{arom}); MS (ESI) *m/z*: 1050,7 [M + H]⁺; HRMS (ESI) *m/z*: calculada per C₅₅H₈₈N₉O₁₁ [M + H]⁺ 1050,6598, trobada 1050,6564; calculada per C₅₅H₈₈N₉O₁₁Na [M + Na + H]²⁺ 536,8245, trobada 536,8225.

8.7 Avaluació de l'activitat biològica

8.7.1 Creixement de les soques bacterianes i fúngiques

En aquest treball es varen utilitzar les soques bacterianes següents: *Erwinia amylovora* PMV6076 (Institut National de la Recherche Agronomique, Angers, França), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, Espanya), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 2133-2, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa3700.1.1, *Xanthomonas fragariae* Xf349-9A (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, València, Espanya), i *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* CFBP5563 (Collection Française de Bactéries associées aux Plantes, Angers, França). Totes les bactèries, excepte *X. fragariae*, es varen conservar en medi Luria Bertani suplementat amb glicerol (20%) i mantingut a -80°C. Per *X. fragariae* es va utilitzar Medium B en comptes de medi Luria Bertani. *E. amylovora*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *actinidiae* es varen cultivar en el medi agar durant 24 h a 25°C, i *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* i *X. fragariae* durant 48 h a 25°C. Passat aquest temps, el material cel·lular es va resuspendre en aigua estèril per a obtenir una suspensió de 10⁸ CFU/ml.

Els fongs utilitzats varen ser: *Penicillium expansum* EPS26 (Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, Espanya) i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* FOL 3 race 2 (ATCC 201829, American Type Culture Collection, Virginia, EEUU). Els fongs es varen cultivar en agar de dextrosa de patata durant 5-7 dies a 25°C. A continuació, es varen resuspendre en aigua destil·lada amb un 0,5% de tween 80. Les suspensions es varen filtrar mitjançant un filtre Miracloth (Merk, Millipore) i la concentració de conidis es va determinar utilitzant un hemacitòmetre i es va ajustar a 10⁴ conidis/ml per *F. oxysporum* a 10³ conidis/ml per *P. expansum*.

8.7.2 Anàlisi de l'activitat antimicrobiana

Els pèptids liofilitzats es varen dissoldre en aigua Milli-Q estèril a una concentració final d'1 mM i les solucions es varen esterilitzar amb un filtre de 0,2 µm de mida de porus. Per determinar la concentració mínima inhibidora (CMI), es varen preparar dissolucions mare dels pèptids a una concentració de 500, 250, 125, 62, 31, 16 i 8 µM.

Per l'activitat antibacteriana, cada dissolució de pèptid (20 µl) es va mesclar en un pouet d'una placa amb la suspensió bacteriana corresponent (20 µl) i caldo de triptona de soja (160 µl) (BioMèrieux, França) per a obtenir un volum final de 200 µl. Es varen realitzar tres replicats per cada soca i cada concentració. El creixement bacterià es va determinar mitjançant la mesura de la densitat òptica a 600 nm (Bioscreen C, LabSystem, Hèlsinki, Finlàndia). Les plaques es varen incubar a 25°C durant 48 h, agitant 20 s abans de la mesura de l'absorbància que es va realitzar cada hora. L'experiment es va repetir dues vegades. La CMI es va establir com la concentració de pèptid més baixa sense creixement bacterià al final de l'experiment.

Per l'activitat antifúngica, cada dissolució de pèptid (20 µl) es va mesclar en un pouet d'una placa amb la suspensió fúngica corresponent (80 µl) i caldo de dextrosa de patata (100 µl) per a obtenir

un volum final de 200 µl contenint 0,003% de cloramfenicol per prevenir la contaminació bacteriana. Es varen realitzar tres replicats per cada soca i cada concentració. El creixement bacterià es va determinar mitjançant la mesura de la densitat òptica a 600 nm (Bioscreen C, Labsystem, Hèlsinki, Finlàndia). Les plaques es varen incubar a 22°C durant 7 dies, agitant 1 min abans de la mesura de l'absorbància, que es va realitzar cada 2 h. L'experiment es va repetir dues vegades. La CMI es va establir com la concentració de pèptid més baixa sense creixement fúngic al final de l'experiment.

8.7.3 Anàlisi de l'activitat hemolítica

L'activitat hemolítica dels pèptids es va determinar a partir de l'hemoglobina alliberada d'una suspensió d'eritròcits de sang de cavall (5%). La sang es va centrifugar a 6000g durant 5 min, es va rentar tres vegades amb tampó TRIS (TRIS 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) i es va diluir 10 vegades.

Els pèptids es varen dissoldre en tampó TRIS a una concentració de 750, 500, 300 i 100 µM, i es varen barrejar amb la suspensió d'eritròcits de cavall (1:1). La mescla es va incubar durant 1 h sota agitació a 37°C. A continuació, es varen centrifugar els tubs a 3500g durant 10 min, el sobrenedant (80 µL) es va dissoldre en aigua (80 µL), la solució es va transferir a microplaques de 100 pous (Bioscreen) i es va mesurar l'absorbància a 540 nm. Es va utilitzar melitina 100 µM com a referència d'un 100% d'hemòlisi. El percentatge d'hemòlisi es va calcular mitjançant l'equació: $H = 100 \times [(Op - Ob)/(Om - Ob)]$, on Op és la densitat òptica del pèptid a la concentració assajada, Ob és la densitat òptica del tampó i Om la densitat òptica del control positiu (melitina).

8.7.4 Anàlisi de l'efecte dels pèptids en fulles de tabac

Per avaluar l'efecte dels pèptids en fulles de tabac, es va infiltrar una solució de cada pèptid (100 µl) a una concentració de 50, 150 i 250 µM al mesofil de fulles de tabac. Per cada pèptid i concentració es varen infiltrar almenys tres fulles distribuïdes aleatòriament en diferents plantes. Es va utilitzar aigua com a control negatiu i melitina com a control positiu. L'aparició de símptomes a les fulles es va mesurar com el diàmetre de la lesió provocada al cap de 48 h.

8.7.5 Anàlisi de l'efecte dels pèptids en la inducció de defenses en tomatera

Es varen sembrar llavors de tomàquet cv. Río Grande en llana de roca i es varen cultivar en condicions controlades d'hivernacle (25°C, 16 h de llum/15°C, 8 h de fosc i 60% d'humitat). Al cap de dues setmanes, les plàntules es varen trasplantar. El disseny experimental va consistir en tres rèpliques de tres plantes per tractament. Al cap de dues setmanes, les fulles de tomàquet es varen polvoritzar, fins al punt de goteig, amb solució aquosa del pèptid a analitzar, a més de **flg15** a 125 µM, àcid jasmònic a 2,5 mM, i acibenzolar-S-metil a 300 mg/L. Es varen utilitzar plantes polvoritzades amb aigua com a controls no tractats. Vint-i-quatre hores després de l'aplicació del producte, es varen recollir mostres de les fulles tractades i es varen processar per extreure'n l'ARN. El material vegetal es va polvoritzar amb nitrogen líquid amb un sistema Tissuelyzer II (Qiagen). L'ARN es va extreure de les fulles mitjançant el reactiu Pure-Link Plant RNA Reagent (Invitrogen, Life Technologies) i es va solubilitzar en aigua lliure de RNAsa.

Per analitzar la inducció de defenses en les plantes tractades, es va realitzar un assaig qPCR en un ciclador tèrmic fluoromètric (qPCR Quant Studio 5, Applied Biosystems) amb un SYBR1Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El volum de reacció total va ser de 20 μ l: 1 μ l de cada *primer*, 10 μ l de MixSyber Green, 6 μ l d'aigua destil·lada i 2 μ l de cDNA. Com a referència es va utilitzar el gen actina. Es varen analitzar els següents gens implicats en la resposta de defenses de plantes: *Harp*, *PR1*, *GluA*, *PPO*, *LOX*, *PinII*, *Sub1*, *ERT3*, *BPC*, *Osm2* i *Tas14*. Es varen utilitzar oligonucleòtids específics per a la quantificació dels gens objectiu. La concentració del *primer* va ser de 100 nM per a tots els gens, tret dels gens *GluA*, *Harp*, *PR1* i l'actina, pels que la concentració es va optimitzar a 300 nM. La quantificació relativa de l'expressió gènica es va fer mitjançant el mètode $\Delta\Delta Ct$. Els valors obtinguts es varen processar en relació amb el valor del gen actina i la importància estadística dels resultats per als pèptids seleccionats es va determinar mitjançant el *software* REST2009.

8.7.6 Anàlisi de l'estabilitat dels pèptids a la degradació per proteases

L'anàlisi de l'estabilitat dels pèptids enfront a la degradació per proteases es va realitzar tractant una solució de pèptid (50 μ g/ml) amb proteïnasa K (1 μ g/ml) en tampó TRIS 100 mM, pH 7,6, durant 60 min a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va analitzar la degradació del pèptid mitjançant HPLC. El percentatge de pèptid degradat es va calcular a partir de la relació amb l'àrea del senyal del pic del pèptid sense tractar.

9 Bibliografia

1. Oerke, EC. Crop losses to pests. *J Agric Sci.* 2006;144(1):31-43. doi:10.1017/S0021859605005708
2. Department of Economic and Social Affairs, UN. *World Population Prospects The 2017 Revision.* New York; 2017.
3. Russell, PE. A century of fungicide evolution. *J Agric Sci.* 2005;143(1):11-25. doi:10.1017/S0021859605004971
4. European Commission. EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public>. Accedit el 30 de maig, 2019.
5. Mansfield, J; Genin, S; Magori, S; Citovsky, V; Sriariyanum, M; Ronald, P; Dow, M; Verdier, V; Beer, S V.; Machado, MA; Toth, I; Salmond, G; Foster, GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(6):614-629. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
6. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). <https://www.eppo.int/index>. Accedit el 31 de maig, 2019.
7. Piqué, N; Miñana-Galbis, D; Merino, S; Tomás, JM. Virulence factors of *Erwinia amylovora*: A review. *Int J Mol Sci.* 2015;16:12836-12854. doi:10.3390/ijms160612836
8. Zhao, Y; Tian, Y; Wang, L; Geng, G; Zhao, W; Hu, B; Zhao, Y. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *J Integr Agric.* 2019;18(4):815-820. doi:10.1016/S2095-3119(18)62033-7
9. Mitrev, S; Kovacevic, B. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from peppers in macedonia. *J Plant Pathol.* 2006;88(3):321-324. doi:10.4454/jpp.v88i3.879
10. Osdaghi, E; Taghavi, SM; Hamzehzarghani, H; Lamichhane, JR. Occurrence and characterization of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas vesicatoria* on pepper in Iran. *J Phytopathol.* 2016;164(10):722-734. doi:10.1111/jph.12493
11. Mirik, M; Aysan, Y; Cinar, O. Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. *J Plant Pathol.* 2007;89(1):153-154. doi:10.4454/jpp.v89i1.737
12. Vandroemme, J; Baeyen, S; Van Vaerenbergh, J; De Vos, P; Maes, M. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathol.* 2008;57:438-444. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01813.x
13. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Data Sheets on Quarantine Pests Xanthomonas Fragariae.*; 2002.
14. Wang, H; McTavish, C; Turechek, WW. Colonization and movement of *Xanthomonas fragariae* in strawberry tissues. *Phytopathology.* 2018;108(6):681-690. doi:10.1094/phyto-10-17-0356-r
15. Morales, G; Moragrega, C; Montesinos, E; Llorente, I. Environmental and inoculum effects on epidemiology of bacterial spot disease of stone fruits and development of a disease forecasting system. *Eur J Plant Pathol.* 2018;152:635-651. doi:10.1007/s10658-018-1507-7

16. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *EPPO Bull.* 2006;36:129-133. doi:10.1111/j.1365-2338.2006.00925.x
17. Martín-Sanz, A; Pérez de la Vega, M; Murillo, J; Caminero, C. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. *Phytopathology.* 2013;103(7):673-681. doi:10.1094/phyto-08-12-0196-r
18. Nemchinov, LG; Shao, J; Maya, NL; Postnikova, OA; Samac, DA. Resistant and susceptible responses in alfalfa (*Medicago sativa*) to bacterial stem blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *PLoS One.* 2017;12(12):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0189781
19. Ivanović, Ž; Blagojević, J; Nikolić, I. Leaf spot disease on *Philodendron scandens*, *Ficus carica* and *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Serbia. *Eur J Plant Pathol.* 2018;151:1107-1113. doi:10.1007/s10658-018-1437-4
20. Mori, M; Sogou, K; Inoue, Y. Development of a selective medium and antisera for *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from seeds of barley and wheat. *J Gen Plant Pathol.* 2019;85:211-220. doi:10.1007/s10327-019-00838-w
21. Newberry, EA; Babu, B; Roberts, PD; Dufault, NS; Goss, EM; Jones, JB; Paret, ML. Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida. *Plant Dis.* 2018;102(3):511-518. doi:10.1094/pdis-07-17-1002-re
22. Hall, SJ; Dry, IB; Blanchard, CL; Whitelaw-Weckert, MA. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bacterial inflorescence rot in grapevine. *Plant Dis.* 2016;100(3):607-616. doi:10.1094/pdis-07-15-0806-re
23. Gutiérrez-Barranquero, JA; Cazorla, FM; de Vicente, A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgepodge” of the *Pseudomonas syringae* complex. *Front Plant Sci.* 2019;10:1-20. doi:10.3389/fpls.2019.00570
24. Xu, G-W; Gross, DC. Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* defective in syringomycin production. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(6):1345-1353.
25. Anselmi, M; Eliseo, T; Zanetti-Polzi, L; Fullone, MR; Fogliano, V; Di Nola, A; Paci, M; Grgurina, I. Structure of the lipodepsipeptide syringomycin E in phospholipids and sodium dodecylsulphate micelle studied by circular dichroism, NMR spectroscopy and molecular dynamics. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2011;1808:2102-2110. doi:10.1016/j.bbamem.2011.04.018
26. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Report of an Express Pest Risk Analysis for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *EPPO Bull.* 2011:1-4.
27. Flores, O; Prince, C; Nuñez, M; Vallejos, A; Mardones, C; Yañez, C; Besoain, X; Bastías, R. Genetic and phenotypic characterization of indole-producing isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* obtained from Chilean Kiwifruit Orchards. *Front Microbiol.* 2018;9:1-12. doi:10.3389/fmicb.2018.01907
28. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *EPPO Bull.* 2014;44(3):360-375. doi:10.1111/epp.12171
29. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Mini Data Sheet on*

- Pseudomonas Syringae* Pv. *Actinidiae*.; 2012.
30. Michielse, CB; Rep, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*. 2009;10(3):311-324. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x
 31. Dean, R; Van Kan, JAL; Pretorius, ZA; Hammond-Kosack, KE; Di Pietro, A; Spanu, PD; Rudd, JJ; Dickman, M; Kahmann, R; Ellis, J; Foster, GD. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(4):414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
 32. Gordon, TR. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annu Rev Phytopathol*. 2017;55:23-39. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-095919
 33. Jurick, WM; Janisiewicz, WJ; Saftner, RA; Vico, I; Gaskins, VL; Park, E; Forsline, PL; Fazio, G; Conway, WS. Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. *Plant Breed*. 2011;130:481-486. doi:10.1111/j.1439-0523.2011.01849.x
 34. Barad, S; Horowitz, SB; Kobiler, I; Sherman, A; Prusky, D. Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2014;27(1):66-77. doi:10.1094/mpmi-05-13-0138-r
 35. Zhang, X; Fu, M. Inhibitory effect of chlorine dioxide (ClO₂) fumigation on growth and patulin production and its mechanism in *Penicillium expansum*. *Lwt - Food Sci Technol*. 2018;96:335-343. doi:10.1016/j.lwt.2018.05.051
 36. Project, R. RosBREED. <https://www.rosbreed.org/>. Accedit el 27 de setembre, 2019.
 37. Mahlapuu, M; Håkansson, J; Ringstad, L; Björn, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:1-12. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
 38. Lorenzon, EN; Piccoli, JP; Santos-Filho, NA; Cilli, EM. Dimerization of antimicrobial peptides: a promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. *Protein Pept Lett*. 2019;26(2):98-107. doi:10.2174/0929866526666190102125304
 39. Kumar, P; Kizhakkedathu, JN; Straus, SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*. 2018;8(4):1-24. doi:10.3390/biom8010004
 40. Andersson, DI; Hughes, D; Kubicek-Sutherland, JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat*. 2016;26:43-57. doi:10.1016/j.drug.2016.04.002
 41. Dept of Pathology & Microbiology, U. The antimicrobial peptide database. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Accedit el 21 de juny, 2019.
 42. Koehbach, J; Craik, DJ. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(7):517-528. doi:10.1016/j.tips.2019.04.012
 43. Eckert, R. Road to clinical efficacy: Challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiol*. 2011;6(6):635-651. doi:10.2217/fmb.11.27
 44. Machado, V; Gelinski, J; Baratto, CM; Borges, EM; Vicente, VA; Mariana, MF. Technological potential of antimicrobial peptides: A systematic review. *Indian J Pharm Sci*.

- 2019;81(5):807-814. doi:10.36468/pharmaceutical-sciences.574
45. Silva, PI; Daffre, S; Bulet, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33464-33470. doi:10.1074/jbc.M001491200
 46. Cavalcante, CSP; Falcão, CB; Fontenelle, ROS; Andreu, D; Rádís-Baptista, G. Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J Antibiot (Tokyo).* 2017;70(3):231-237. doi:10.1038/ja.2016.135
 47. Fogaça, AC; Zaini, PA; Wulff, NA; Da Silva, PIP; Fázio, MA; Miranda, A; Daffre, S; Da Silva, AM. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;306(2):152-159. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01950.x
 48. Le, C-F; Fang, C-M; Devi Sekaran, S. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4):1-16. doi:10.1128/AAC.02340-16
 49. Bektas, Y; Eulgem, T. Synthetic plant defense elicitors. *Front Plant Sci.* 2015;5:1-17. doi:10.3389/fpls.2014.00804
 50. Feijó Corrêa, JA; Gonçalves Evangelista, A; de Melo Nazareth, T; Bittencourt Luciano, F. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia.* 2019;8. doi:10.1016/J.MTLA.2019.100494
 51. Yui Ong, Z; Wiradharma, N; Yan Yang, Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;78:28-45. doi:10.1016/j.addr.2014.10.013
 52. Bechinger, B; Gorr, SU. Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance. *J Dent Res.* 2016;96(3):254-260. doi:10.1177/0022034516679973
 53. Mechler, L; Bonetti, EJ; Reichert, S; Flötenmeyer, M; Schrenzel, J; Bertram, R; François, P; Götz, F. Daptomycin tolerance in the *Staphylococcus aureus* pitA6 mutant is due to upregulation of the *dlt* operon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):2684-2691. doi:10.1128/AAC.03022-15
 54. van der Weerden, NL; Bleackley, MR; Anderson, MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:3545-3570. doi:10.1007/s00018-013-1260-1
 55. Mania, D; Hilpert, K; Ruden, S; Fischer, R; Takeshita, N. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(21):7102-7108. doi:10.1128/AEM.01560-10
 56. Bleackley, MR; Dawson, CS; Payne, JAE; Harvey, PJ; Rosengren, JK; Quimbar, P; Garcia-Ceron, D; Lowe, R; Bulone, V; van der Weerden, Nicole L. Craik, DJ; Anderson, MA. Interactions with fungal cell wall polysaccharides determines the salt tolerance of antifungal plant defensins. *Cell Surf.* 2019;5:1-12. doi:10.1016/j.tesw.2019.100026
 57. Mishra, B; Reiling, S; Zarena, D; Wang, G. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;38:87-96. doi:10.1016/j.cbpa.2017.03.014

58. Sheppard, DC. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(4):375-379. doi:10.1016/j.mib.2011.07.006
59. Free, SJ. *Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis*. Vol 81. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6
60. Kanthawong, S; Bolscher, JGM; Veerman, ECI; Van Marle, J; De Soet, HJJ; Nazmi, K; Wongratanacheewin, S; Taweechaisupapong, S. Antimicrobial and antibiofilm activity of LL-37 and its truncated variants against *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):39-44. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.010
61. Kwon, JY; Kim, MK; Mereuta, L; Seo, CH; Luchian, T; Park, Y. Mechanism of action of antimicrobial peptide P5 truncations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *AMB Express.* 2019;9(1):1-15. doi:10.1186/s13568-019-0843-0
62. Nguyen, LT; Chau, JK; Perry, NA; de Boer, L; Zaat, SAJ; Vogel, HJ. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS One.* 2010;5(9):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0012684
63. Svenson, J; Stensen, W; Brandsdal, BO; Haug, BE; Monrad, J; Svendsen, JS. Antimicrobial peptides with stability toward tryptic degradation. *Biochemistry.* 2008;47(12):3777-3788. doi:10.1021/bi7019904
64. Erak, M; Bellmann-Sickert, K; Els-Heindl, S; Beck-Sickinger, AG. Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorganic Med Chem.* 2018;26(10):2759-2765. doi:10.1016/j.bmc.2018.01.012
65. Lee, MR; Raman, N; Gellman, SH; Lynn, DM; Palecek, SP. Incorporation of β -amino acids enhances the antifungal activity and selectivity of the helical antimicrobial peptide aurein 1.2. *ACS Chem Biol.* 2017;12(12):2975-2980. doi:10.1021/acscchembio.7b00843
66. Dewangan, RP; Bisht, GS; Singh, VP; Yar, MS; Pasha, S. Design and synthesis of cell selective α/β -diastereomeric peptidomimetic with potent in vivo antibacterial activity against methicillin resistant *S. Aureus*. *Bioorg Chem.* 2018;76:538-547. doi:10.1016/j.bioorg.2017.12.020
67. Sharma, D; Choudhary, M; Vashistt, J; Shrivastava, R; Bisht, GS. Cationic antimicrobial peptide and its poly-N-substituted glycine congener: Antibacterial and antibiofilm potential against *A. baumannii*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;518(3):472-478. doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.062
68. Giuliani, A; Rinaldi, AC. Beyond natural antimicrobial peptides: Multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(13):2255-2266. doi:10.1007/s00018-011-0717-3
69. Li, W; O'Brien-Simpson, NM; Yao, S; Tailhades, J; Reynolds, EC; Dawson, RM; Otvos, L; Hossain, MA; Separovic, F; Wade, JD. C-Terminal modification and multimerization increase the efficacy of a proline-rich antimicrobial peptide. *Chem - A Eur J.* 2017;23(2):390-396. doi:10.1002/chem.201604172
70. Jiang, X; Qian, K; Liu, G; Sun, L; Zhou, G; Li, J; Fang, X; Ge, H; Lv, Z. Design and activity study of a melittin–thanatin hybrid peptide. *AMB Express.* 2019;9(14):1-6. doi:10.1186/s13568-019-0739-z
71. Wade, HM; Darling, LEO; Elmore, DE. Hybrids made from antimicrobial peptides with

- different mechanisms of action show enhanced membrane permeabilization. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2019;1861(10). doi:10.1016/j.bbamem.2019.05.002
72. Al Tall, Y; Abualhajjaa, A; Alsaggar, M; Almaaytah, A; Masadeh, M; Alzoubi, KH. Design and characterization of a new hybrid peptide from LL-37 and BMAP-27. *Infect Drug Resist.* 2019;12:1035-1045. doi:10.2147/IDR.S199473
73. Gao, Y; Fang, H; Fang, L; Liu, D; Liu, J; Su, M; Fang, Z; Ren, W; Jiao, H. The modification and design of antimicrobial peptide. *Curr Pharm Des.* 2018;24(8):904-910. doi:10.2174/1381612824666180213130318
74. David, AA; Park, SE; Parang, K; Tiwari, RK. Antibiotics-peptide conjugates against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(22):1926-1936. doi:10.2174/1568026619666181129141524
75. Deshayes, S; Xian, W; Schmidt, NW; Kordbacheh, S; Lieng, J; Wang, J; Zарmer, S; Germain, SS; Voyen, L; Thulin, J; Wong, GCL; Kasko, AM. Designing hybrid antibiotic peptide conjugates to cross bacterial membranes. *Bioconjug Chem.* 2017;28(3):793-804. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00725
76. Rodriguez, CA; Papanastasiou, EA; Juba, M; Bishop, B. Covalent modification of a ten-residue cationic antimicrobial peptide with levofloxacin. *Front Chem.* 2014;2:1-12. doi:10.3389/fchem.2014.00071
77. Lu, X; Liu, J; Gou, L; Li, J; Yuan, B; Yang, K; Ma, Y. Designing melittin-graphene hybrid complexes for enhanced antibacterial activity. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(9):1-10. doi:10.1002/adhm.201801521
78. Chow, HY; Zhang, Y; Matheson, E; Li, X. Ligation technologies for the synthesis of cyclic peptides. *Chem Rev.* 2019;119(17):9971-10001. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00657
79. Van'T Hof, W; Hansenová Maňásková, S; Veerman, ECI; Bolscher, JGM. Sortase-mediated backbone cyclization of proteins and peptides. *Biol Chem.* 2015;396(4):283-293. doi:10.1515/hsz-2014-0260
80. Lau, YH; De Andrade, P; Wu, Y; Spring, DR. Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries. *Chem Soc Rev.* 2015;44(1):91-102. doi:10.1039/c4cs00246f
81. Lu, Y; Freeland, S. On the evolution of the standard amino-acid alphabet. *Genome Biol.* 2006;7(1):102.1-102.6. doi:10.1186/gb-2006-7-1-102
82. Huang, Y; He, L; Li, G; Zhai, N; Jiang, H; Chen, Y. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein Cell.* 2014;5(8):631-642. doi:10.1007/s13238-014-0061-0
83. Li, H; Anuwongcharoen, N; Malik, AA; Prachayasittikul, V; Wikberg, JES; Nantasenamat, C. Roles of D-amino acids on the bioactivity of host defense peptides. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1-27. doi:10.3390/ijms17071023
84. Sun, S; Zhao, G; Huang, Y; Cai, M; Yan, Q; Wang, H; Chen, Y. Enantiomeric effect of D-amino acid substitution on the mechanism of action of α -helical membrane-active peptides. *Int J Mol Sci.* 2018;19(67):1-13. doi:10.3390/ijms19010067
85. Jia, F; Wang, J; Peng, J; Zhao, P; Kong, Z; Wang, K; Yan, W; Wang, R. D-amino acid substitution enhances the stability of antimicrobial peptide polybia-CP. *Acta Biochim*

- Biophys Sin (Shanghai)*. 2017;49(10):916-925. doi:10.1093/abbs/gmx091
86. Koh, J-J; Lin, S; Beuerman, RW; Liu, S. Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: designs and synthetic approaches. *Amino Acids*. 2017;49(10):1653-1677. doi:10.1007/s00726-017-2476-4
 87. Czechowicz, P; Nowicka, J. Antimicrobial activity of lipopeptides. *Postep Mikrobiol*. 2018;57(3):213-226.
 88. Meena, KR; Kanwar, SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/473050
 89. Balleza, D; Alessandrini, A; Beltrán García, MJ. Role of lipid composition, physicochemical interactions, and membrane mechanics in the molecular actions of microbial cyclic lipopeptides. *J Membr Biol*. 2019;252(2):131-157. doi:10.1007/s00232-019-00067-4
 90. Shahane, G; Ding, W; Palaiokostas, M; Azevedo, HS; Orsi, M. Interaction of antimicrobial lipopeptides with bacterial lipid bilayers. *J Membr Biol*. 2019;252(4):317-329. doi:10.1007/s00232-019-00068-3
 91. Cochrane, SA; Vederas, JC. Unacylated tridecaptin A1 acts as an effective sensitiser of Gram-negative bacteria to other antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(6):493-499. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.08.008
 92. Desjardine, K; Pereira, A; Wright, H; Maitainaho, T; Kelly, M; Andersen, RJ. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: Structure elucidation and synthesis. *J Nat Prod*. 2007;70(12):1850-1853. doi:10.1021/np070209r
 93. Mandal, SM; Barbosa, AEAD; Franco, OL. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. *Biotechnol Adv*. 2013;31(2):338-345. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.004
 94. Sieber, SA; Marahiel, MA. Learning from nature's drug factories : Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J Bacteriol*. 2003;185(24):7036-7043. doi:10.1128/JB.185.24.7036
 95. Schimana, J; Gebhardt, K; Holtzel, A; G. Schmid, D; Süßmuth, R; Müller, J; Pukall, R; Fiedler, H-P. Arylomycins A and B, new biaryl-bridged lipopeptide antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Tü 6075. *J Antibiot*. 2002;55(6):565-570.
 96. Robbel, L; Marahiel, MA. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem*. 2010;285(36):27501-27508. doi:10.1074/jbc.R110.128181
 97. Wood, TM; Martin, NI. The calcium-dependent lipopeptide antibiotics: structure, mechanism, and medicinal chemistry. *Medchemcomm*. 2019;10(5):634-646. doi:10.1039/C9MD00126C
 98. Laverty, G; McLaughlin, M; Shaw, C; Gorman, SP; Gilmore, BF. Antimicrobial activity of short, synthetic cationic lipopeptides. *Chem Biol Drug Des*. 2010;75(6):563-569. doi:10.1111/j.1747-0285.2010.00973.x
 99. Siano, A; Tonarelli, G; Larpin, D; Imaz, MS; Alvarez, C; Zerbini, E. Analogues of human Granulysin as antimycobacterial agents. *Int J Pept Res Ther*. 2019;25(2):691-696.

- doi:10.1007/s10989-018-9715-8
100. Kihara, S; De Zoysa, GH; Shahlori, R; Vadakkedath, PG; Ryan, TM; Mata, JP; Sarojini, V; McGillivray, DJ. Solution structure of linear battacin lipopeptides – the effect of lengthening fatty acid chain. *Soft Matter*. 2019;15(37):7501-7508. doi:10.1039/c9sm00932a
 101. De Zoysa, GH; Cameron, AJ; Hegde, V V.; Raghothama, S; Sarojini, V. Antimicrobial peptides with potential for biofilm eradication: Synthesis and structure activity relationship studies of battacin peptides. *J Med Chem*. 2015;58(2):625-639. doi:10.1021/jm501084q
 102. Sánchez-Gómez, S; Ferrer-Espada, R; S. Stewart, P; Pitts, B; Lohner, K; Martínez De Tejada, G. Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms. *BMC Microbiol*. 2015;15:1-11. doi:10.1186/s12866-015-0473-x
 103. Makovitzki, A; Viterbo, A; Brotman, Y; Chet, I; Shai, Y. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens in vitro and in planta with ultrashort cationic lipopeptides. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(20):6629-6636. doi:10.1128/AEM.01334-07
 104. Brotman, Y; Makovitzki, A; Shai, Y; Chet, I; Viterbo, A. Synthetic ultrashort cationic lipopeptides induce systemic plant defense responses against bacterial and fungal pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(16):5373-5379. doi:10.1128/AEM.00724-09
 105. Camó, C; Bonaterra, A; Badosa, E; Baró, A; Montesinos, L; Montesinos, E; Planas, M; Feliu, L. Antimicrobial peptide KSL-W and analogues: Promising agents to control plant diseases. *Peptides*. 2019;112:85-95. doi:10.1016/j.peptides.2018.11.009
 106. Vilà, S; Badosa, E; Montesinos, E; Planas, M; Feliu, L. Synthetic cyclolipopeptides selective against microbial, plant and animal cell targets by incorporation of D-amino acids or histidine. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151639. doi:10.1371/journal.pone.0151639
 107. Vilà, S; Badosa, E; Montesinos, E; Feliu, L; Planas, M. A convenient solid-phase strategy for the synthesis of antimicrobial cyclic lipopeptides. *Org Biomol Chem*. 2013;11(20):3365-3374. doi:10.1039/c3ob40319j
 108. Andreu, D; Ubach, J; Boman, A; Wåhlin, B; Wade, D; Merrifield, RB; Boman, HG. Shortened cecropin A-melittin hybrids significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett*. 1992;296(2):190-194. doi:10.1016/0014-5793(92)80377-S
 109. Wade, D; Andreu, D; Mitchell, SA; Silveira, AMV; Boman, A; Boman, HG; Merrifield, RB. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int J Pept Protein Res*. 1992;40(5):429-436. doi:10.1111/j.1399-3011.1992.tb00321.x
 110. Boman, HG; Wade, D; Boman, IA; Wåhlin, B; Merrifield, RB. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett*. 1989;259(1):103-106. doi:10.1016/0014-5793(89)81505-4
 111. Cavallarin, L; Andreu, D; San Segundo, B. Cecropin A—derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact*. 1998;11(3):218-227. doi:10.1094/mpmi.1998.11.3.218
 112. Ali, GS; Reddy, ASN. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: In vitro growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2000;13(8):847-859.

doi:10.1094/mpmi.2000.13.8.847

113. Ferre, R; Badosa, E; Feliu, L; Planas, M; Montesinos, E; Bardají, E. Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(5):3302-3308. doi:10.1128/AEM.72.5.3302-3308.2006
114. Badosa, E; Ferre, R; Planas, M; Feliu, L; Besalú, E; Cabrefiga, J; Bardají, E; Montesinos, E. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides.* 2007;28:2276-2285. doi:10.1016/j.peptides.2007.09.010
115. Badosa, E; Ferré, R; Francés, J; Bardají, E; Feliu, L; Planas, M; Montesinos, E. Sporidical activity of synthetic antifungal undecapeptides and control of *Penicillium* rot of apples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(17):5563-5569. doi:10.1128/AEM.00711-09
116. Alves, CS; Kairys, V; Castanho, MARB; Fernandes, MX. Interaction of antimicrobial peptides, BP100 and pepR, with model membrane systems as explored by brownian dynamics simulations on a coarse-grained model. *Biopolymers.* 2012;98(4):294-312. doi:10.1002/bip.22075
117. Park, P; Franco, LR; Chaimovich, H; Coutinho, K; Cuccovia, IM; Lima, FS. Binding and flip as initial steps for BP-100 antimicrobial actions. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-45075-5
118. Ferre, R; Melo, MN; Correia, AD; Feliu, L; Bardají, E; Planas, M; Castanho, M. Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. *Biophys J.* 2009;96(5):1815-1827. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.053
119. Alves, CS; Melo, MN; Franquelim, HG; Ferre, R; Planas, M; Feliu, L; Bardají, E; Kowalczyk, W; Andreu, D; Santos, NC; Fernandes, MX; Castanho, MARB. Escherichia coli cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *J Biol Chem.* 2010;285(36):27536-27544. doi:10.1074/jbc.M110.130955
120. Manzini, MC; Perez, KR; Riske, KA; et al. Peptide:Lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2014;1838(7):1985-1999. doi:10.1016/j.bbamem.2014.04.004
121. Wadhwani, P; Strandberg, E; van den Berg, J; Mink, C; Bürck, J; Ciriello, RAM; Ulrich, AS. Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2014;1838(3):940-949. doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.001
122. Wang, Y; Zhao, T; Wei, D; Strandberg, E; Ulrich, AS; Ulmschneider, JP. How reliable are molecular dynamics simulations of membrane active antimicrobial peptides? *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2014;1838(9):2280-2288. doi:10.1016/j.bbamem.2014.04.009
123. Misiewicz, J; Afonin, S; Grage, SL; van den Berg, J; Strandberg, E; Wadhwani, P; Ulrich, AS. Action of the multifunctional peptide BP100 on native biomembranes examined by solid-state NMR. *J Biomol NMR.* 2015;61(3):287-298. doi:10.1007/s10858-015-9897-8
124. Zamora-Carreras, H; Strandberg, E; Mühlhäuser, P; Bürck, J; Wadhwani, P; Jiménez, MÁ; Bruix, M; Ulrich, AS. Alanine scan and 2H NMR analysis of the membrane-active peptide BP100 point to a distinct carpet mechanism of action. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858(6):1328-1338. doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.014
125. Carretero, GPB; Saraiva, GKV; Cauz, ACG; Rodrigues, MA; Kiyota, S; Riske, KA; dos Santos,

- AA; Pinatto-Botelho, MF; Bemquerer, MP; Gueiros-Filho, FJ; Chaimovich, H; Schreier, S; Cuccovia, IM. Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2018;1860(8):1502-1516. doi:10.1016/j.bbamem.2018.05.003
126. Torcato, IM; Huang, YH; Franquelim, HG; Gaspar, D; Craik, DJ; Castanho, MARB; Troeira Henriques, S. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2013;1828(3):944-955. doi:10.1016/j.bbamem.2012.12.002
127. Oddo, A; Thomsen, TT; Kjelstrup, S; Gorey, C; Franzyk, H; Frimodt-Møller, N; Løbner-Olesen, A; Hansen, PR. An amphipathic undecapeptide with all D-amino acids shows promising activity against colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and a dual mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):592-599. doi:10.1128/aac.01966-15
128. Güell, I; Micaló, L; Cano, L; Badosa, E; Ferre, R; Montesinos, E; Bardají, E; Feliu, L; Planas, M. Peptidotriazoles with antimicrobial activity against bacterial and fungal plant pathogens. *Peptides.* 2012;33(1):9-17. doi:10.1016/j.peptides.2011.12.003
129. Güell, I; Cabrefiga, J; Badosa, E; Ferre, R; Talleda, M; Bardají, E; Planas, M; Feliu, L; Montesinos, E. Improvement of the efficacy of linear undecapeptides against plant-pathogenic bacteria by incorporation of D-amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(8):2667-2675. doi:10.1128/AEM.02759-10
130. Güell, I; Ferre, R; Sørensen, KK; Badosa, E; Ng-Choi, I; Montesinos, E; Bardaji, E; Feliu, L; Jensen, KJ; Planas, M. Multivalent display of the antimicrobial peptides BP100 and BP143. *Beilstein J Org Chem.* 2012;8:2106-2117. doi:10.3762/bjoc.8.237
131. Badosa, E; Moiset, G; Montesinos, L; Talleda, M; Bardají, E; Feliu, L; Planas, M; Montesinos, E. Derivatives of the antimicrobial peptide BP100 for expression in plant systems. Wu K, ed. *PLoS One.* 2013;8(12):e85515. doi:10.1371/journal.pone.0085515
132. Montesinos, L; Bundó, M; Badosa, E; San Segundo, B; Coca, M; Montesinos, E. Production of BP178, a derivative of the synthetic antibacterial peptide BP100, in the rice seed endosperm. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):1-14. doi:10.1186/s12870-017-1011-9
133. Torres, LMFC; Braga, NA; Gomes, IP; et al. Nanobiostructure of fibrous-like alumina functionalized with an analog of the BP100 peptide: Synthesis, characterization and biological applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;163:275-283. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.01.001
134. Torres, LMFC; Almeida, MT; Santos, TL; et al. Antimicrobial alumina nanobiostructures of disulfide- and triazole-linked peptides: Synthesis, characterization, membrane interactions and biological activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;177:94-104. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.01.052
135. Zhang, B; Gu, H; Shi, W; Li, H; Ma, G; Chen, X; Qian, H; Lin, H; Huang, W; Ge, L. Synthesis and biological evaluation of novel aliphatic acid-conjugated antimicrobial peptides as potential agents with anti-tumor, multidrug resistance-reversing activity and enhanced stability. *Amino Acids.* 2017;49(11):1831-1841. doi:10.1007/s00726-017-2482-6
136. Eales, MG; Ferrari, E; Goddard, AD; Lancaster, L; Sanderson, P; Miller, C. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii*.

- Res Microbiol.* 2018;169(6):296-302. doi:10.1016/j.resmic.2018.04.005
137. Soler, M; González-Bártulos, M; Soriano-Castell, D; Ribas, X; Costas, M; Tebar, F; Massaguer, A; Feliu, L; Planas, M. Identification of BP16 as a non-toxic cell-penetrating peptide with highly efficient drug delivery properties. *Org Biomol Chem.* 2014;12(10):1652-1663. doi:10.1039/c3ob42422g
 138. Zhang, B; Shi, W; Li, J; Liao, C; Li, M; Huang, W; Qian, H. Design, synthesis and biological evaluation of novel peptides as potential agents with anti-tumor and multidrug resistance-reversing activities. *Amino Acids.* 2017;49(8):1355-1364. doi:10.1007/s00726-017-2434-1
 139. Zhang, B; Shi, W; Li, J; Liao, C; Yang, L; Huang, W; Qian, H. Synthesis and biological evaluation of novel peptides based on antimicrobial peptides as potential agents with antitumor and multidrug resistance-reversing activities. *Chem Biol Drug Des.* 2017;90(5):972-980. doi:10.1111/cbdd.13023
 140. Derakhshankhah, H; Jafari, S. Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1090-1096. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.097
 141. Eggenberger, K; Mink, C; Wadhwani, P; Ulrich, AS; Nick, P. Using the peptide Bp100 as a cell-penetrating tool for the chemical engineering of actin filaments within living plant cells. *ChemBioChem.* 2011;12(1):132-137. doi:10.1002/cbic.201000402
 142. Eggenberger, K; Sanyal, P; Hundt, S; Wadhwani, P; Ulrich, AS; Nick, P. Challenge integrity: The cell-penetrating peptide BP100 interferes with the auxin-actin oscillator. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(1):71-85. doi:10.1093/pcp/pcw161
 143. Gao, N; Wadhwani, P; Mühlhäuser, P; Liu, Q; Riemann, M; Ulrich, AS; Nick, P. An antifungal protein from *Ginkgo biloba* binds actin and can trigger cell death. *Protoplasma.* 2016;253(4):1159-1174. doi:10.1007/s00709-015-0876-4
 144. Lakshmanan, M; Kodama, Y; Yoshizumi, T; Sudesh, K; Numata, K. Rapid and efficient gene delivery into plant cells using designed peptide carriers. *Biomacromolecules.* 2013;14(1):10-16. doi:10.1021/bm301275g
 145. Ng, KK; Motoda, Y; Watanabe, S; Othman, AS; Kigawa, T; Kodama, Y; Numata, K. Intracellular delivery of proteins via fusion peptides in intact plants. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154081. doi:10.1371/journal.pone.0154081
 146. Numata, K; Ohtani, M; Yoshizumi, T; Demura, T; Kodama, Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant Biotechnol J.* 2014;12(8):1027-1034. doi:10.1111/pbi.12208
 147. Chuah, J-A; Yoshizumi, T; Kodama, Y; Numata, K. Gene introduction into the mitochondria of *Arabidopsis thaliana* via peptide-based carriers. *Sci Rep.* 2015;5:1-7. doi:10.1038/srep07751
 148. Lakshmanan, M; Yoshizumi, T; Sudesh, K; Kodama, Y; Numata, K. Double-stranded DNA introduction into intact plants using peptide-DNA complexes. *Plant Biotechnol.* 2015;32(1):39-45. doi:10.5511/plantbiotechnology.14.1210b
 149. Midorikawa, K; Kodama, Y; Numata, K. Vacuum/compression infiltration-mediated permeation pathway of a peptide-pDNA complex as a non-viral carrier for gene delivery in planta. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-018-36466-1

150. Miyamoto, T; Tsuchiya, K; Numata, K. Block copolymer/plasmid DNA micelles postmodified with functional peptides via thiol-maleimide conjugation for efficient gene delivery into plants. *Biomacromolecules*. 2019;20(2):653-661. doi:10.1021/acs.biomac.8b01304
151. Thagun, C; Chuah, J; Numata, K. Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating and chloroplast-targeting peptides. *Adv Sci*. 2019;1902064:1-14. doi:10.1002/advs.201902064
152. Islam, MM; Odahara, M; Yoshizumi, T; Oikawa, K; Kimura, M; Su'etsugu, M; Numata, K. Cell-penetrating peptide-mediated transformation of large plasmid DNA into *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*. 2019;8(5):1215-1218. doi:10.1021/acssynbio.9b00055
153. Higuchi-Takeuchi, M; Morisaki, K; Numata, K. Method for the facile transformation of marine purple photosynthetic bacteria using chemically competent cells. *Microbiol Open*. 2019;1-9. doi:10.1002/mbo3.953
154. Oikawa, K; Islam, MM; Horii, Y; Yoshizumi, T; Numata, K. Screening of a cell-penetrating peptide library in *Escherichia coli*: Relationship between cell penetration efficiency and cytotoxicity. *ACS Omega*. 2018;3(12):16489-16499. doi:10.1021/acsomega.8b02348
155. Numata, K; Horii, Y; Oikawa, K; Miyagi, Y; Demura, T; Ohtani, M. Library screening of cell-penetrating peptide for BY-2 cells, leaves of *Arabidopsis*, tobacco, tomato, poplar, and rice callus. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-17. doi:10.1038/s41598-018-29298-6
156. Badosa, E; Montesinos, L; Ruz, L; Cabrefiga, J; Planas, M; Feliu, L; Montesinos, E. Control of fire blight infections with synthetic peptides that elicit plant defense responses. *J Plant Pathol*. 2017;99:65-73. doi:10.4454/jpp.v99i0.3915
157. Kates, F.; Albericio, SA. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*. Sheffield: CRC Press; 2000.
158. Subirós-Funosas, R; Prohens, R; Barbas, R; El-Faham, A; Albericio, F. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem - Eur J*. 2009;15(37):9394-9403. doi:10.1002/chem.200900614
159. Chhabra, SR; Hothi, B; Evans, DJ; White, PD; Bycroft, BW; Chan, WC. An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*. 1998;39(12):1603-1606. doi:10.1016/S0040-4039(97)10828-0
160. Jerala, R. Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(8):1159-1169. doi:10.1517/13543784.16.8.1159
161. Mangoni, ML; Shai, Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: Similarities and differences in cell specificities and modes of action. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(13):2267-2280. doi:10.1007/s00018-011-0718-2
162. Malina, A; Shai, Y. Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*. 2005;390:695-702. doi:10.1042/BJ20050520
163. Ng-Choi, I; Soler, M; Cerezo, V; Badosa, E; Montesinos, E; Planas, M; Feliu, L. Solid-phase synthesis of 5-arylhistidine-containing peptides with antimicrobial activity through a microwave-assisted Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Eur J Org Chem*. 2012:4321-4332. doi:10.1002/ejoc.201200291

164. Felix, G; Duran, JD; Volko, S; Boller, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 1999;18(3):265-276. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x
165. Meindl, T; Boller, T; Felix, G. The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept. *Plant Cell.* 2000;12(9):1783-1794. doi:10.1105/tpc.12.9.1783
166. Miyashita, M; Oda, M; Ono, Y; Komoda, E; Miyagawa, H. Discovery of a small peptide from combinatorial libraries that can activate the plant immune system by a jasmonic acid signaling pathway. *ChemBioChem.* 2011;12(9):1323-1329. doi:10.1002/cbic.201000694
167. Camó, C; Supervisada: Planas, M; Feliu, L. KSL-W analogues, peptide conjugates and tryptophan-containing cyclic peptides with activity against plant pathogens; Universitat de Girona. 2019. <http://hdl.handle.net/10256/17902>.
168. Jindal, MH; Le, CF; Mohd Yusof, MY; Sekaran, SD. Net charge, hydrophobicity and specific amino acids contribute to the activity of antimicrobial peptides. *J Heal Transl Med.* 2014;17(1):1-7. doi:10.22452/jummec.vol17no1.1
169. Jiang, Z; Vasil, AI; Hale, JD; Hancock, REW; Vasil, ML; Hodges, RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolym - Pept Sci Sect.* 2008;90(3):369-383. doi:10.1002/bip.20911
170. Krämer, W; Schirmer, U; Jeschke, P; Witschel, M, eds. *Modern Crop Protection Compounds.* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2012.
171. Li, R; Chen, Z; Tao, Y; Pan, X; Jiang, D; Dong, F; Xu, J; Liu, X; Wu, X; Zheng, Y. Determination of valifenalate in grape, vegetables, and soil using ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and exploration of its degradation behavior in grape field. *Food Anal Methods.* 2019;12(3):742-751. doi:10.1007/s12161-018-1399-3
172. Coghlan, MJ; Krumkalns, E V.; Caley, BA; Hall, HR; Arnold, WR. Novel agents for the control of cereal and grape powdery mildew. In: R. Baker D, G. Fenyes J, K. Moberg W, eds. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II, ACS Symposium Series, Vol. 443.* Washington DC; 1991:538-552. doi:10.1021/bk-1991-0443.ch043
173. Arnold, WR; Coghlan, MJ; Krumkalns, EV; Jourdan, GP; Suhr, RG. Quinoline, quinazoline, and cinnoline fungicides. Patent EP 0 326 330 A2. 1989.
174. Qiu, Y; Hou, Y; Sun, F; Chen, P; Wang, D; Mu, H; Zhang, X; Ding, K; Duan, J. Hyaluronic acid conjugation facilitates clearance of intracellular bacterial infections by streptomycin with neglectable nephrotoxicity. *Glycobiology.* 2017;27(9):861-867. doi:10.1093/glycob/cwx061
175. Zhang, A; Mu, H; Zhang, W; Cui, G; Zhu, J; Duan, J. Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. *Sci Rep.* 2013;3(3364):1-7. doi:10.1038/srep03364
176. Pels, K; Kodadek, T. Solid-phase synthesis of diverse peptide tertiary amides by reductive amination. *ACS Comb Sci.* 2015;17(3):152-155. doi:10.1021/acscombsci.5b00007
177. Santini, R; Griffith, MC; Qi, M. A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1998;39(49):8951-8954. doi:10.1016/S0040-4039(98)02069-3

178. Tofteng Shelton, P; Jensen, KJ. Peptide synthesis and applications: Linkers, resins, and general procedures for SPPS. In: Jensen KJ, Tofteng Shelton P, Pendersen S, eds. *Peptide Synthesis and Applications. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol 1047. Totowa: Humana Press; 2013. doi:10.1007/978-1-62703-544-6
179. Cordes, EH; Jencks, WP. The mechanism of hydrolysis of schiff bases derived from aliphatic amines. *J Am Chem Soc.* 1963;85(18):2843-2848. doi:10.1021/ja00901a037
180. Fuentes-Martinez, JP; Gutiérrez-Rodríguez, D; Garcia, ER; Rivera-Márquez, KI; Medrano, F; Torres-Ángeles, O; Castillo-Vargas, E; Duque Montaña, BE; Godoy-Alcántar, C. Streptomycin hydrazone derivatives: synthesis and molecular recognition in aqueous solution. *Nat Prod Commun.* 2014;9(10):1449-1455. doi:10.1177/1934578X1400901012
181. Millington, CR; Quarrell, R; Lowe, G. Aryl hydrazides as linkers for solid phase synthesis which are cleavable under mild oxidative conditions. *Tetrahedron Lett.* 1998;39(39):7201-7204. doi:10.1016/S0040-4039(98)01543-3
182. de la Cruz, A; Elguero, J; Goya, P; Martinez, A. Tautomerism and acidity in 4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron.* 1992;48(29):6135-6150. doi:10.1016/S0040-4020(01)89860-4
183. Price, CC; Roberts, RM. 4,7-Dichloroquinoline. *Org Synth.* 1948;28:38. doi:10.15227/orgsyn.028.0038
184. Robey, RL; Alt, CA; DeAmicis, C V. Process for the preparation of 4-phenoxyquinoline compounds. Patent EP 0 569 021 A1. 1993.
185. Mattsson, S; Dahlström, M; Karlsson, S. A mild hydrolysis of esters mediated by lithium salts. *Tetrahedron Lett.* 2007;48(14):2497-2499. doi:10.1016/j.tetlet.2007.02.029
186. Berjanskii, M V.; Wishart, DS. A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts. *J Am Chem Soc.* 2005;127(43):14970-14971. doi:10.1021/ja054842f
187. Hafsa, NE; Arndt, D; Wishart, DS. CSI 3.0: A web server for identifying secondary and super-secondary structure in proteins using NMR chemical shifts. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W370-W377. doi:10.1093/nar/gkv494
188. Ongena, M; Jourdan, E; Adam, A; Paquot, M; Brans, A; Joris, B; Arpigny, JL; Thonart, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 2007;9(4):1084-1090. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x
189. Rosés Subirós, C; Supervisada: Planas, M; Feliu, L. Solid-phase synthesis of cell-penetrating γ -peptide/antimicrobial peptide conjugates and of cyclic lipodepsipeptides derived from fengycins. January 2016. <http://hdl.handle.net/10803/393895>.
190. Rosés, C; Camo, C; Oliveras, À; Moll, L; Lopez, N; Feliu, L; Planas, M. Total solid-phase synthesis of dehydroxy fengycin derivatives. *J Org Chem.* 2018;83:15297-15311. doi:10.1021/acs.joc.8b02553
191. Roberts, TC; Smith, PA; Romesberg, FE. Structural and initial biological evaluation of synthetic arylomycin A2. *J Am Chem Soc.* 2007;129:15830-15838. doi:10.1021/ja073340u
192. Dufour, J; Neuville, L; Zhu, J. Intramolecular suzuki-miyaura reaction for the total synthesis

- of signal peptidase inhibitors, arylomycins A2 and B2. *Chem - Eur J*. 2010;16(34):10523-10534. doi:10.1002/chem.201000924
193. Liu, J; Smith, PA; Steed, DB; Romesberg, F. Efforts toward broadening the spectrum of arylomycin antibiotic activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(20):5654-5659. doi:10.1016/j.bmcl.2013.08.026
194. Liu, J; Luo, C; Smith, PA; Chin, JK; Page, MGP; Paetzel, M; Romesberg, FE. Synthesis and characterization of the arylomycin lipoglycopeptide antibiotics and the crystallographic analysis of their complex with signal peptidase. *J Am Chem Soc*. 2011;133(44):17869-17877. doi:10.1021/ja207318n
195. Roberts, TC; Smith, PA; Romesberg, FE. Synthesis and biological characterization of arylomycin B antibiotics. *J Nat Prod*. 2011;74(5):956-961. doi:10.1021/np200163g
196. Roberts, TC; Schallenberger, MA; Liu, J; Smith, PA; Romesberg, FE. Initial efforts toward the optimization of arylomycins for antibiotic activity. *J Med Chem*. 2011;54(14):4954-4963. doi:10.1021/jm1016126
197. Ng-Choi, I; Supervisada: Planas, M; Feliu, L. Solid-phase synthesis of 5-arylhistidine-containing peptides: from linear antimicrobial peptides to cyclic peptides derived from arylomycins and aciculitins. 2015. <http://hdl.handle.net/10256/12429>.
198. Afonso, A; Feliu, L; Planas, M. Solid-phase synthesis of biaryl cyclic peptides by borylation and microwave-assisted intramolecular Suzuki–Miyaura reaction. *Tetrahedron*. 2011;67(12):2238-2245. doi:10.1016/j.tet.2011.01.084
199. Kaiser, E; Colescott, RL; Bossinger, CD; Cook, PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*. 1970;34(2):595-598. doi:10.1016/0003-2697(70)90146-6
200. Vojtkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept Res*. 1995;8(4):236-237.



ANNEX

SÍNTESI DE LIPOPÈPTIDS I DE PÈPTIDS
CONJUGATS DERIVATS DE **BP100**.
CARACTERITZACIÓ PER RMN DE LIPOPÈPTIDS
LINEALS I CÍCLICS

Àngel Oliveras Rovira

2020

PROGRAMA DE DOCTORAT EN QUÍMICA

Dirigida per:

Dra. Marta Planas Grabuleda

Dra. Lidia Feliu Soley

Tutora:

Dra. Lidia Feliu Soley

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

Índex

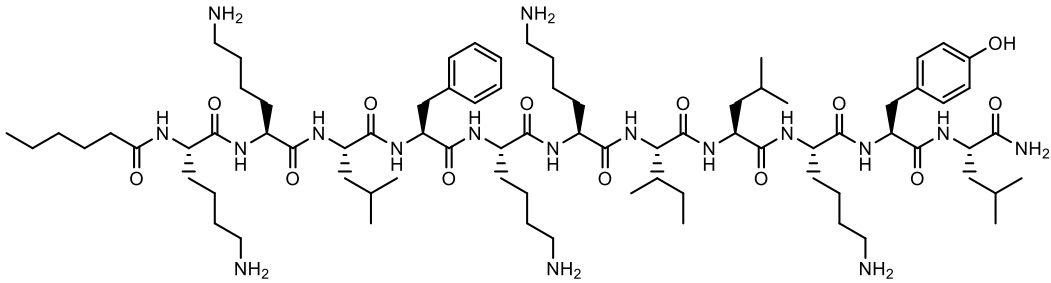
1	<i>Lipopèptids antimicrobians derivats de BP100</i>	A-1
	C ₅ H ₁₁ CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP367)	A-1
	Ac-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP368)	A-5
	Ac-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP369)	A-8
	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP370).....	A-12
	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP371)	A-16
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₅ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP372)	A-20
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP373)	A-24
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP374).....	A-27
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP375).....	A-31
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP376)	A-35
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-NH ₂ (BP377)	A-38
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂ (BP378)	A-42
	C ₃ H ₇ CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP379).....	A-46
	Ac-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP380)	A-50
	Ac-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP381)	A-54
	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP382).....	A-58
	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP383)	A-62
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP384)	A-66
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP385)	A-70
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP386)	A-74
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP387)	A-78
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP388)	A-81
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP389).....	A-84
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₃ H ₇)-NH ₂ (BP390)	A-88
	C ₁₁ H ₂₃ CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP391)	A-92
	Ac-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP392).....	A-96
	Ac-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP393).....	A-100
	Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP394)	A-103
	Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP395).....	A-107
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP396).....	A-111
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP397).....	A-115
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP398)	A-119
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP399).....	A-123
	Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP400)	A-127

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-NH ₂ (BP401)	A-131
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂ (BP402)	A-135
C ₅ H ₁₁ CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP472)	A-139
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP473)	A-143
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP474)	A-147
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP475)	A-151
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-NH ₂ (BP476)	A-158
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP484)	A-162
C ₃ H ₇ CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP485)	A-166
Ac-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP486)	A-170
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP488)	A-174
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP489)	A-178
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP490)	A-182
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC ₅ H ₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP494)	A-186
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₅ H ₁₁)-NH ₂ (BP495)	A-190
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC ₃ H ₇)-NH ₂ (BP496)	A-194
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP497)	A-198
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP498)	A-202
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC ₃ H ₇)-Tyr-Leu-NH ₂ (BP499)	A-206
Ac-Lys-Lys-Lys(COC ₁₁ H ₂₃)-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP500)	A-209
Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (BP501)	A-212
Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP502)	A-215
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-D-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP503)	A-218
2 Lipopèptids conjugats derivats de BP100	A-221
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH ₂ (BP387-BP16)	A-221
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP16-BP387)	A-225
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP387-BP100)	A-229
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP100-BP387)	A-233
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP474-BP143)	A-237
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP143-BP474)	A-241
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP387-flg15)	A-245

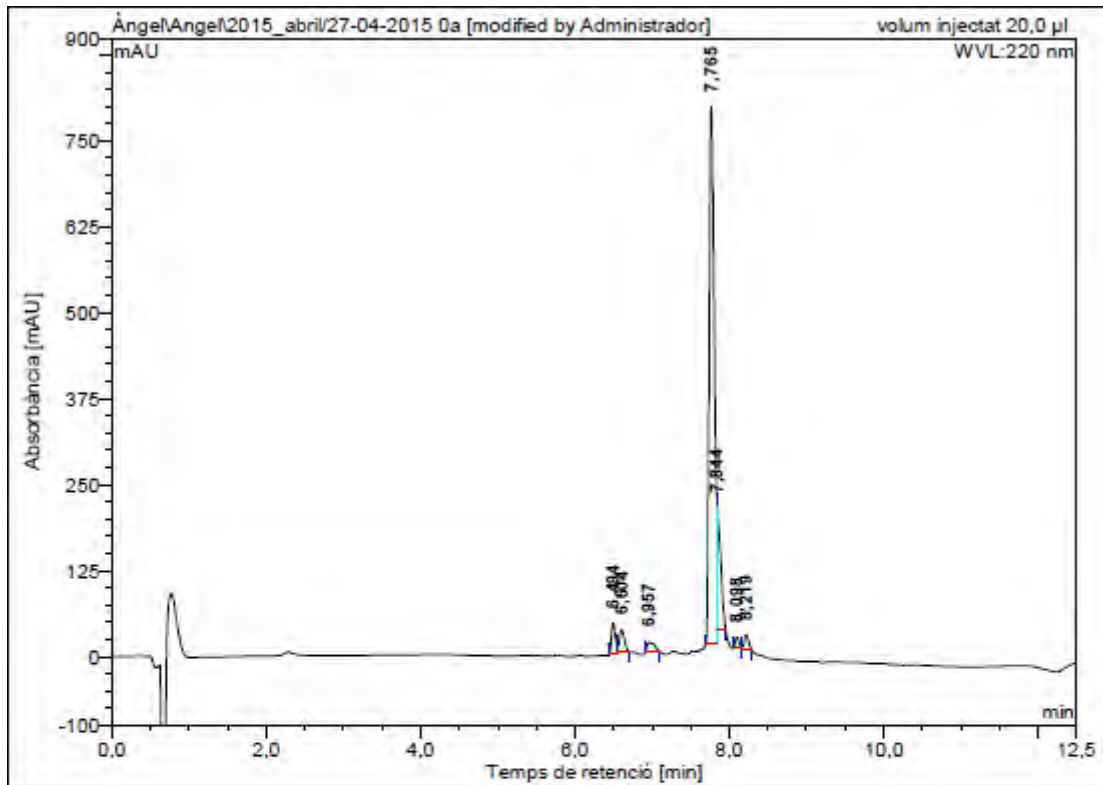
Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC ₃ H ₇)-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (flg15-BP387)	A-249
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP475-flg15)	A-253
Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (flg15-BP475)	A-257
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH ₂ (BP475-Pip1)	A-261
Ac-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC ₃ H ₇)-Leu-NH ₂ (Pip1-BP475)	A-265
3 Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals	A-269
Peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^t Bu)-Leu-NH-Rink-MBHA (6a)	A-269
Peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^t Bu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (6b)	A-270
Síntesi del pèptid conjugat BP524a/b	A-271
4-Hidrazino-benzoat-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^t Bu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (10)	A-271
Pèptid conjugat BP524a/b	A-272
Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH ₂ (BP103)	A-277
Pèptid conjugat contenint BP100 i un derivat de valifenalat	A-280
Síntesi del pèptid conjugat BP493 contenint BP100 i un derivat de quinoxifèn	A-284
2-(3,5-Dicloroanilinometilen)malonat de dietil (14)	A-284
5,7-Dicloro-4-oxo-quinolina-3-carboxilat d'etil (15)	A-289
5,7-Dicloro-4-(4-fluorofenoxi)quinolina-3-carboxilat d'etil (17)	A-293
Àcid 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxilic (18)	A-296
Pèptid conjugat BP493	A-300
4 Dehidroderivats de fengicines	A-304
C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC838)	A-304
C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC840)	A-311
C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC842)	A-318
C ₇ H ₁₅ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC844)	A-325
C ₁₁ H ₂₃ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC854)	A-331
C ₁₅ H ₃₁ CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC856)	A-337
5 Ciclolipèptid biarílic 20 derivat de les arilomicines	A-343
C ₁₅ H ₃₁ CO-Lys-D-(NMe)Ser-D-Ala-Gly-(NMe)Tyr(3-&4-Me)-Ala-Tyr(3-&4-Me)-NH ₂ (20)	A-343

1 Lipopèptids antimicrobians derivats de BP100

C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP367)

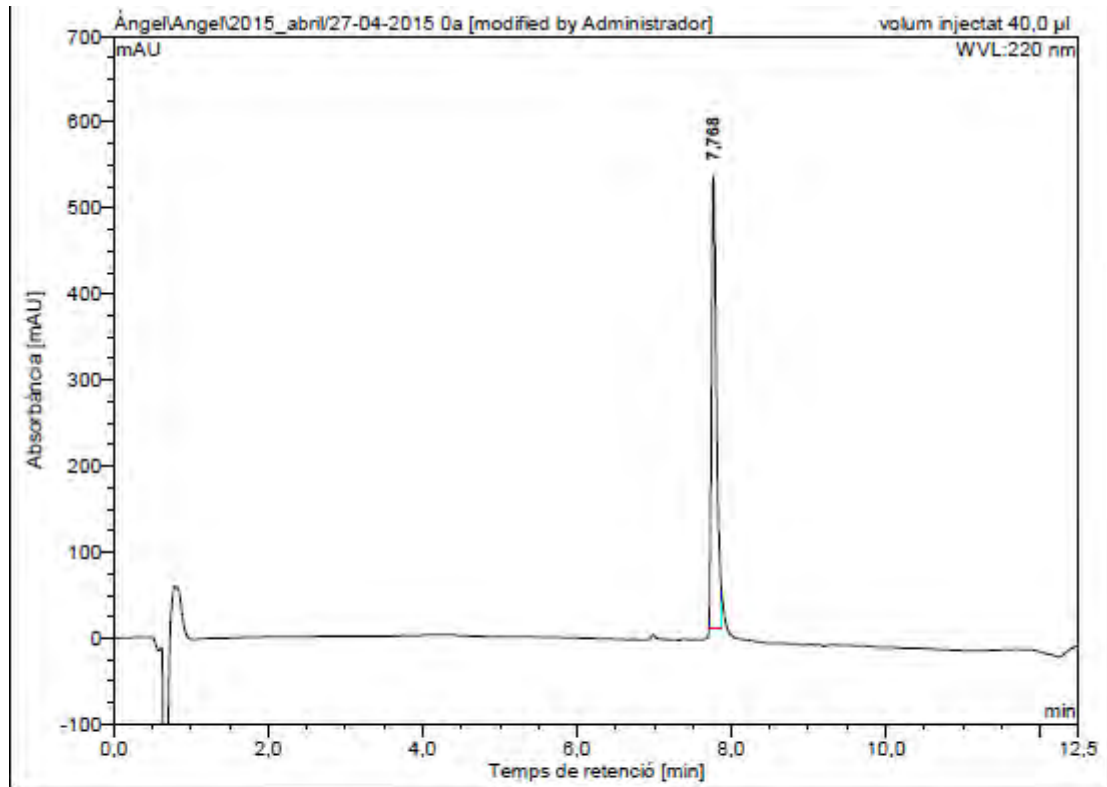


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



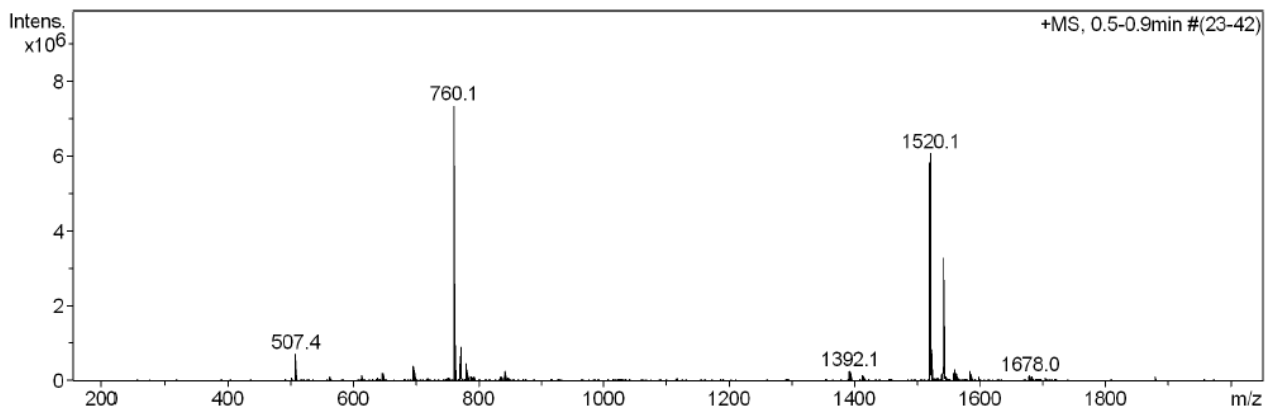
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,49	43,350	2,553	3,25
2	6,60	32,810	2,437	3,11
3	6,96	14,730	1,697	2,16
4	7,77	782,429	60,517	77,13
5	7,84	176,586	9,122	11,63
6	8,10	15,984	0,862	1,10
7	8,22	19,823	1,277	1,63
Total:		1085,712	78,465	100,00

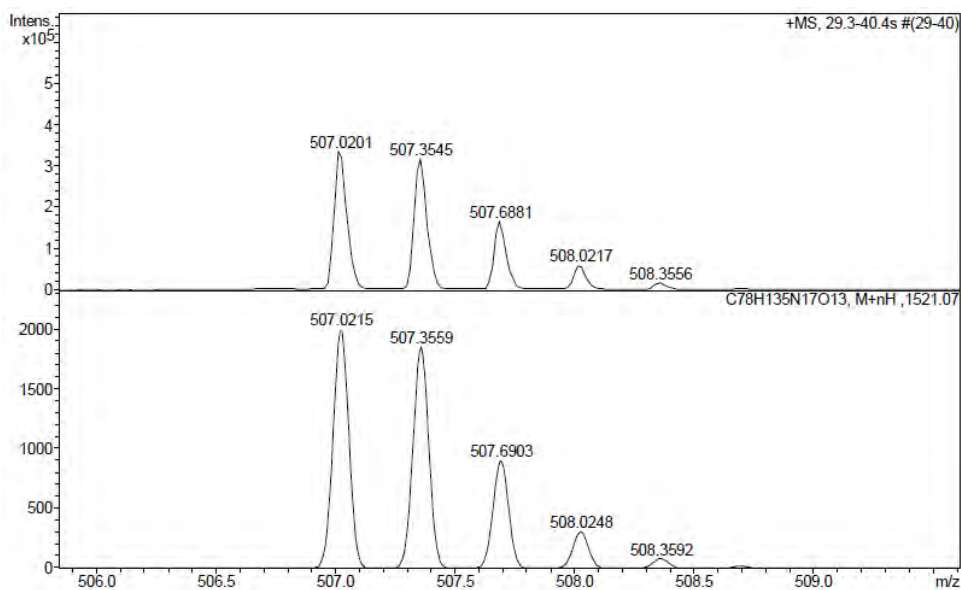
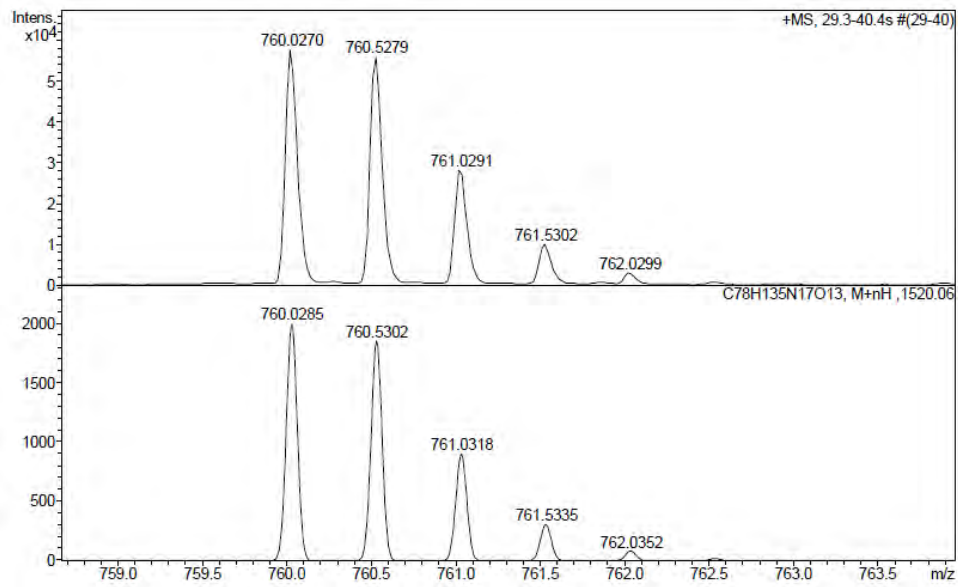
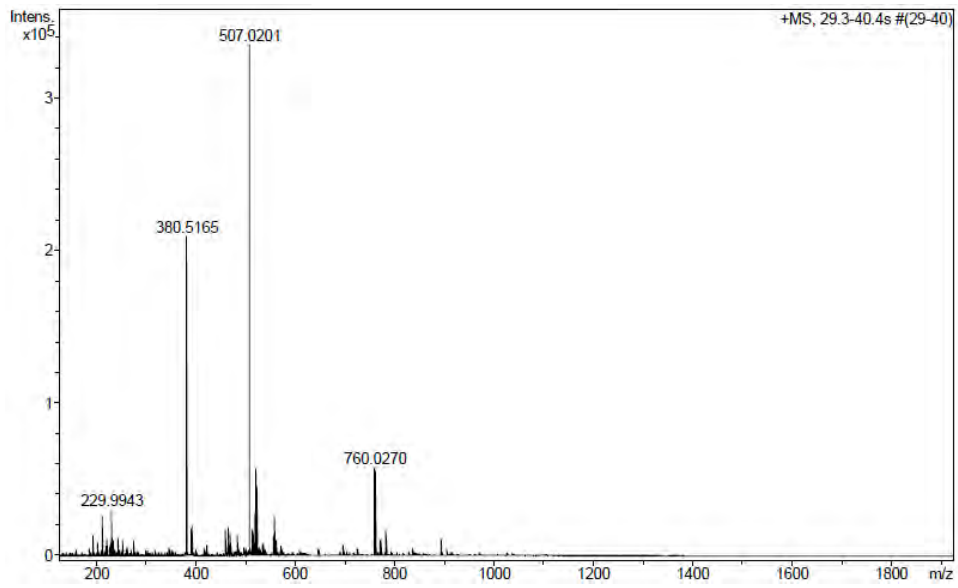
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

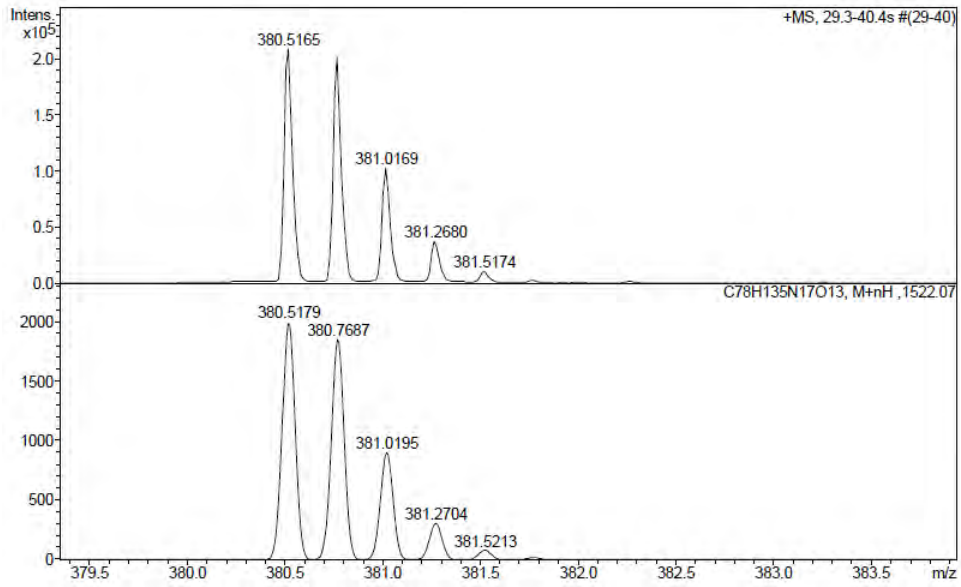


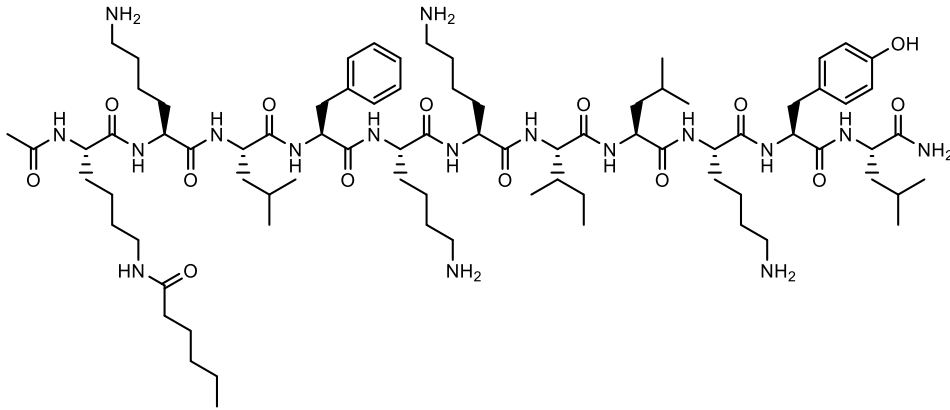
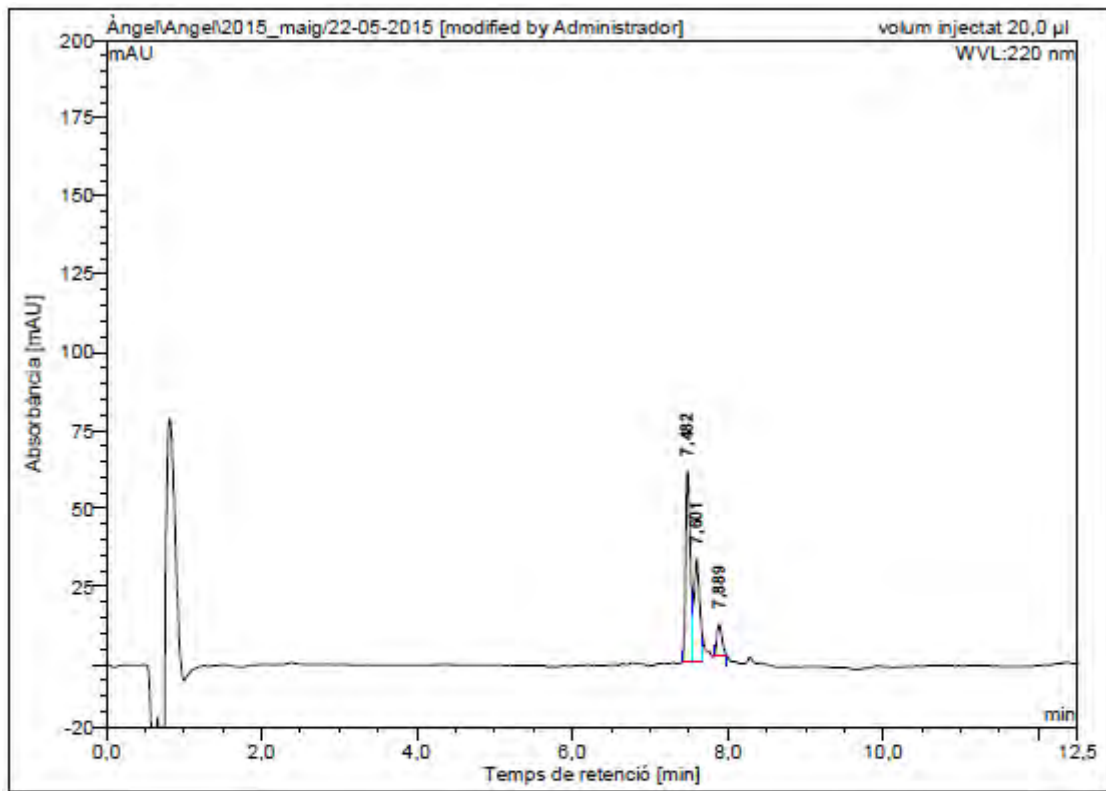
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,77	525,723	39,635	100,00
Total:		525,723	39,635	100,00

ESI-MS (m/z)



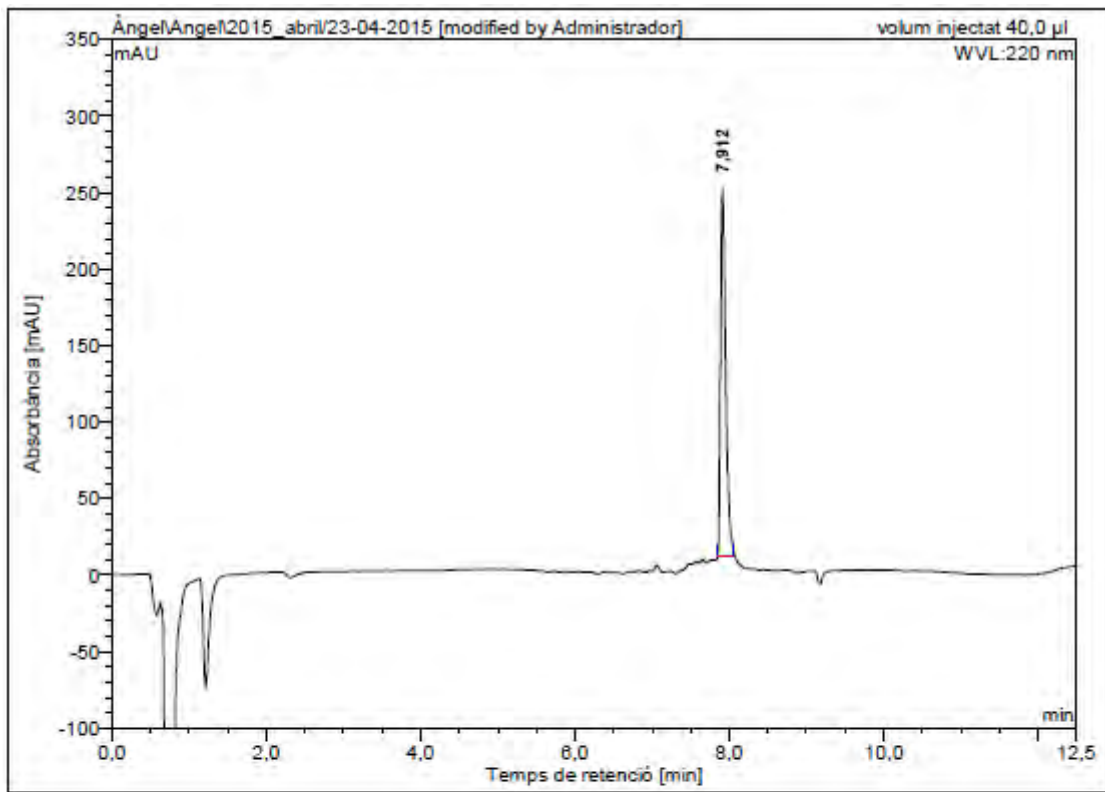
HRMS (m/z)



Ac-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP368)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

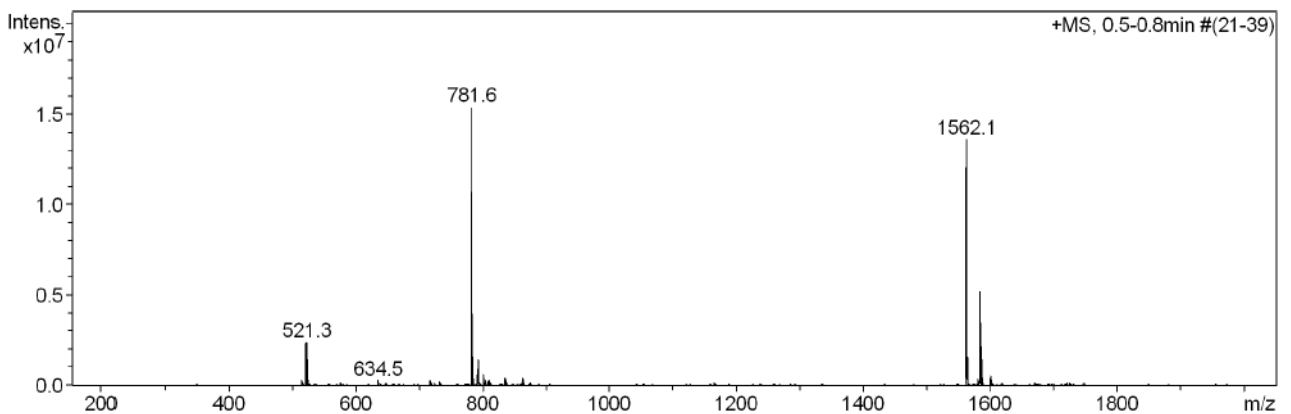
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,48	60,911	4,478	56,85
2	7,60	32,697	2,633	33,43
3	7,89	9,958	0,765	9,72
Total:		103,566	7,877	100,00

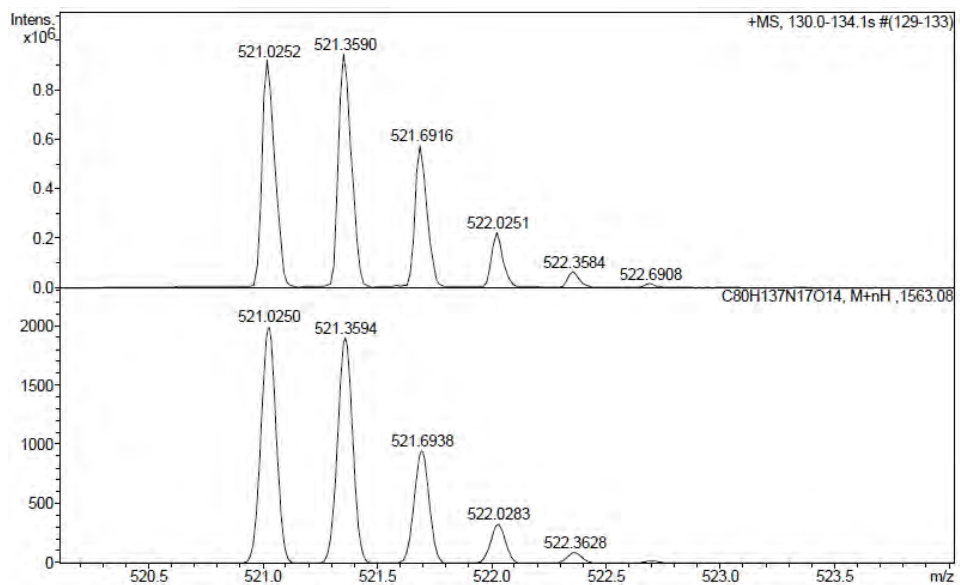
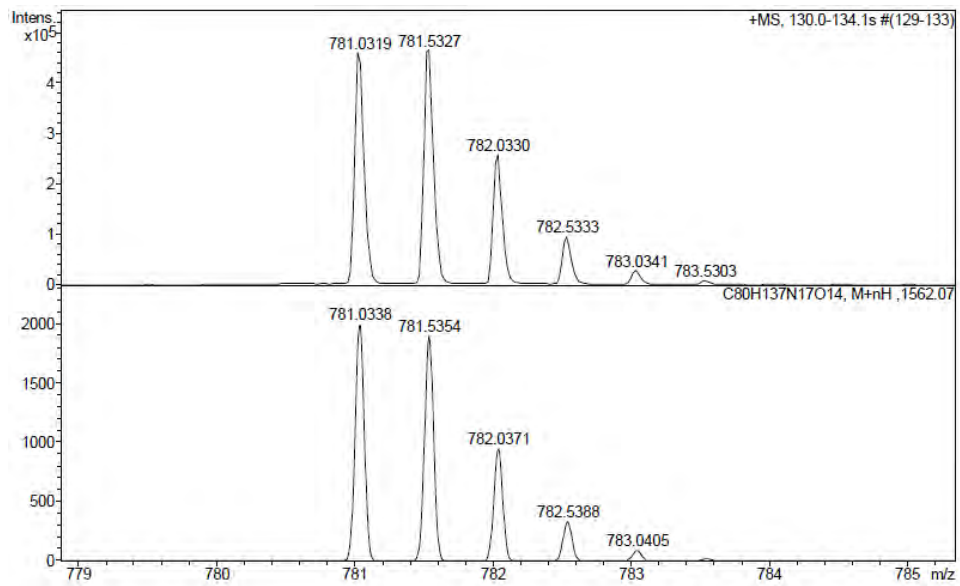
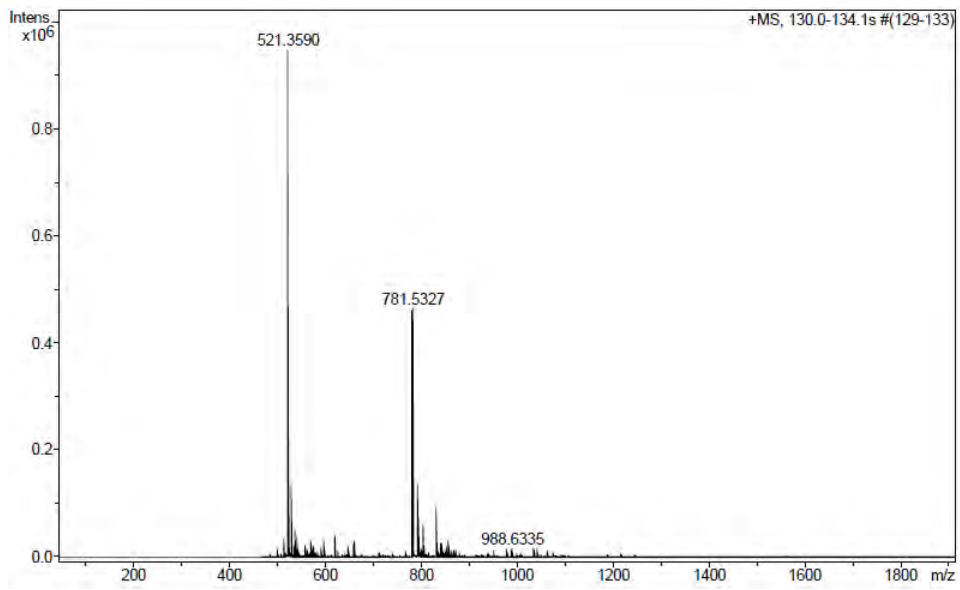
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



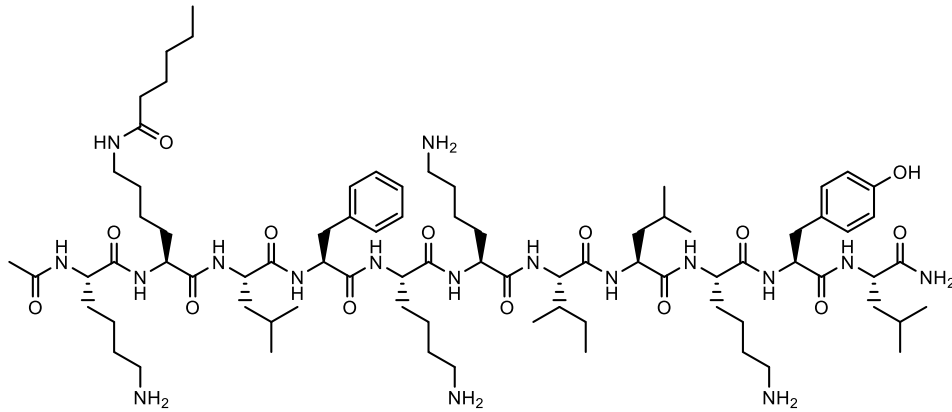
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,91	240,601	18,423	100,00
Total:		240,601	18,423	100,00

ESI-MS (m/z)

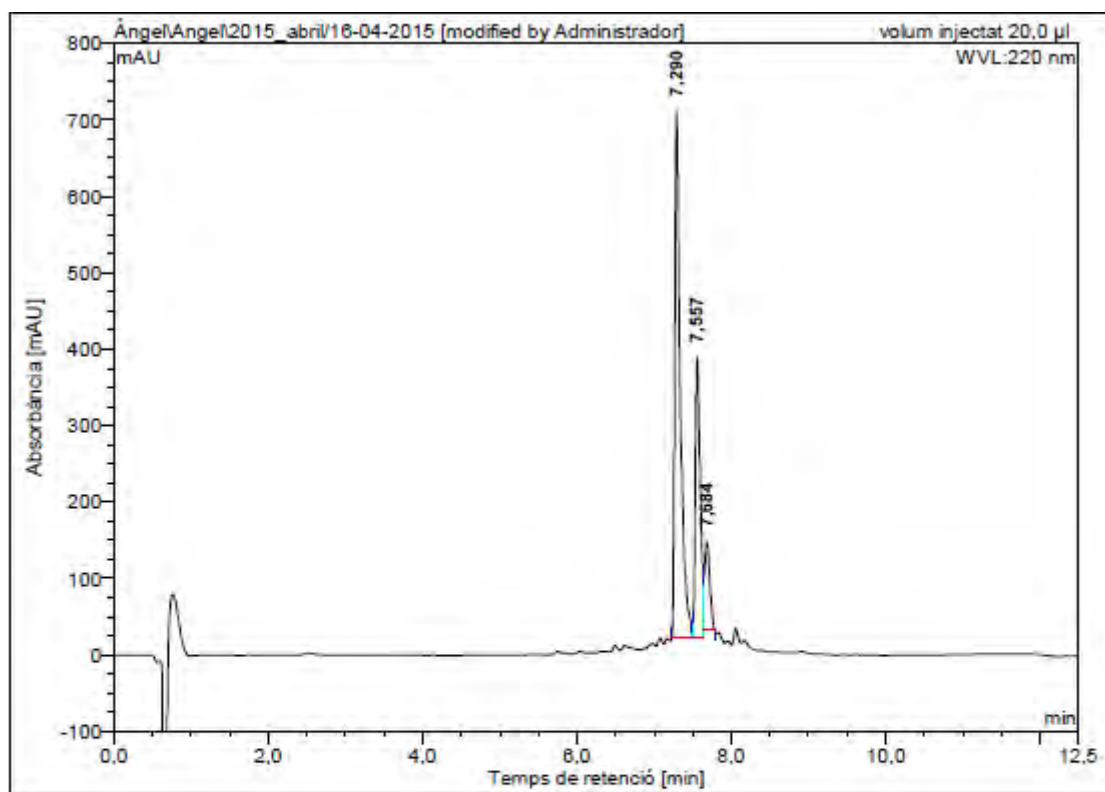


HRMS (m/z)

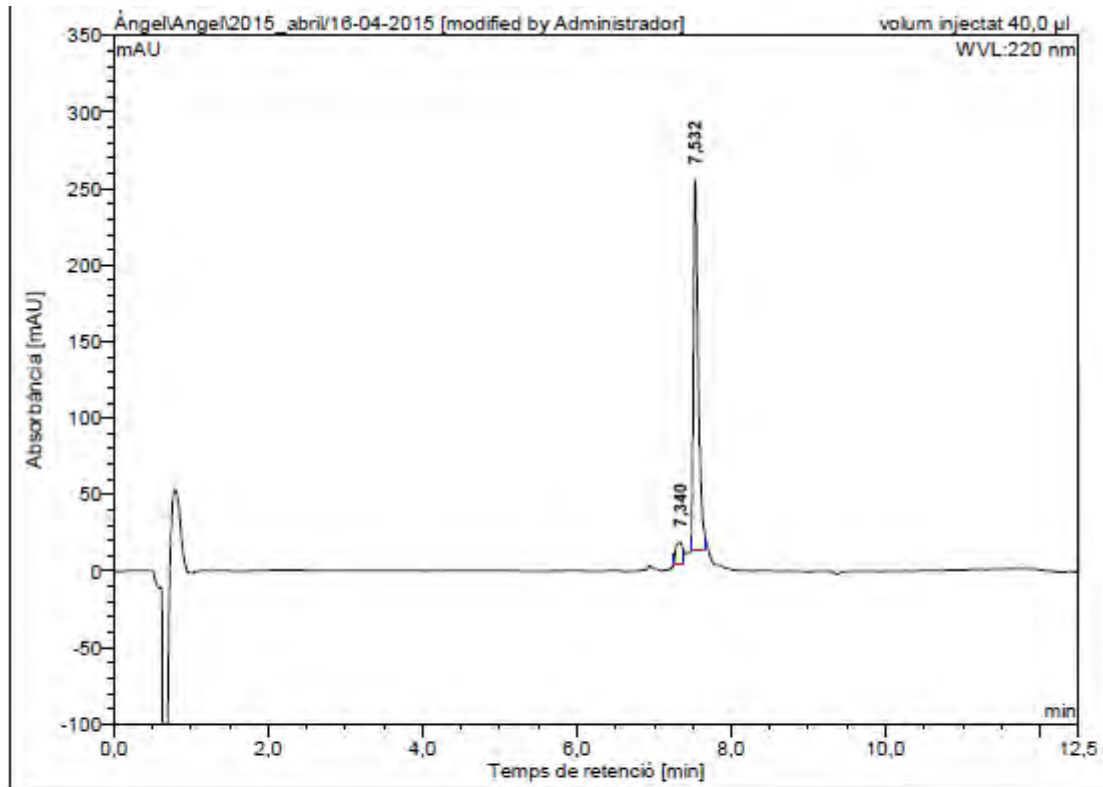
Ac-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP369)



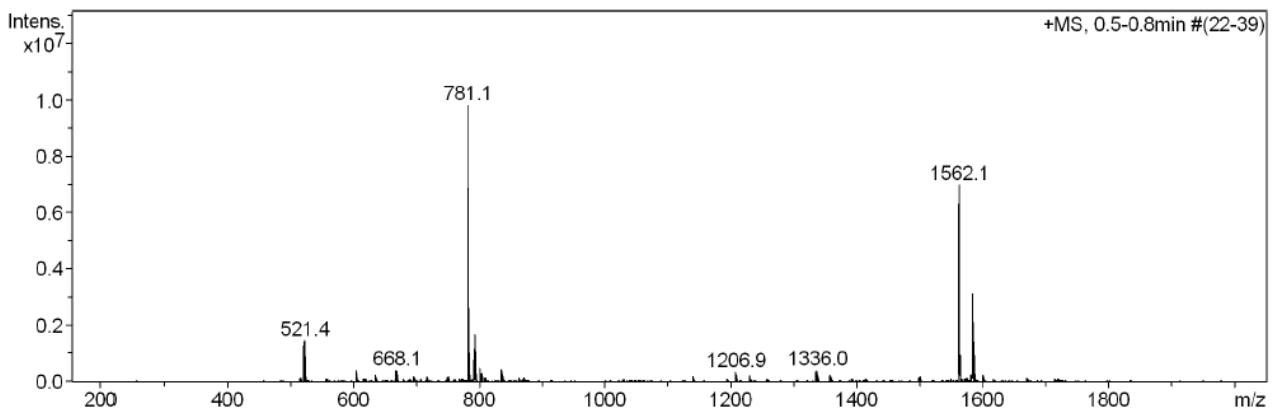
HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)



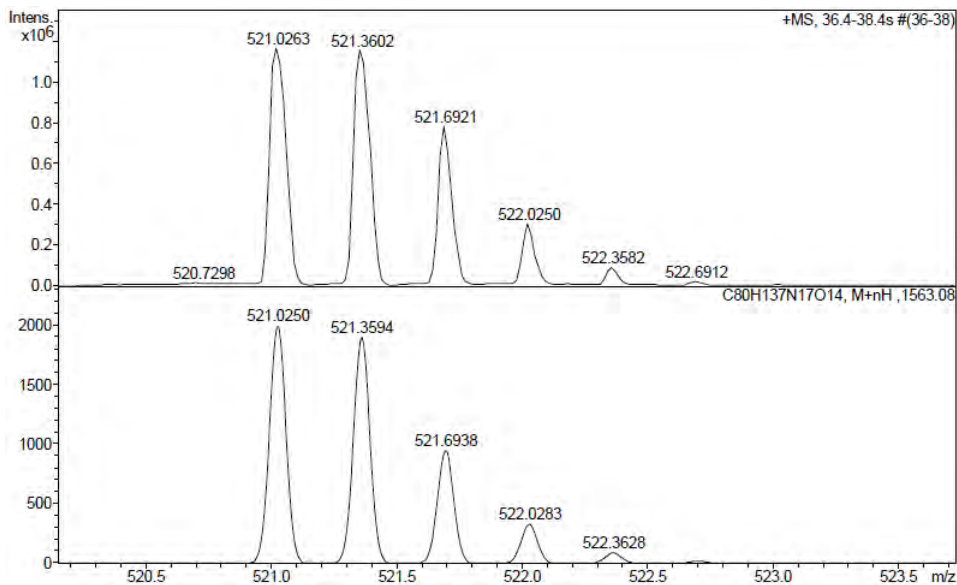
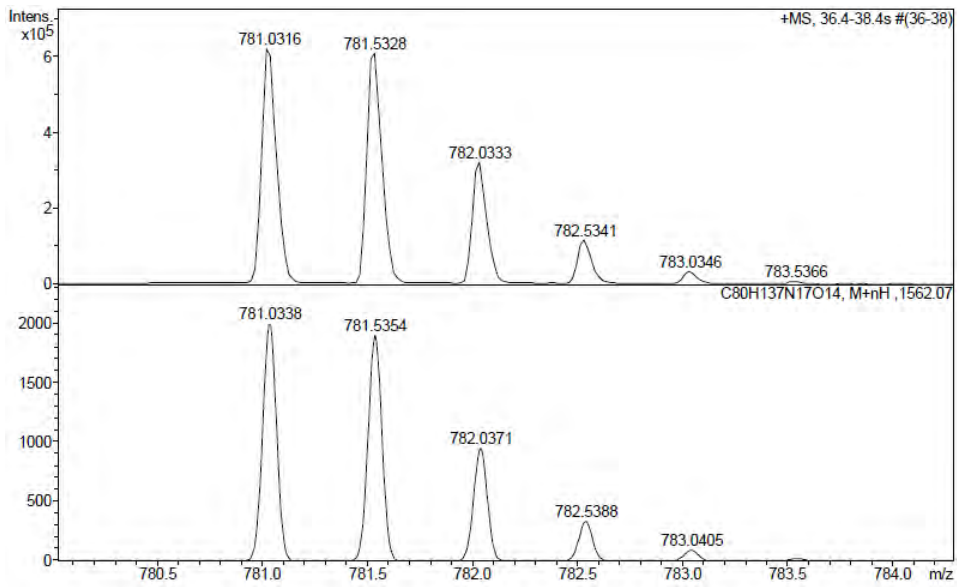
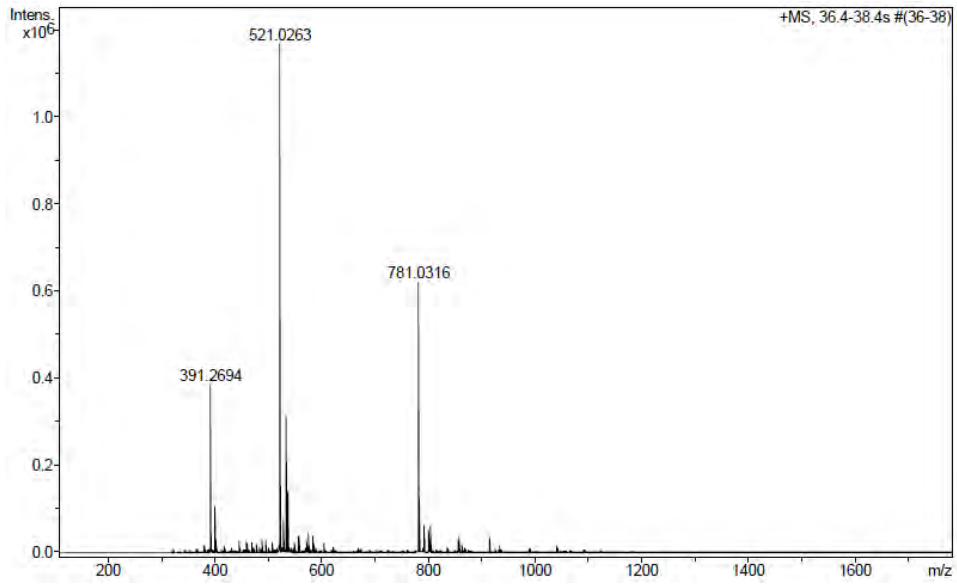
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,29	690,240	57,590	62,04
2	7,56	367,199	26,591	28,65
3	7,68	114,437	8,641	9,31
Total:		1171,877	92,822	100,00

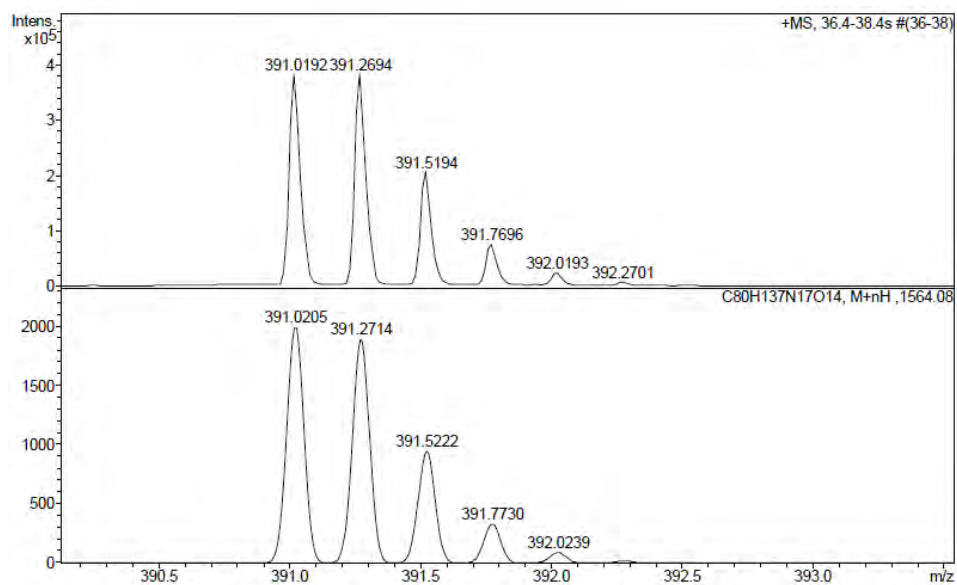
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU \cdot min	Rel.Area %
1	7,34	15,021	1,526	8,06
2	7,53	241,900	17,408	91,94
Total:		256,921	18,934	100,00

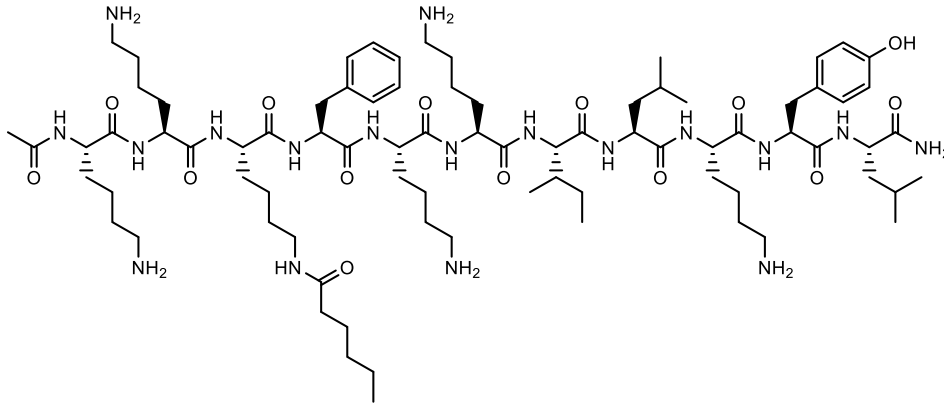
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

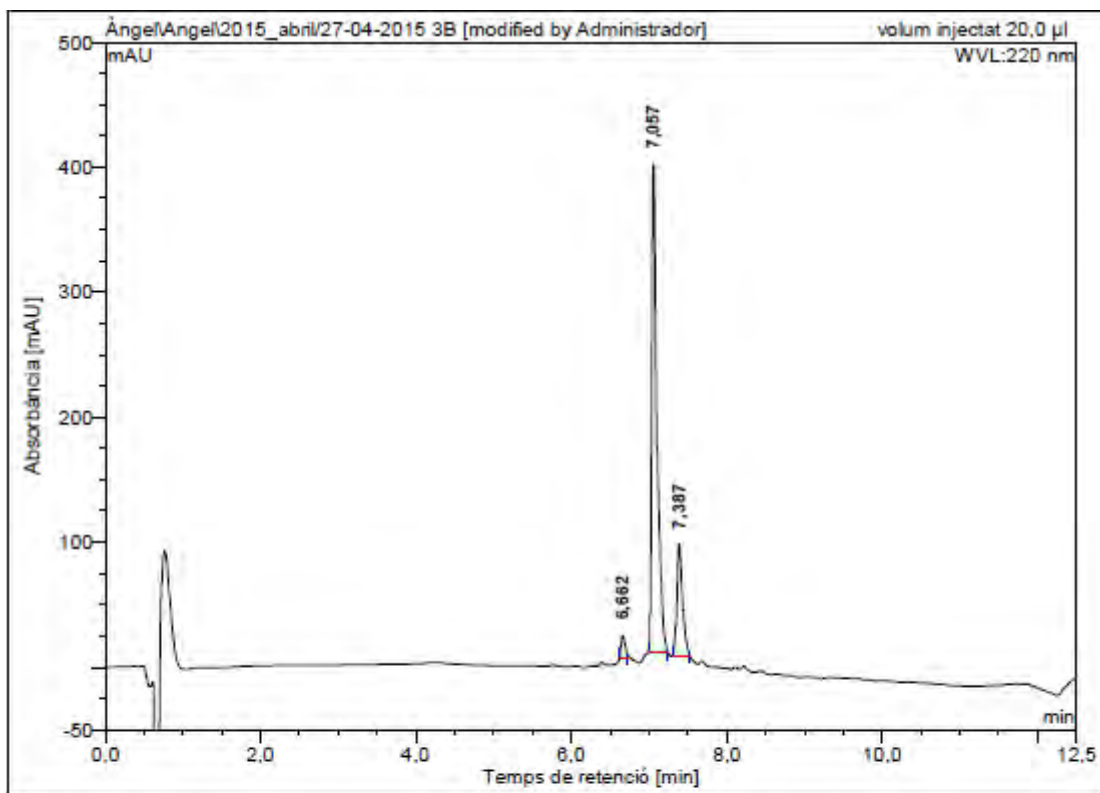




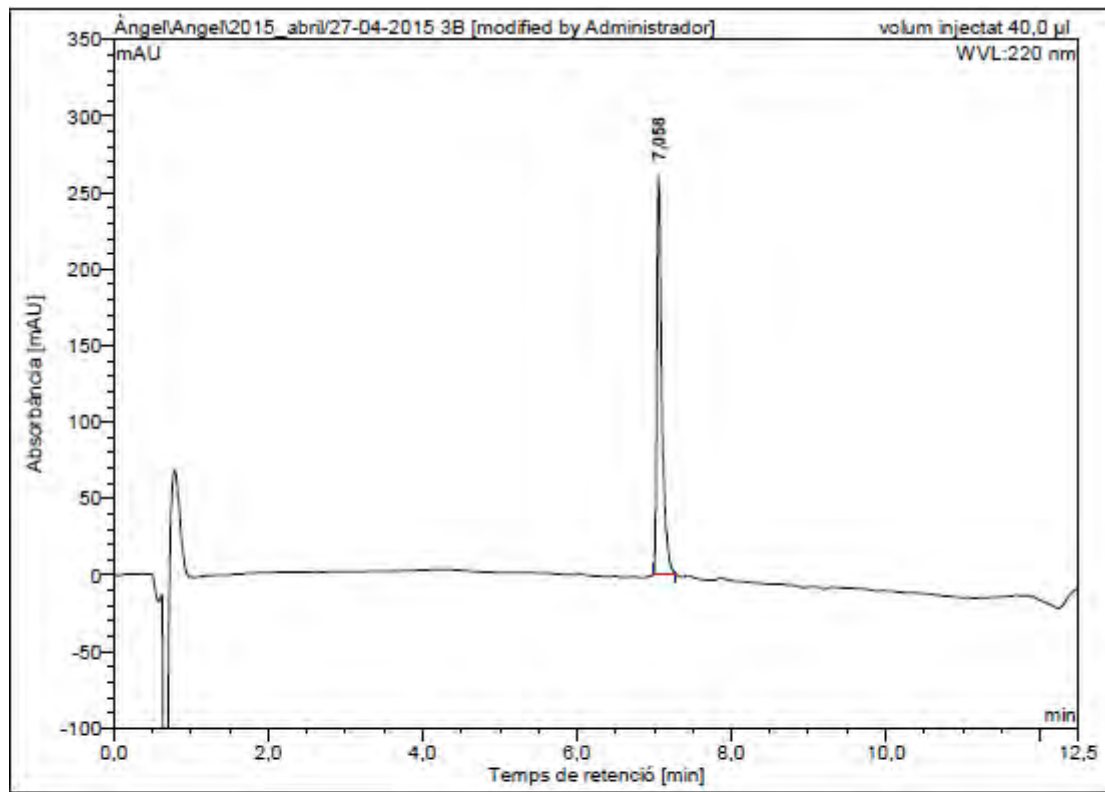
Ac-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP370)



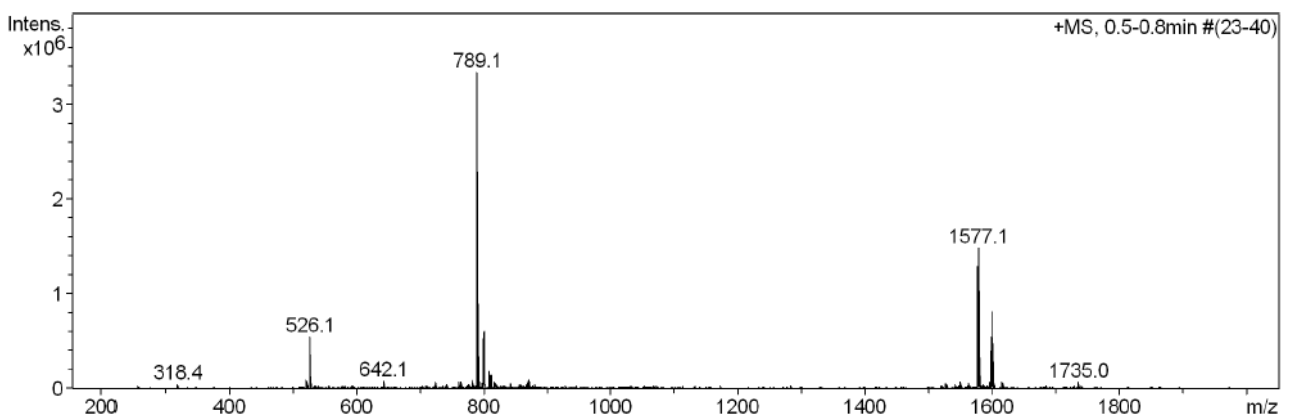
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



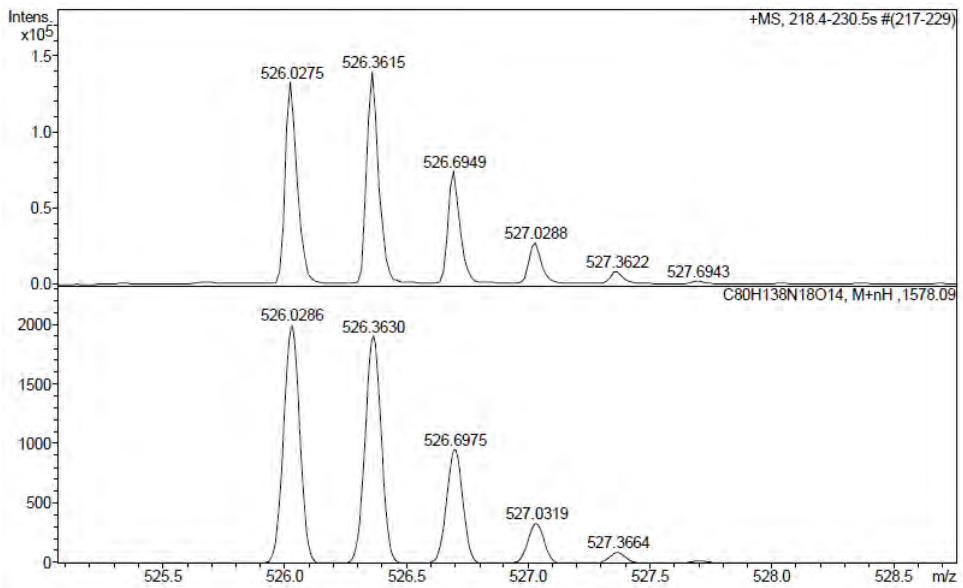
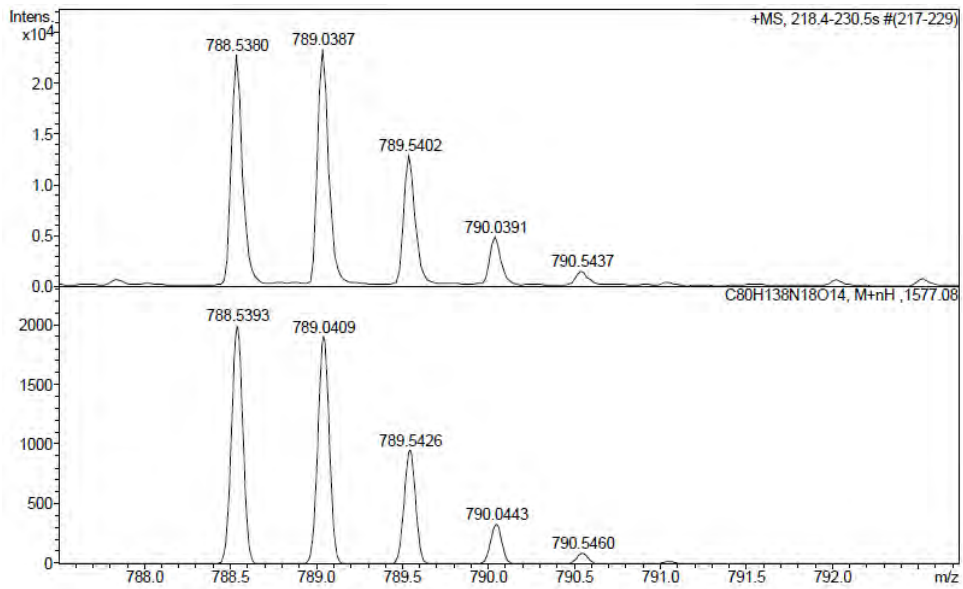
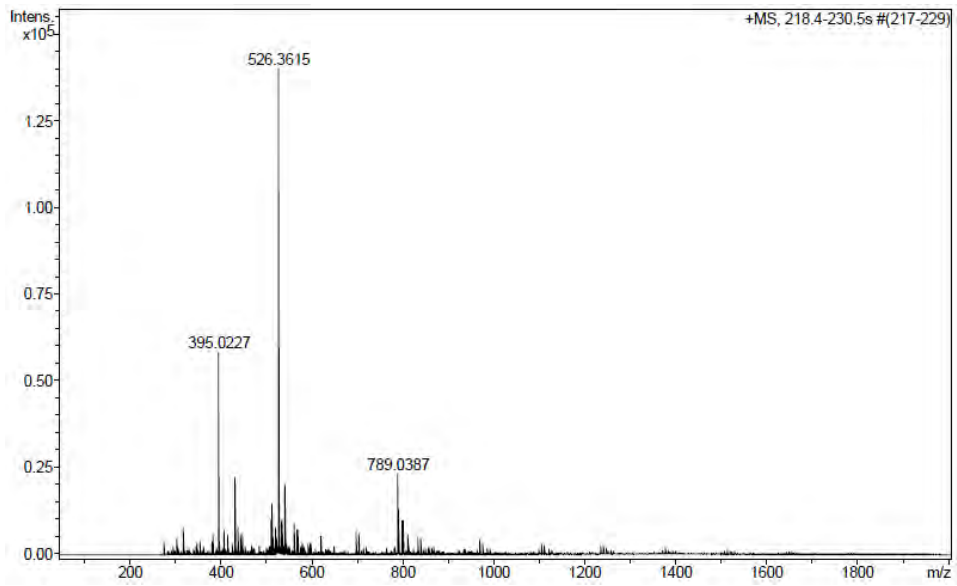
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,66	17,474	0,994	2,57
2	7,06	389,607	30,135	77,87
3	7,39	90,027	7,572	19,57
Total:		497,108	38,701	100,00

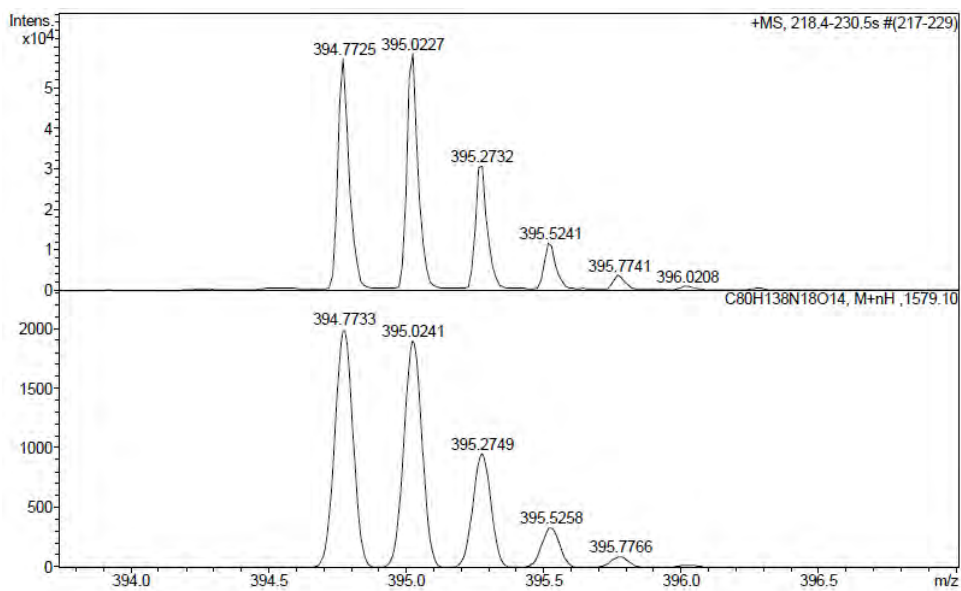
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,06	260,633	19,695	100,00
Total:		260,633	19,695	100,00

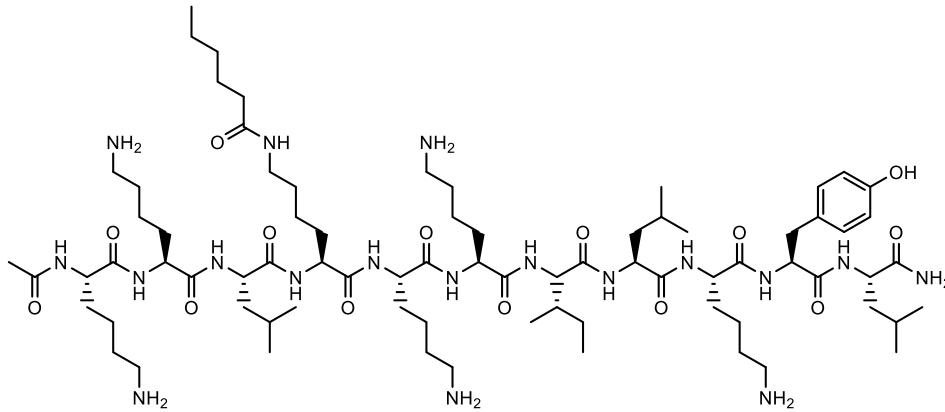
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

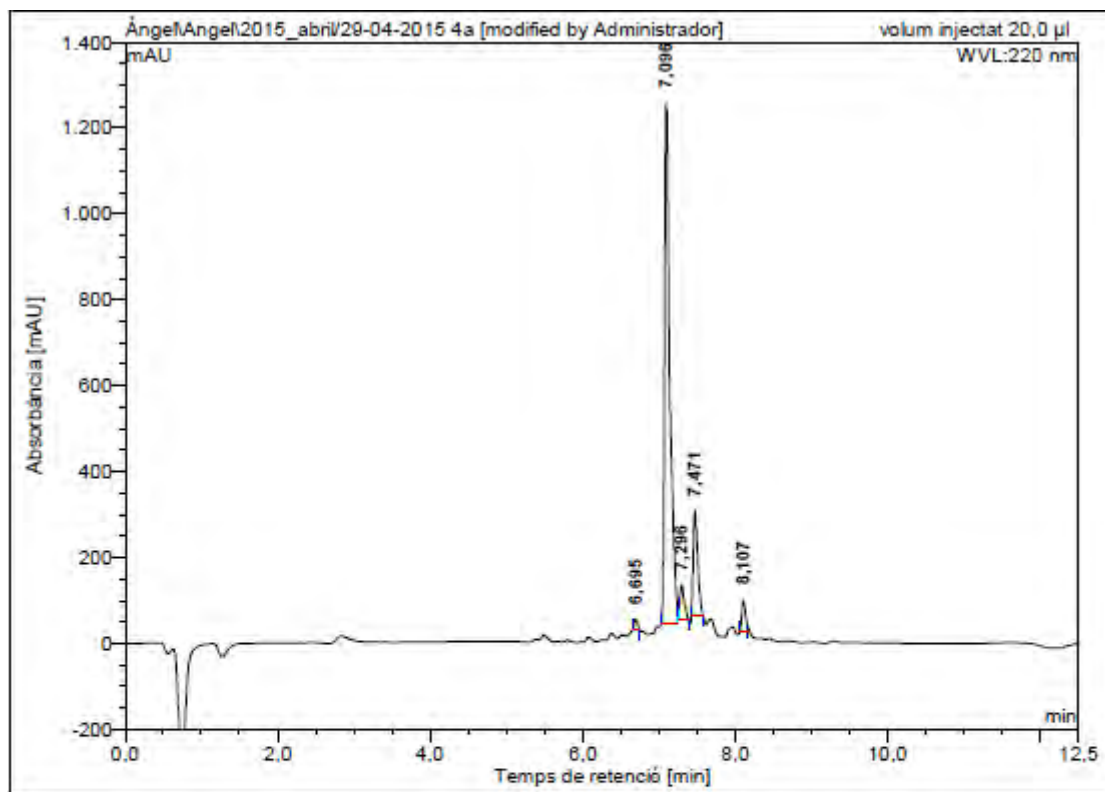




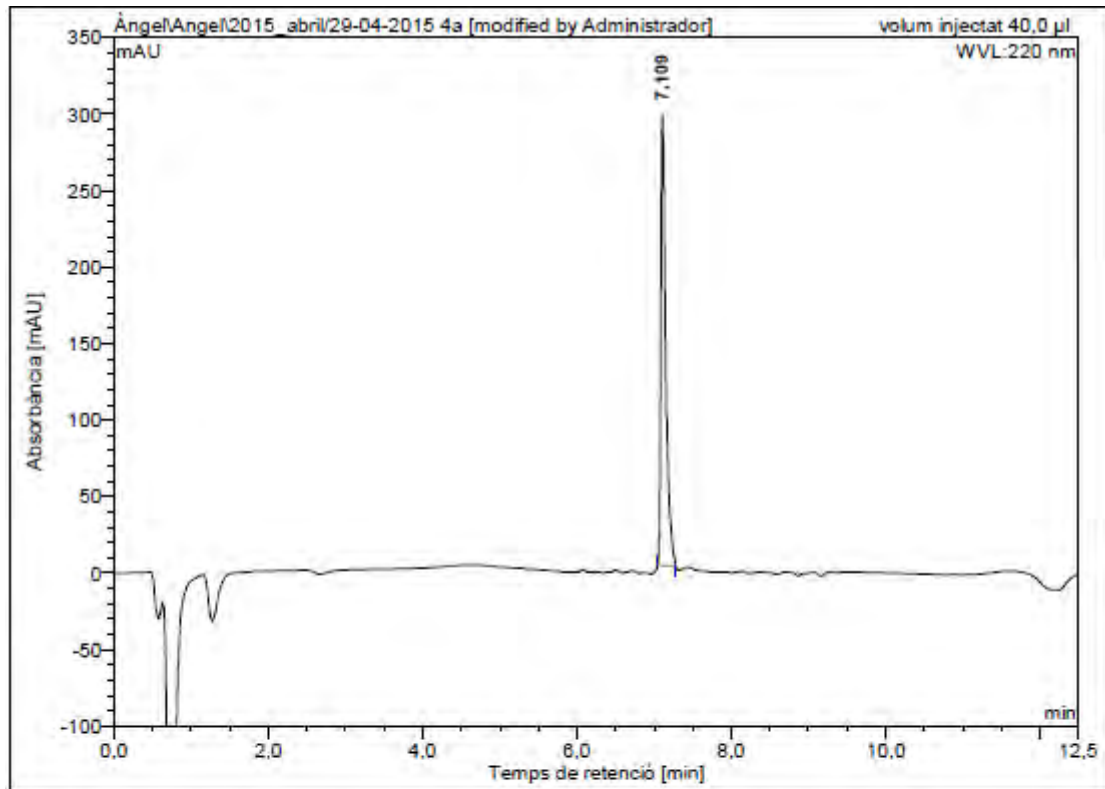
Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP371)



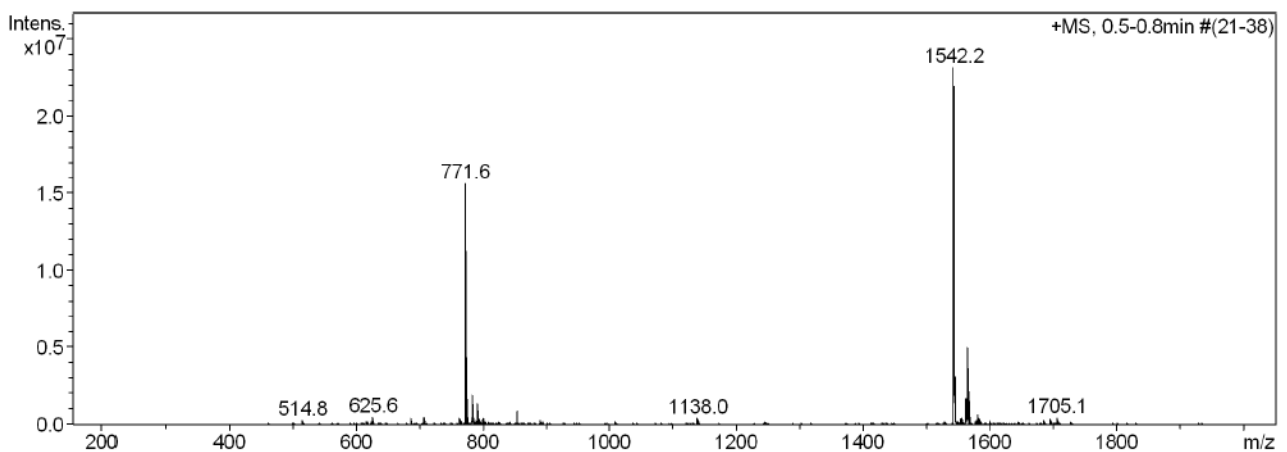
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



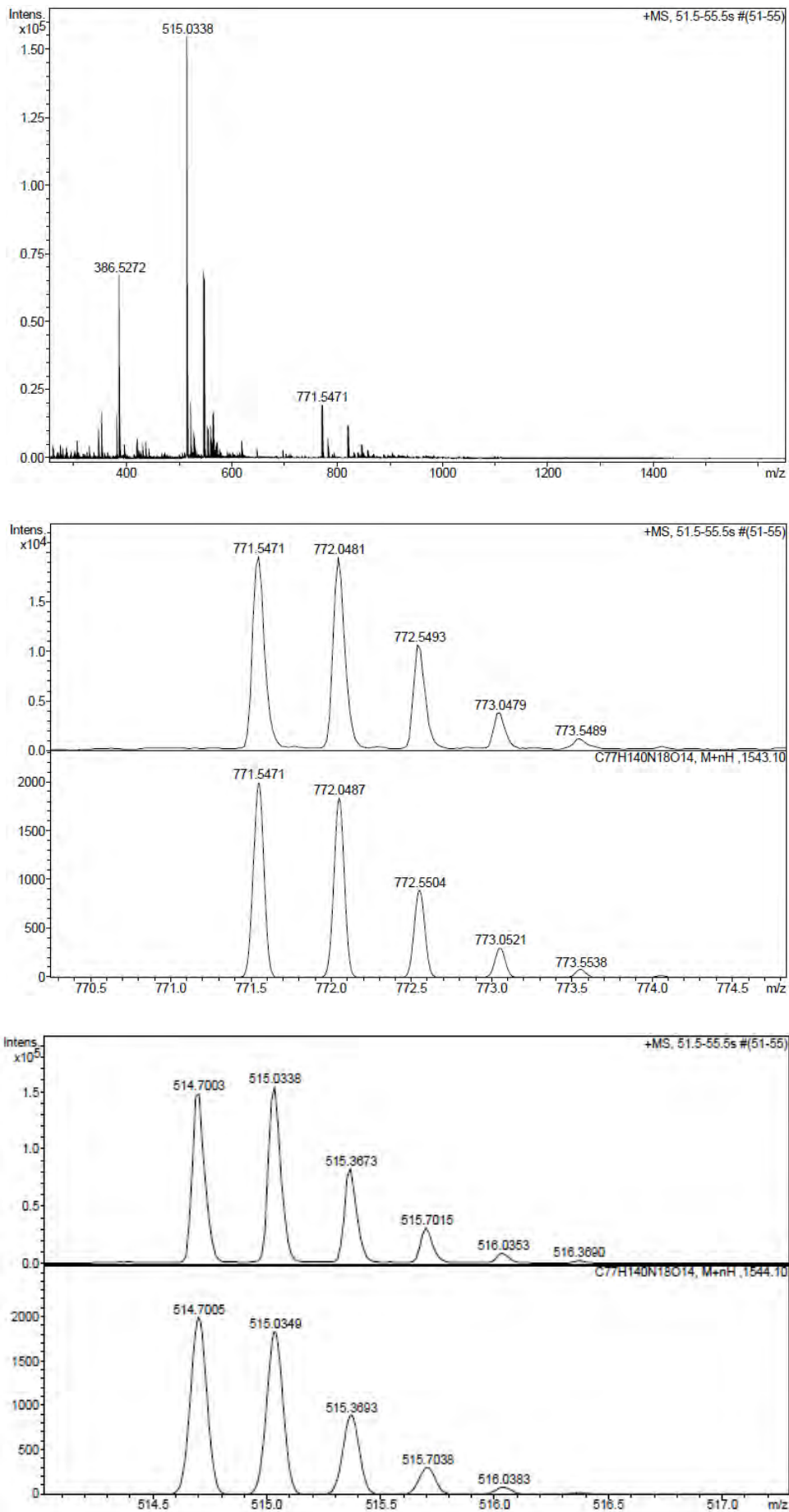
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,69	24,367	1,155	0,93
2	7,10	1213,823	97,208	77,85
3	7,30	81,648	5,491	4,40
4	7,47	245,014	16,765	13,43
5	8,11	71,929	4,245	3,40
Total:		1636,782	124,863	100,00

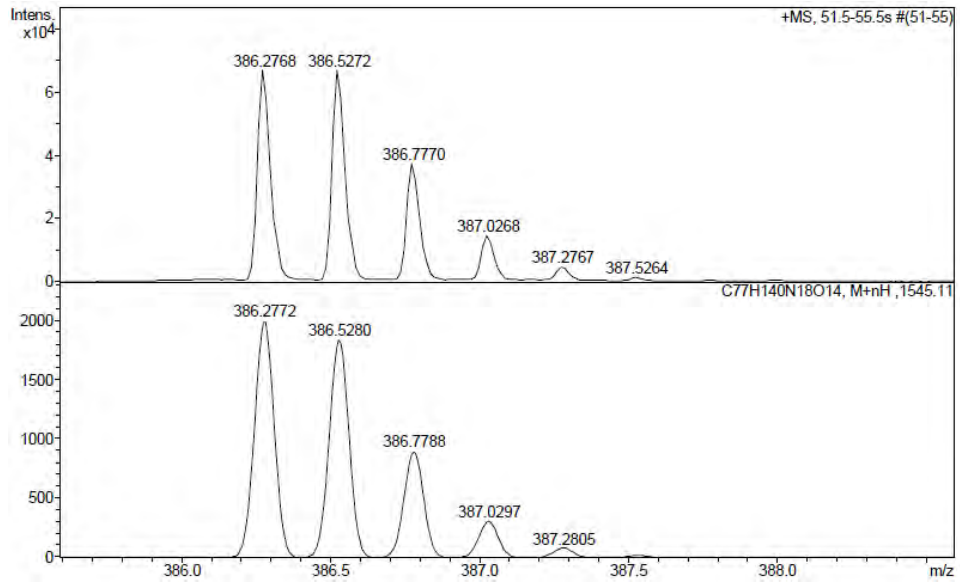
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,11	294,893	21,782	100,00
Total:		294,893	21,782	100,00

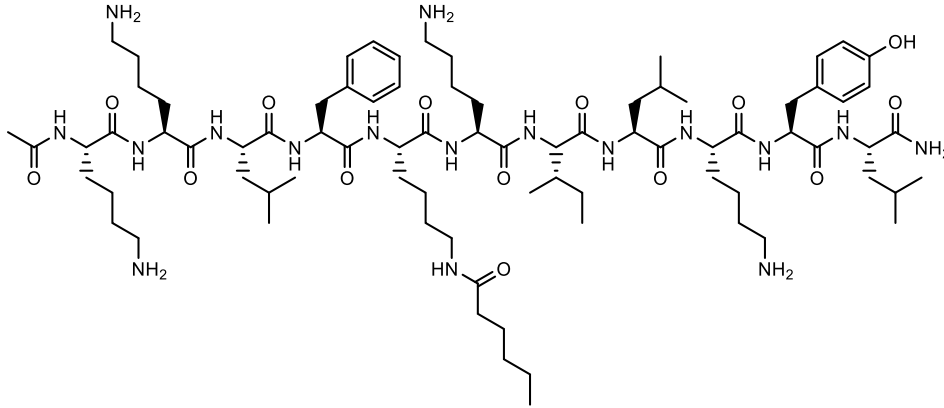
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

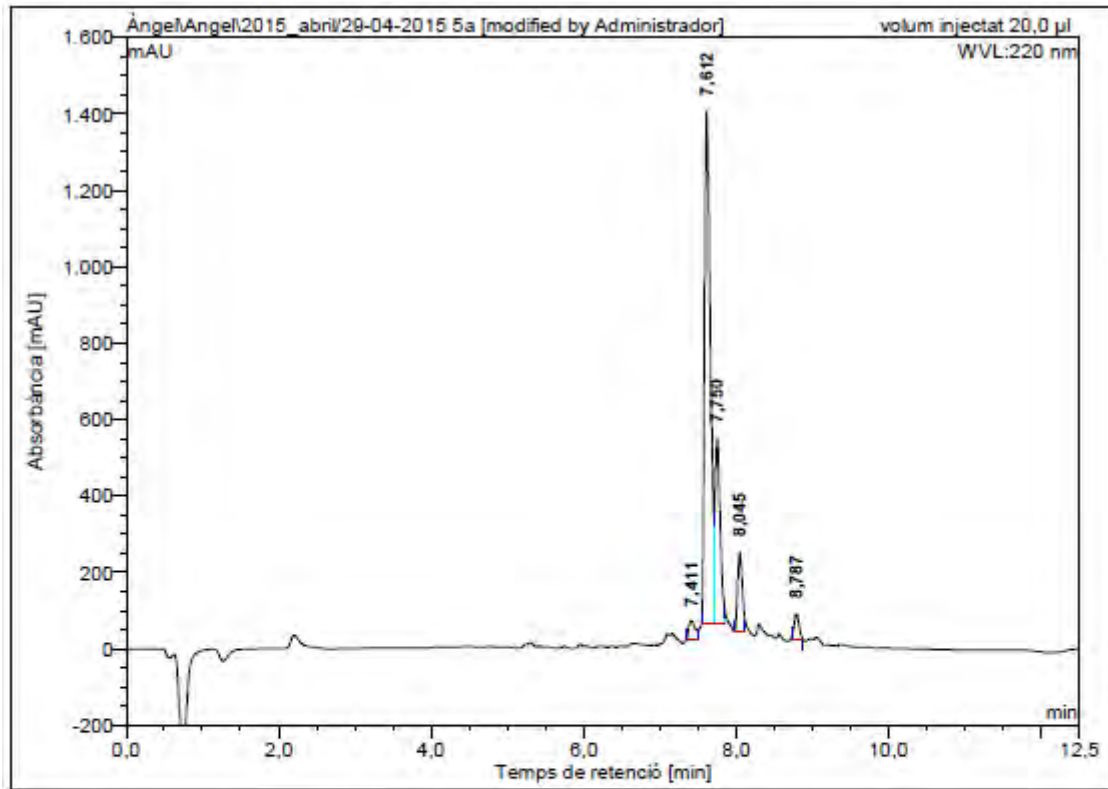




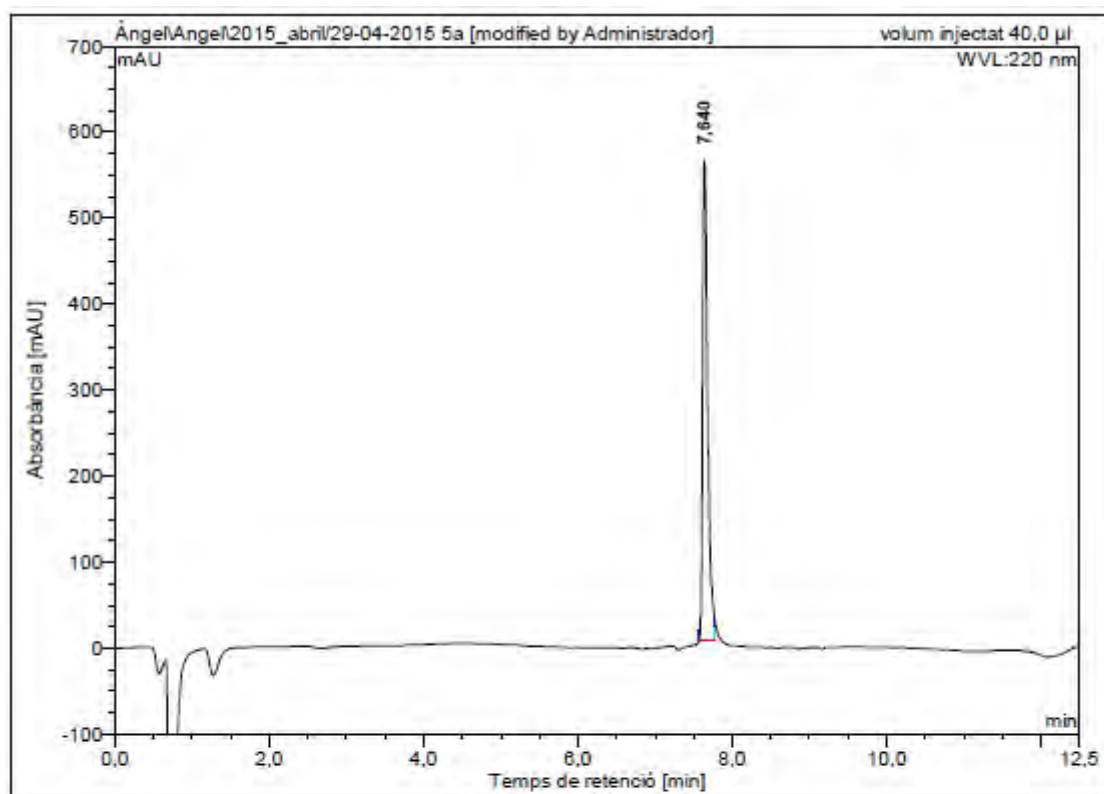
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₅H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP372)



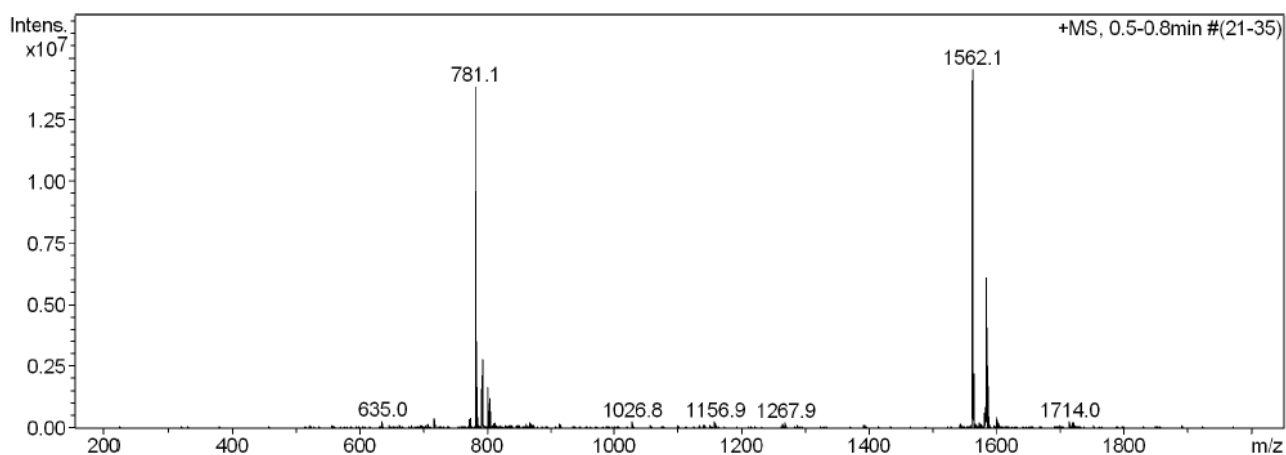
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



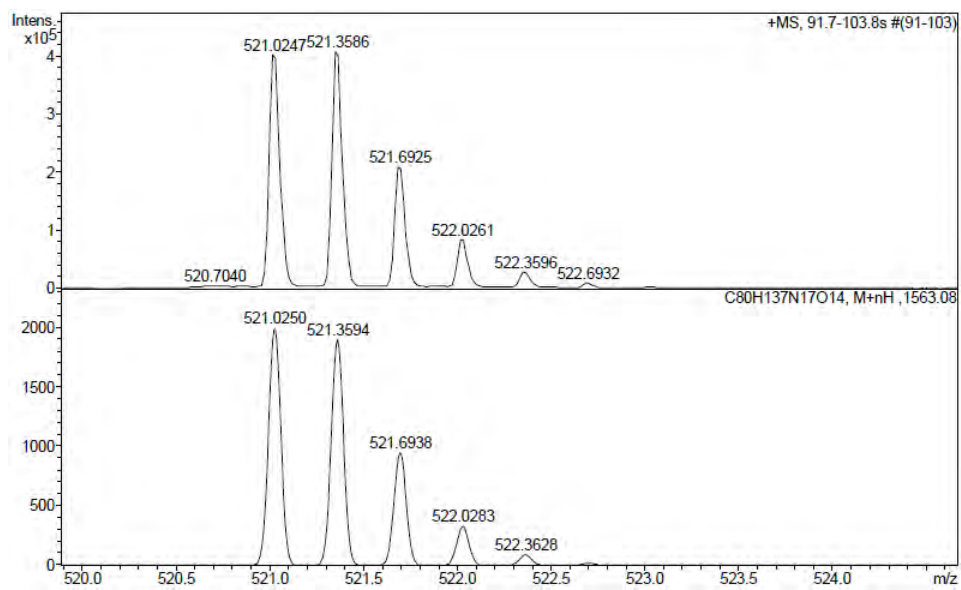
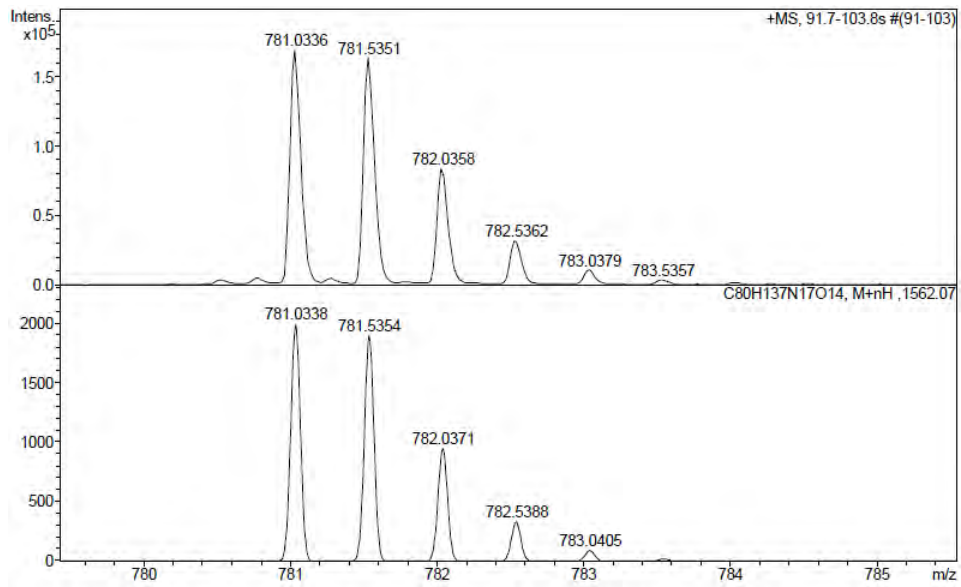
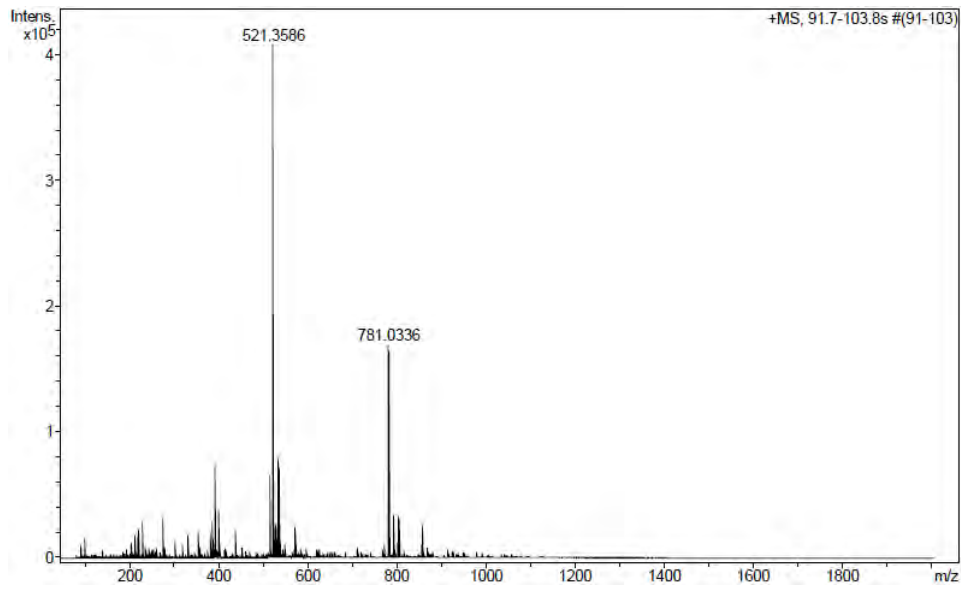
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,41	47,935	4,595	2,52
2	7,61	1340,772	118,085	64,77
3	7,75	485,876	39,491	21,66
4	8,05	205,759	15,107	8,29
5	8,79	66,449	5,022	2,75
Total:		2146,790	182,300	100,00

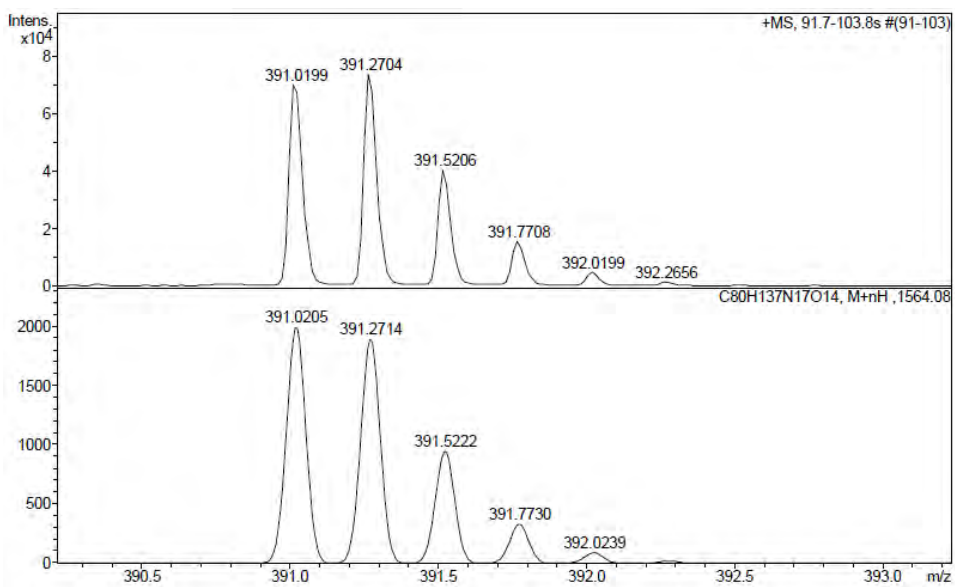
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,64	558,375	42,439	100,00
Total:		558,375	42,439	100,00

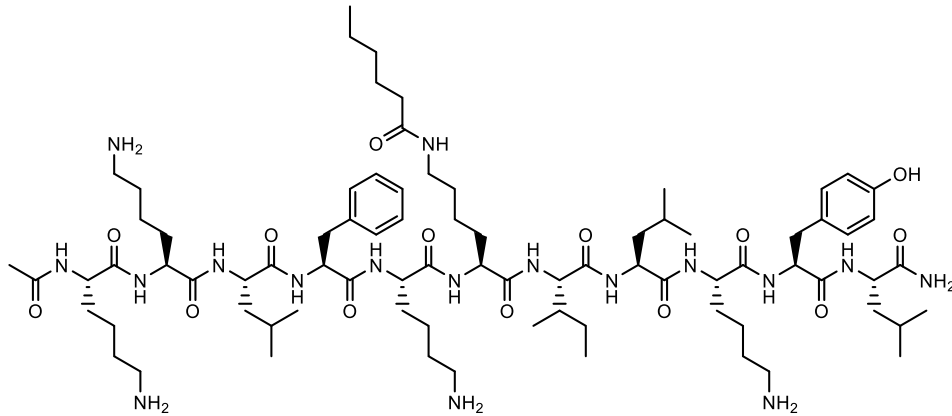
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

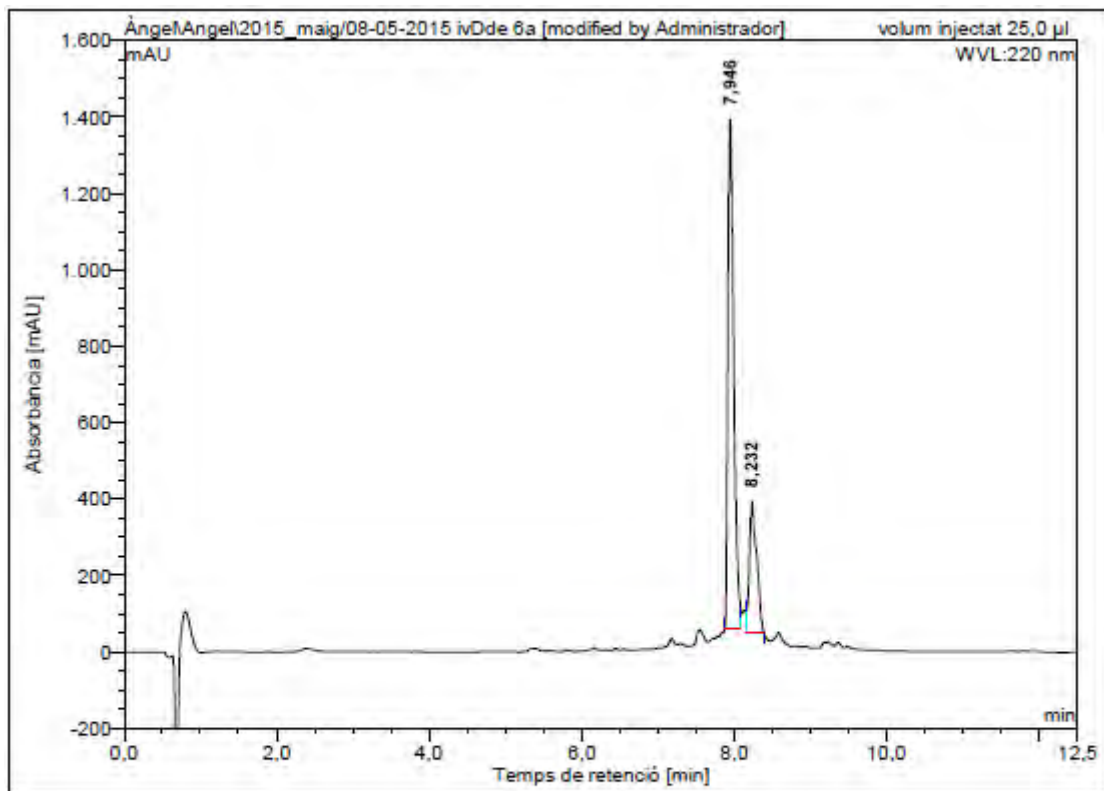




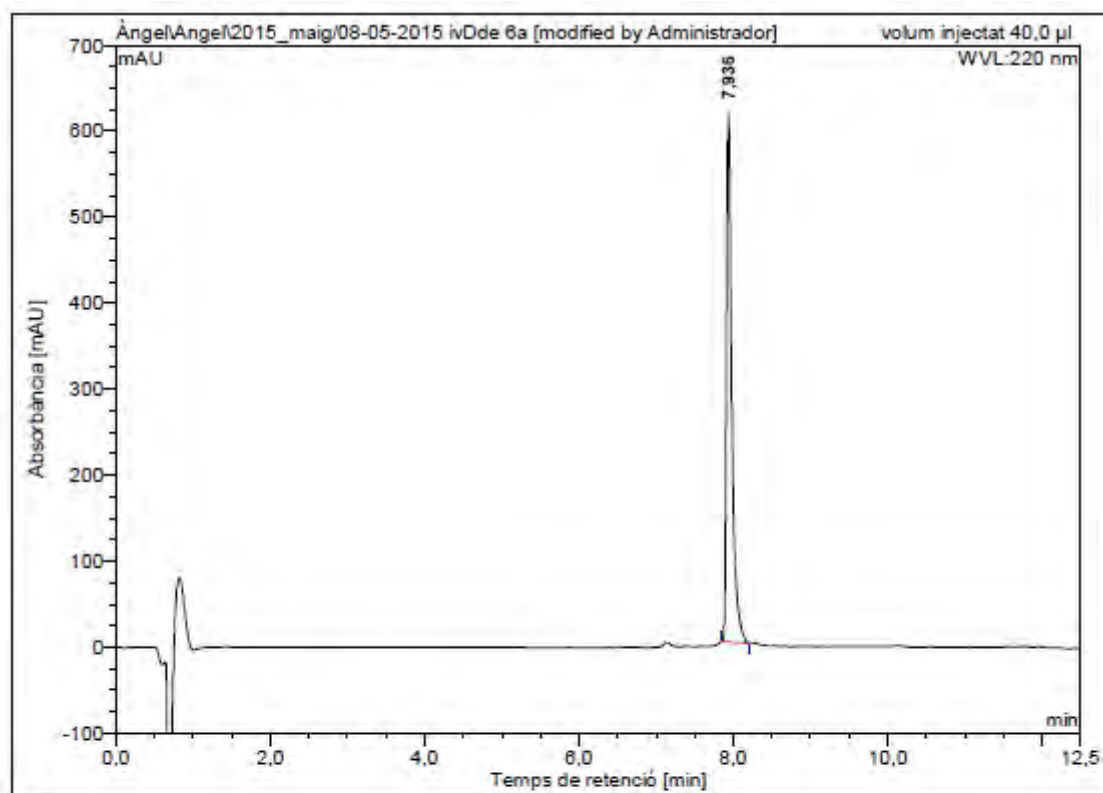
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP373)



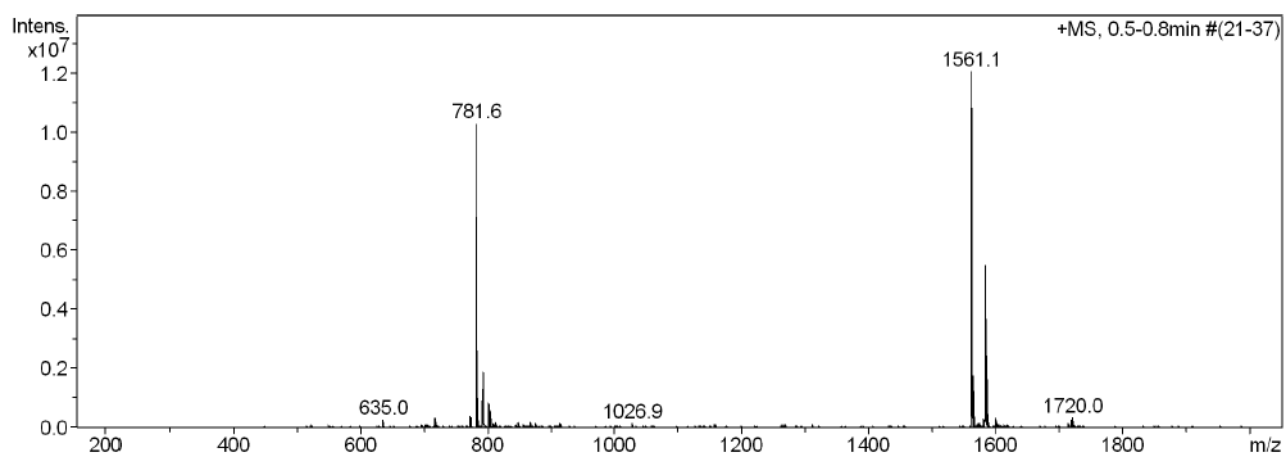
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



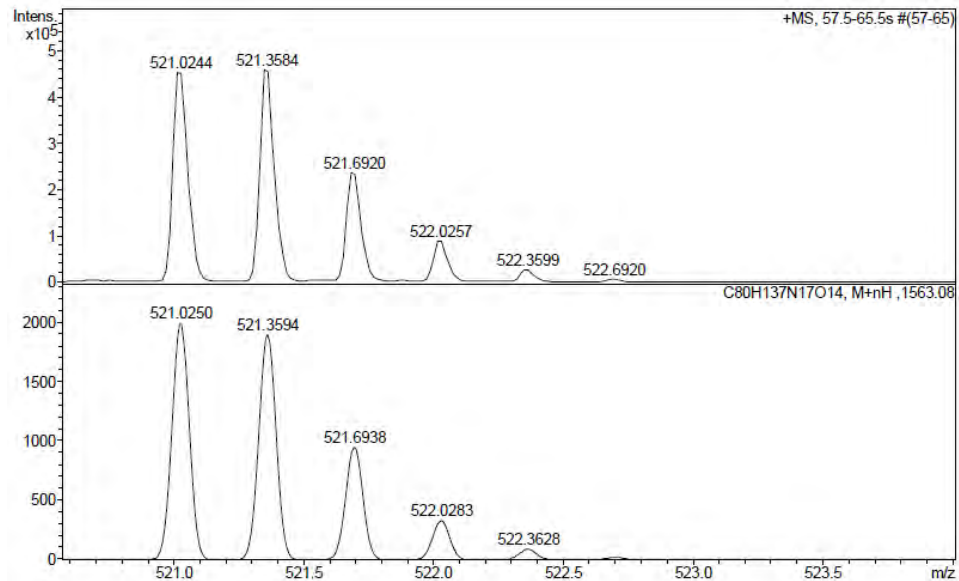
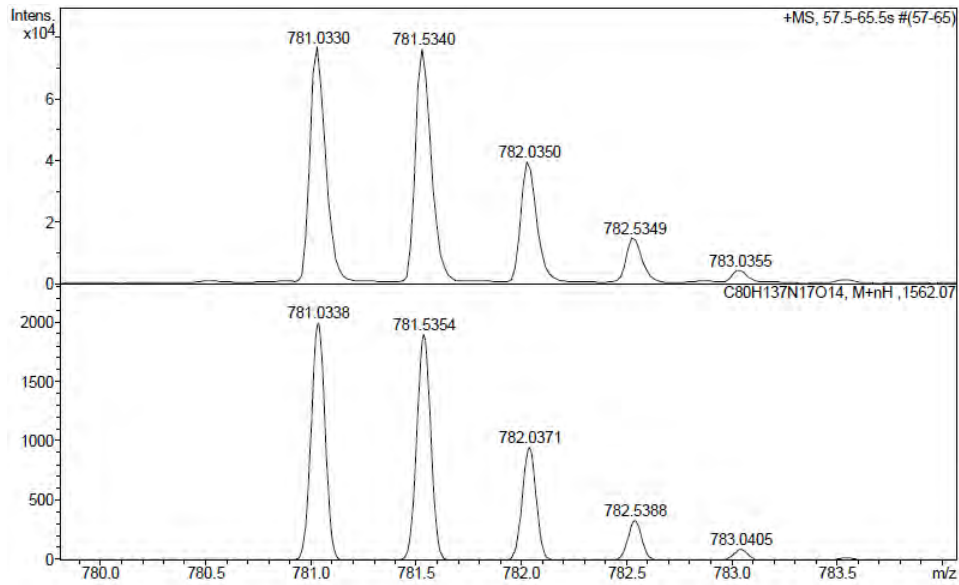
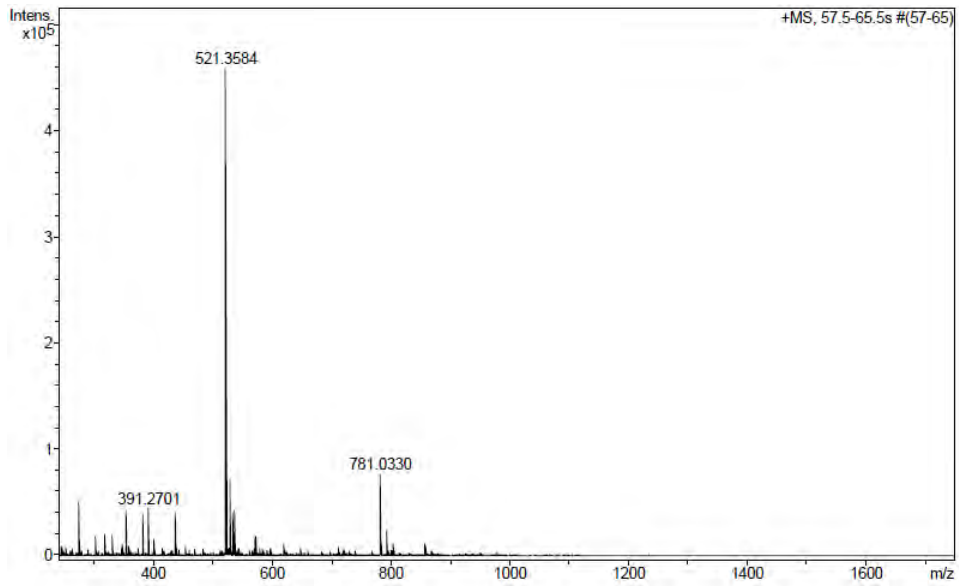
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,95	1332,447	118,517	75,92
2	8,23	340,877	37,595	24,08
Total:		1673,324	156,113	100,00

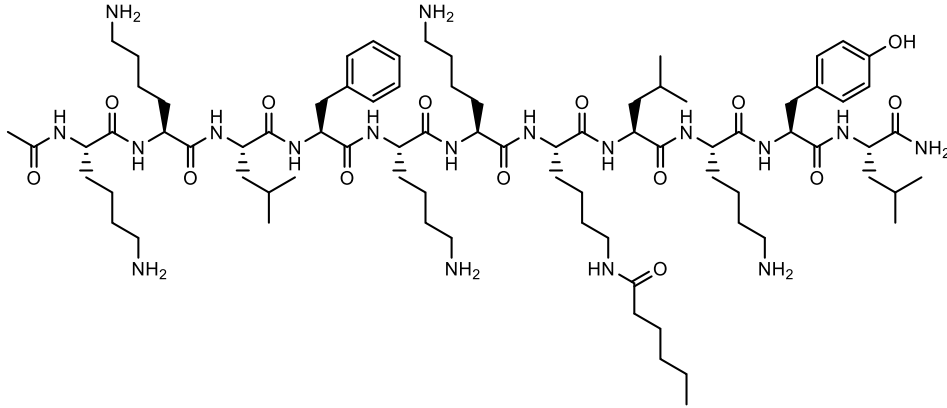
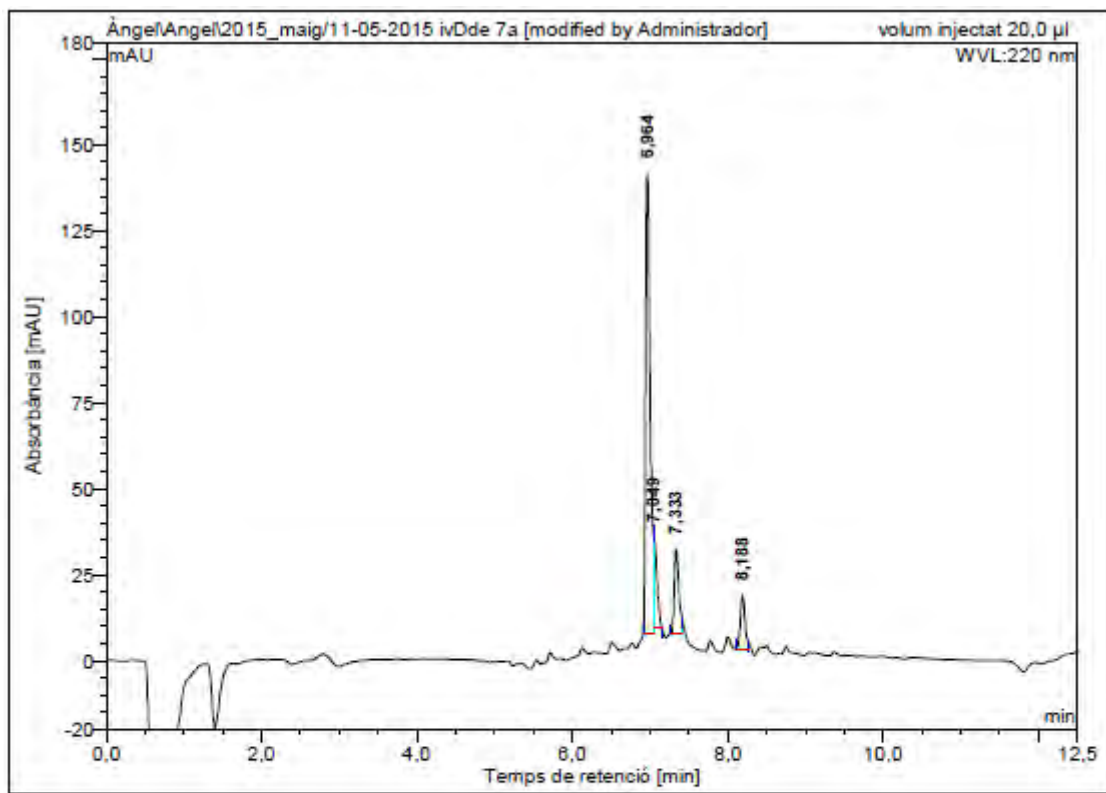
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,94	612,471	49,315	100,00
Total:		612,471	49,315	100,00

ESI-MS (m/z)

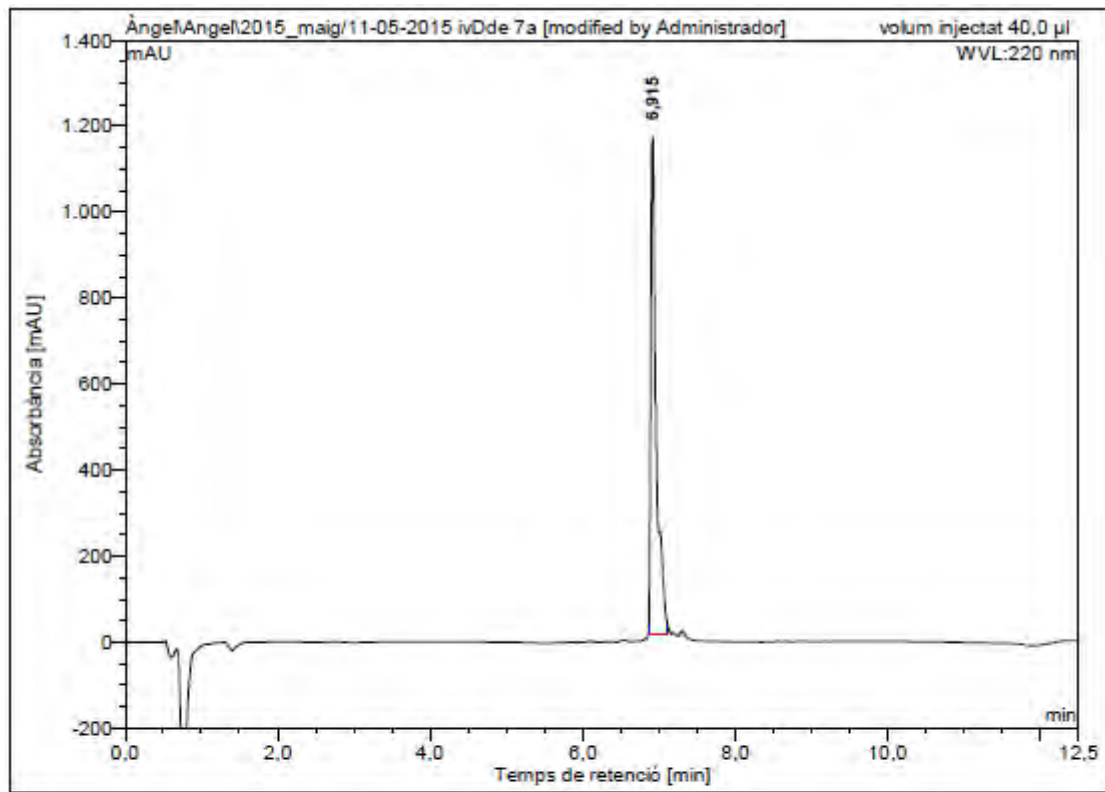
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP374)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

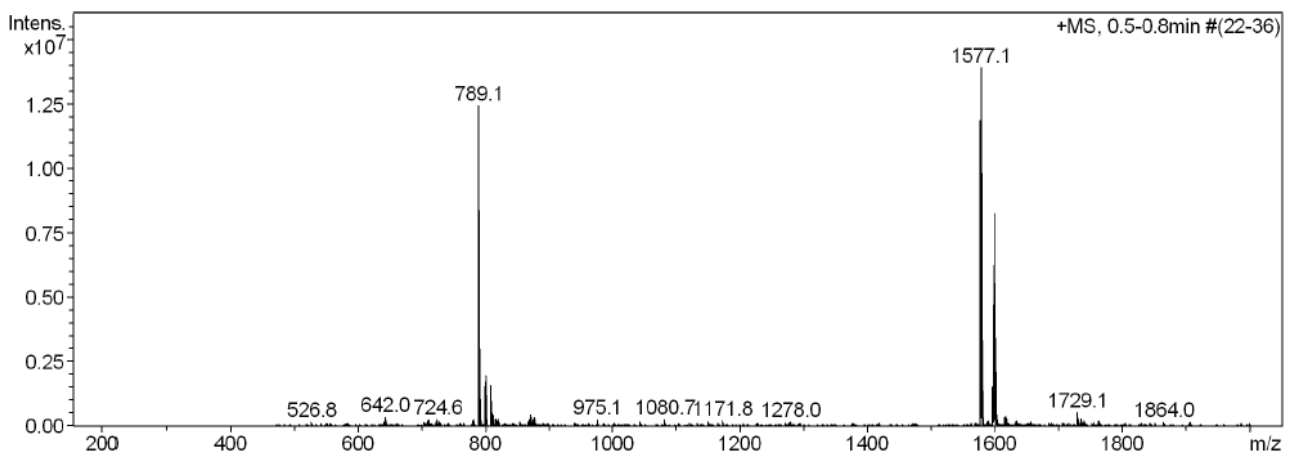
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,96	133,525	9,002	68,96
2	7,05	26,348	1,253	9,60
3	7,33	24,700	1,724	13,20
4	8,19	15,596	1,075	8,23
Total:		200,170	13,054	100,00

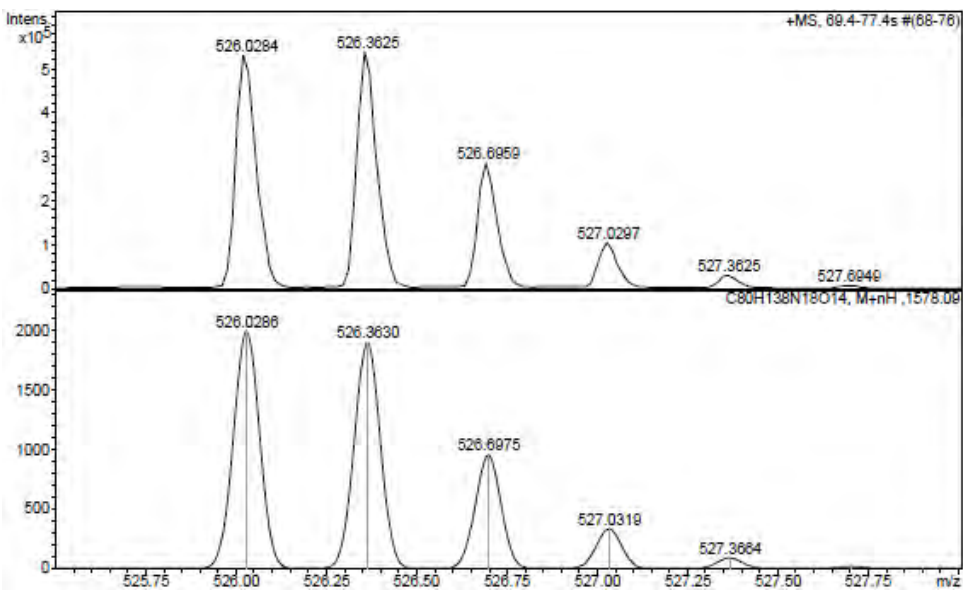
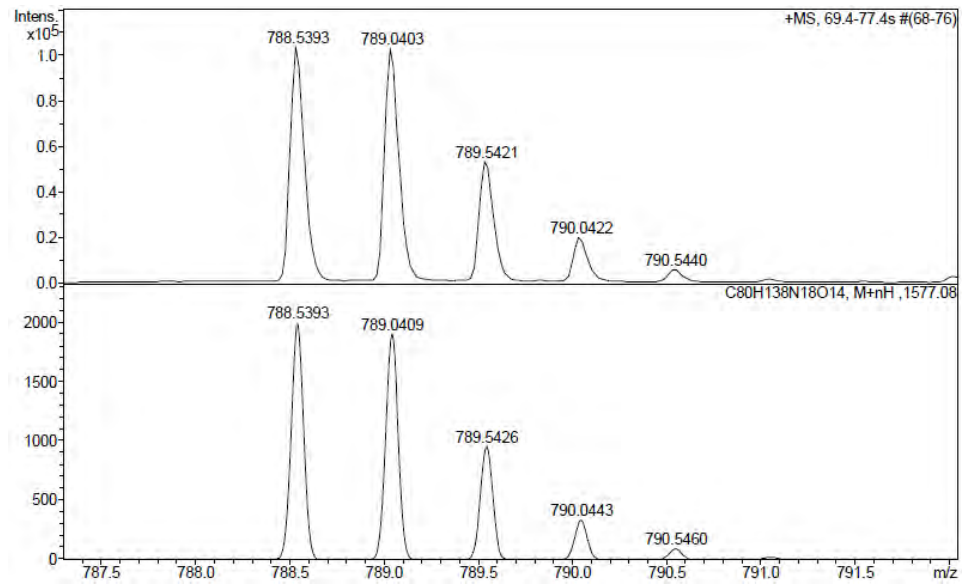
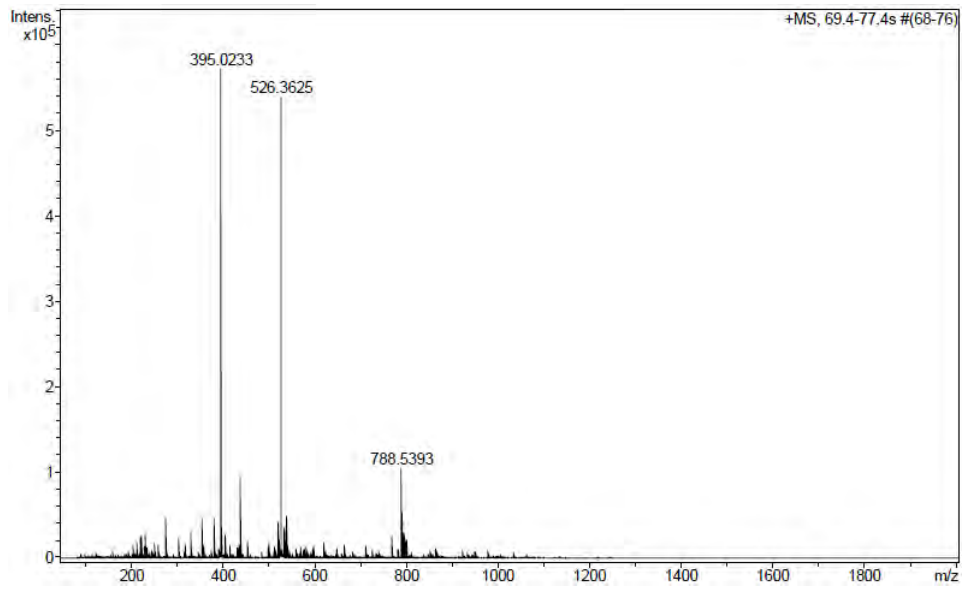
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

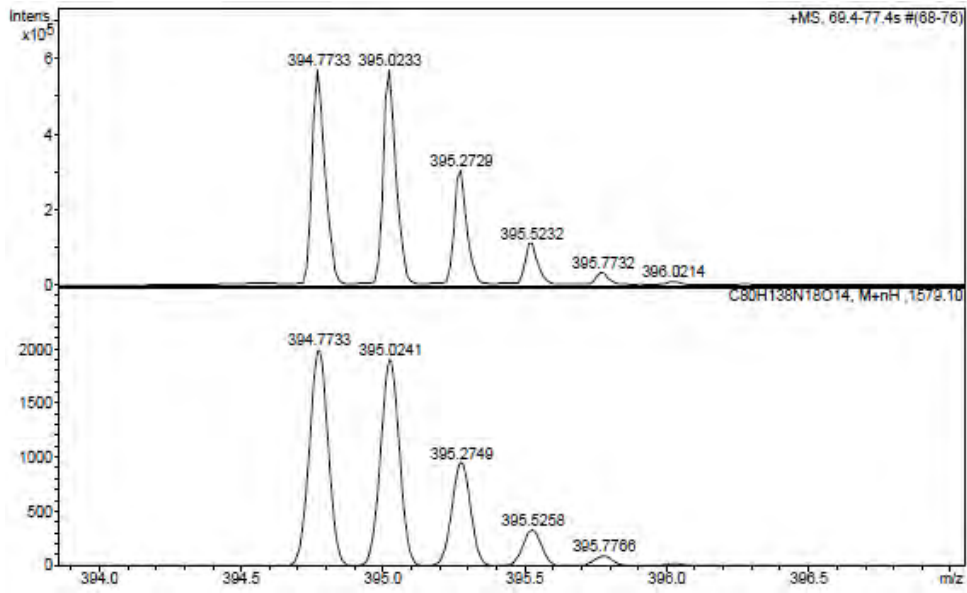


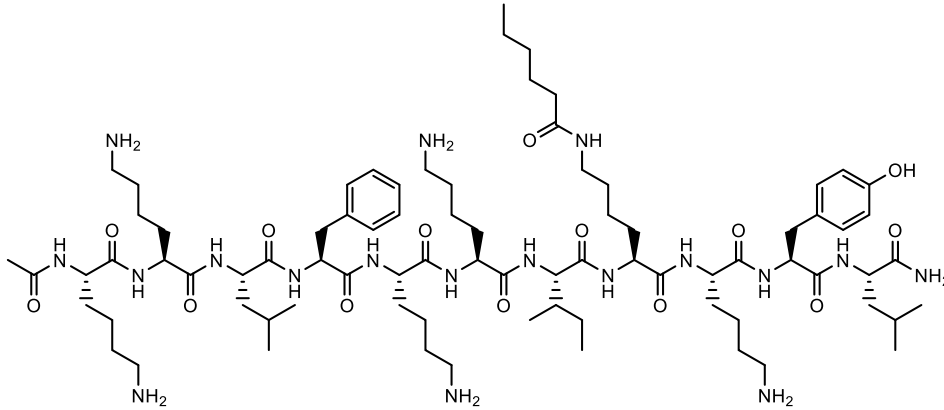
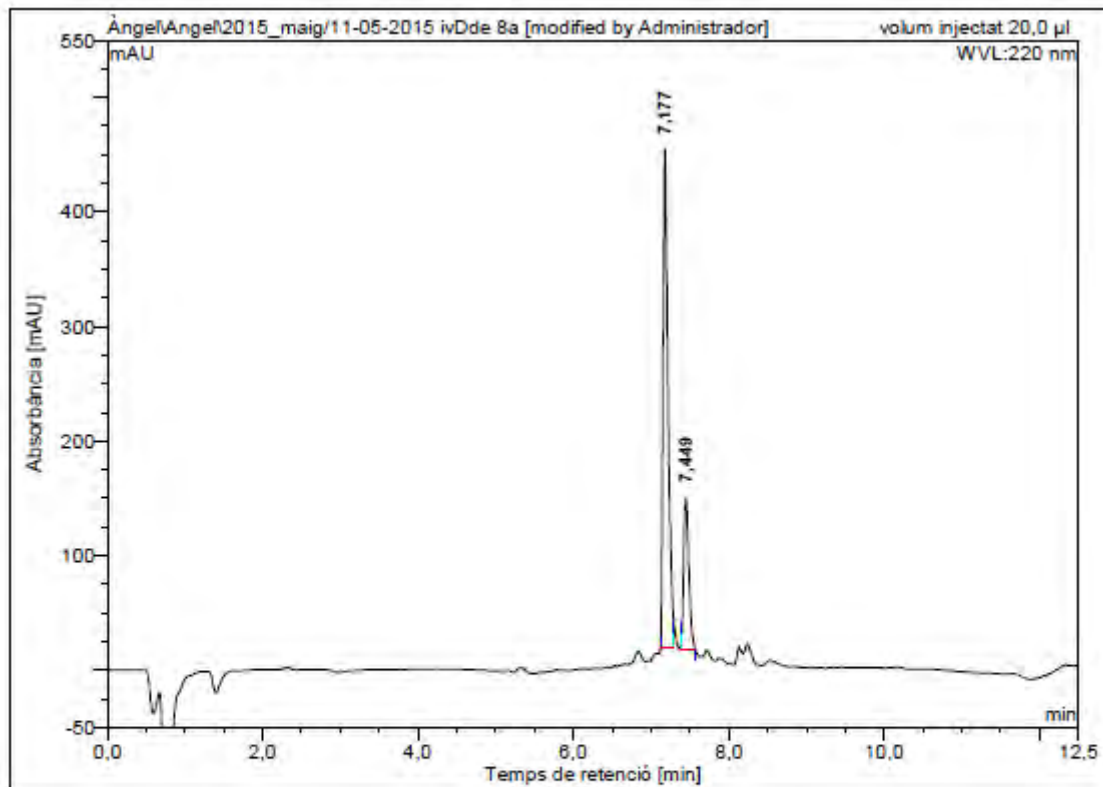
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,91	1158,422	95,276	100,00
Total:		1158,422	95,276	100,00

ESI-MS (m/z)



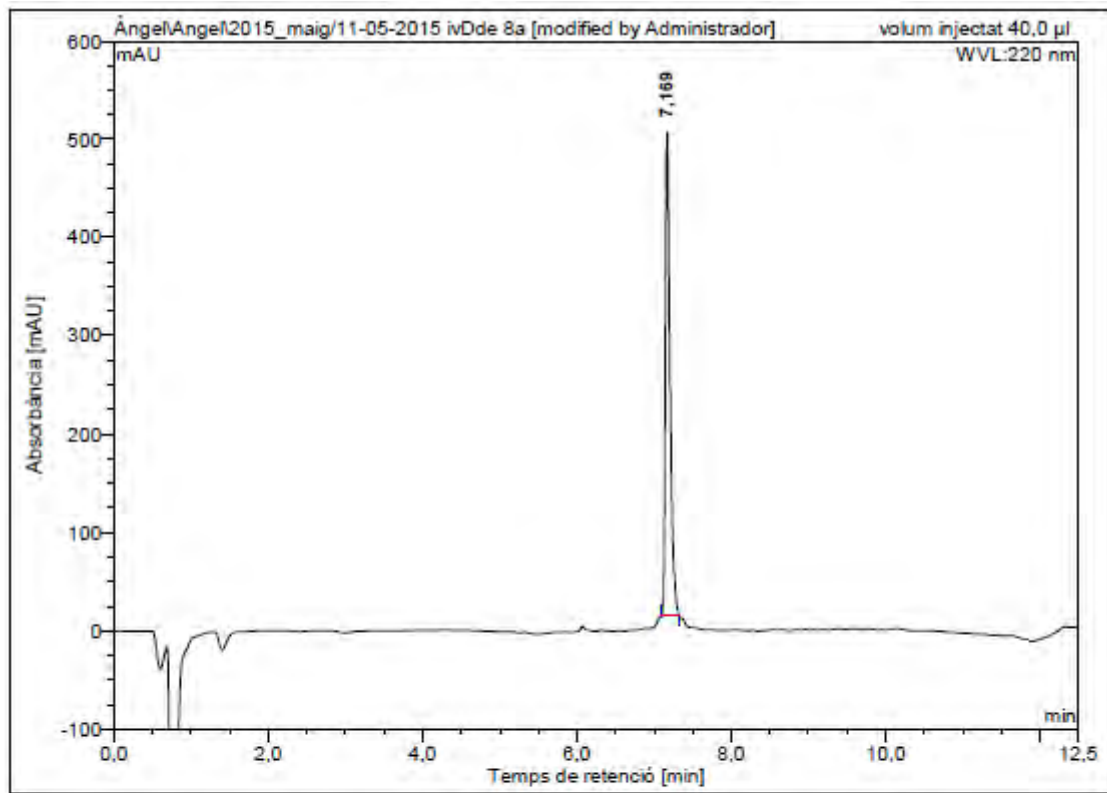
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP375)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

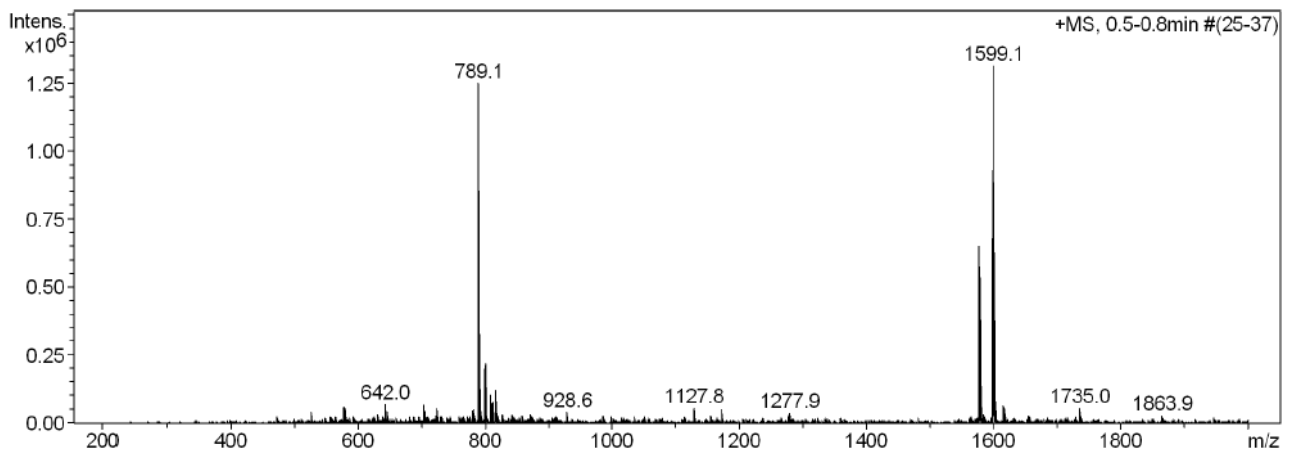
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,18	434,330	31,911	75,93
2	7,45	132,639	10,117	24,07
Total:		566,969	42,028	100,00

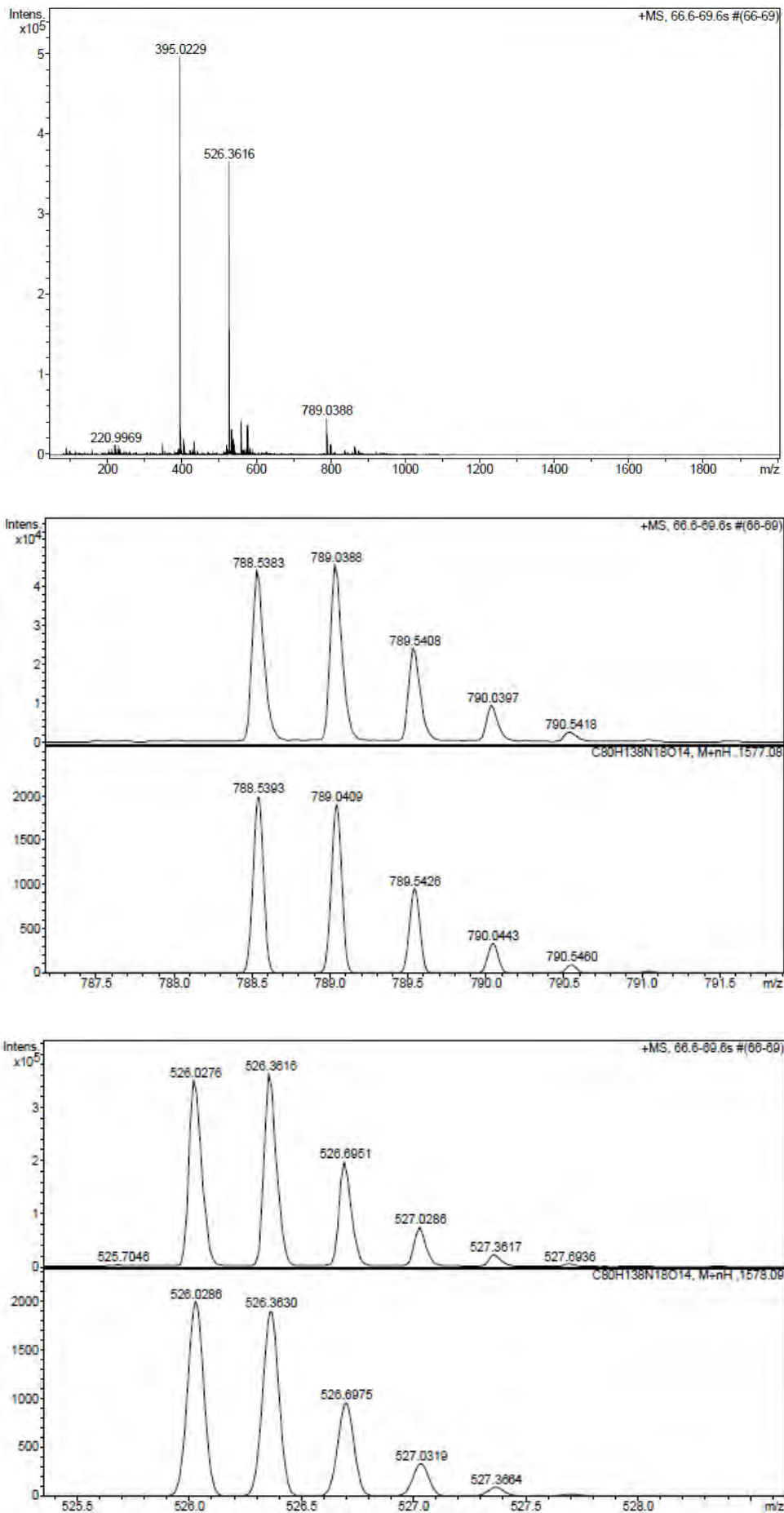
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

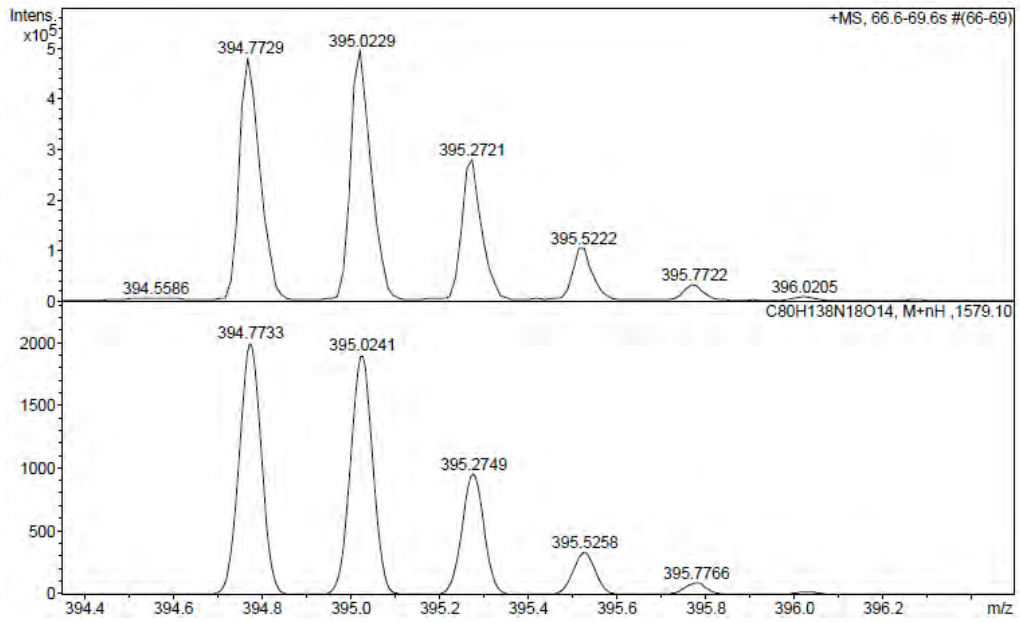


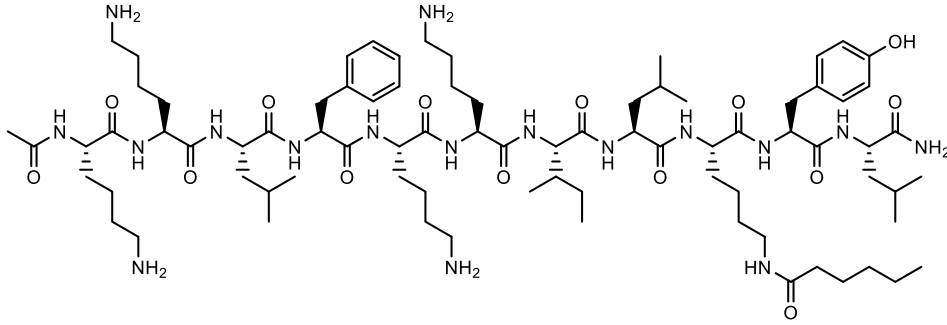
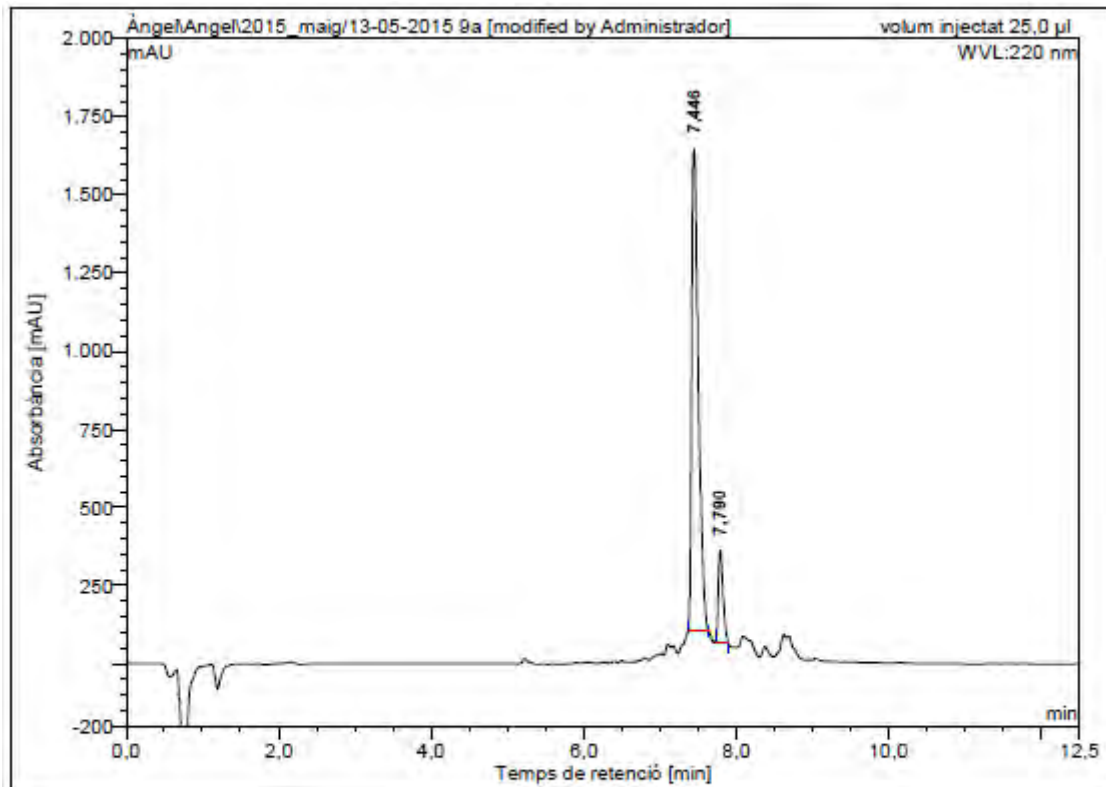
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,17	491,684	34,711	100,00
Total:		491,684	34,711	100,00

ESI-MS (m/z)



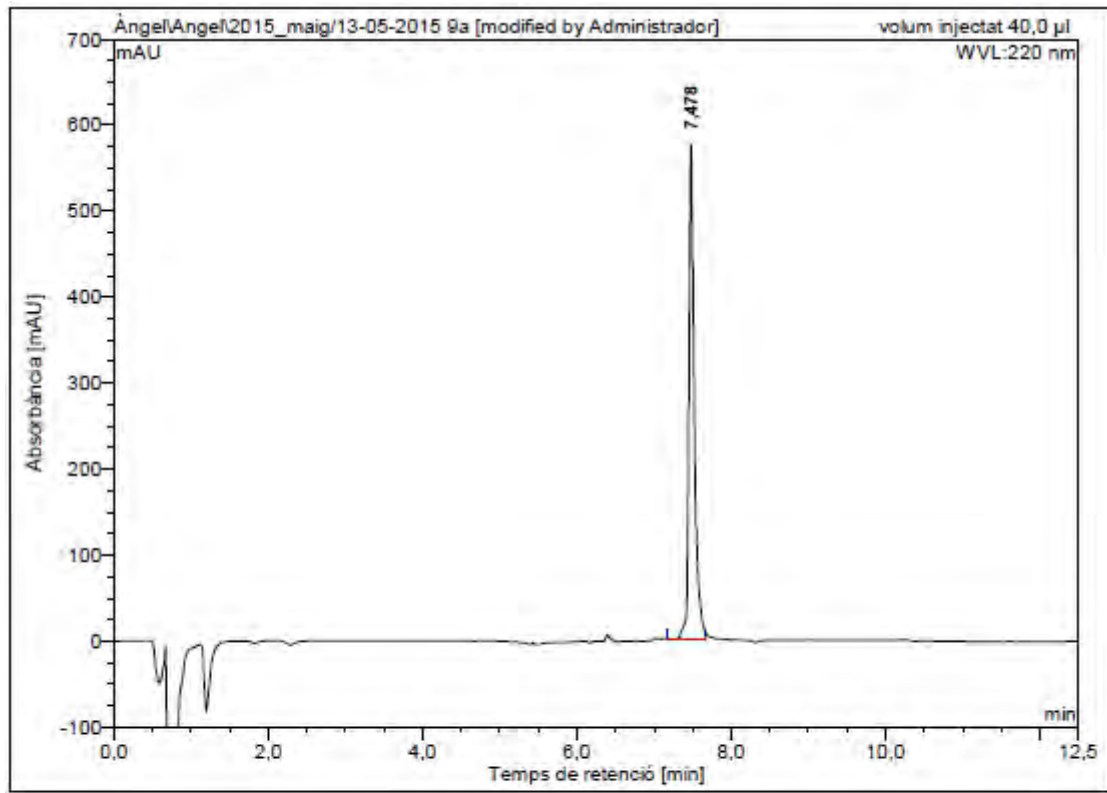
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₅H₁₁)-Tyr-Leu-NH₂ (BP376)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

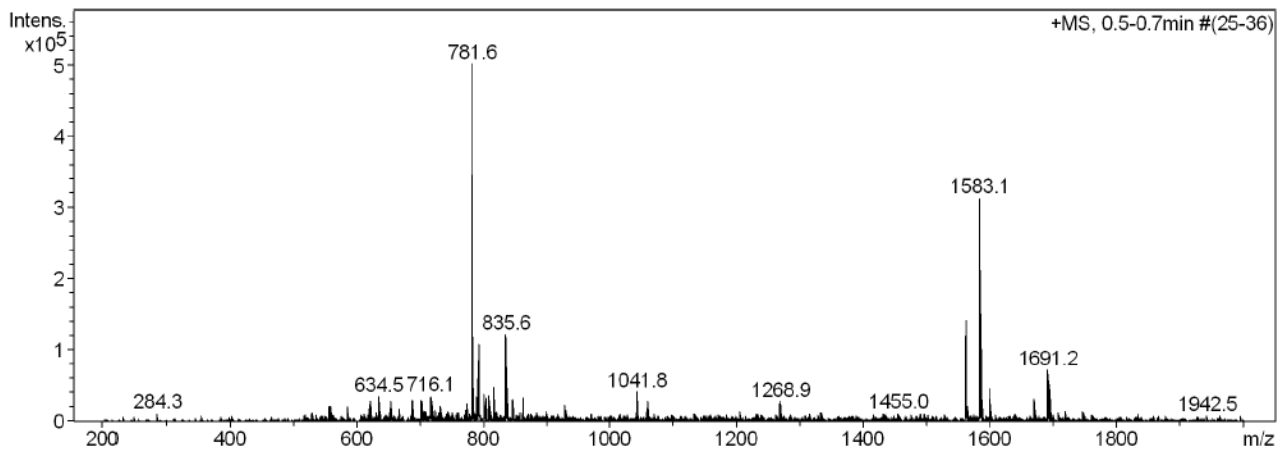
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,45	1536,958	155,833	87,70
2	7,79	298,985	21,863	12,30
Total:		1835,943	177,696	100,00

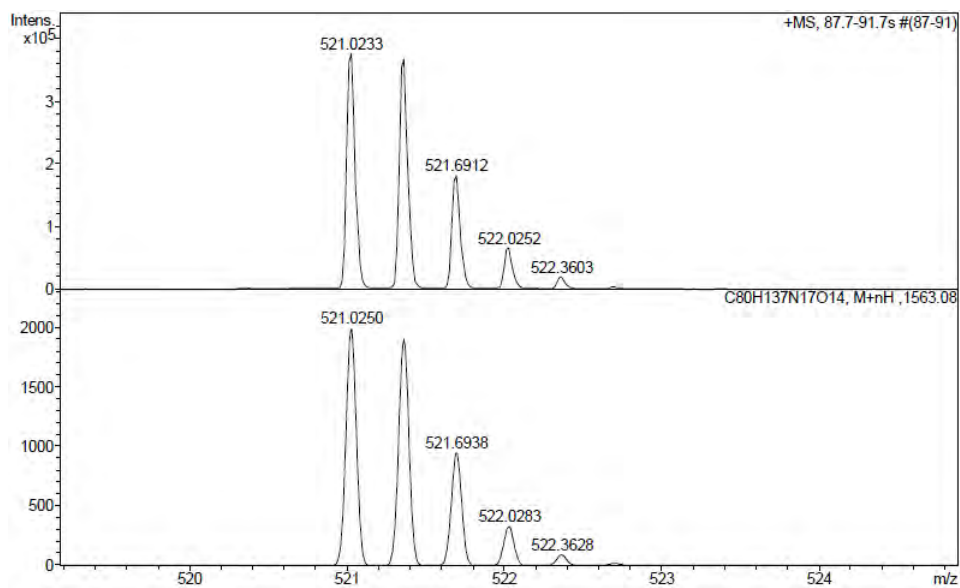
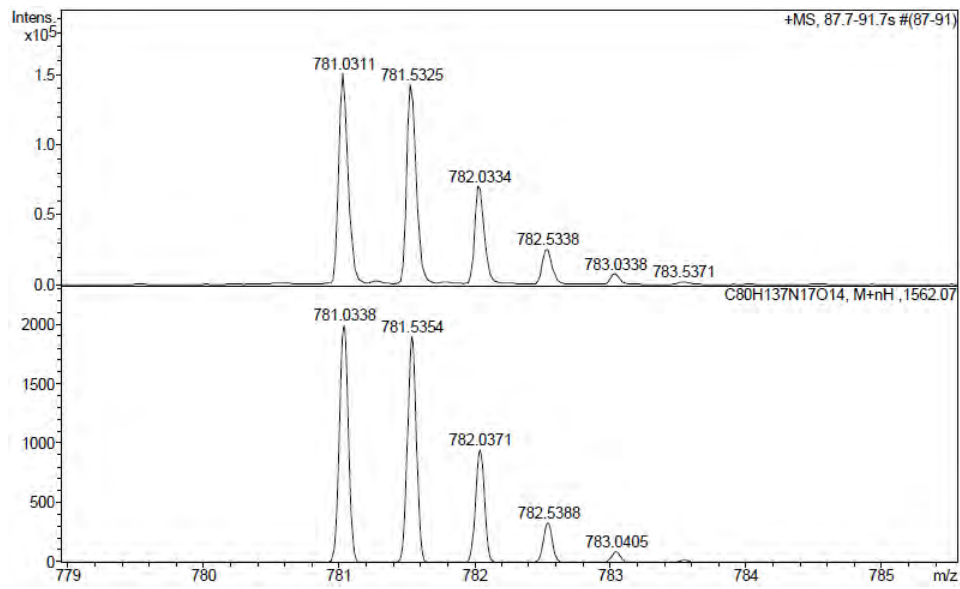
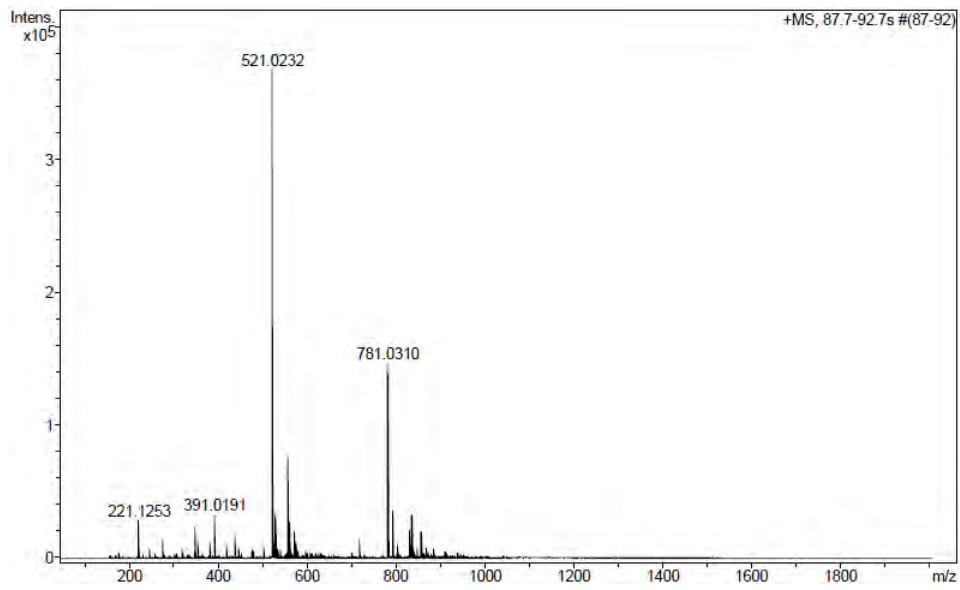
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



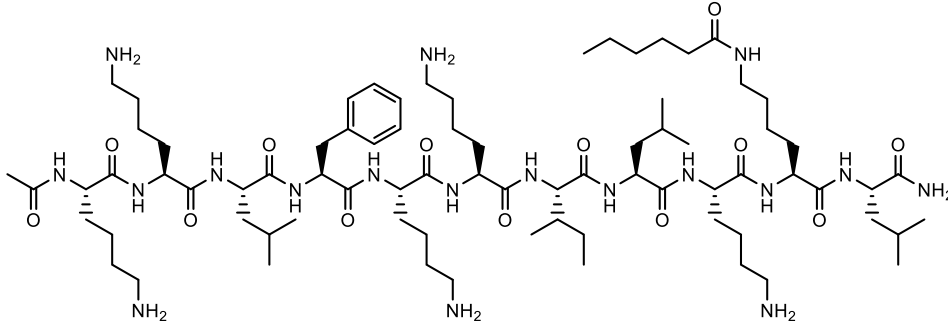
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,48	574,445	47,224	100,00
Total:		574,445	47,224	100,00

ESI-MS (m/z)

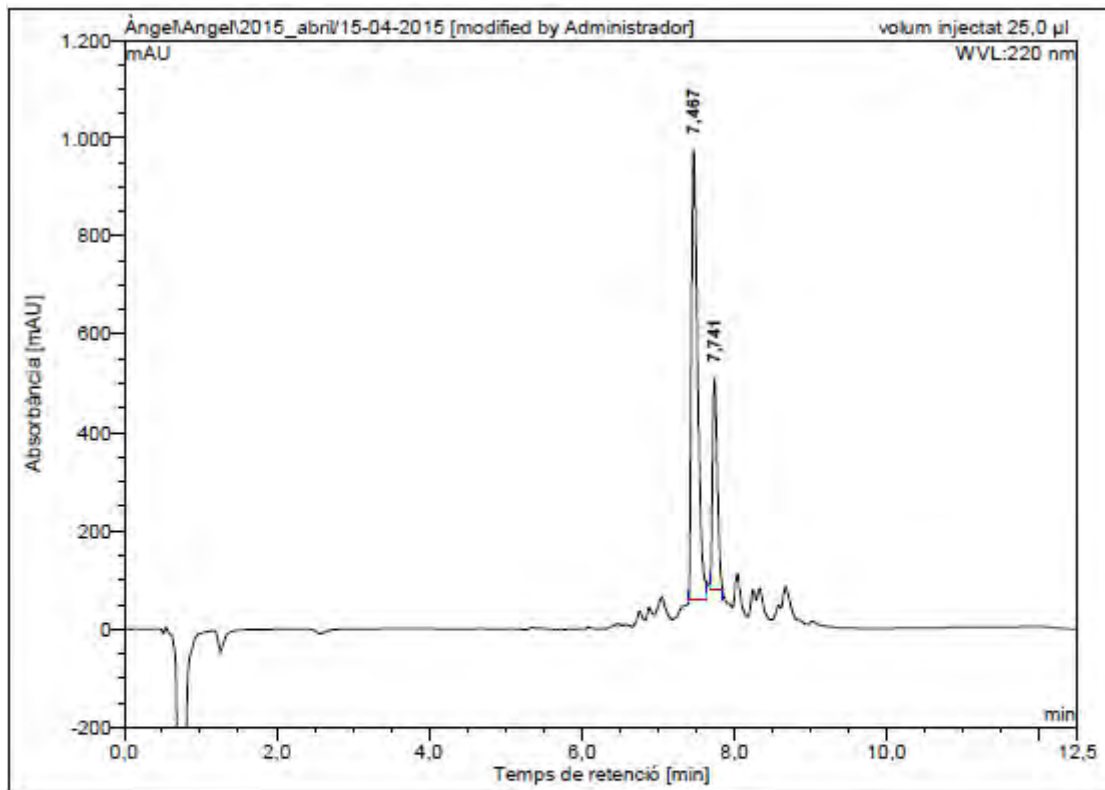


HRMS (m/z)

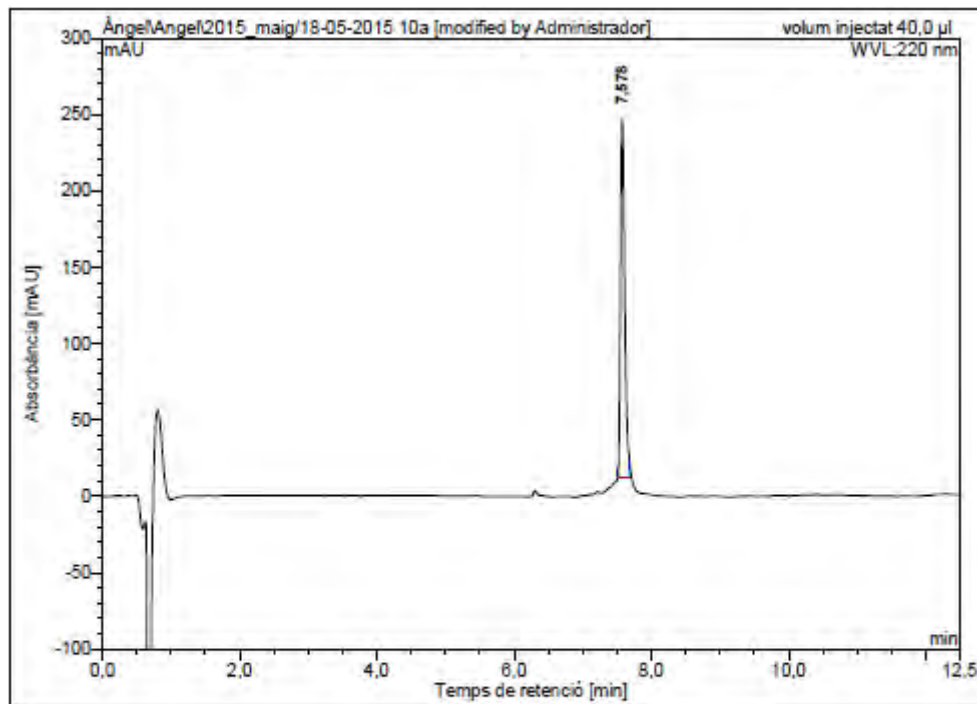
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-NH₂ (BP377)



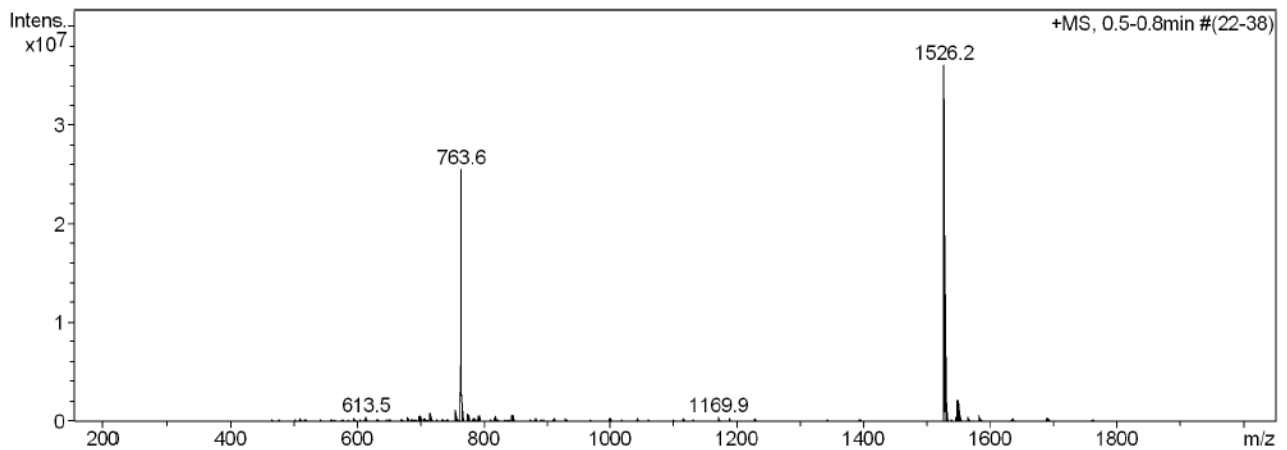
HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)



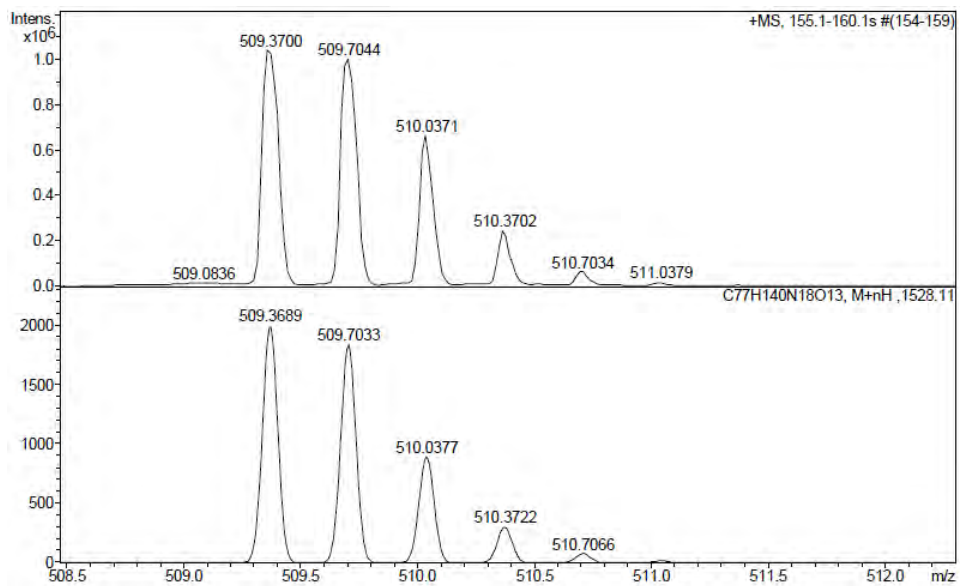
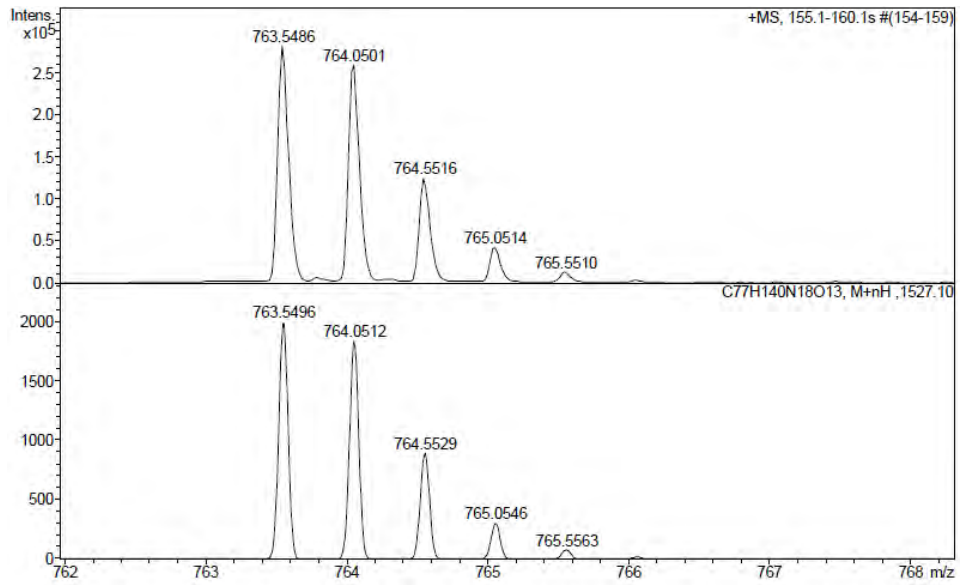
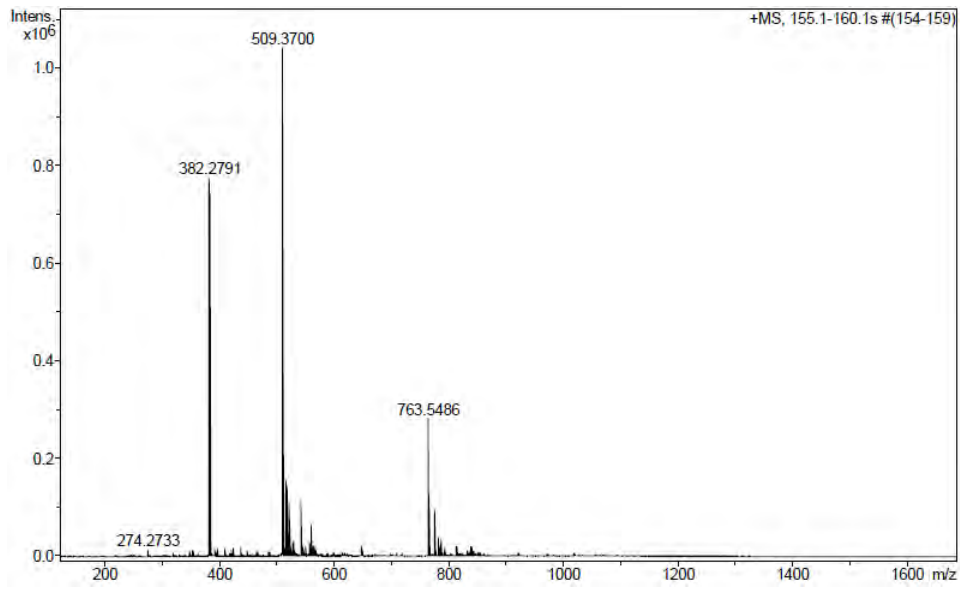
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,47	918,568	86,749	73,19
2	7,74	430,457	31,783	26,81
Total:		1349,025	118,532	100,00

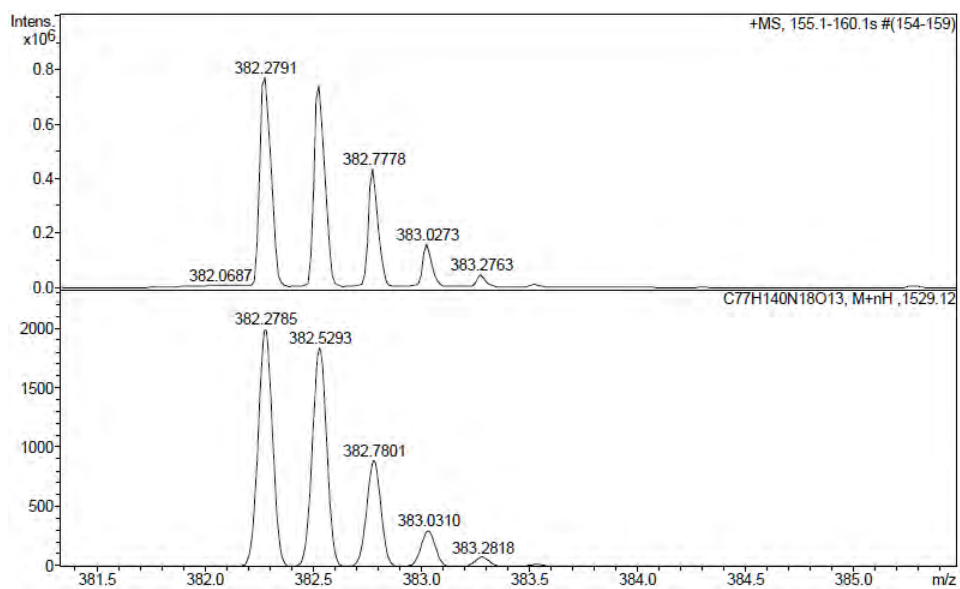
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,58	234,918	17,199	100,00
Total:		234,918	17,199	100,00

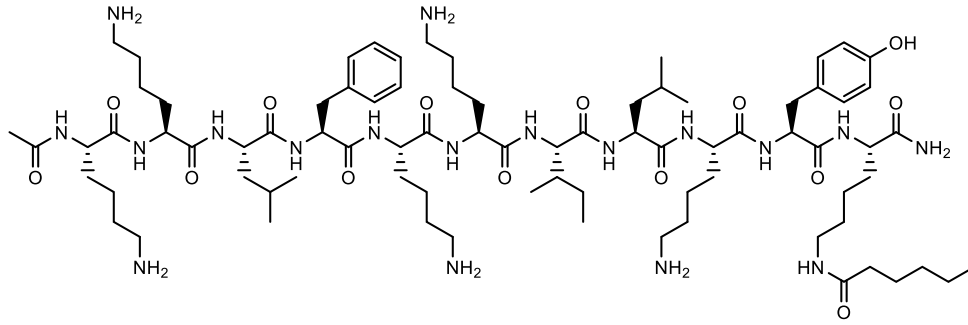
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

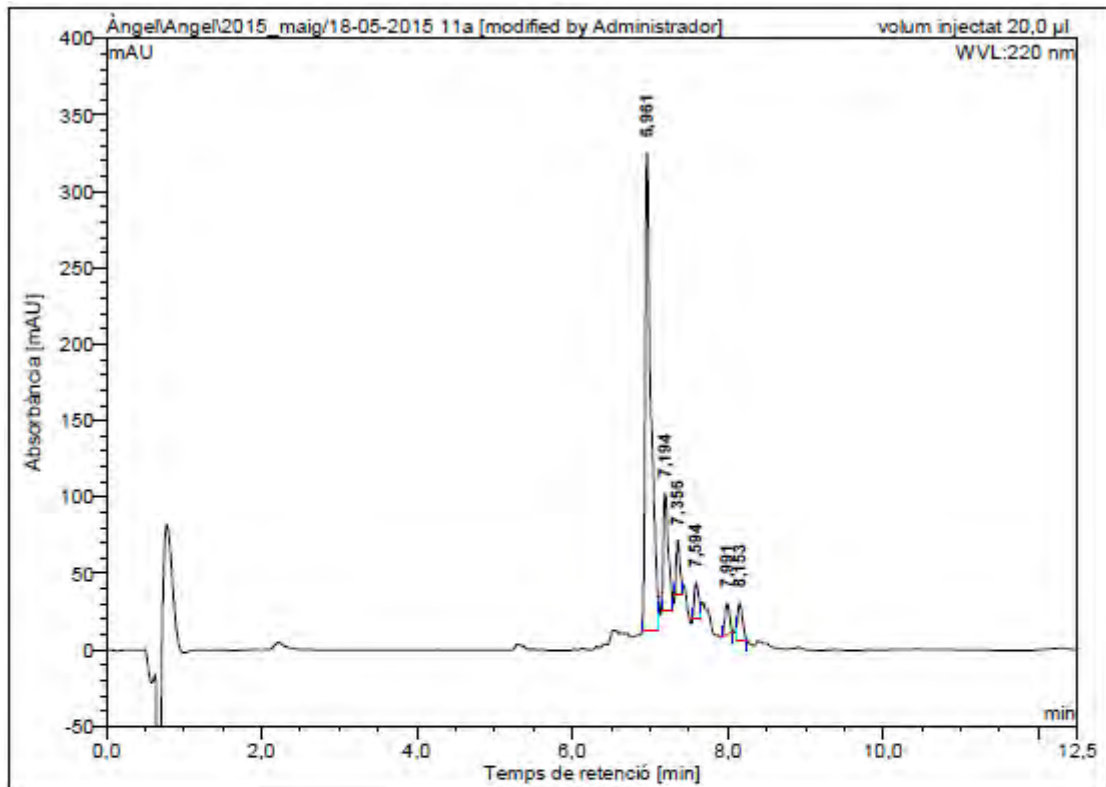




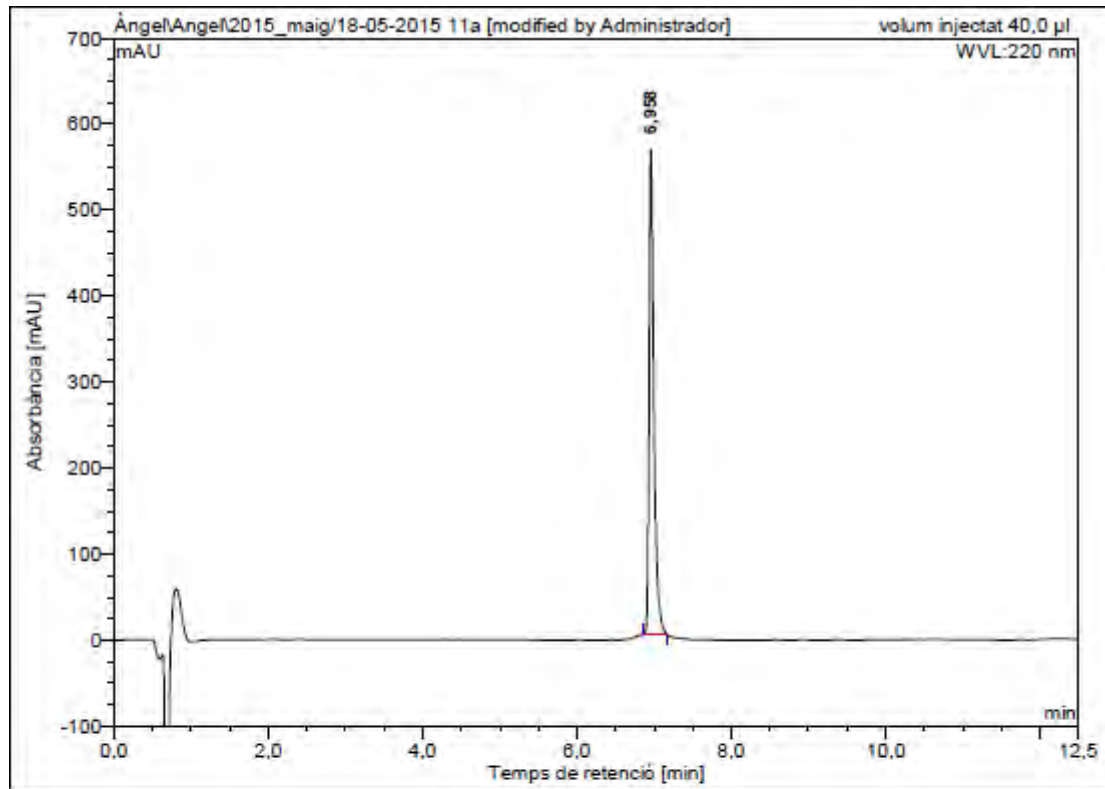
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (BP378)



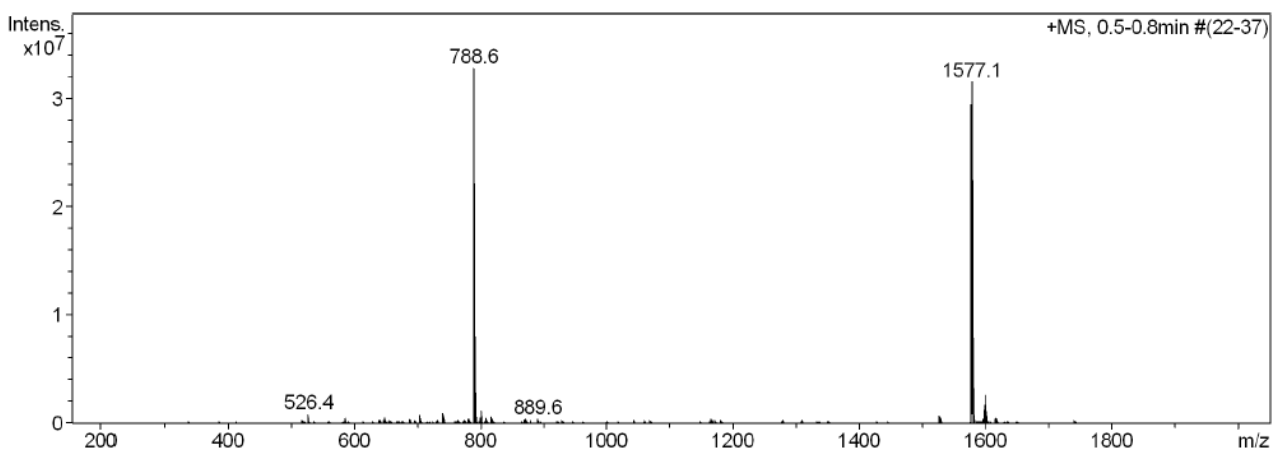
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



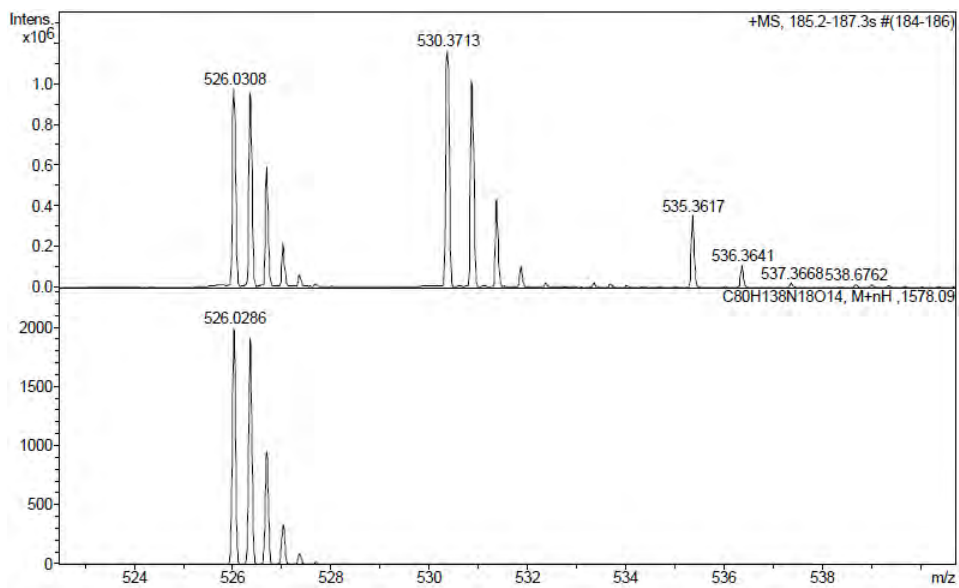
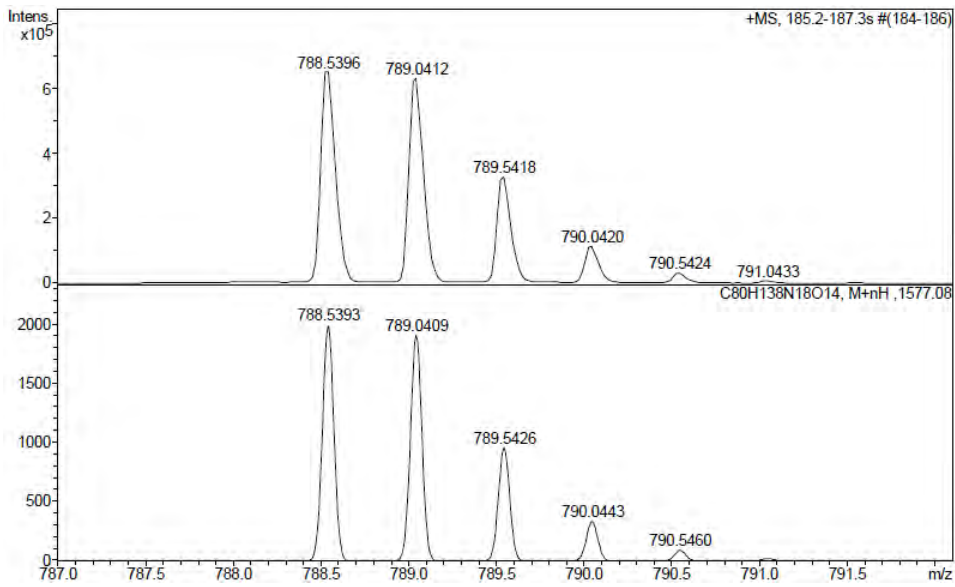
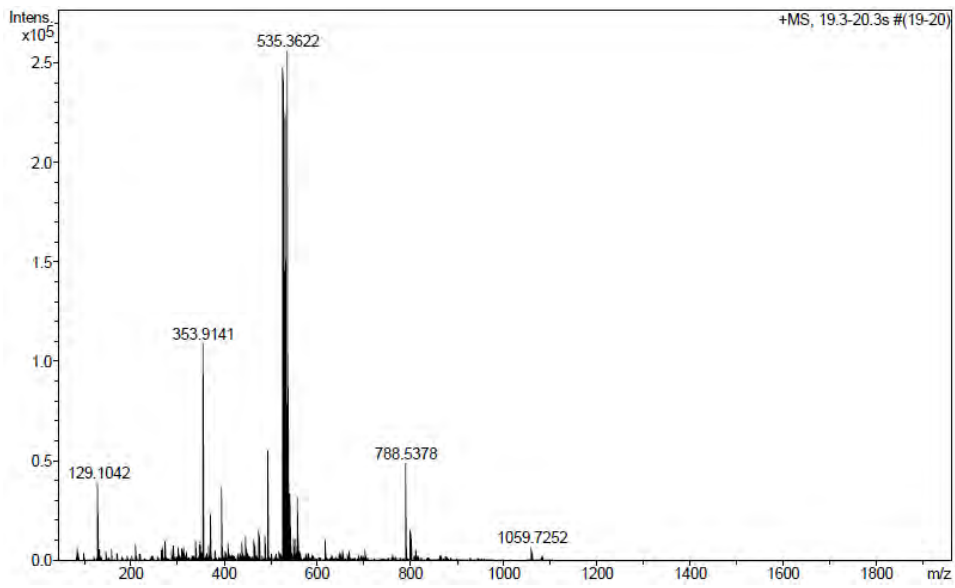
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,96	312,376	27,209	68,48
2	7,19	77,522	5,774	14,53
3	7,36	36,021	1,980	4,98
4	7,59	23,610	1,467	3,69
5	7,99	20,581	1,420	3,57
6	8,15	24,528	1,881	4,73
Total:		494,638	39,730	100,00

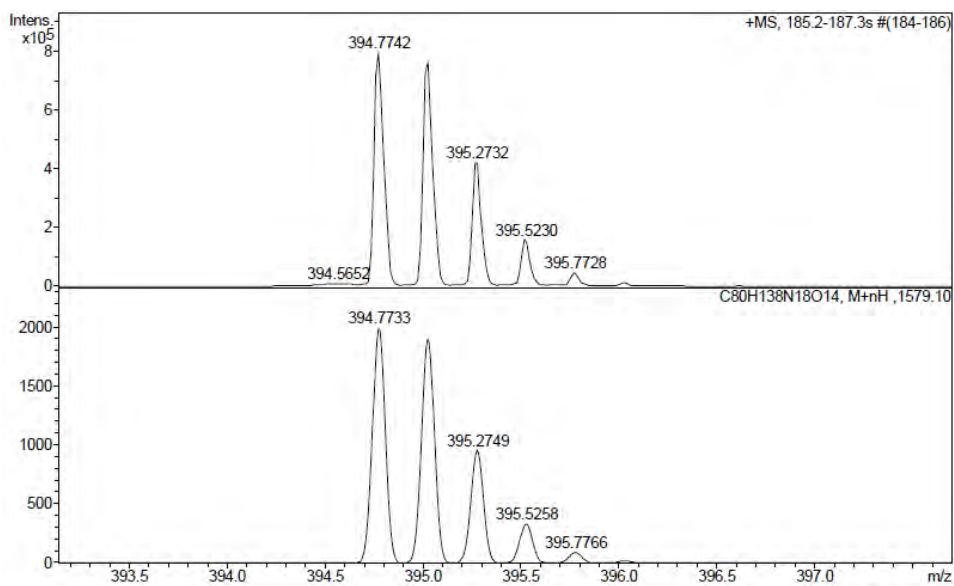
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,96	564,325	40,841	100,00
Total:		564,325	40,841	100,00

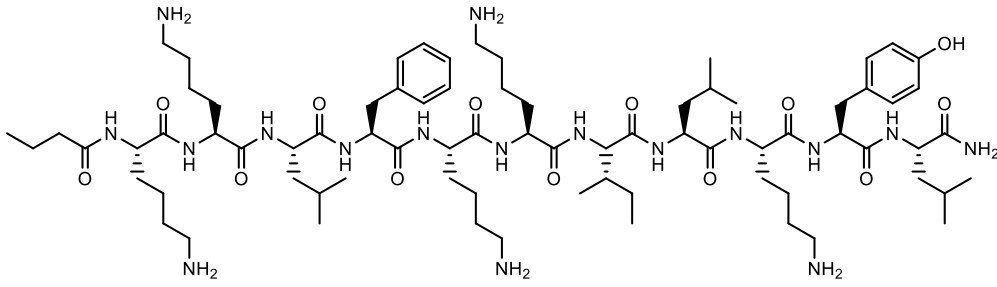
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

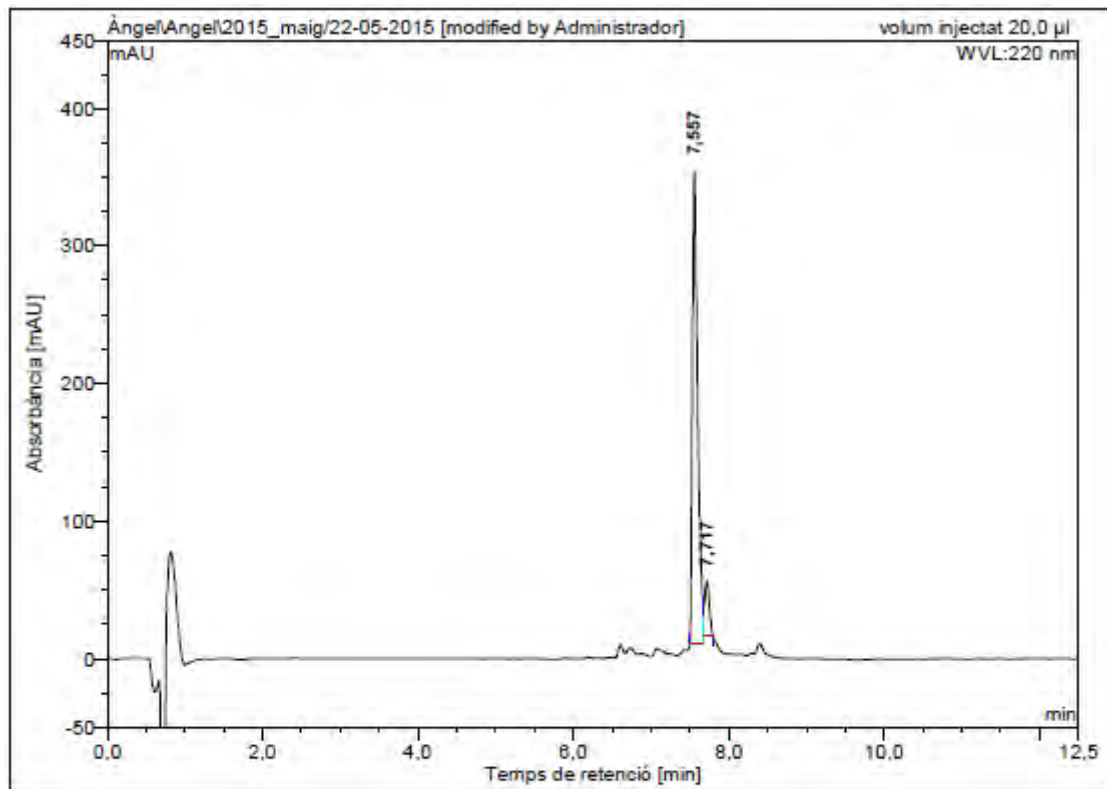




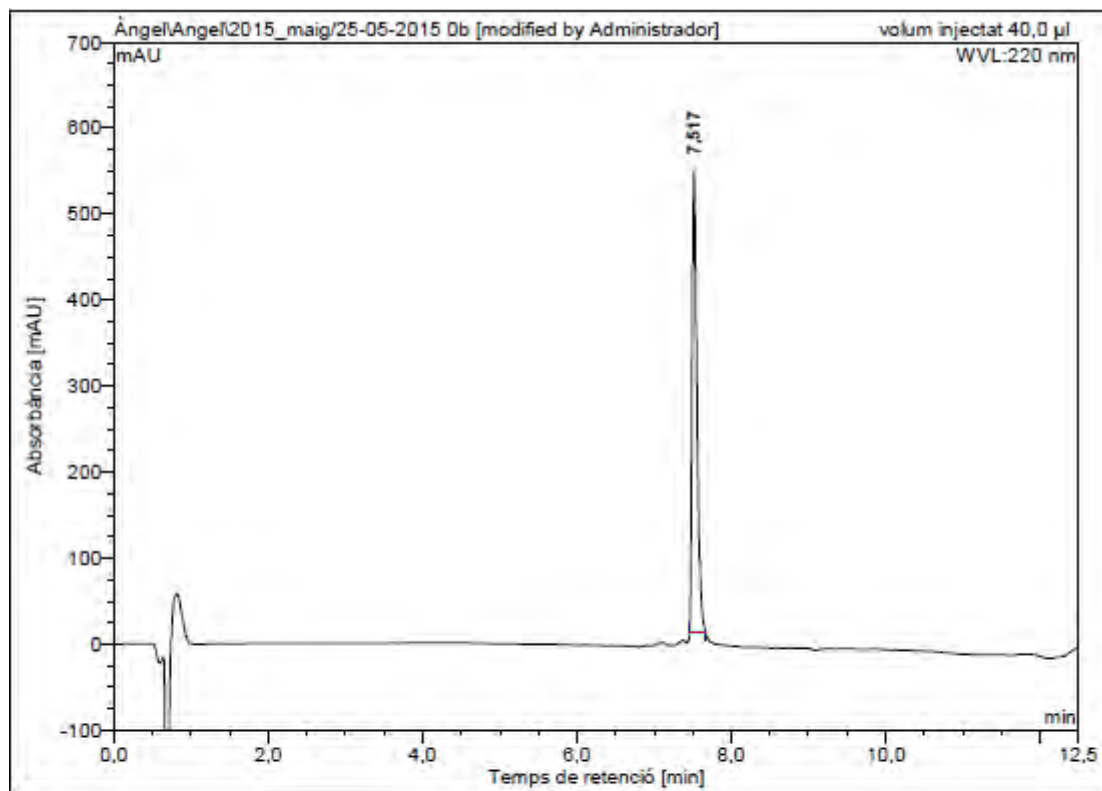
C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP379)



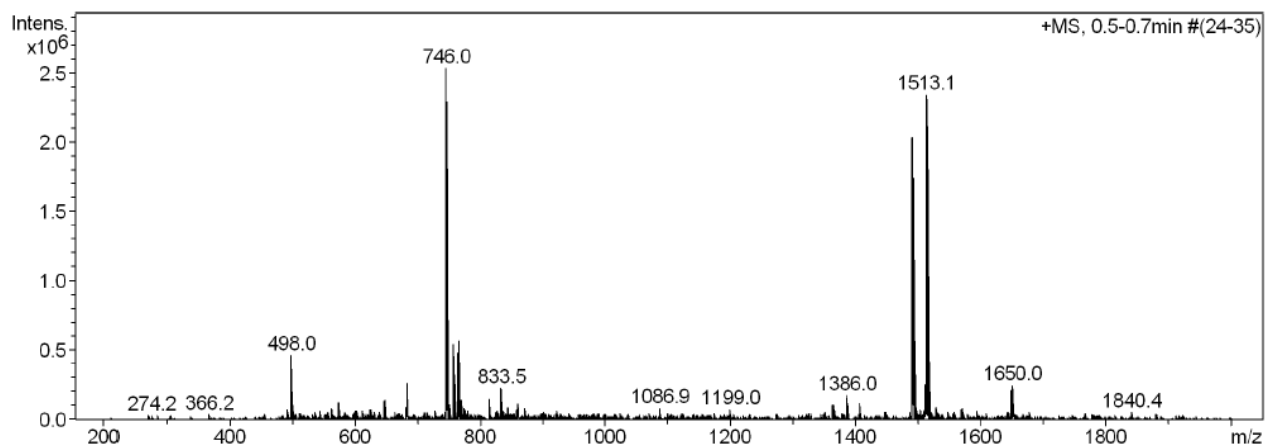
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



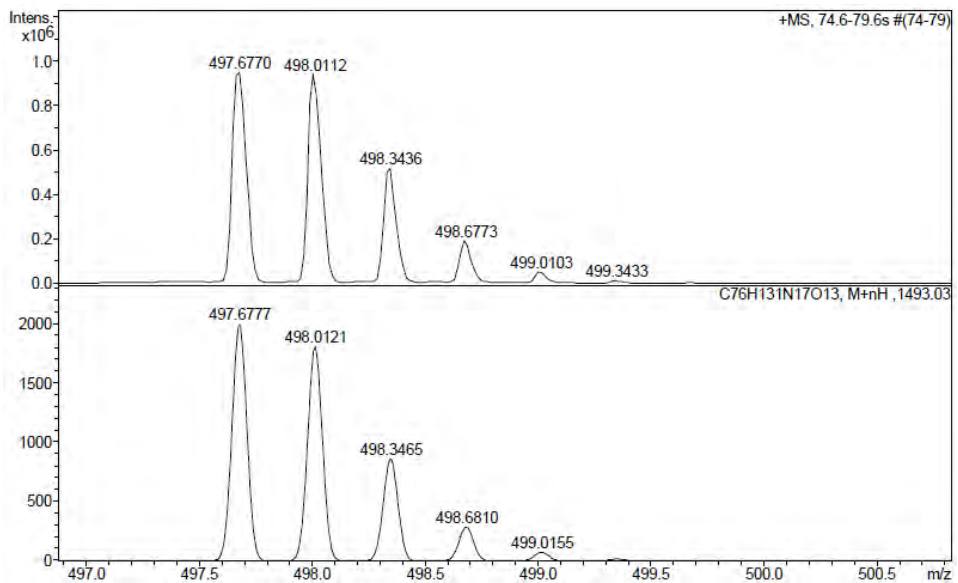
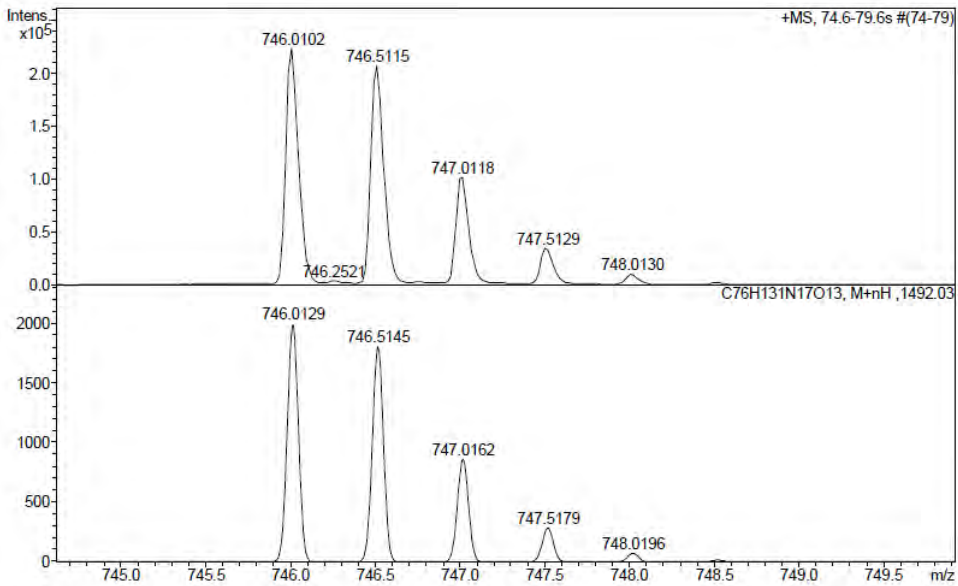
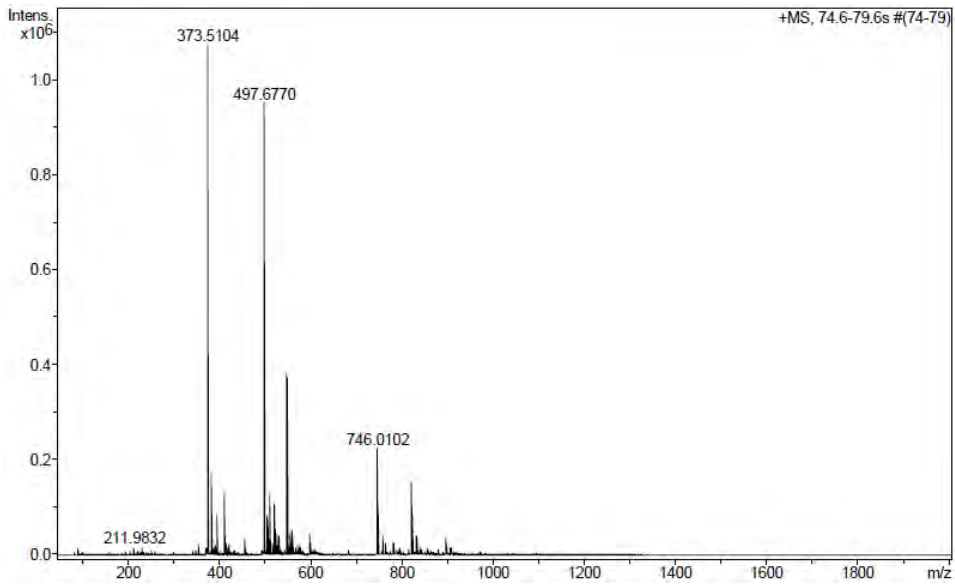
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,56	343,351	26,903	90,82
2	7,72	39,891	2,718	9,18
Total:		383,242	29,621	100,00

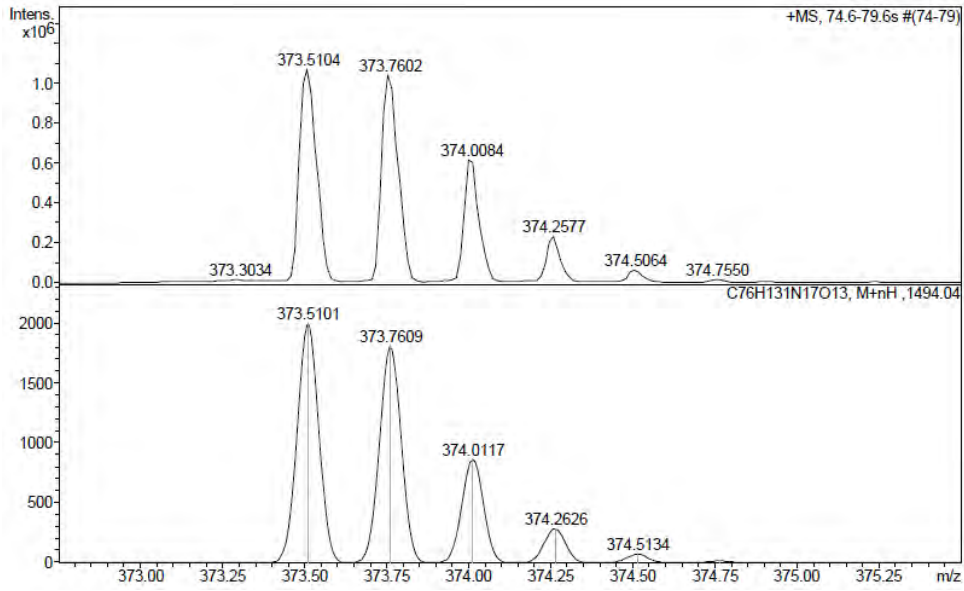
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,52	535,647	38,742	100,00
Total:		535,647	38,742	100,00

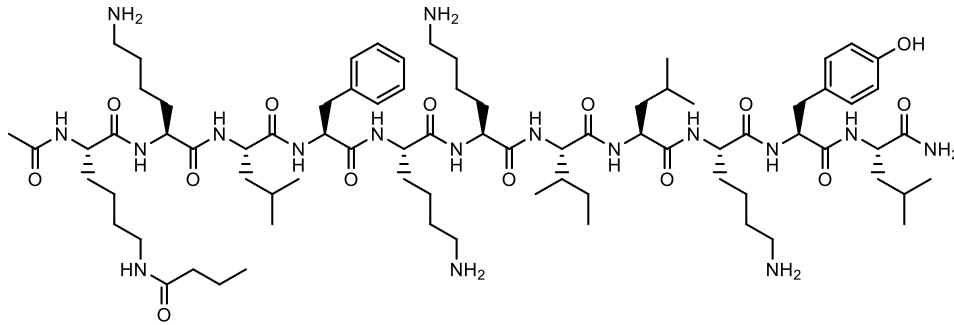
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

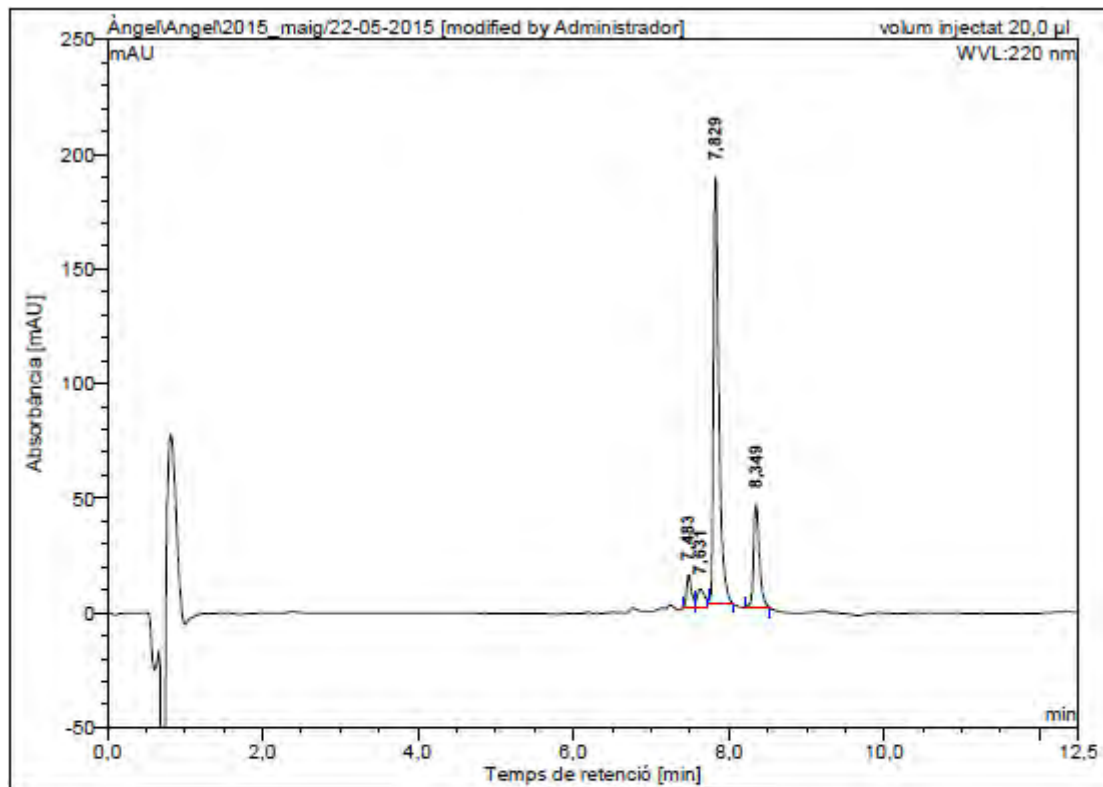




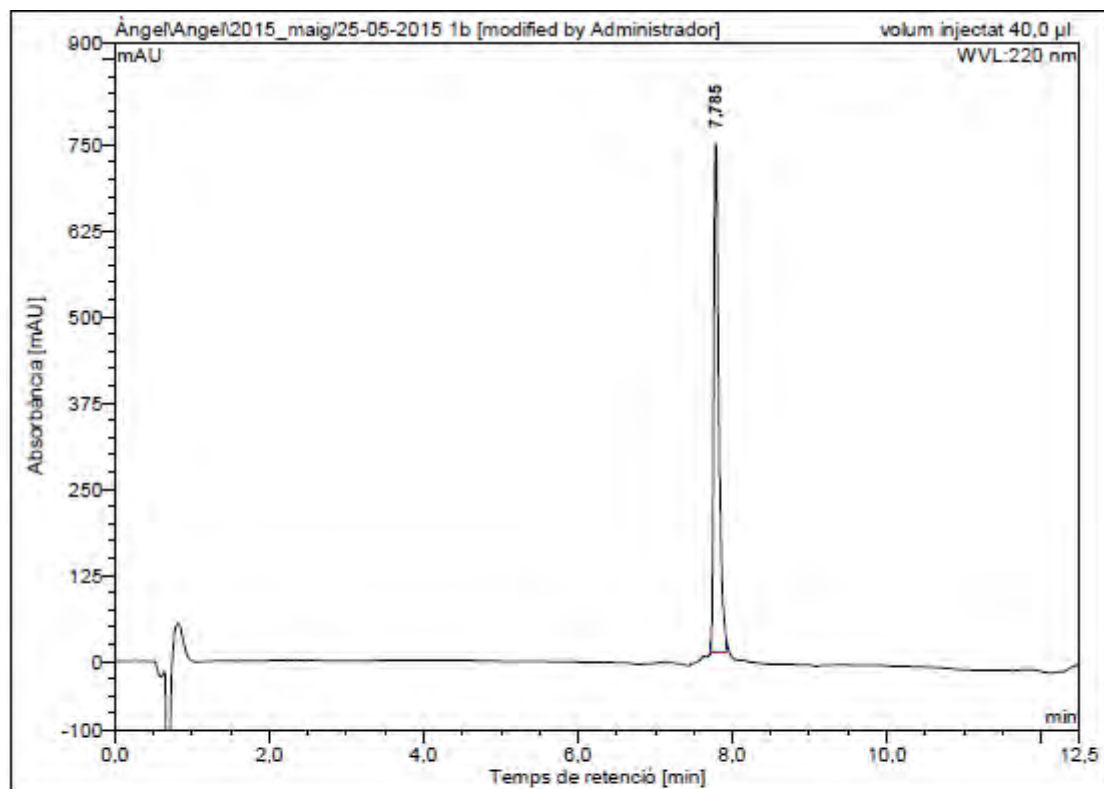
Ac-Lys(COC₃H₇)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP380)



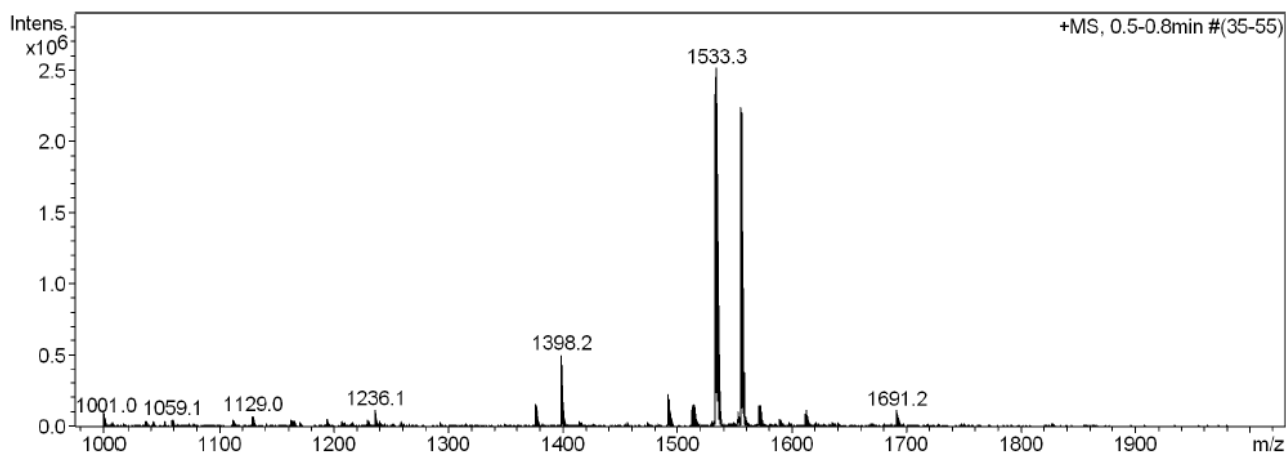
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



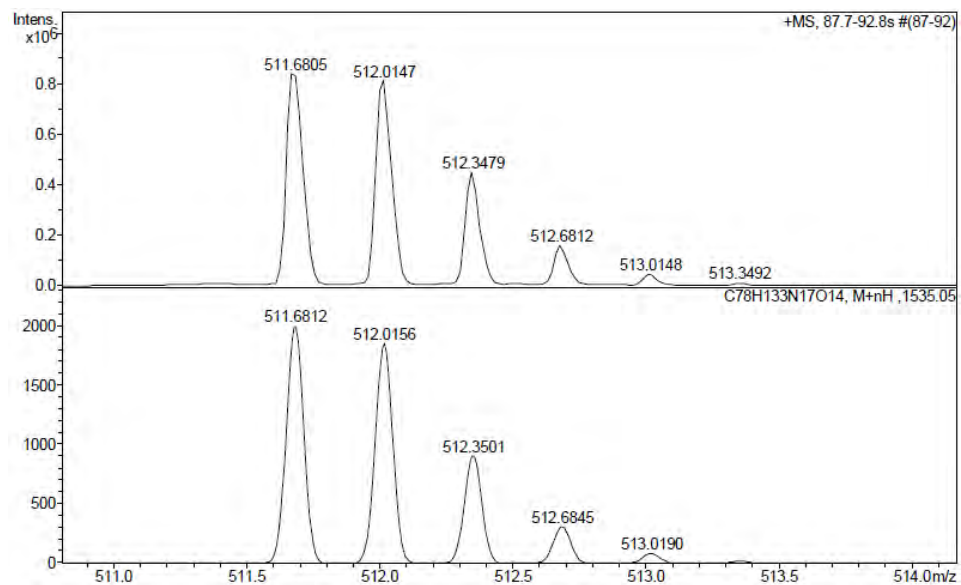
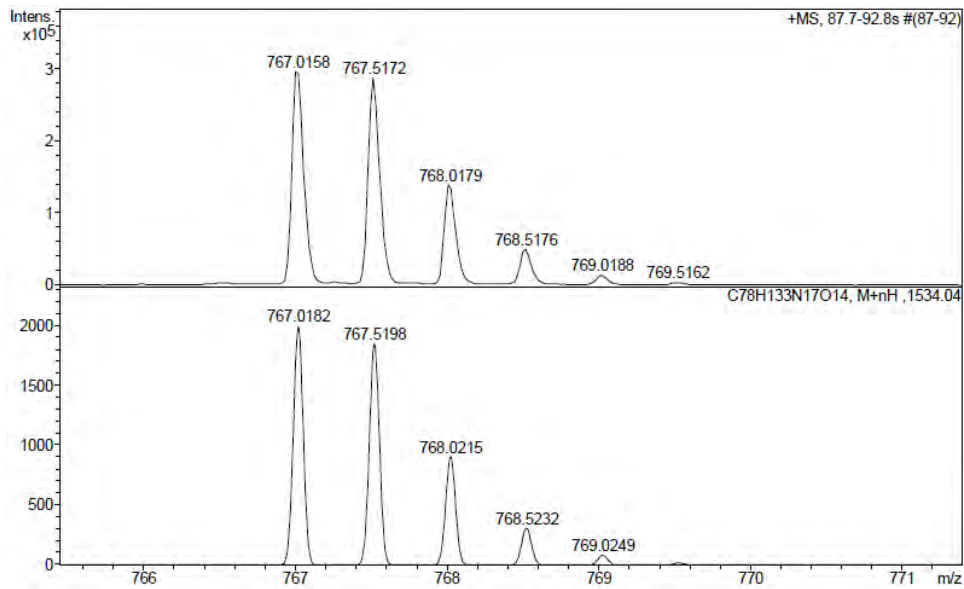
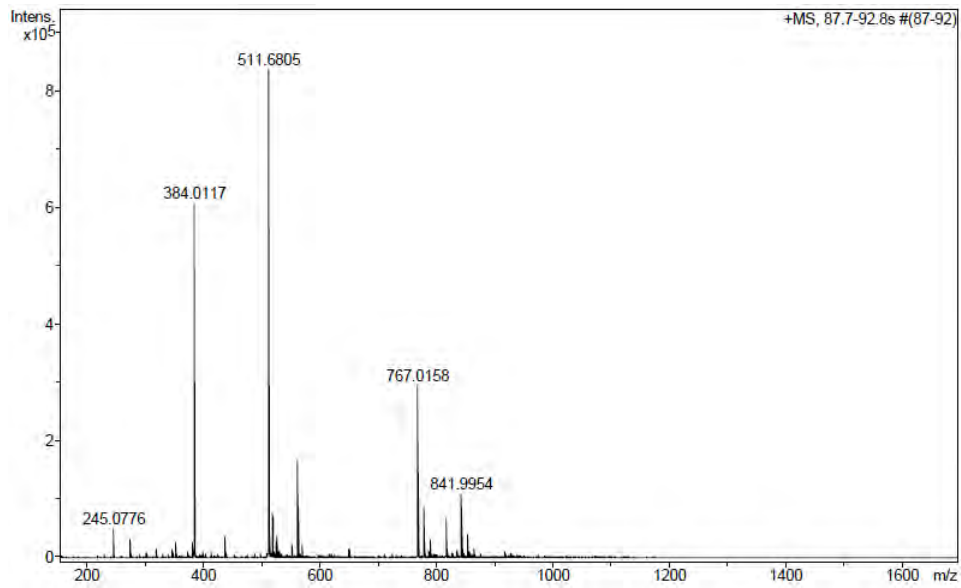
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,48	13,940	1,010	4,86
2	7,63	7,761	0,816	3,93
3	7,83	186,064	15,078	72,59
4	8,35	44,933	3,866	18,61
Total:		252,699	20,770	100,00

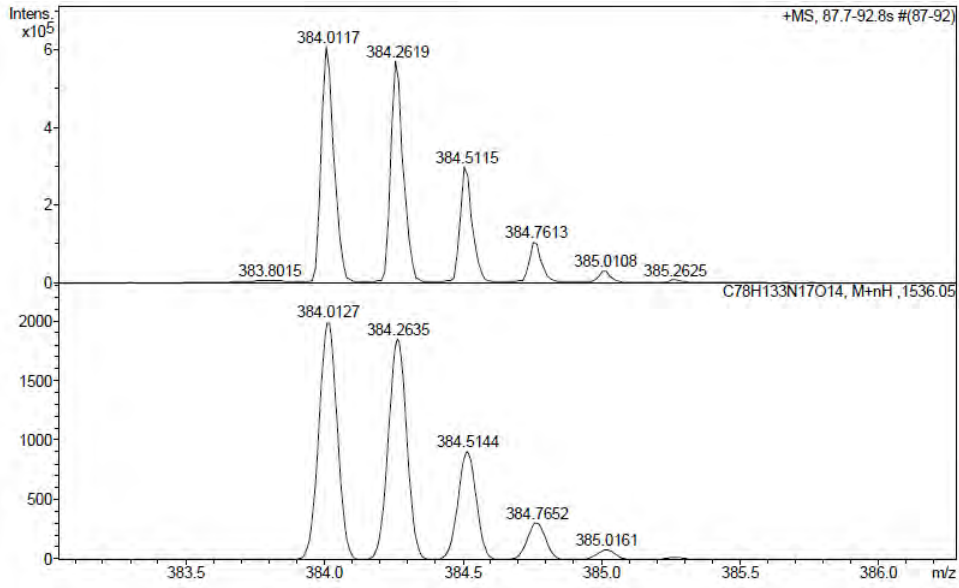
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,79	738,105	57,784	100,00
Total:		738,105	57,784	100,00

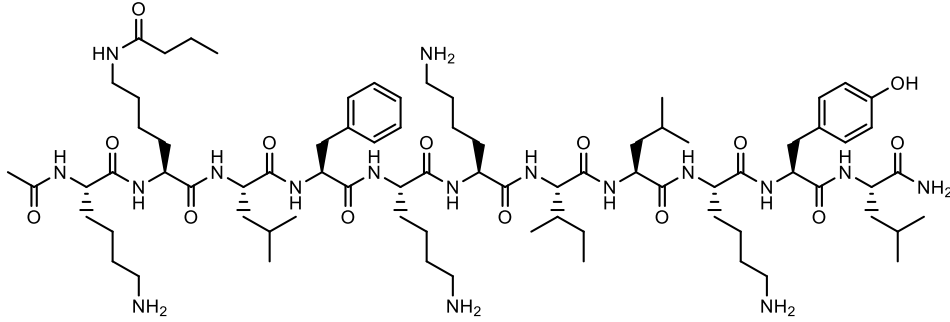
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

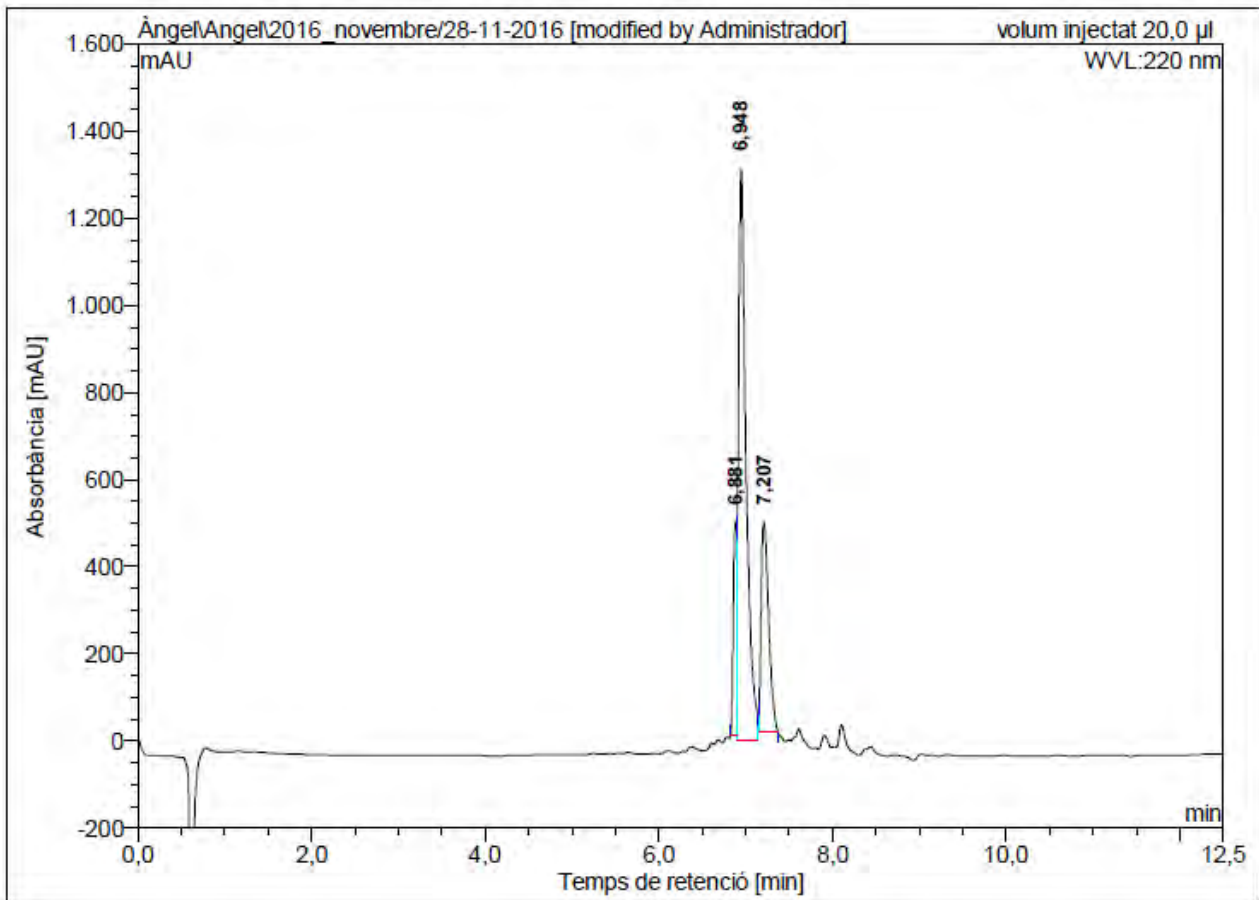




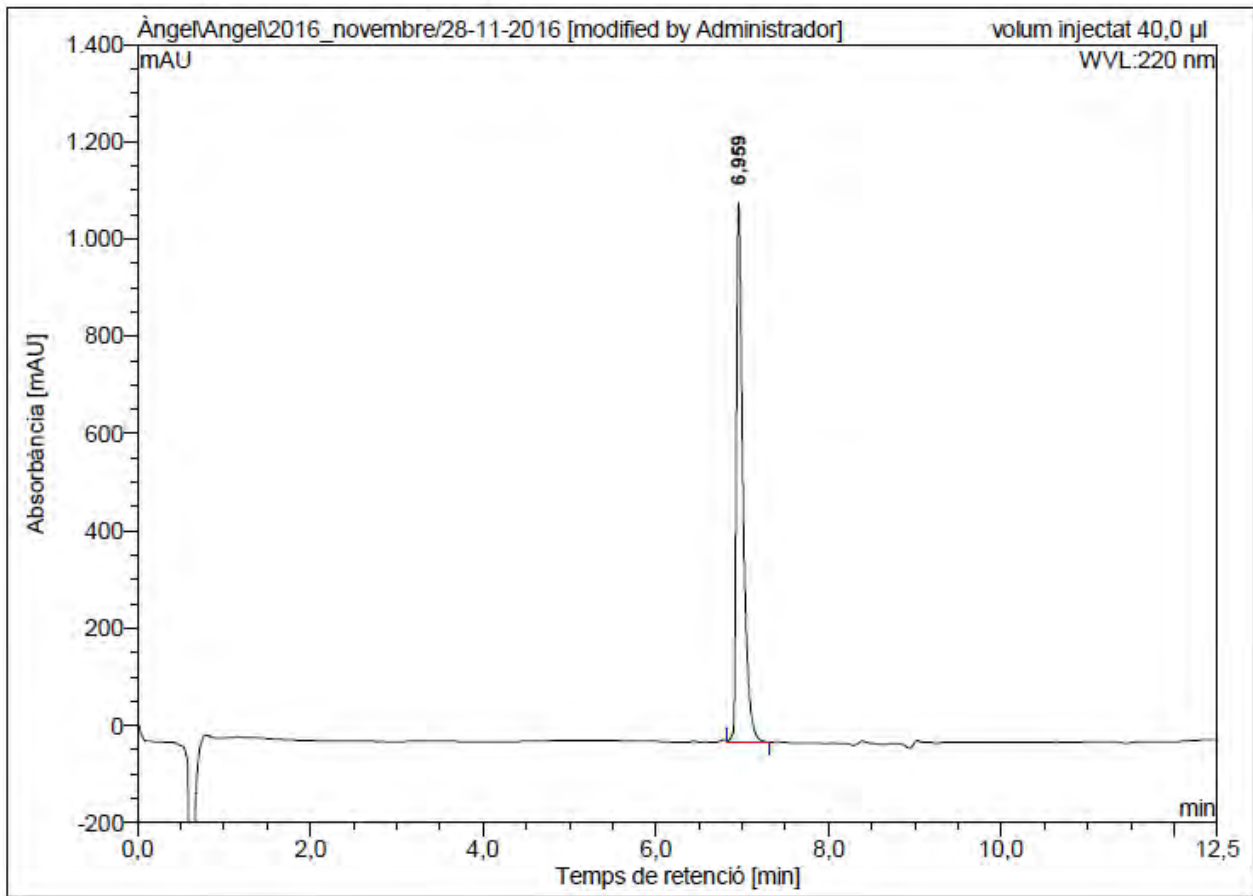
Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP381)



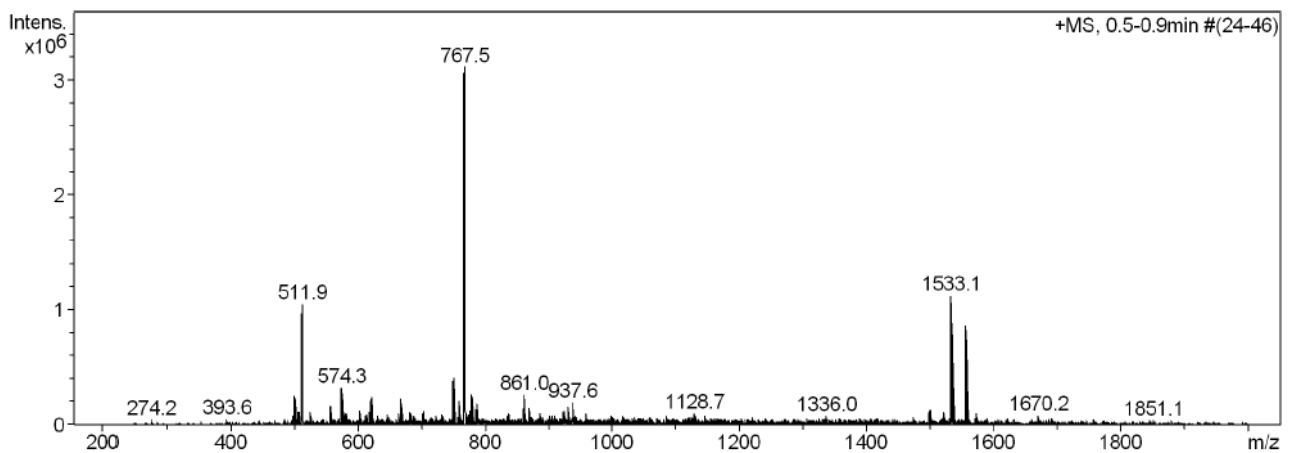
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



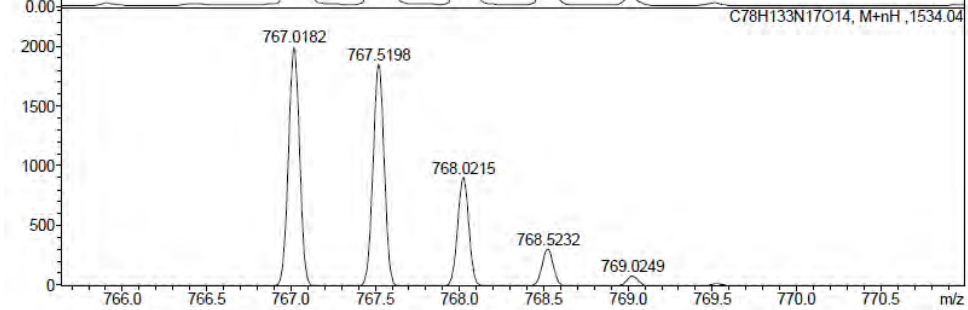
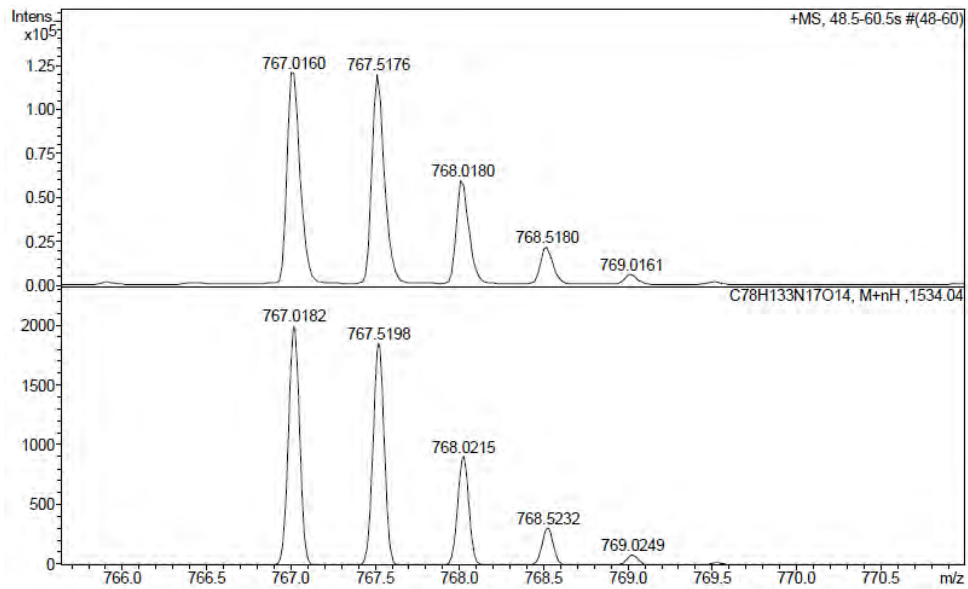
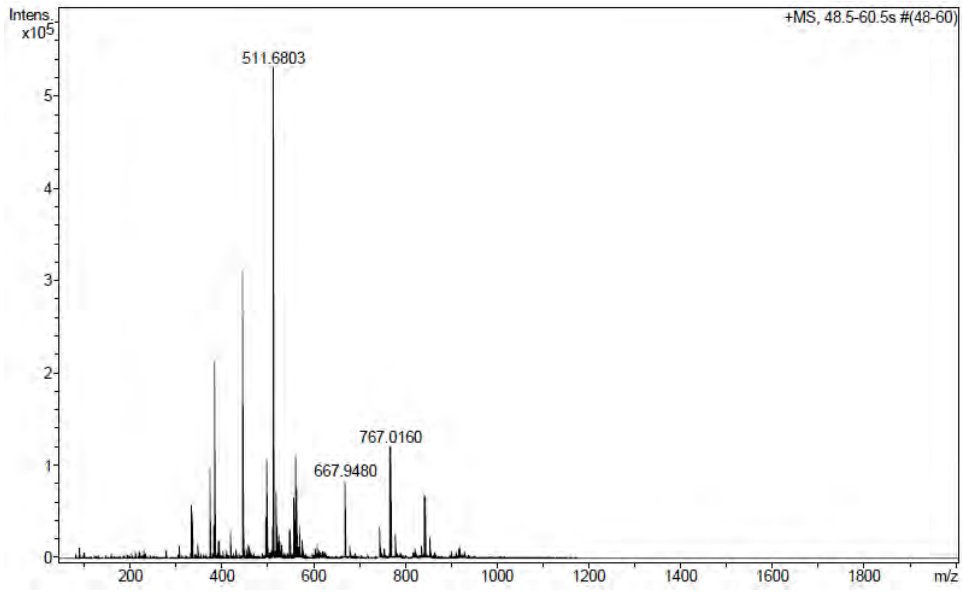
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,88	491,197	18,143	9,03
2	6,95	1312,045	134,699	67,01
3	7,21	480,384	48,178	23,97
Total:		2283,626	201,020	100,00

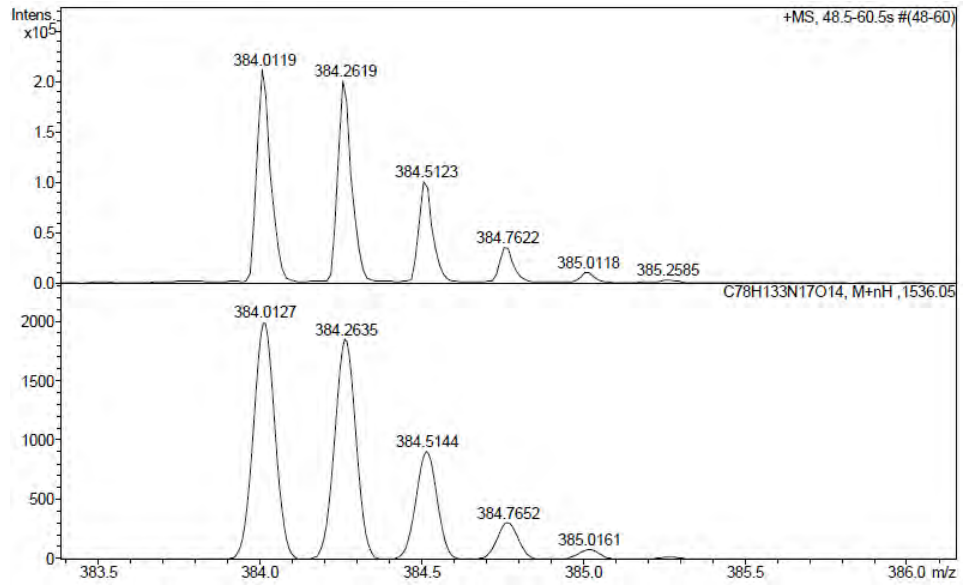
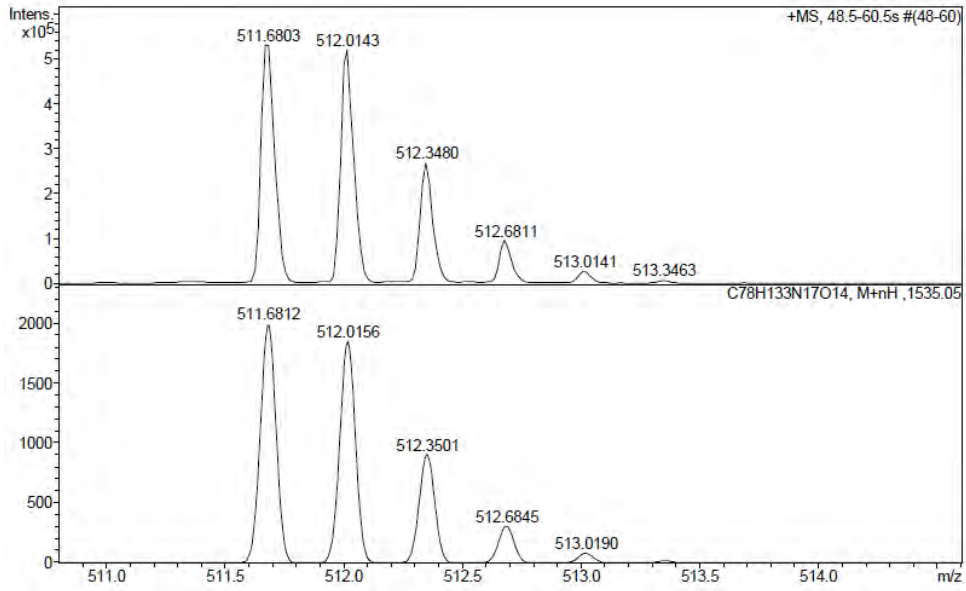
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,96	1109,076	100,505	100,00
Total:		1109,076	100,505	100,00

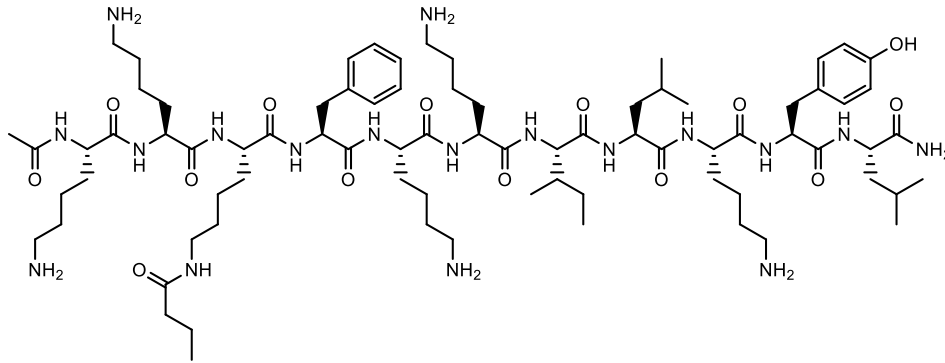
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

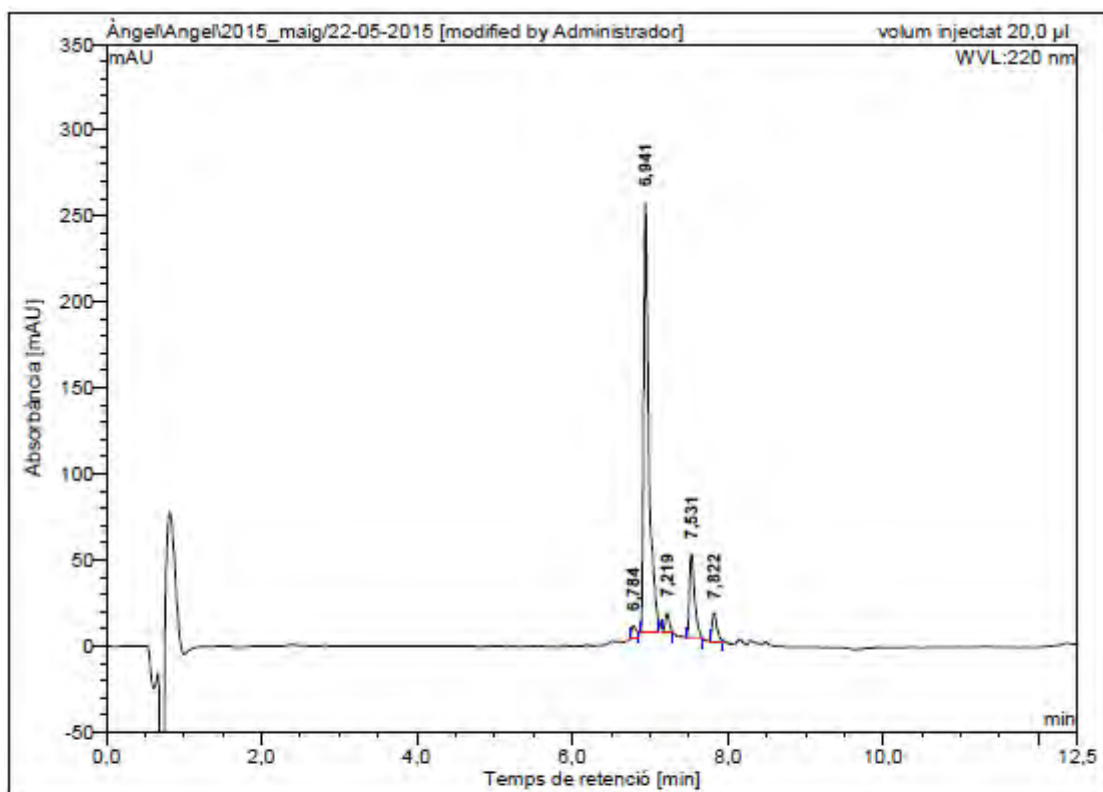




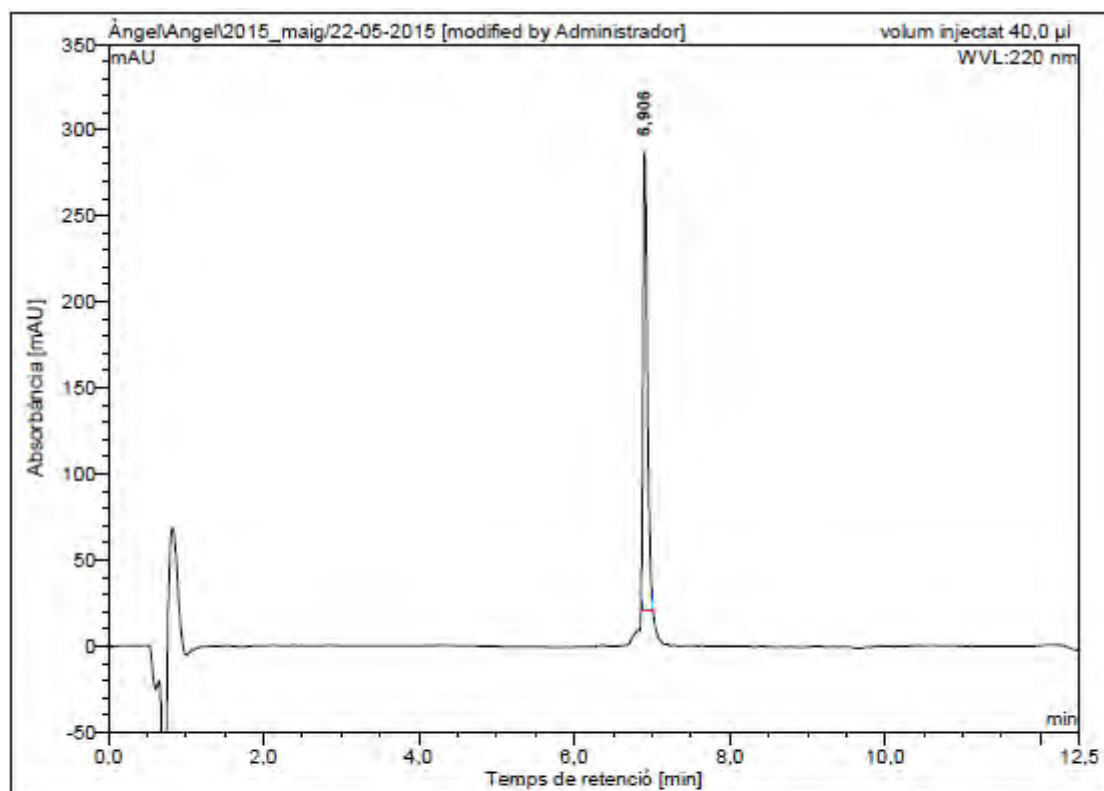
Ac-Lys-Lys-Lys(COC₃H₇)-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP382)



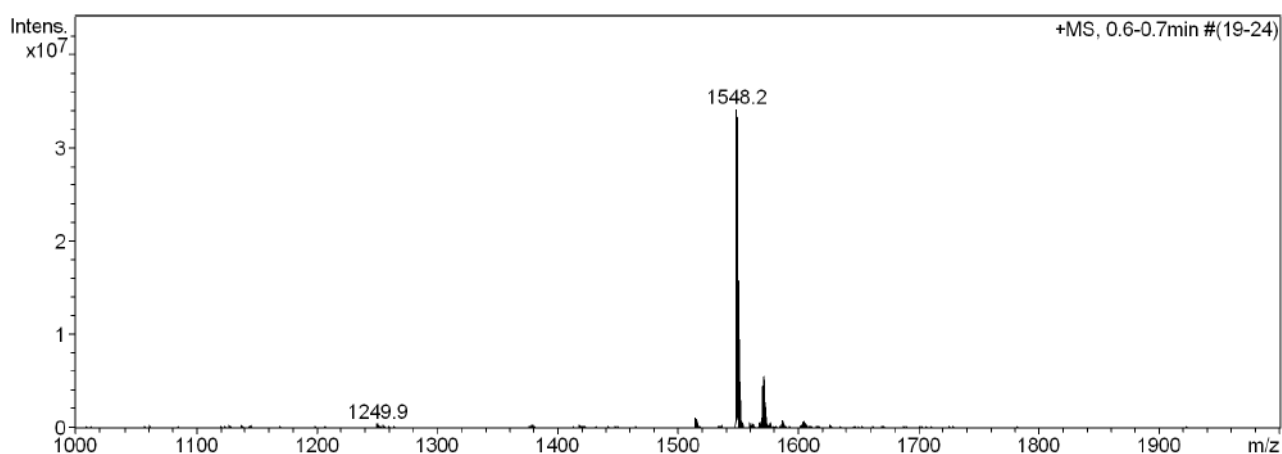
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



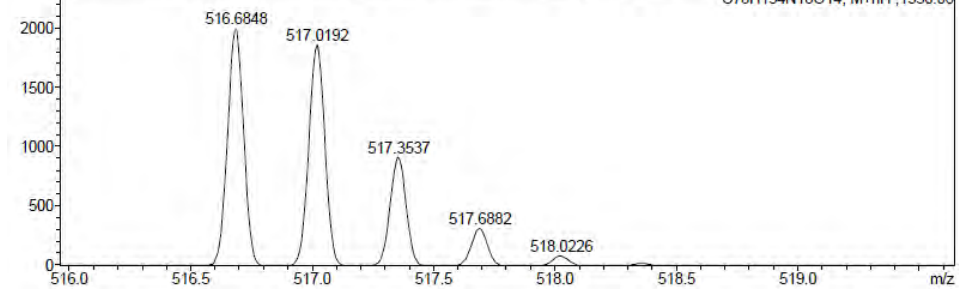
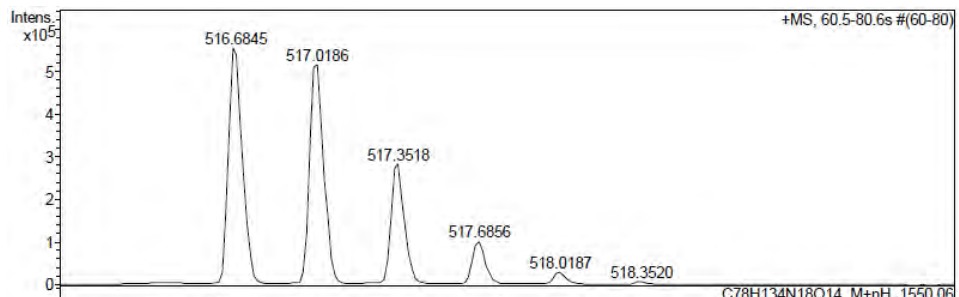
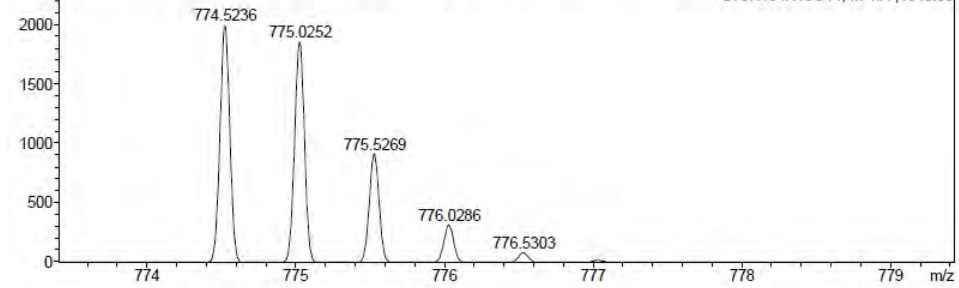
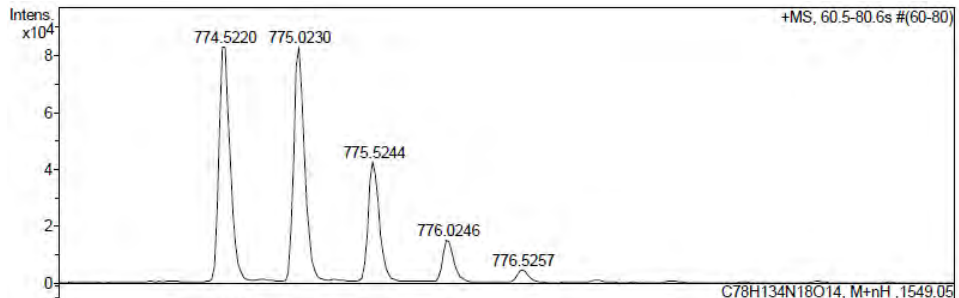
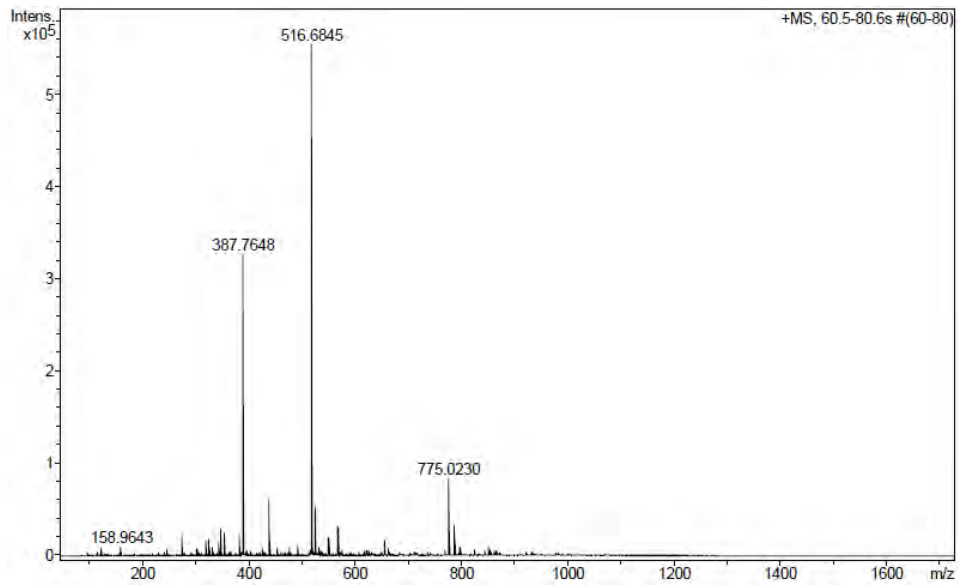
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU ² min	Rel.Area %
1	6,78	7,516	0,551	2,18
2	6,94	248,872	19,212	75,96
3	7,22	10,420	0,588	2,32
4	7,53	48,490	3,767	14,89
5	7,82	16,044	1,176	4,65
Total:		331,343	25,293	100,00

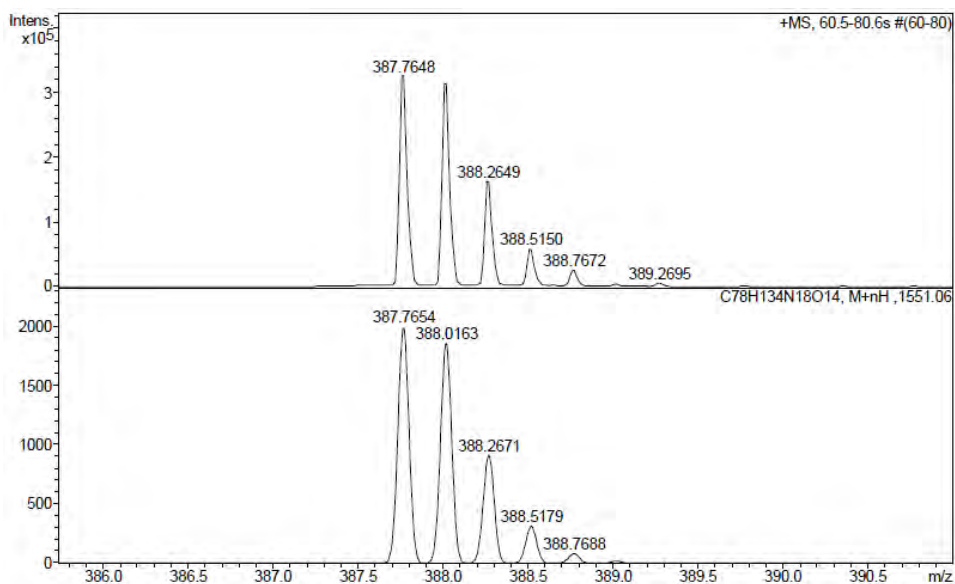
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,91	267,492	17,120	100,00
Total:		267,492	17,120	100,00

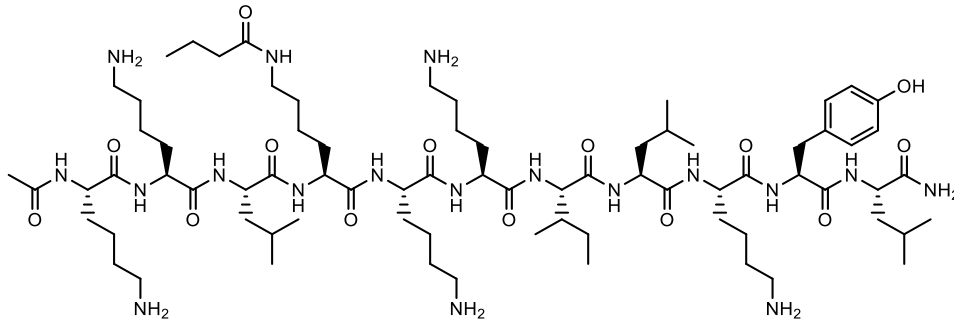
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

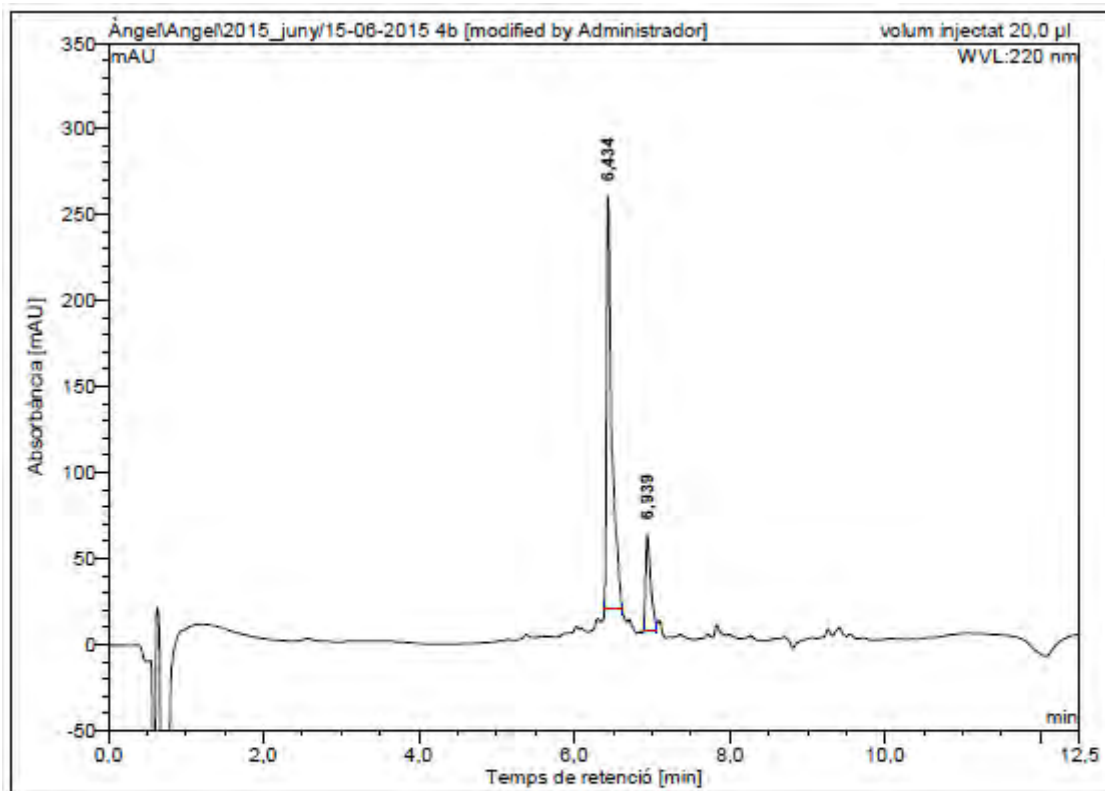




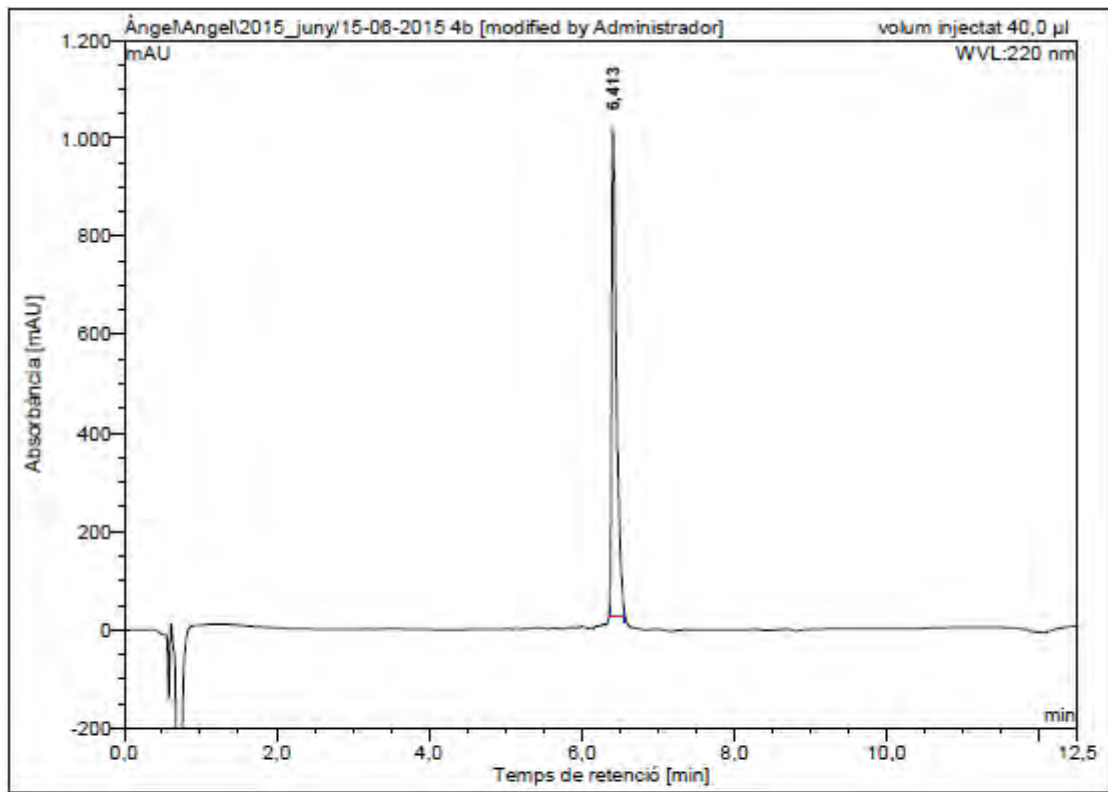
Ac-Lys-Lys-Leu-Lys(COC₃H₇)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP383)



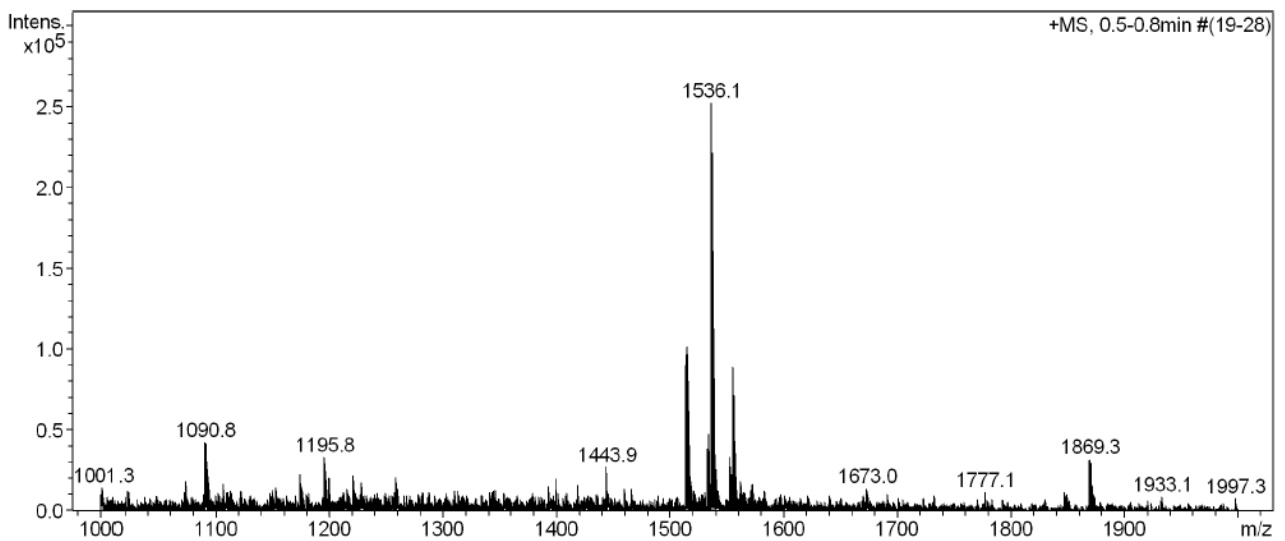
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



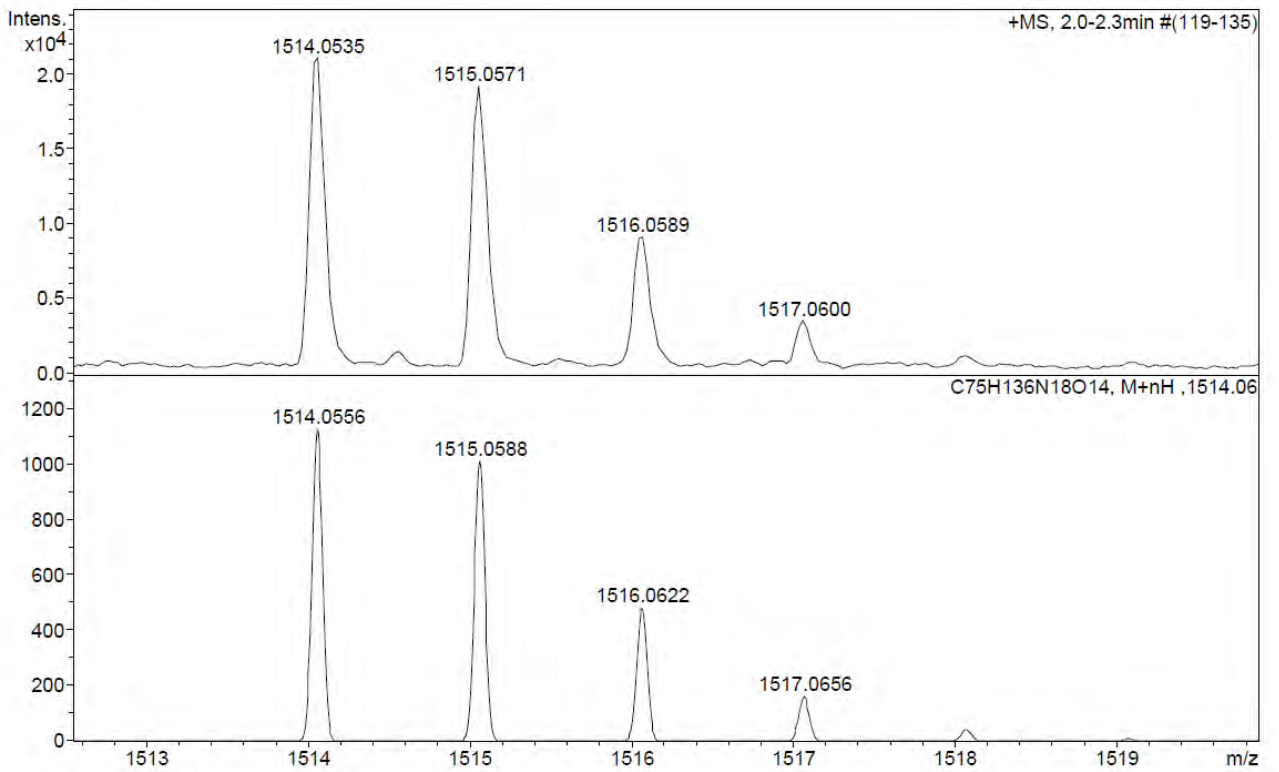
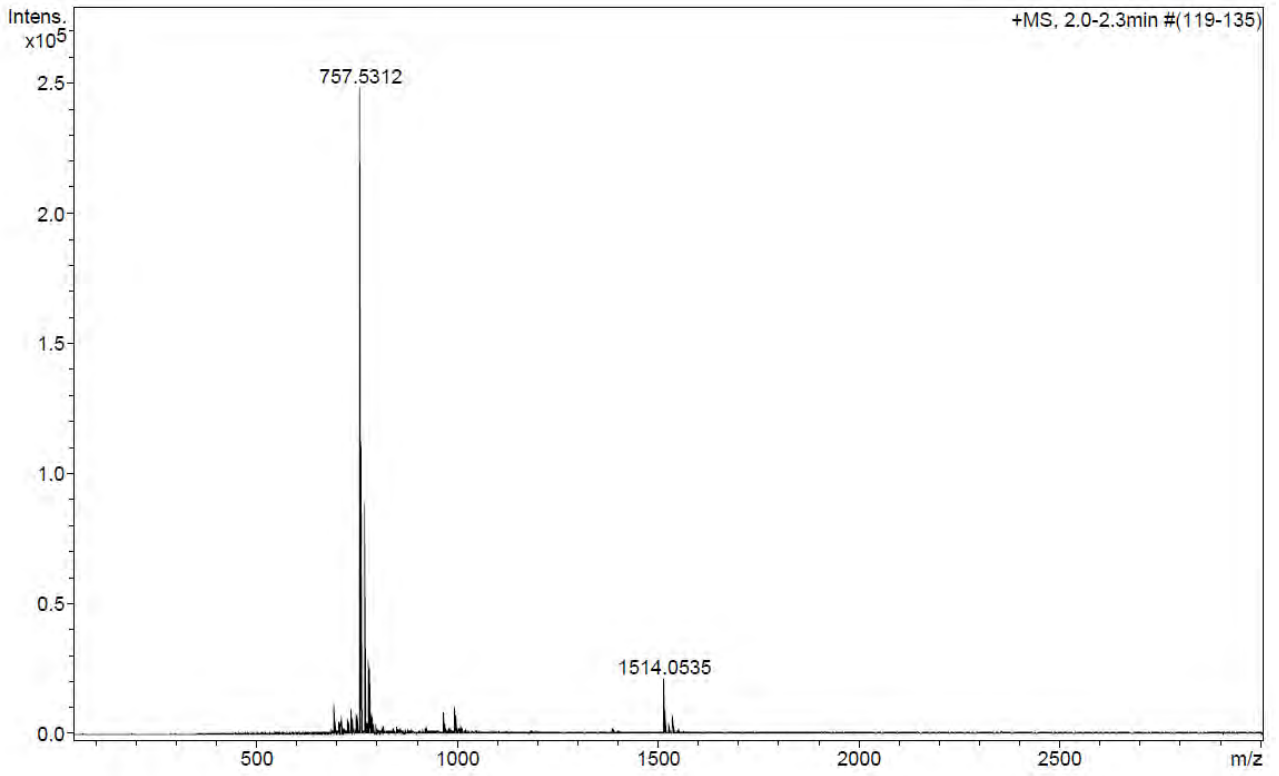
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,43	240,285	19,131	82,31
2	6,94	55,808	4,112	17,69
Total:		296,093	23,243	100,00

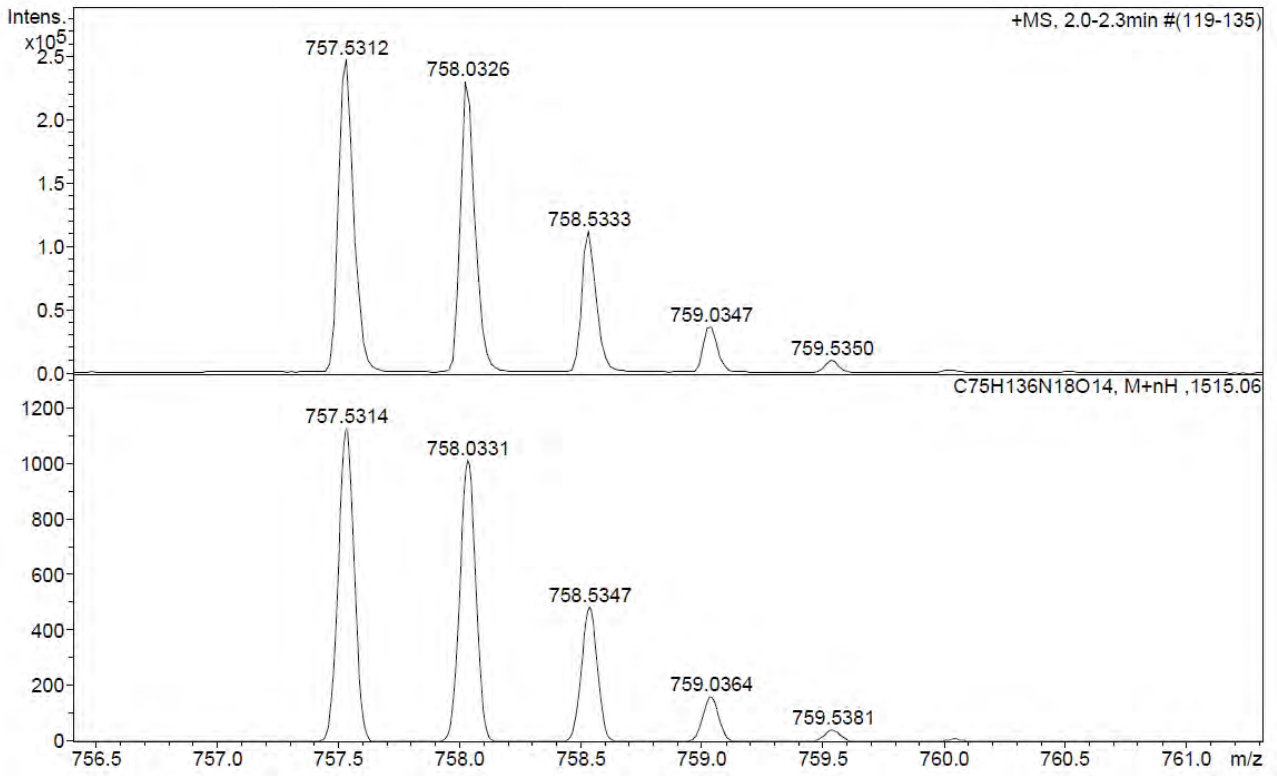
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,41	995,875	73,746	100,00
Total:		995,875	73,746	100,00

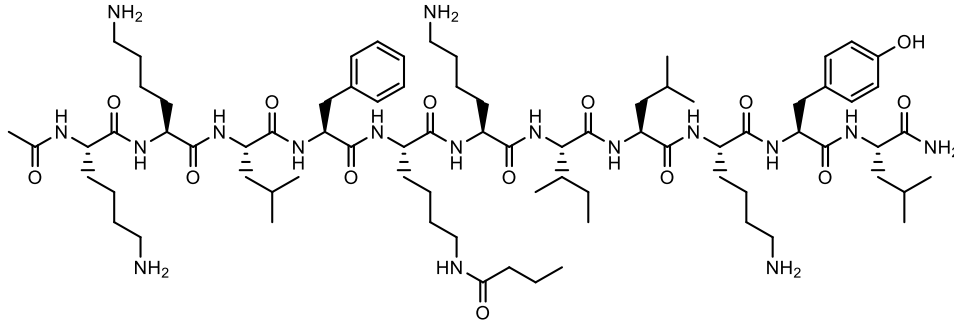
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

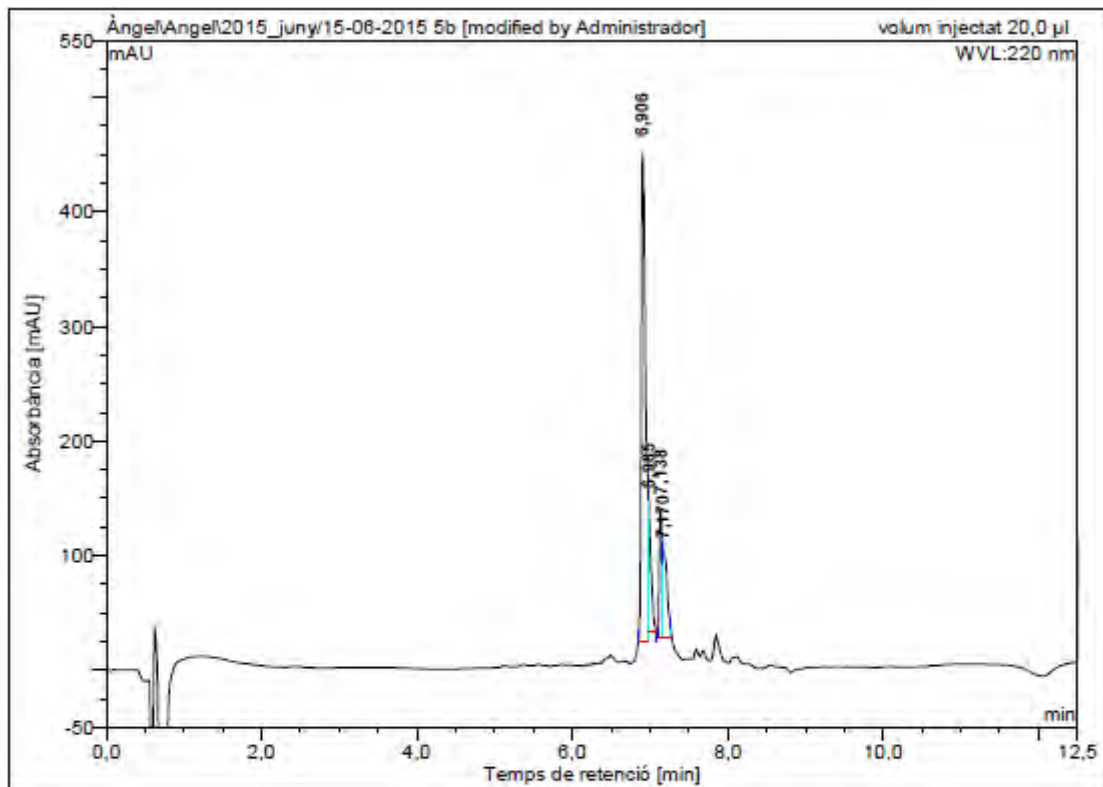




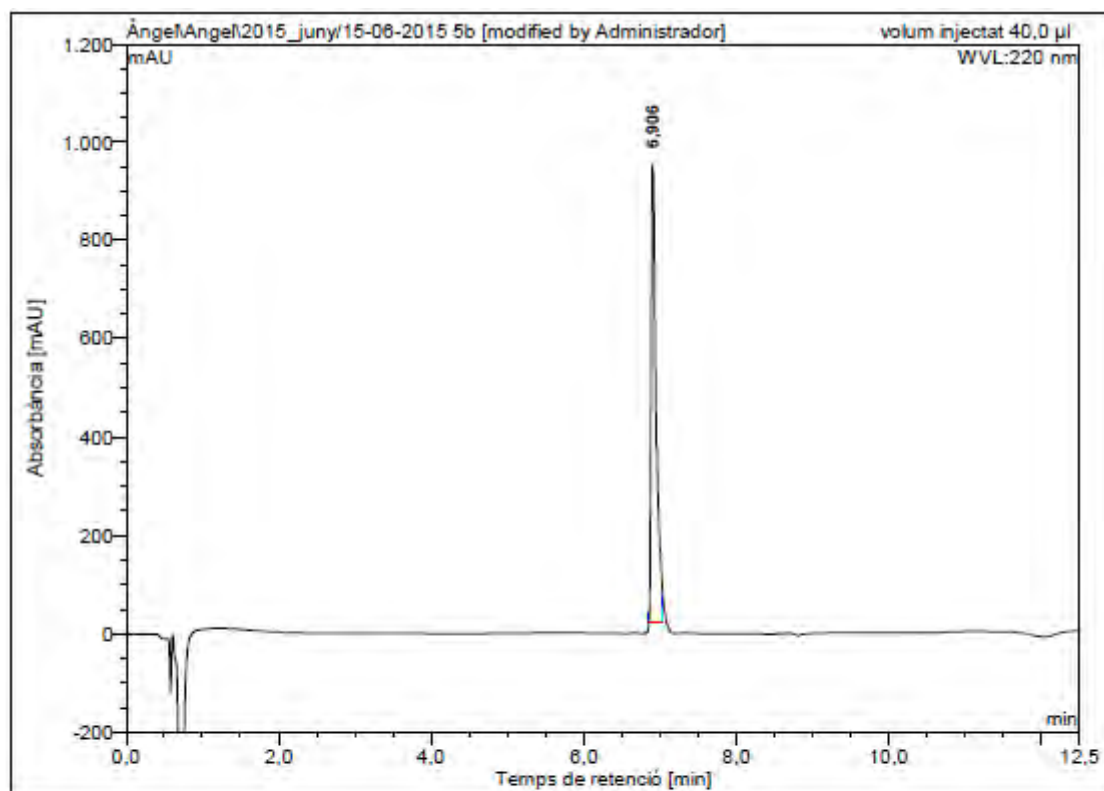
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP384)



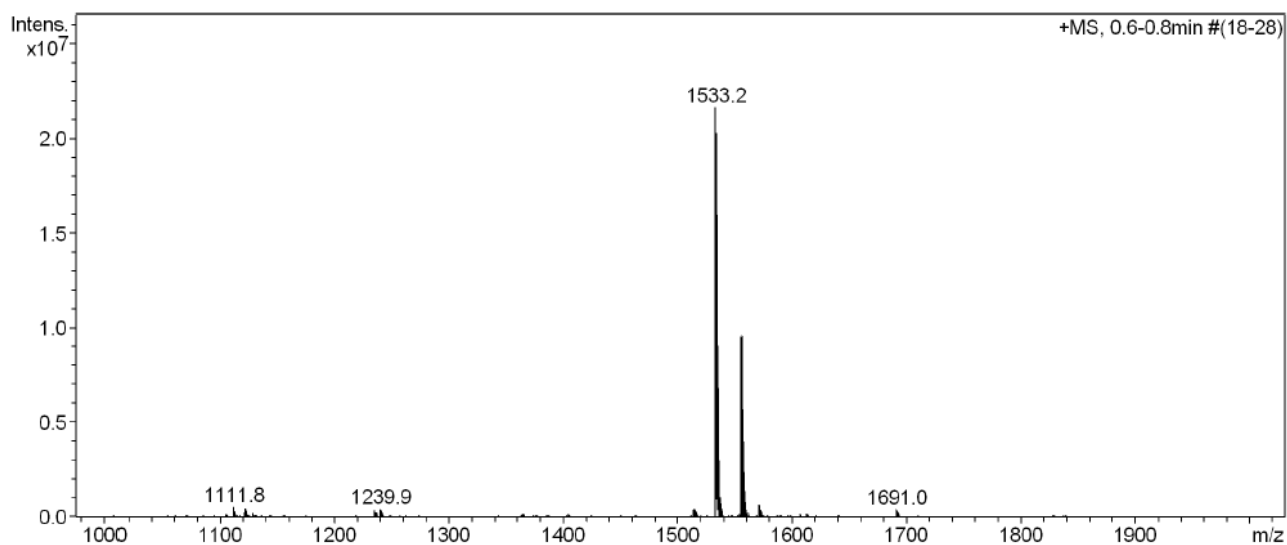
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



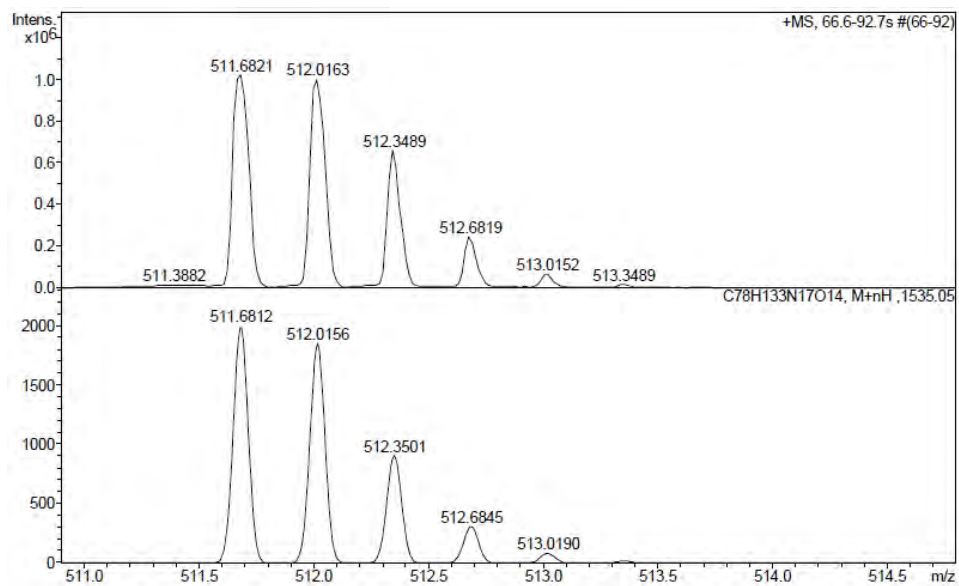
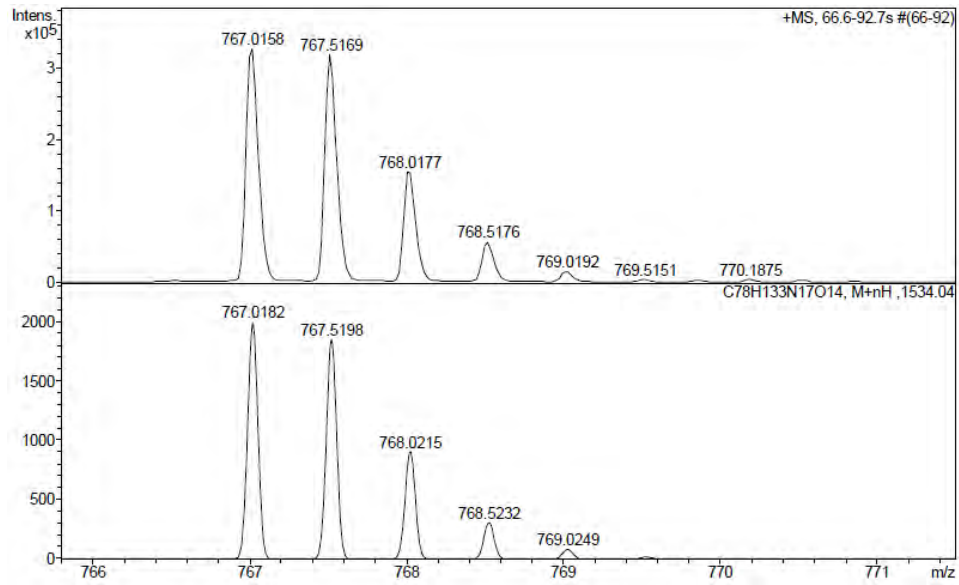
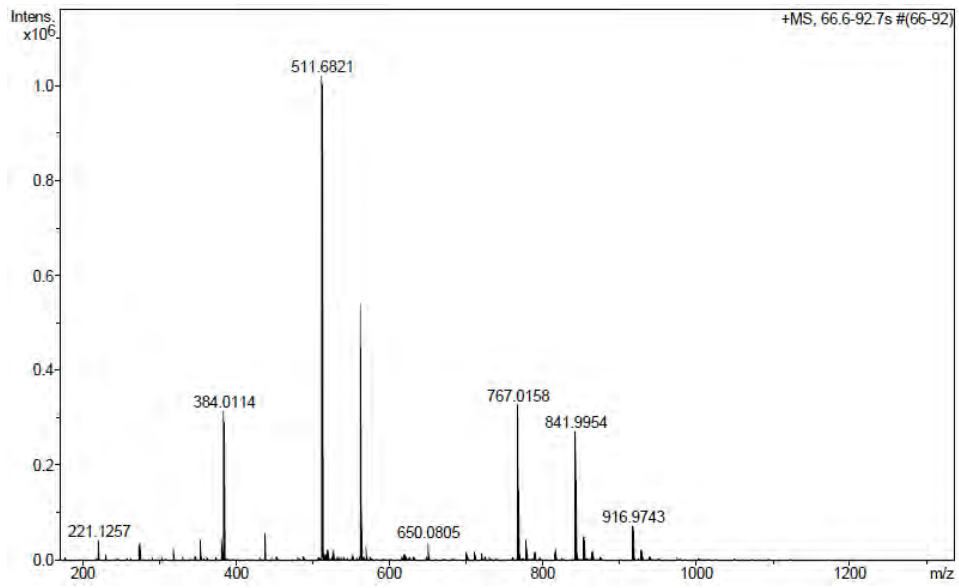
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,91	426,920	27,025	66,79
2	6,98	112,434	3,823	9,45
3	7,14	112,964	5,513	13,62
4	7,17	73,501	4,103	10,14
Total:		725,818	40,463	100,00

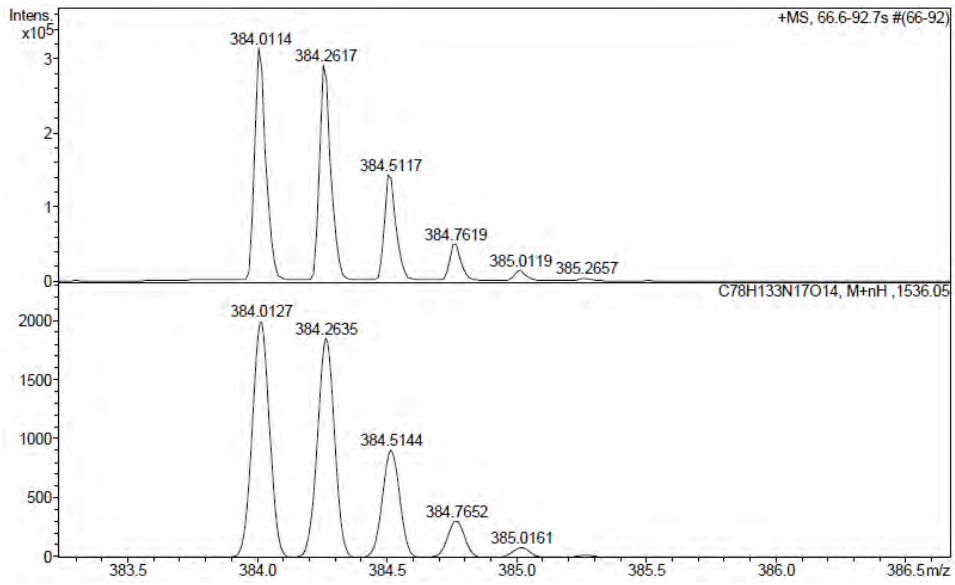
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,91	931,844	70,418	100,00
Total:		931,844	70,418	100,00

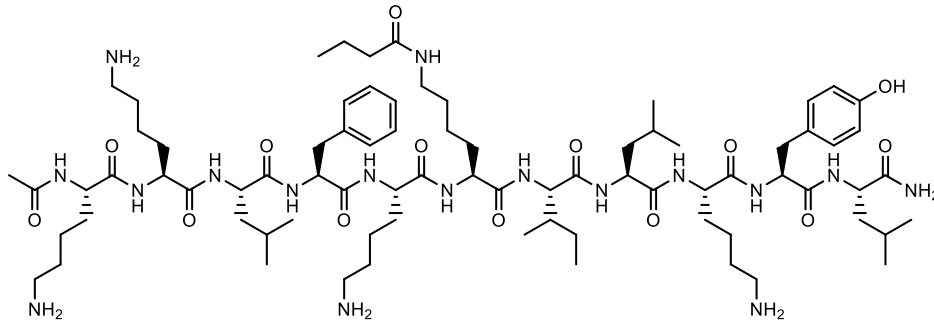
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

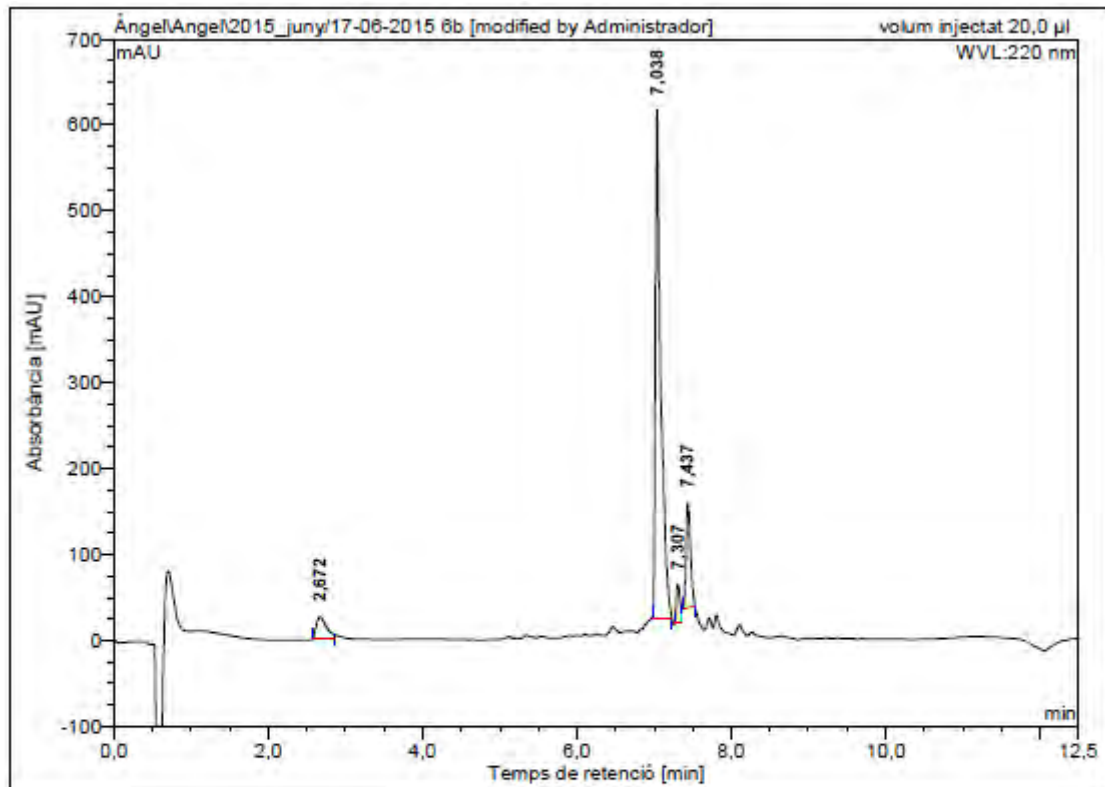




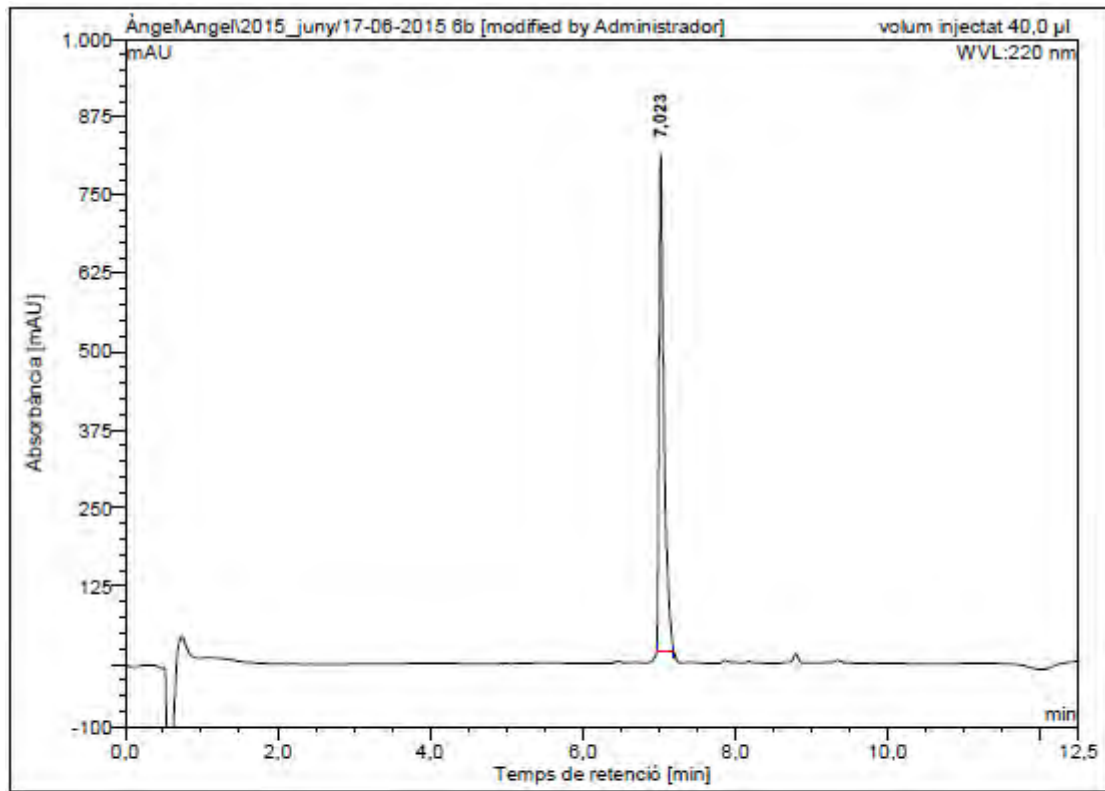
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP385)



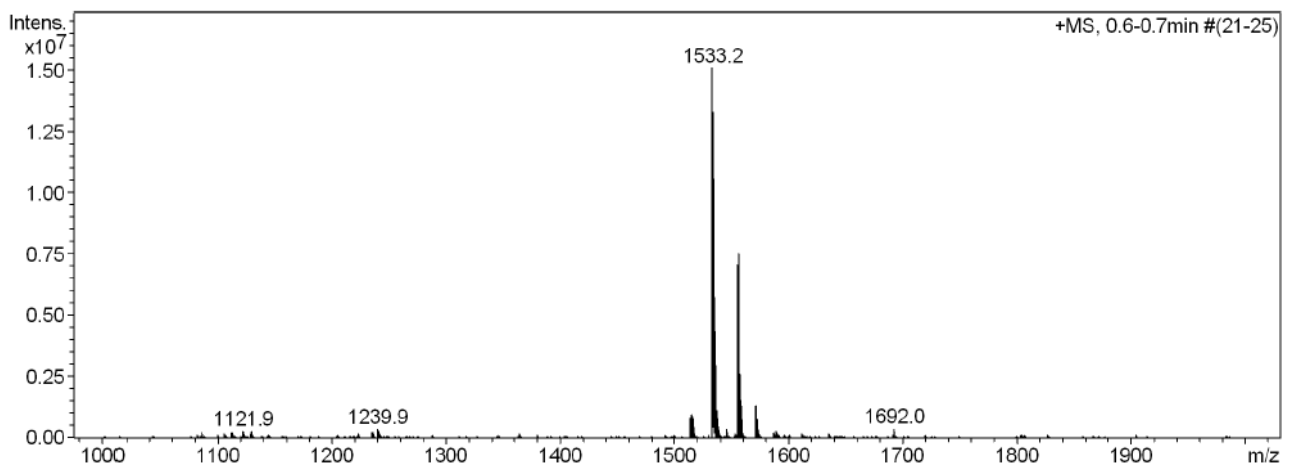
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



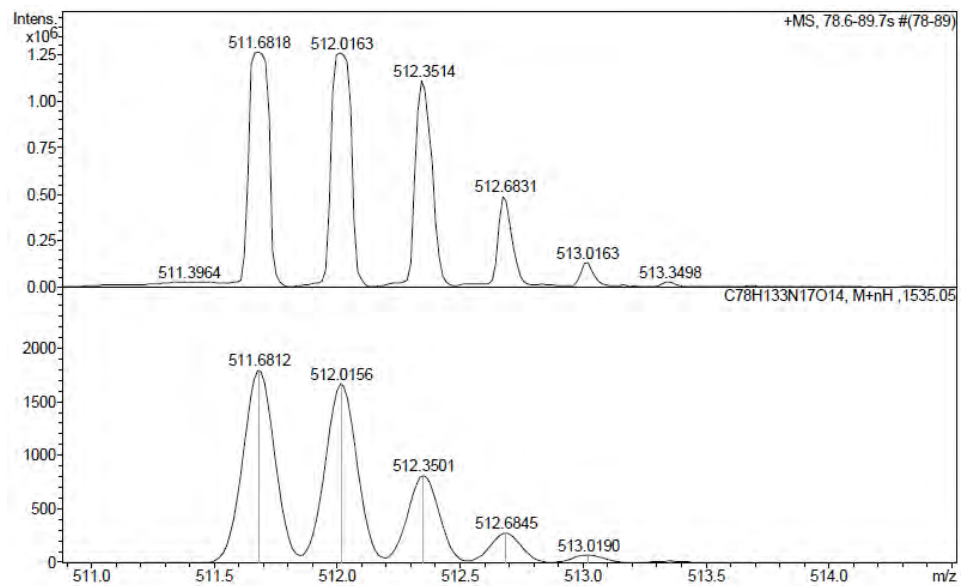
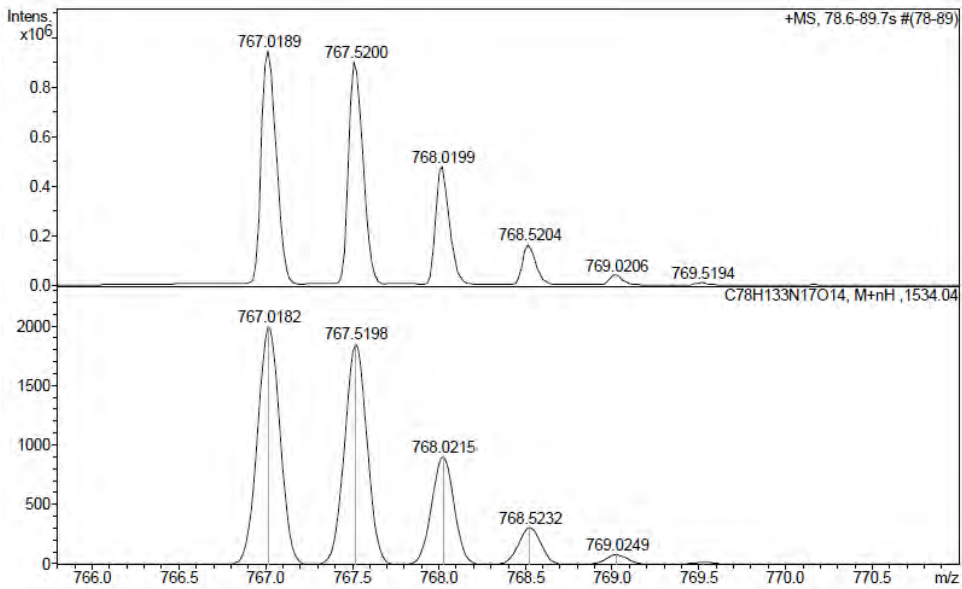
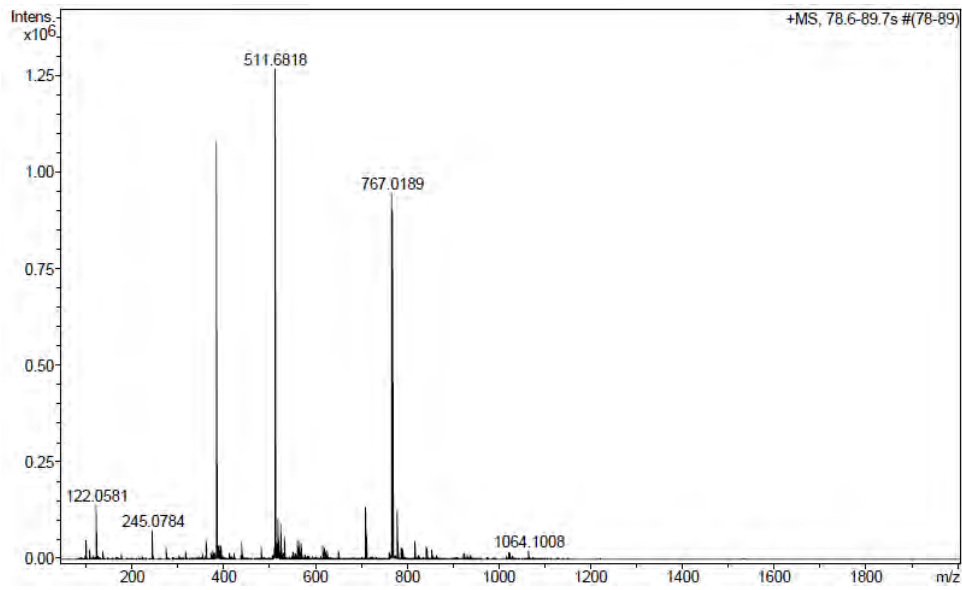
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	2,67	24,266	3,591	5,79
2	7,04	592,498	48,281	77,83
3	7,31	45,100	2,200	3,55
4	7,44	122,228	7,962	12,83
Total:		784,093	62,033	100,00

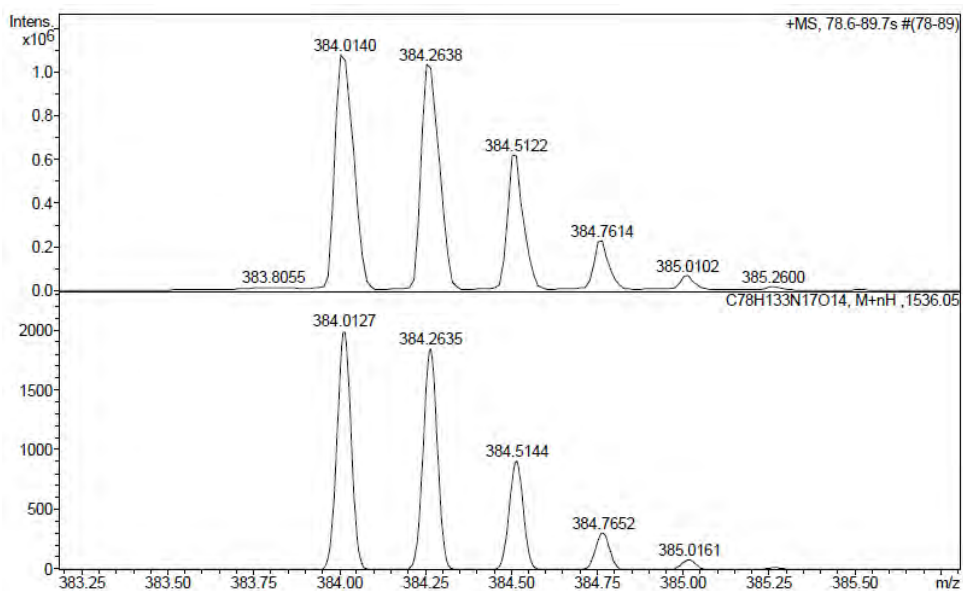
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,02	795,497	59,612	100,00
Total:		795,497	59,612	100,00

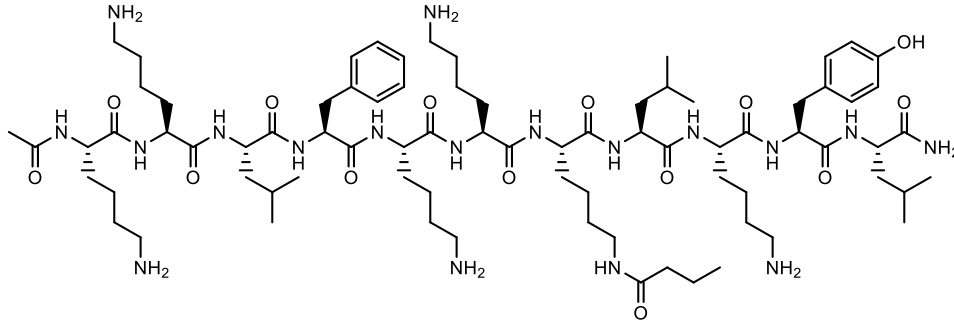
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

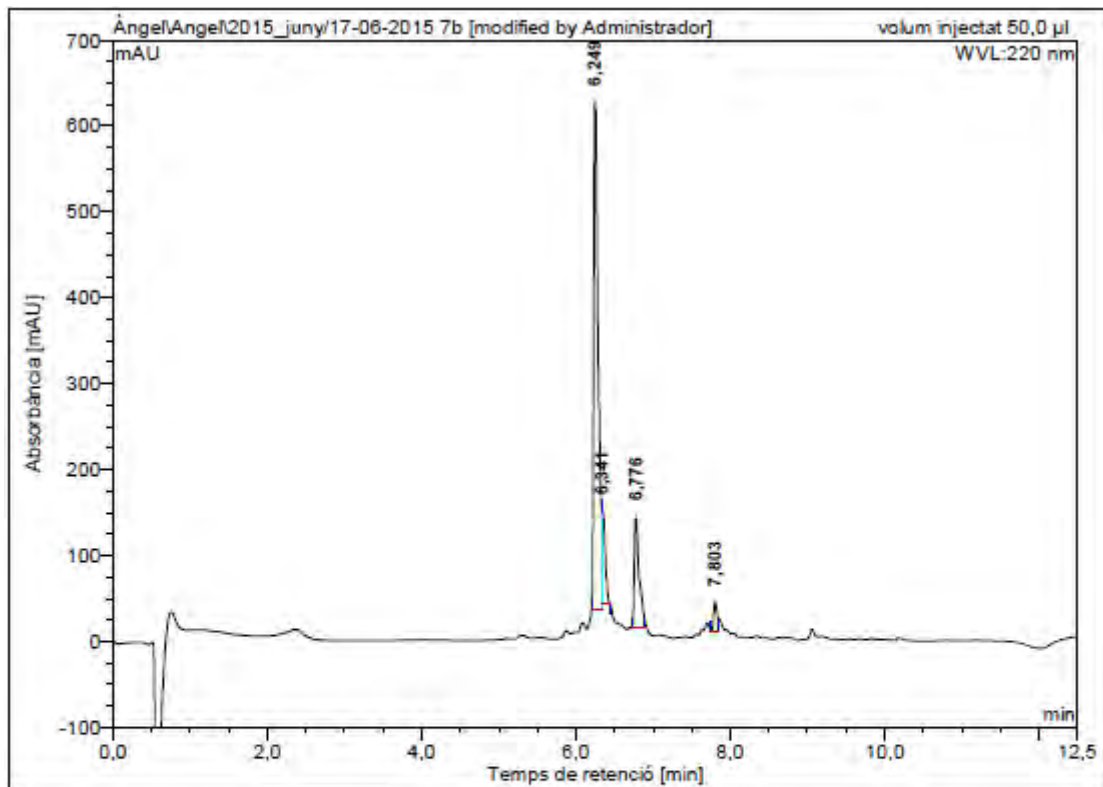




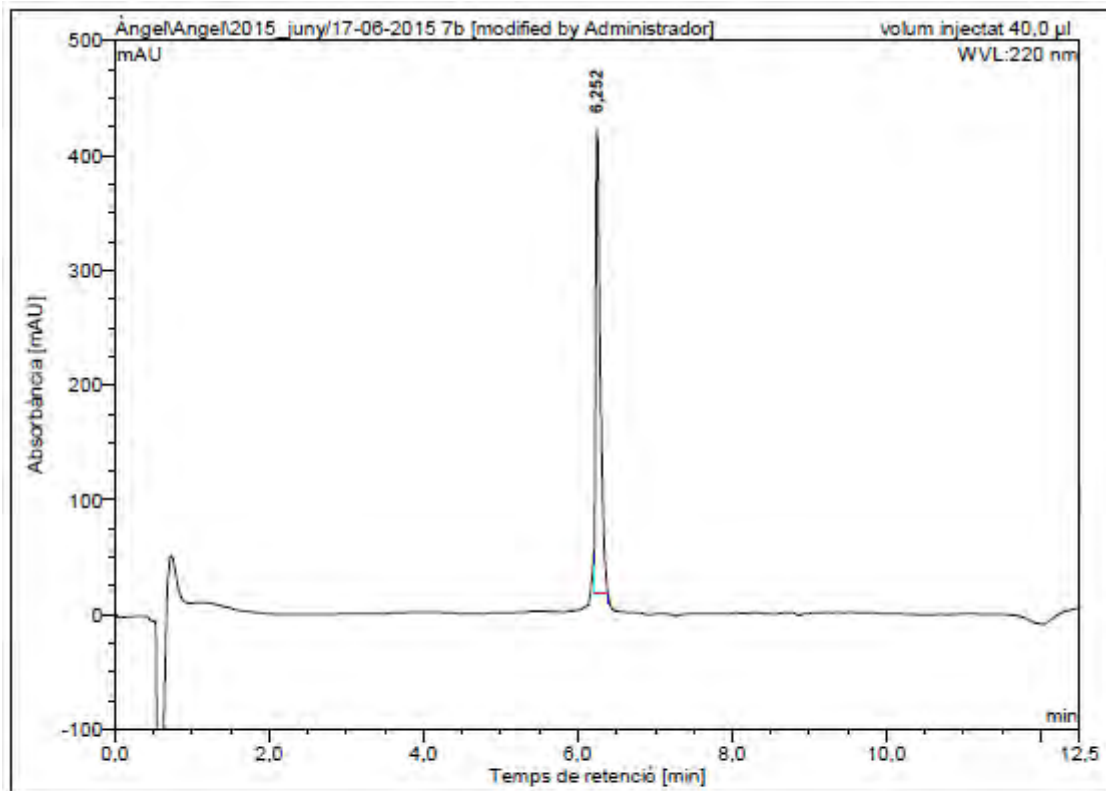
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP386)



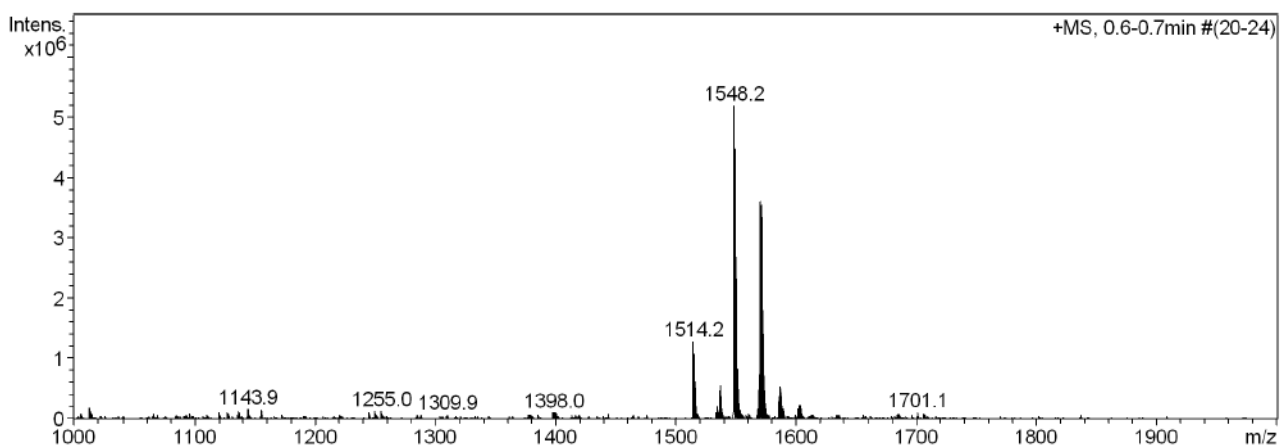
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



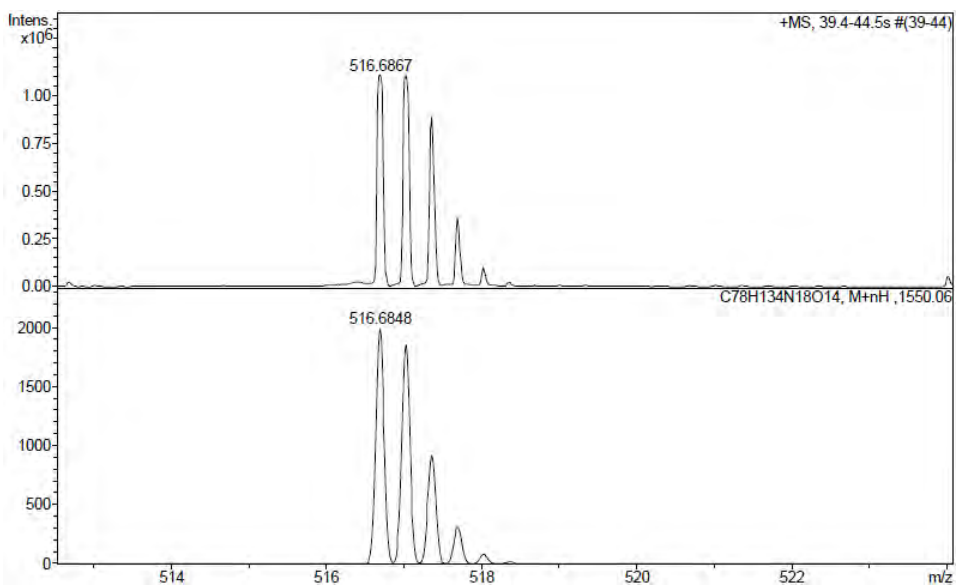
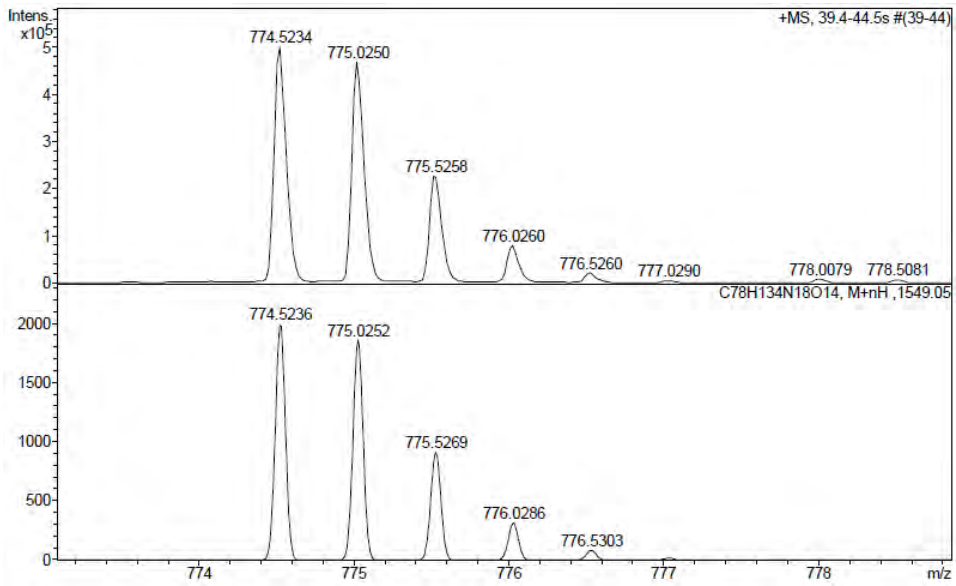
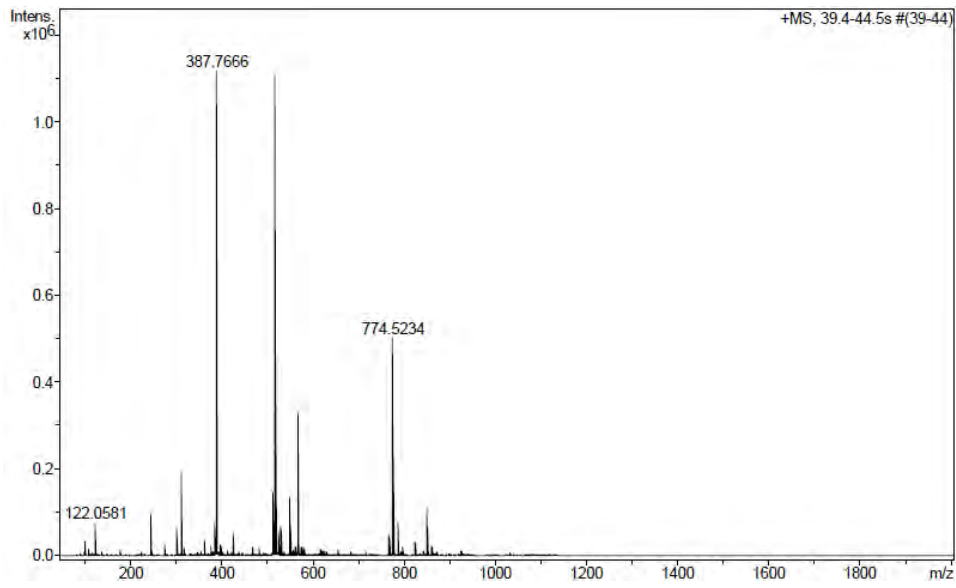
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,25	592,905	38,948	70,32
2	6,34	108,977	5,107	9,22
3	6,78	129,662	9,529	17,20
4	7,80	33,947	1,805	3,26
Total:		865,491	55,388	100,00

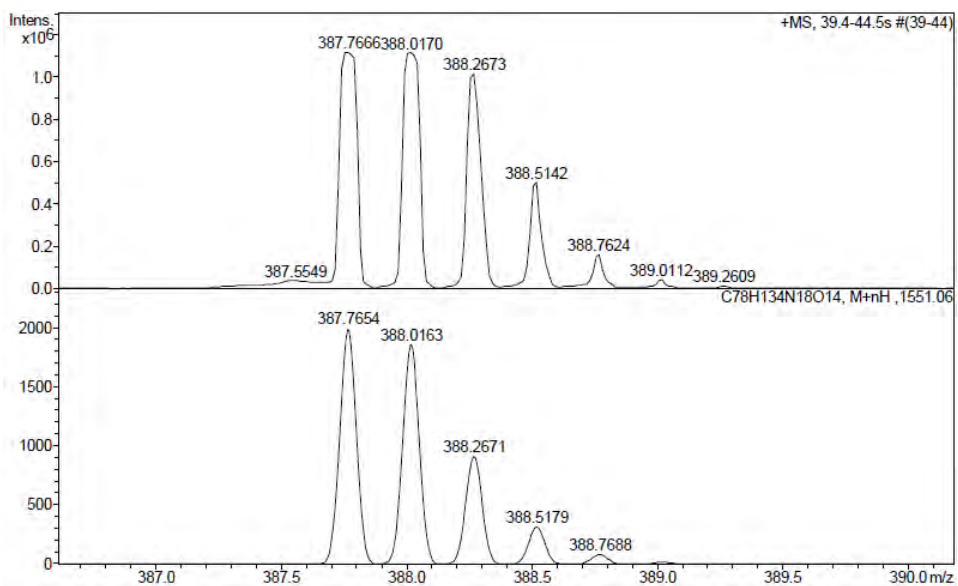
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,25	405,383	28,199	100,00
Total:		405,383	28,199	100,00

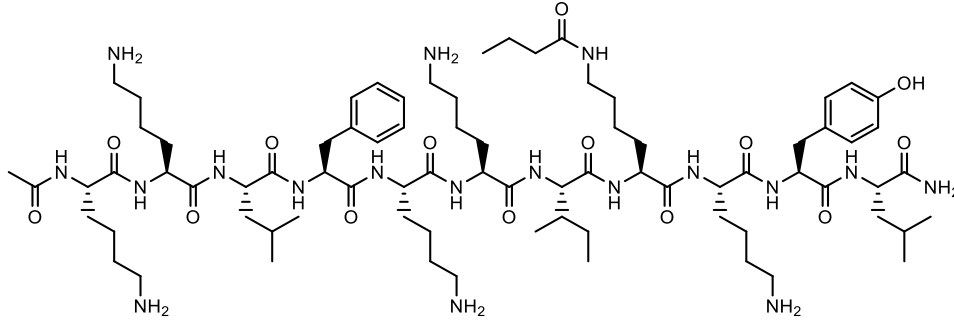
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

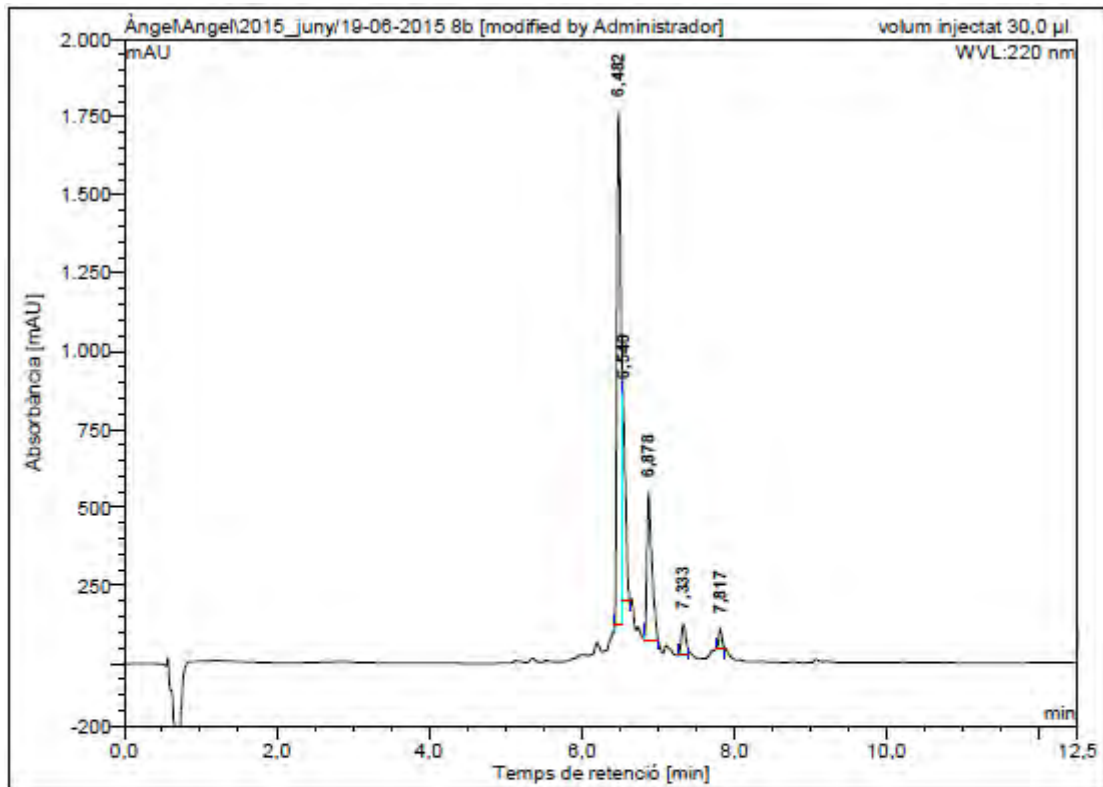




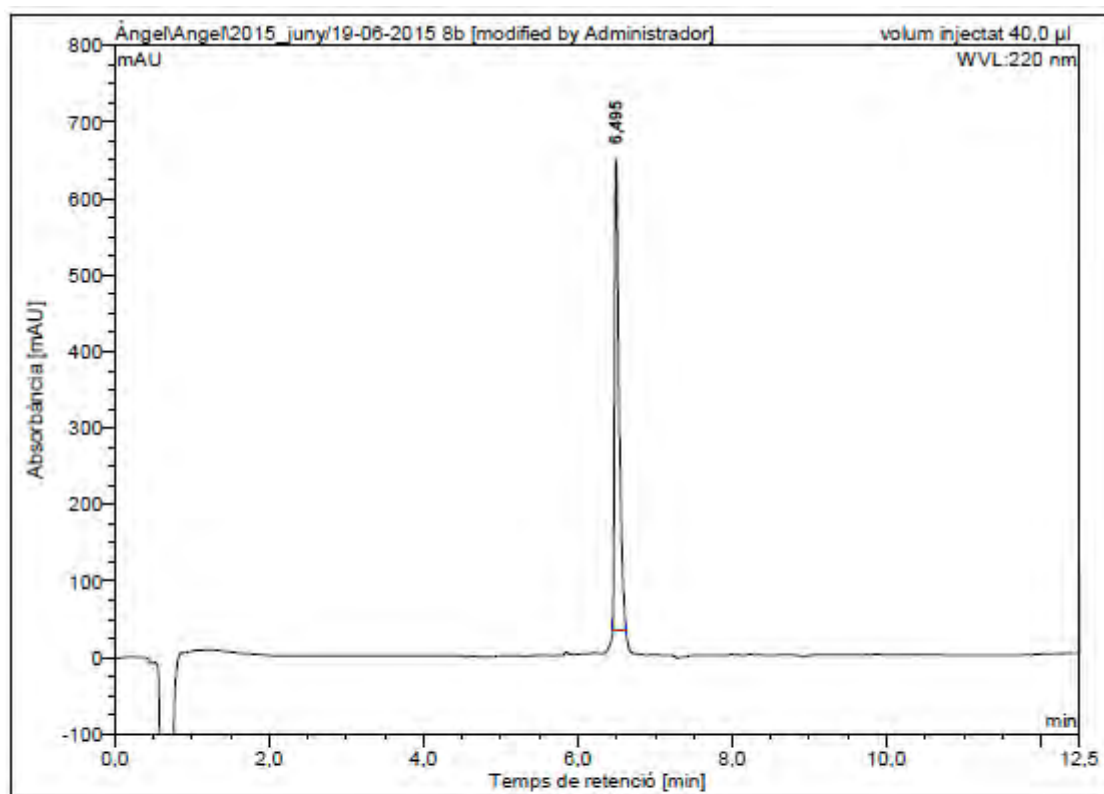
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP387)



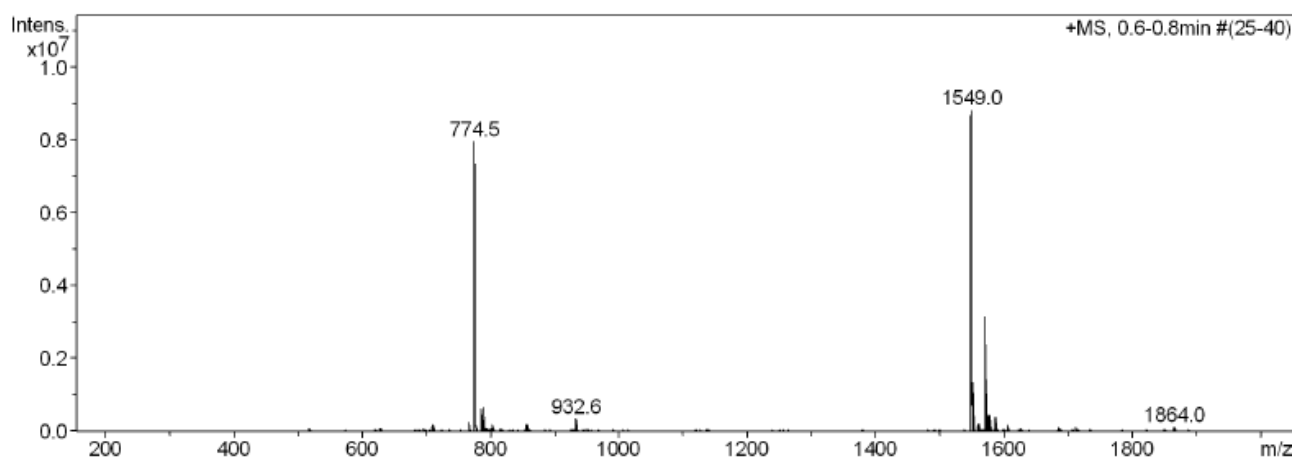
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



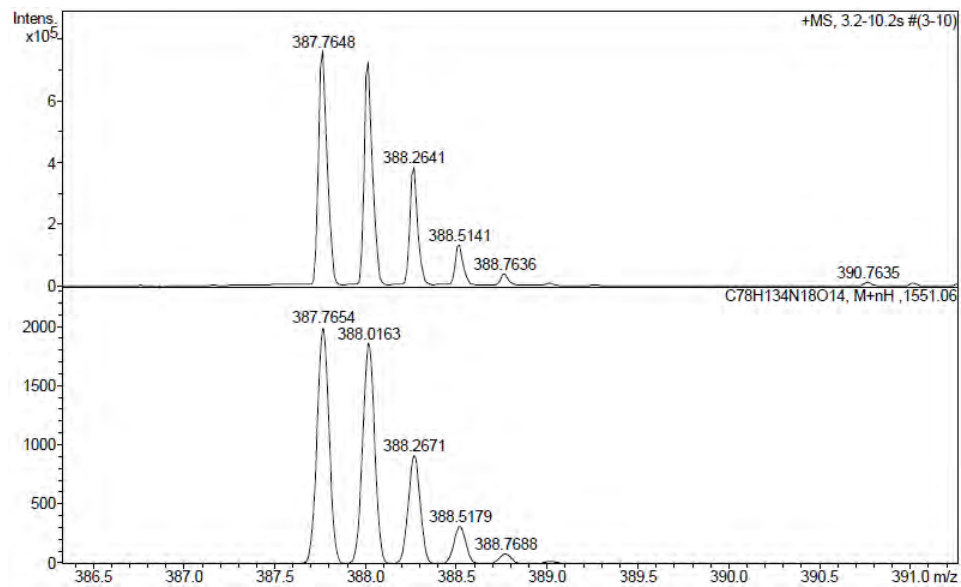
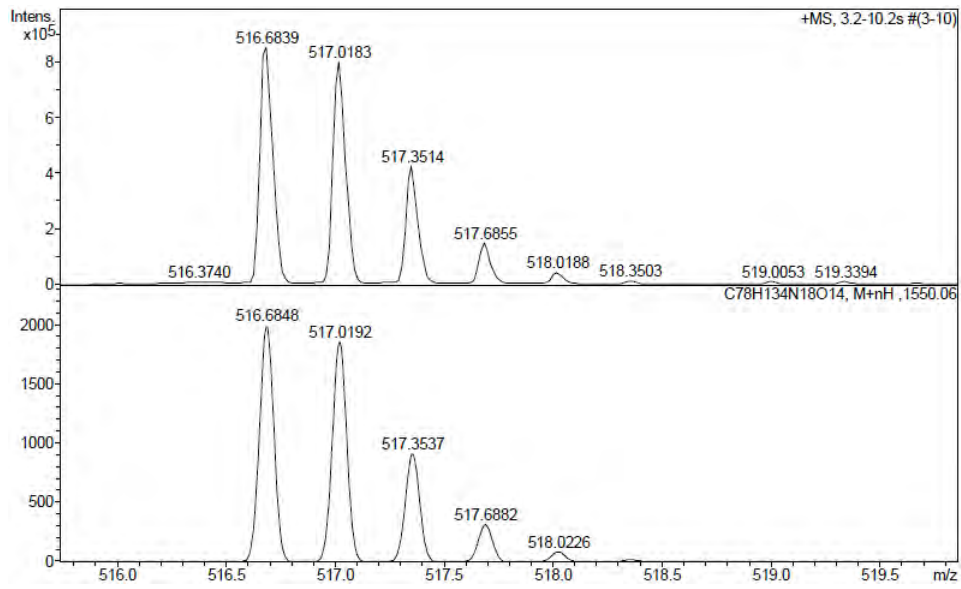
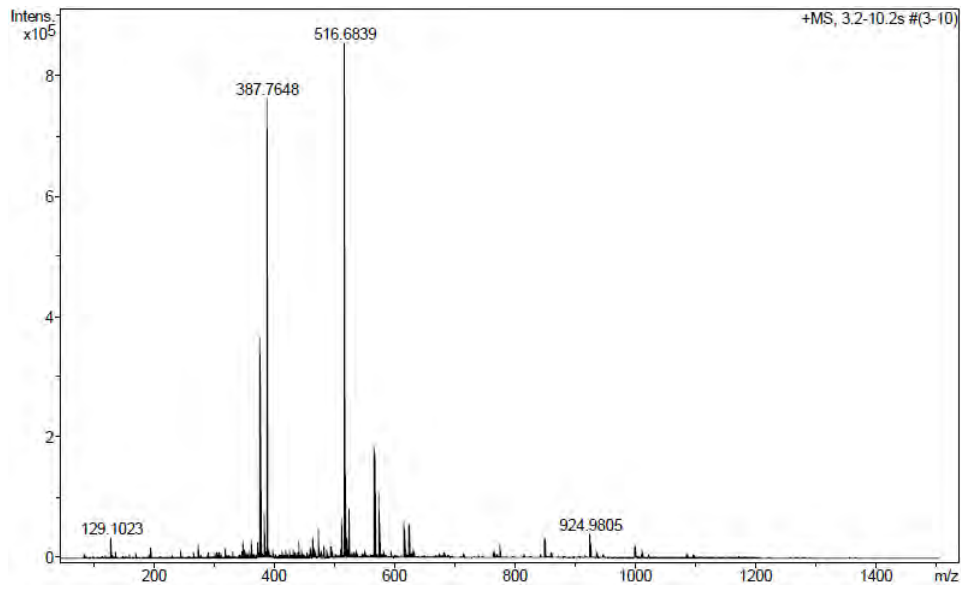
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,48	1641,202	103,705	59,43
2	6,54	662,273	25,655	14,70
3	6,88	470,800	35,575	20,39
4	7,33	99,025	6,624	3,80
5	7,82	62,032	2,926	1,68
Total:		2935,332	174,486	100,00

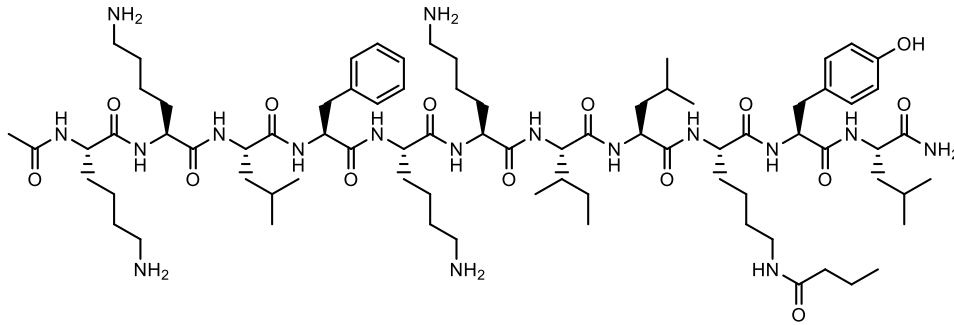
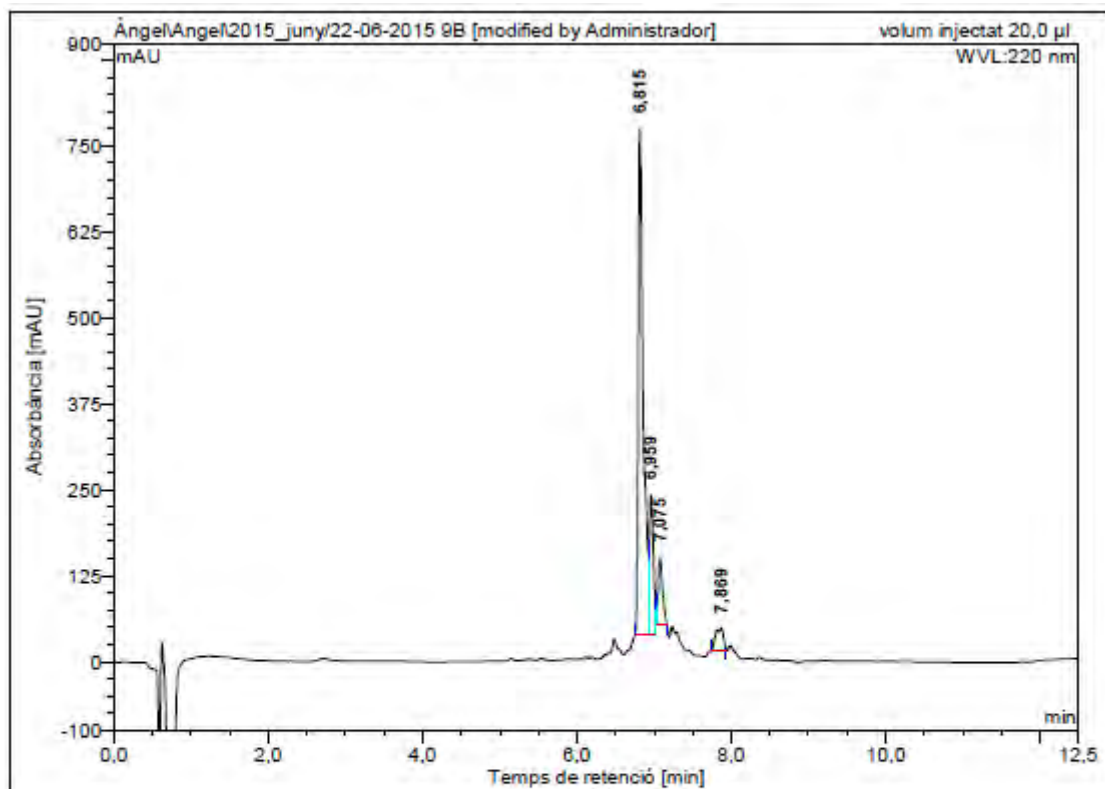
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,49	614,564	41,220	100,00
Total:		614,564	41,220	100,00

ESI-MS (m/z)

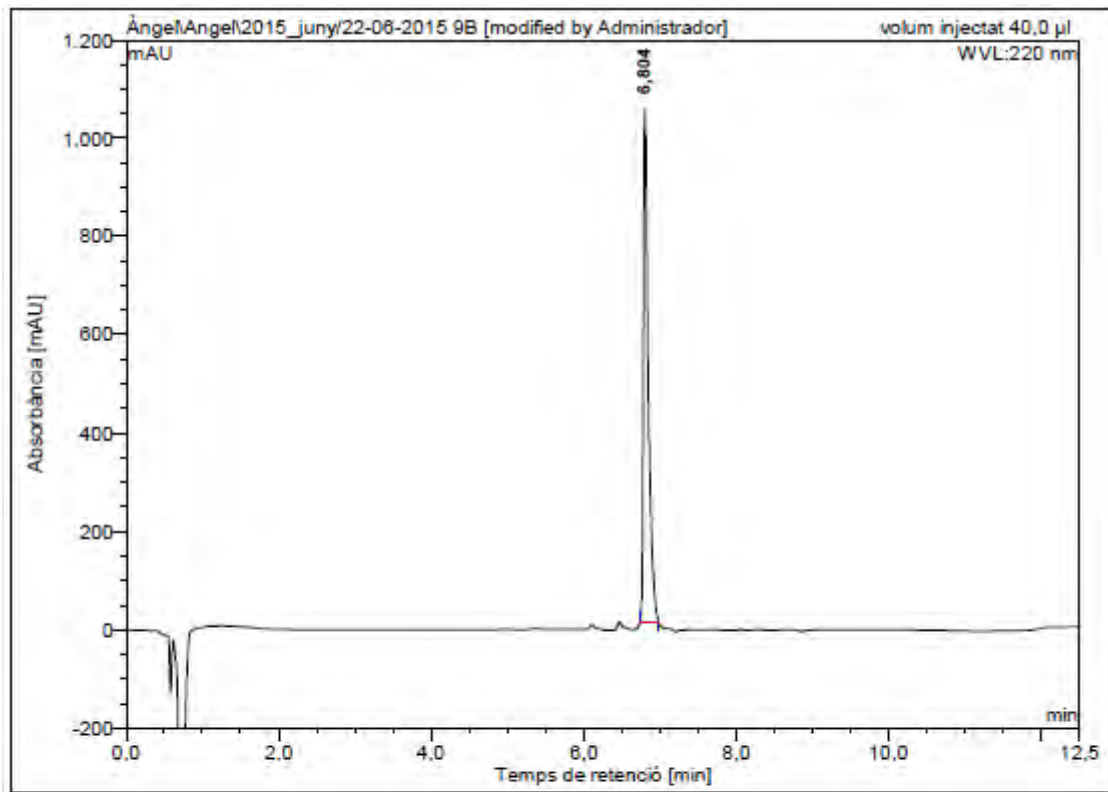
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP388)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

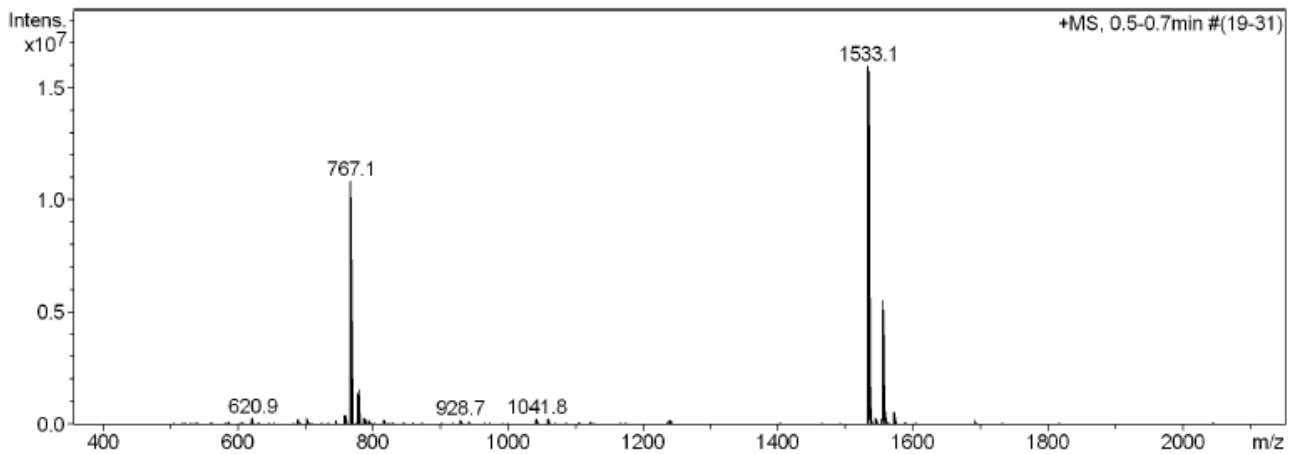
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,81	734,597	55,356	71,07
2	6,96	202,939	12,415	15,94
3	7,08	96,940	6,299	8,09
4	7,87	32,676	3,822	4,91
Total:		1067,152	77,893	100,00

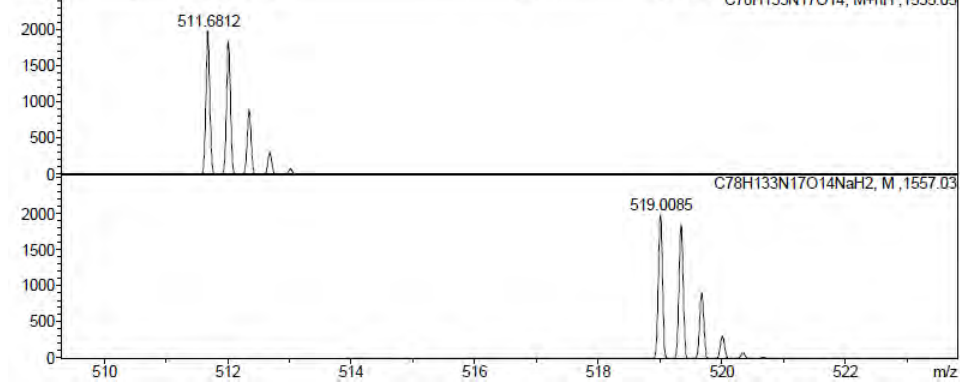
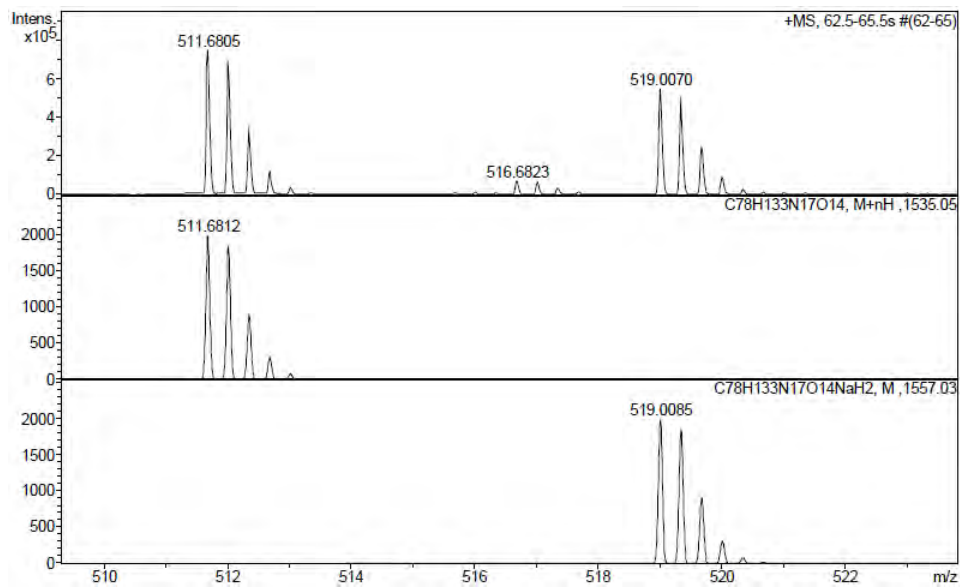
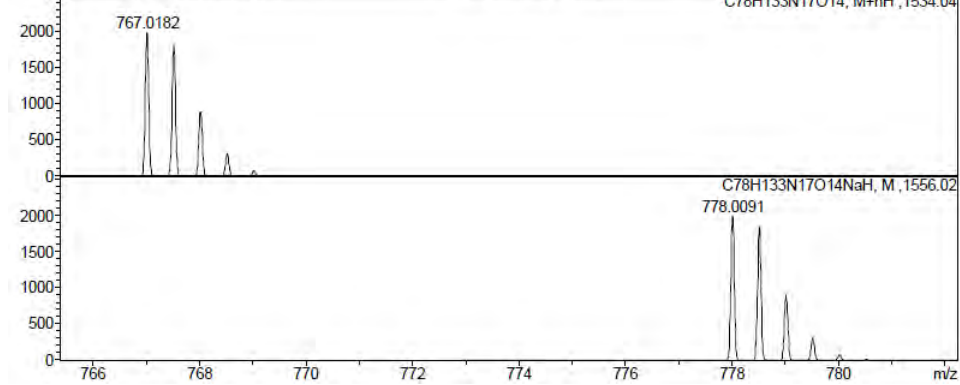
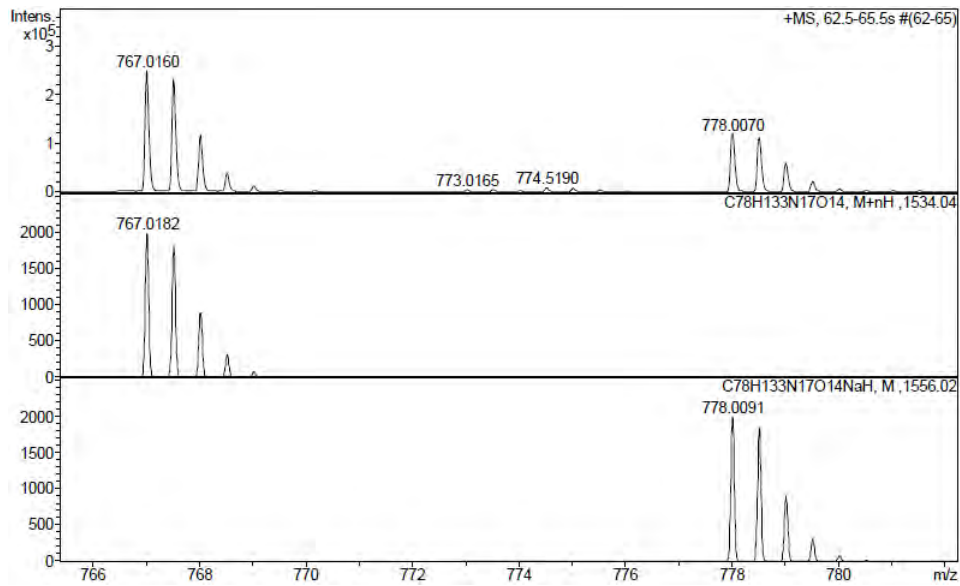
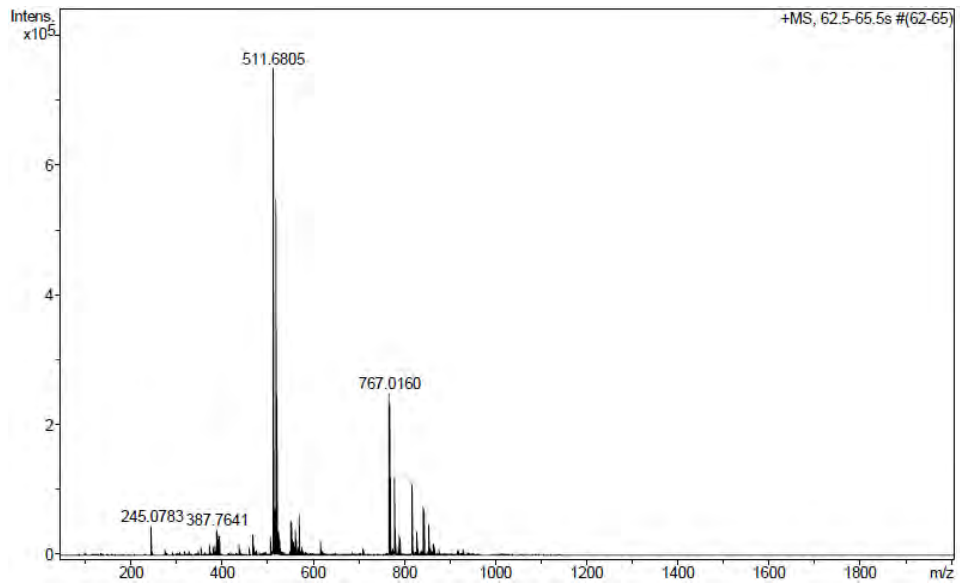
HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)



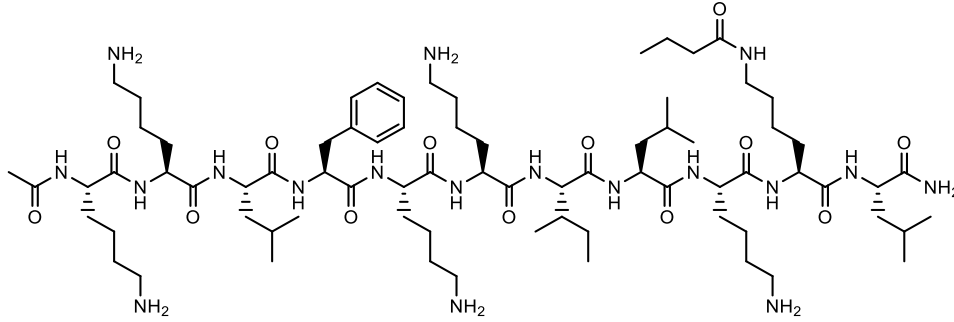
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,80	1043,690	77,975	100,00
Total:		1043,690	77,975	100,00

ESI-MS (m/z)

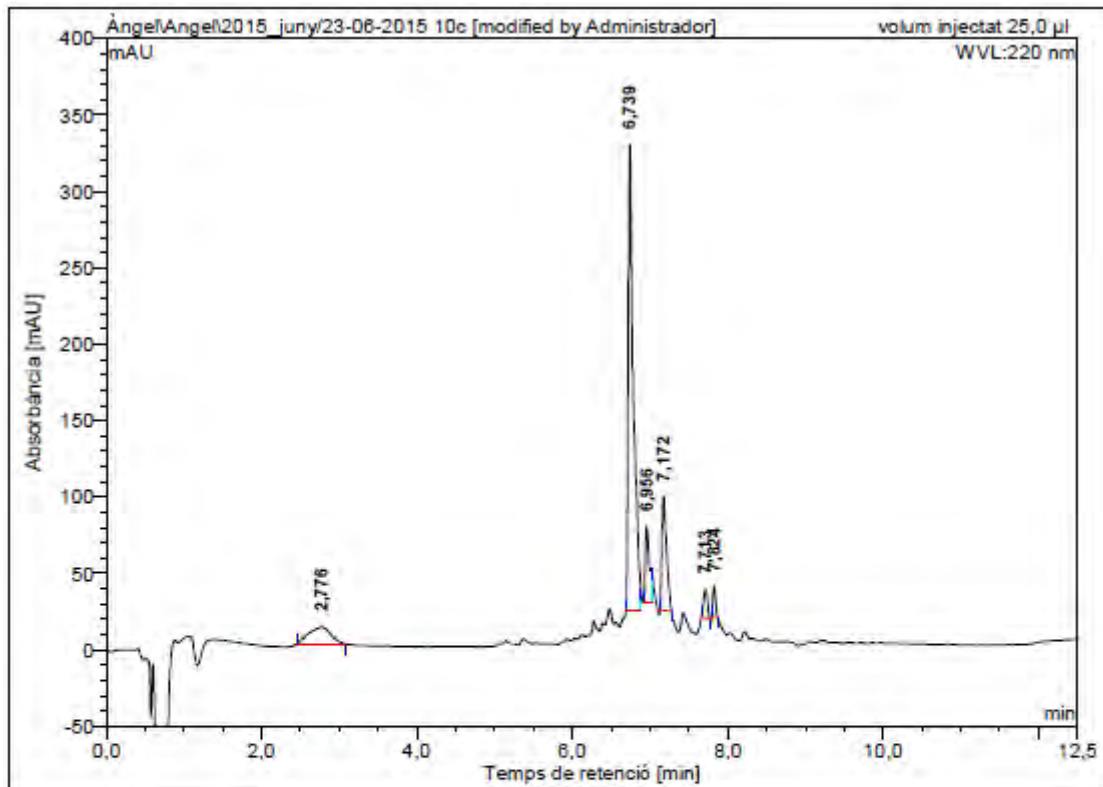


HRMS (m/z)

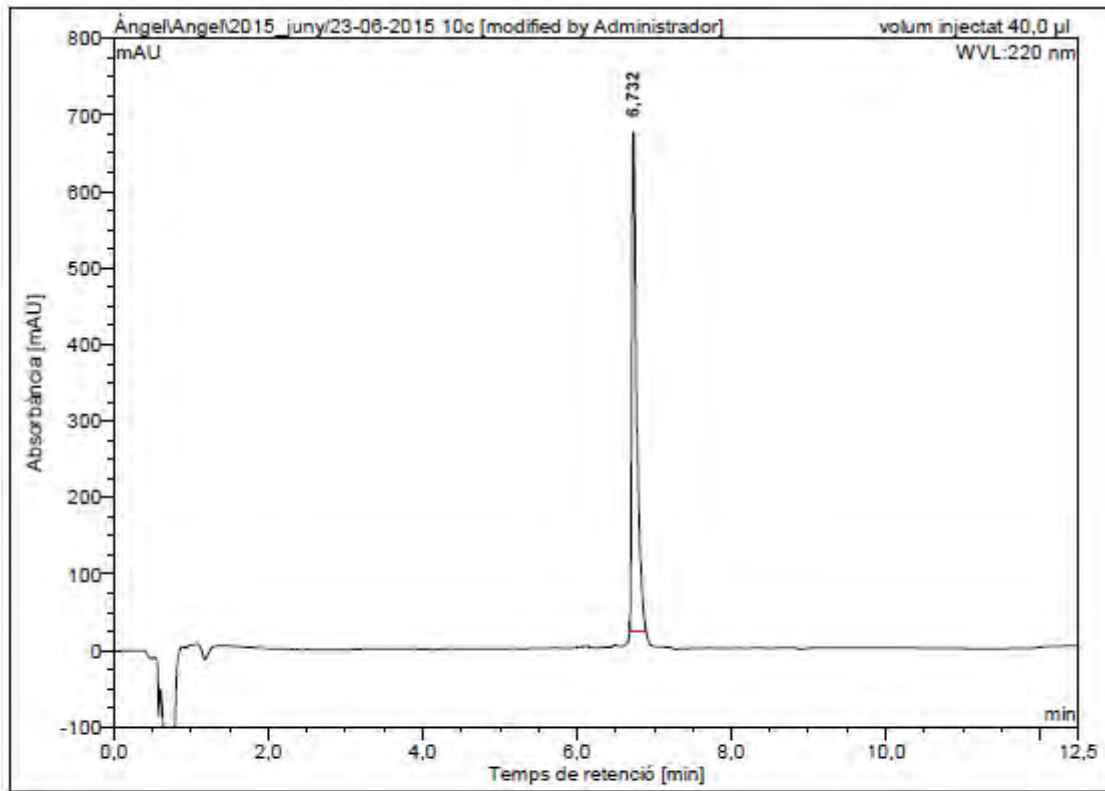
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP389)



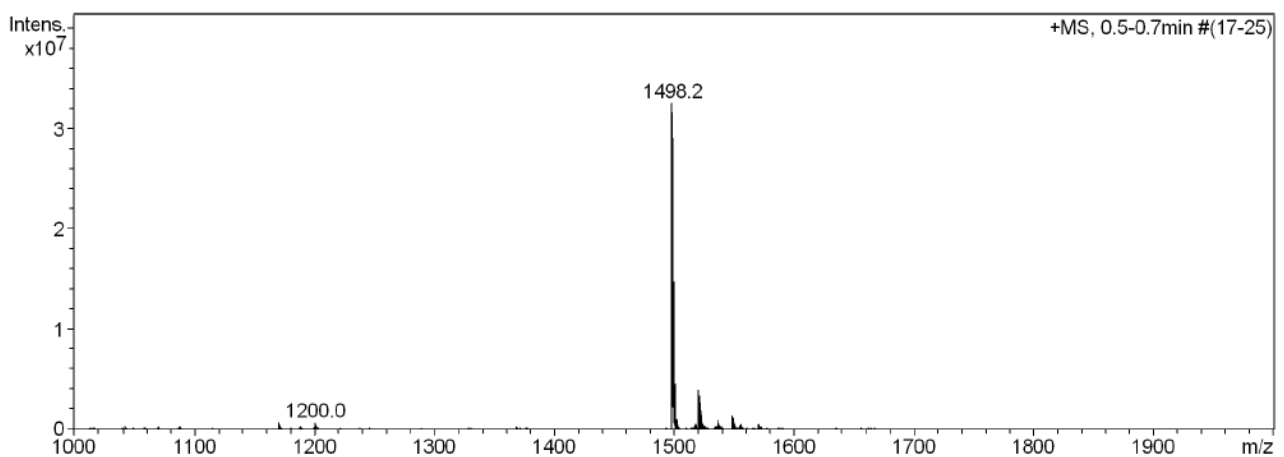
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



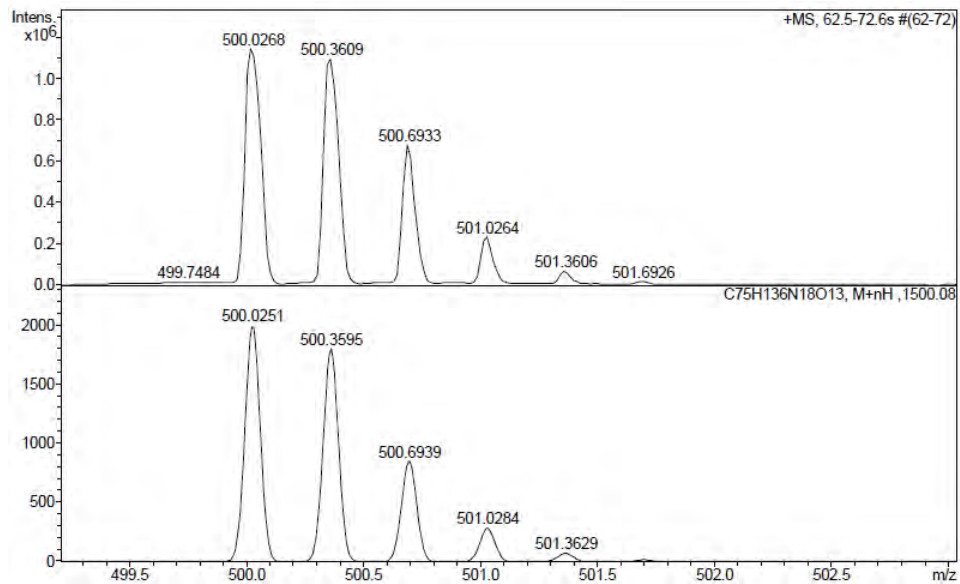
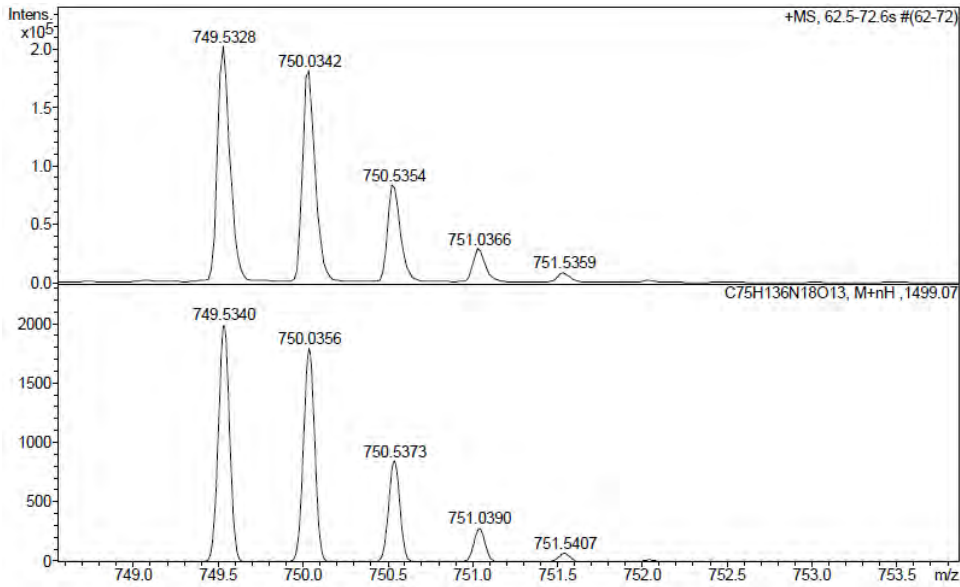
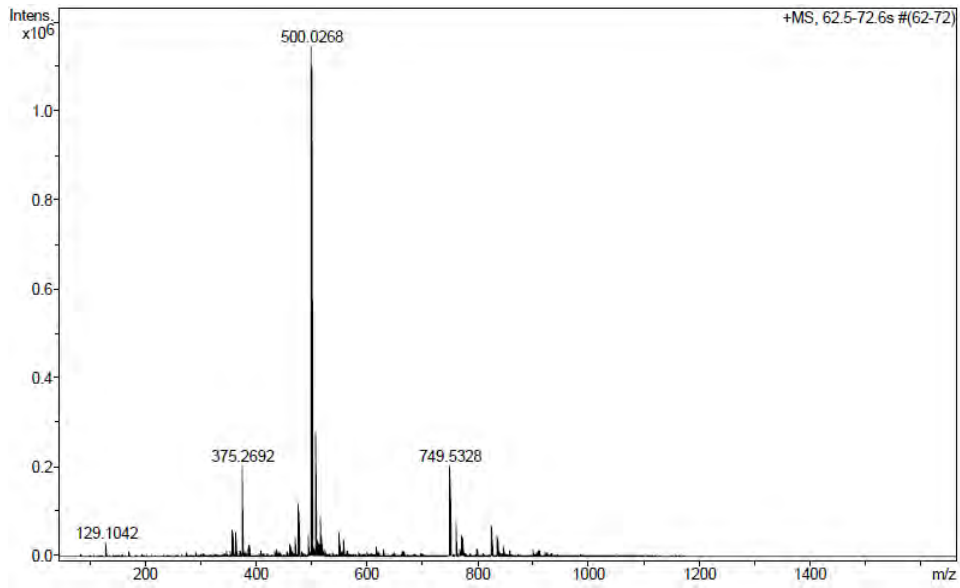
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	2,78	11,120	3,623	9,81
2	6,74	304,240	23,356	63,24
3	6,96	49,294	2,872	7,78
4	7,17	75,149	5,192	14,06
5	7,71	18,724	1,088	2,95
6	7,82	19,966	0,802	2,17
Total:		478,493	36,934	100,00

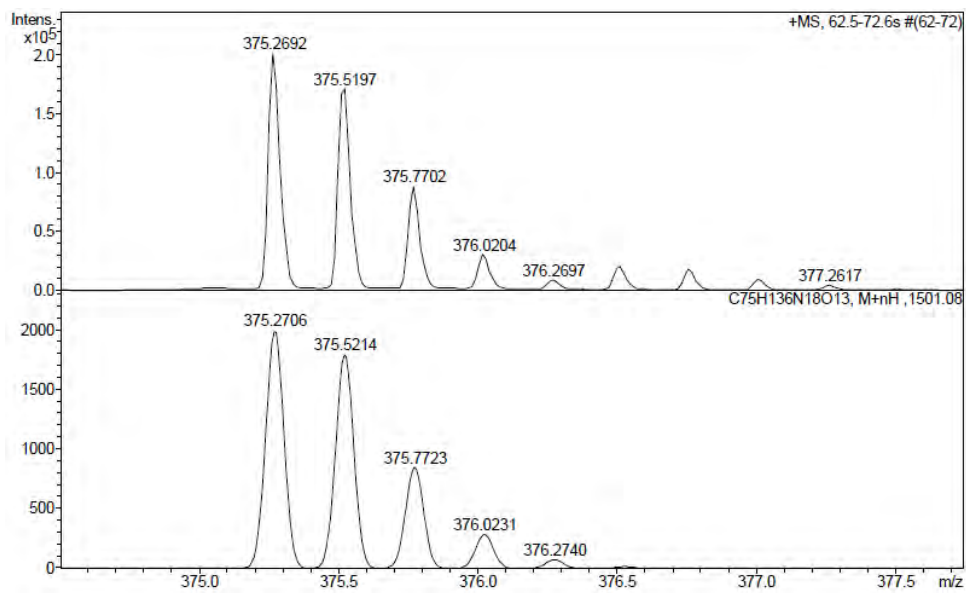
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,73	652,224	47,088	100,00
Total:		652,224	47,088	100,00

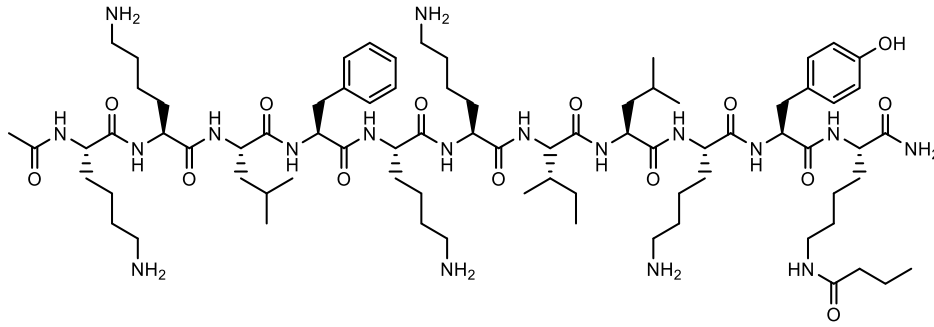
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

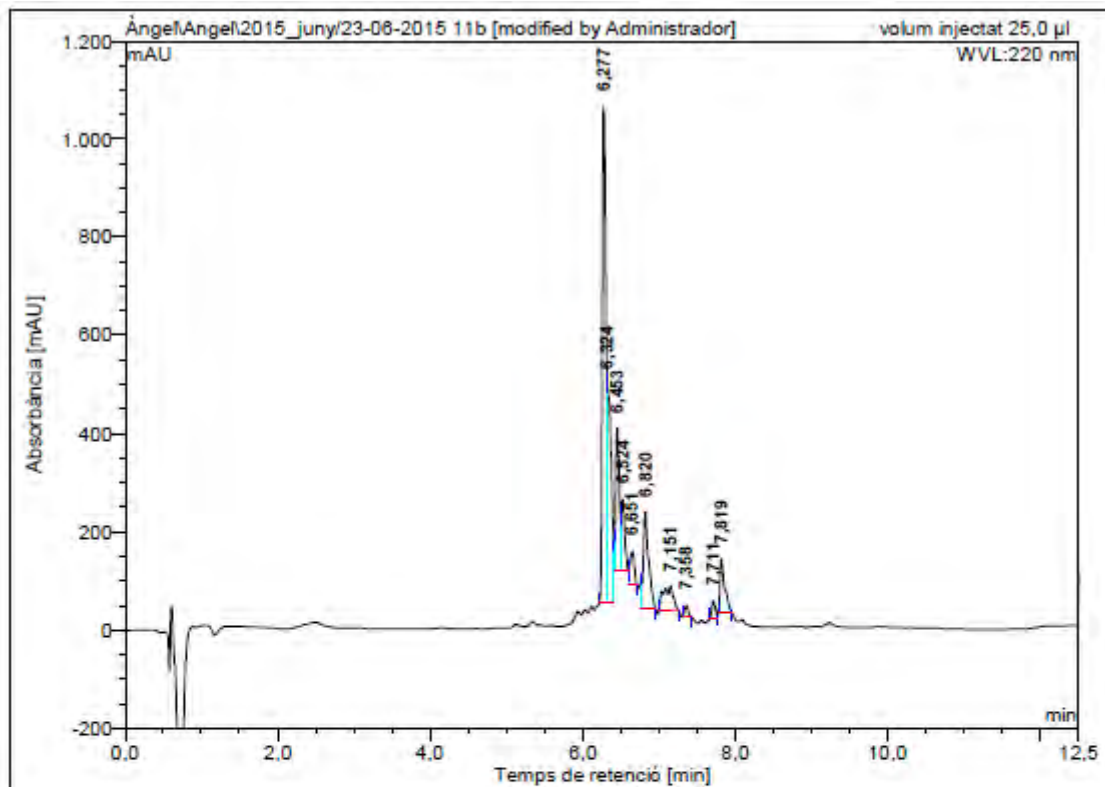




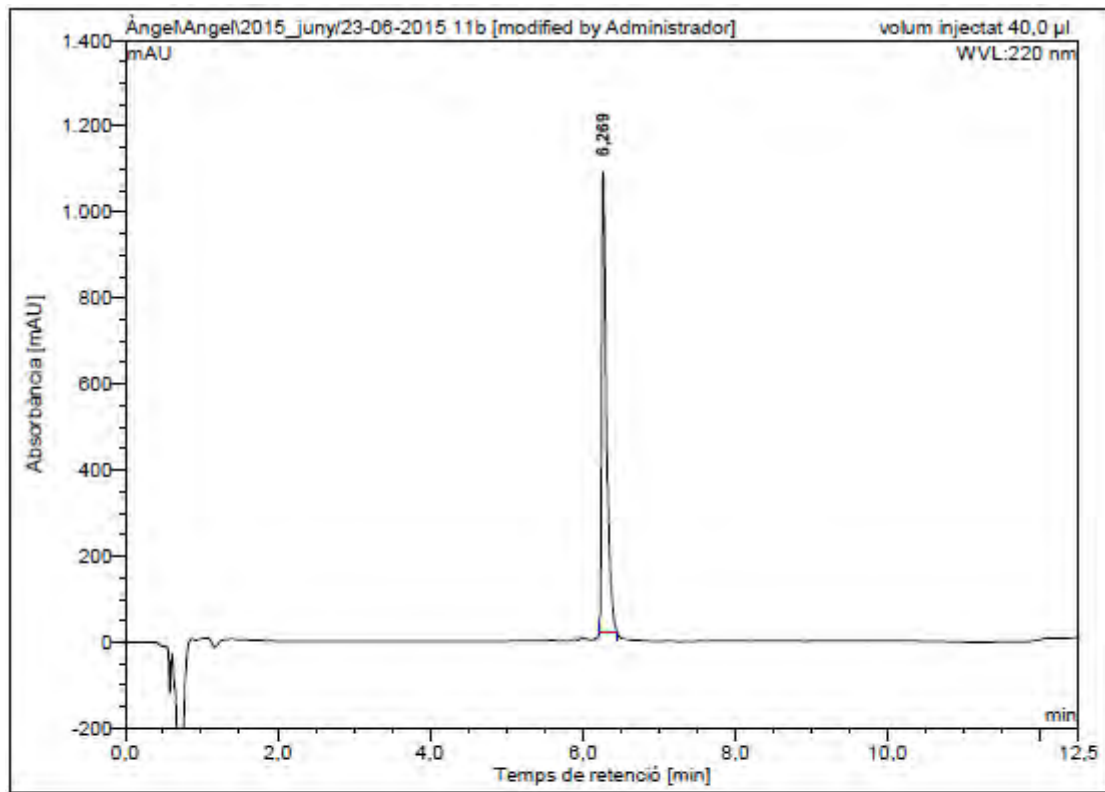
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (BP390)



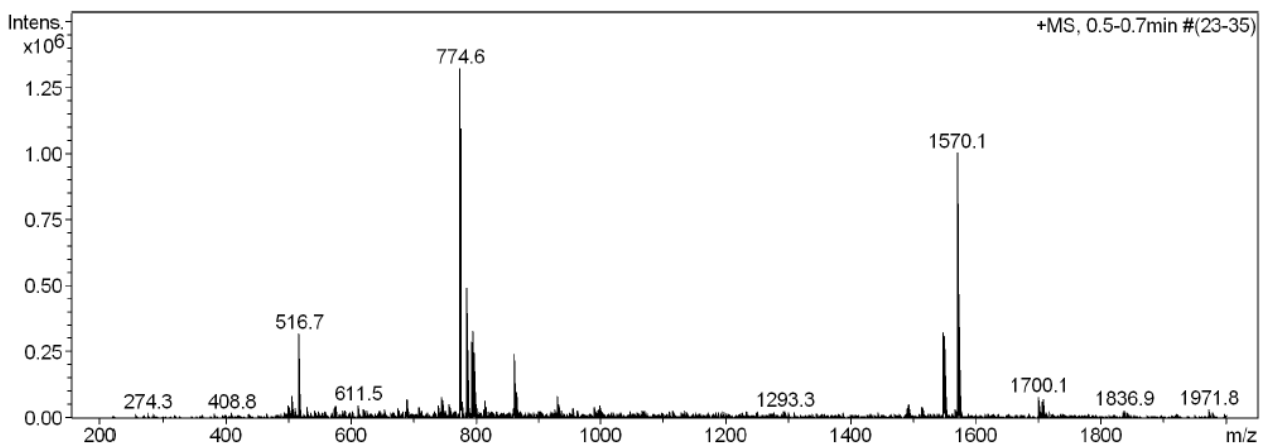
HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)



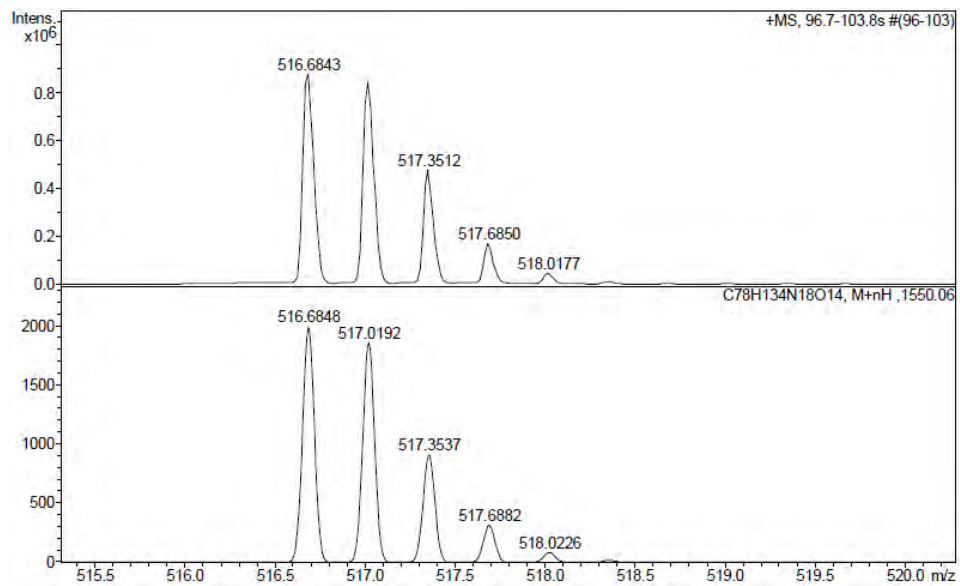
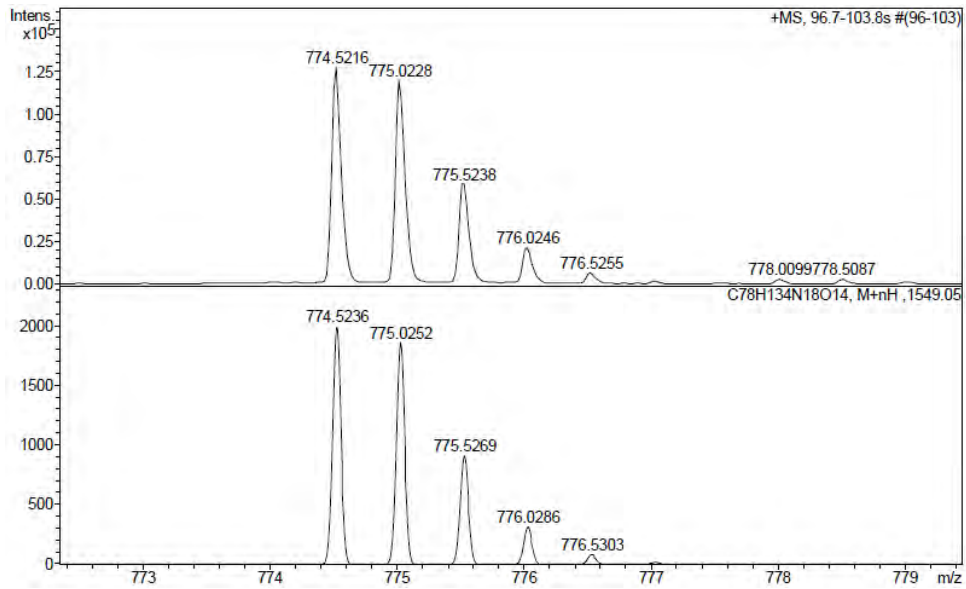
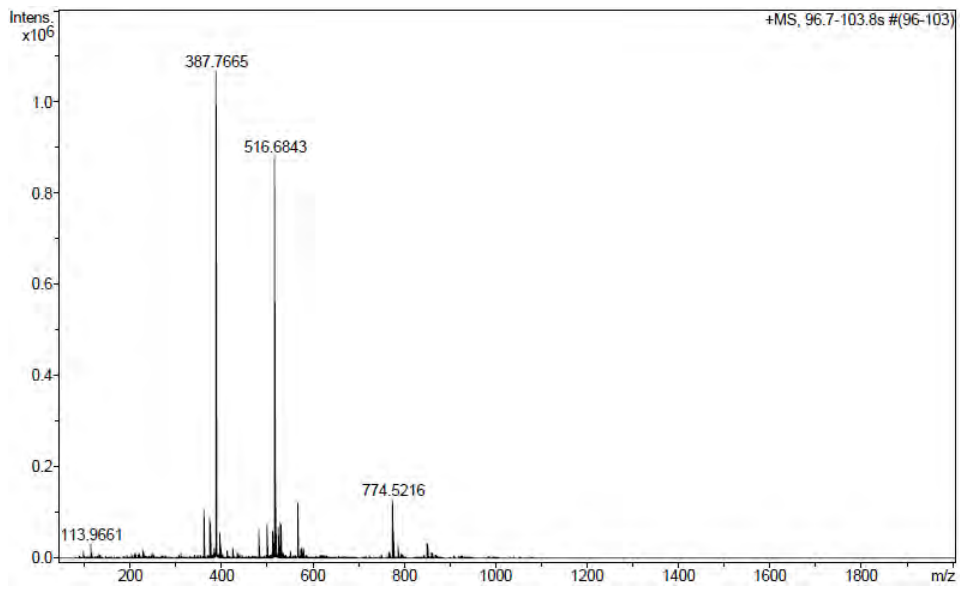
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,28	1011,506	57,532	39,69
2	6,32	444,995	26,334	18,17
3	6,45	290,645	16,081	11,09
4	6,52	146,149	7,347	5,07
5	6,65	67,035	4,255	2,94
6	6,82	195,858	15,276	10,54
7	7,15	48,894	7,528	5,19
8	7,36	21,532	1,052	0,73
9	7,71	34,648	1,810	1,25
10	7,82	110,083	7,753	5,35
Total:		2371,346	144,969	100,00

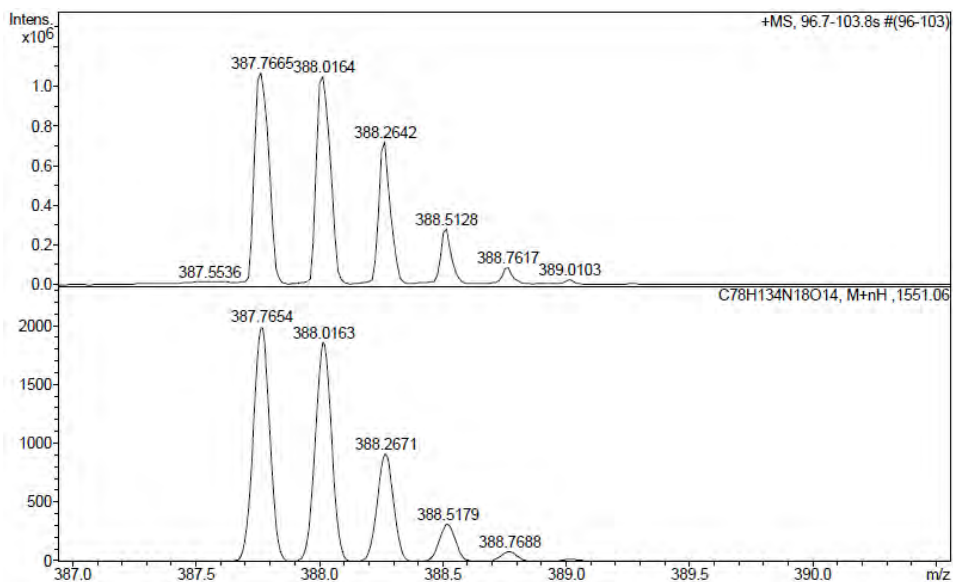
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,27	1068,134	76,691	100,00
Total:		1068,134	76,691	100,00

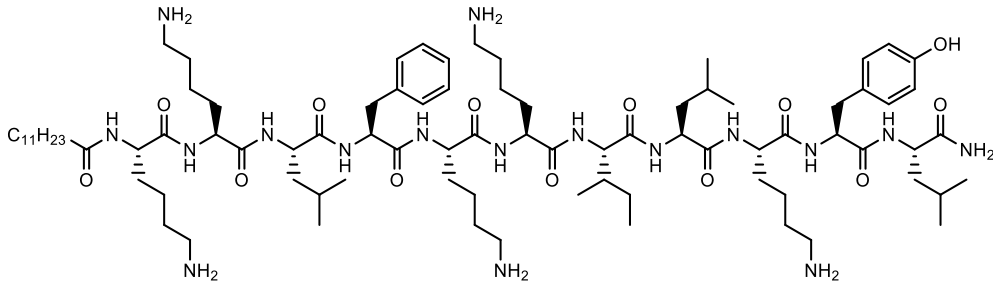
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

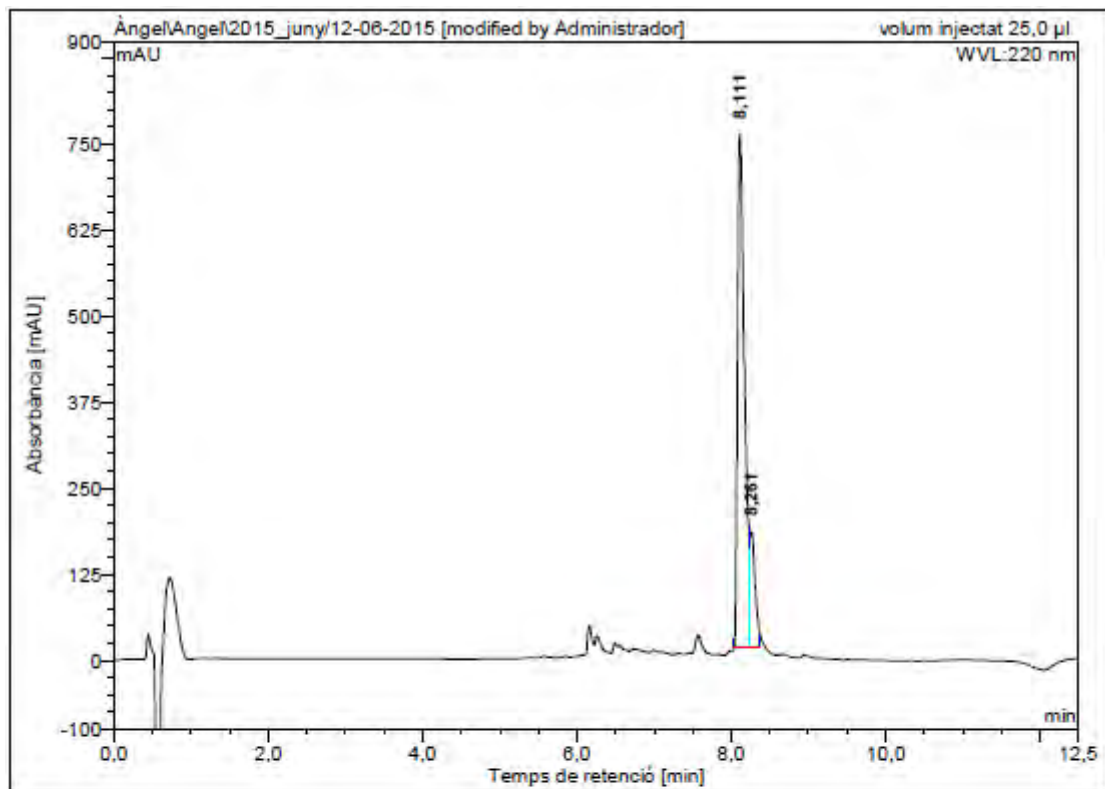




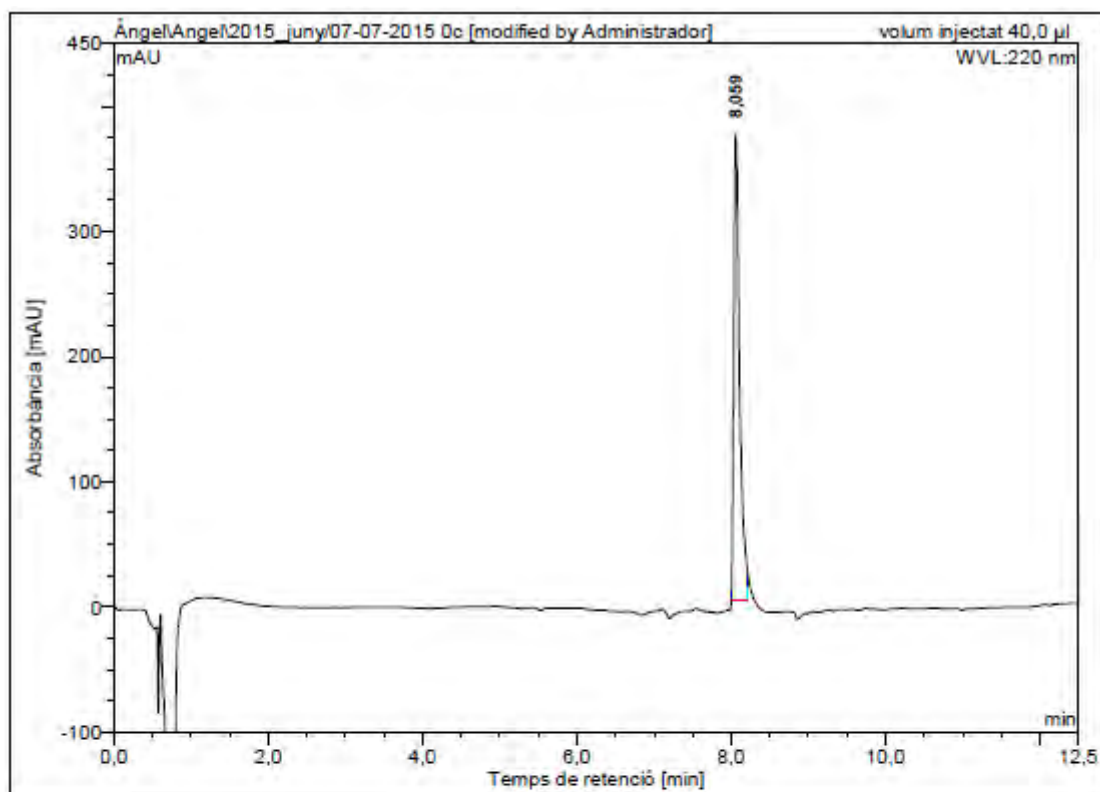
C₁₁H₂₃CO-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP391)



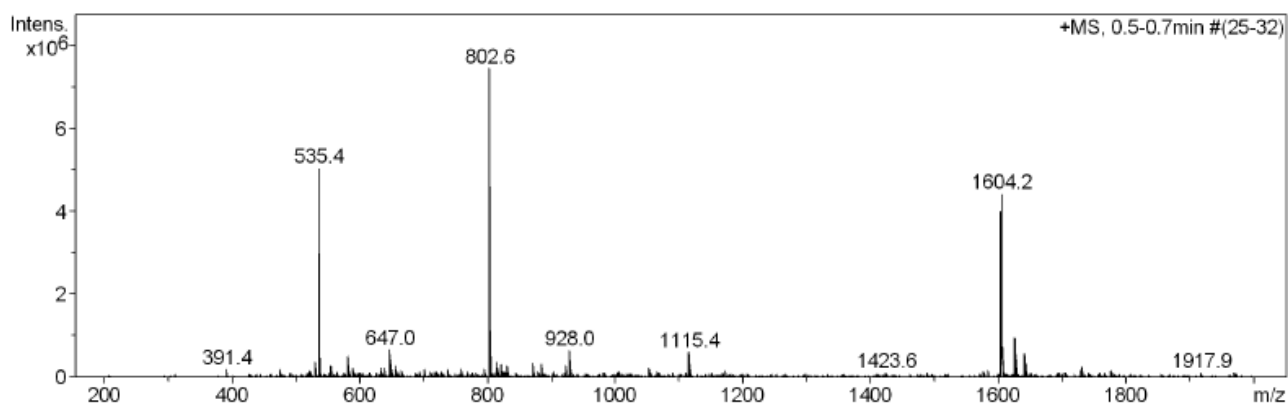
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



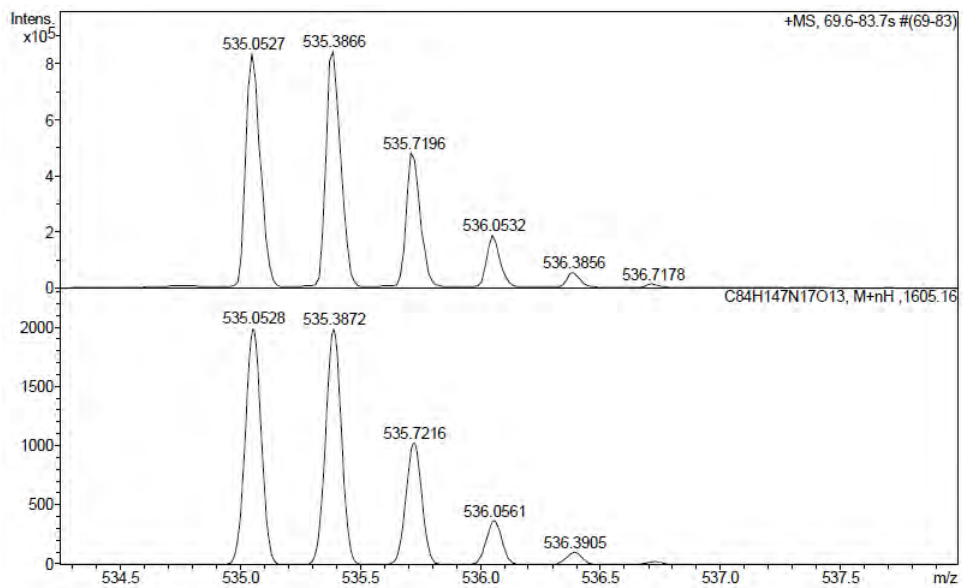
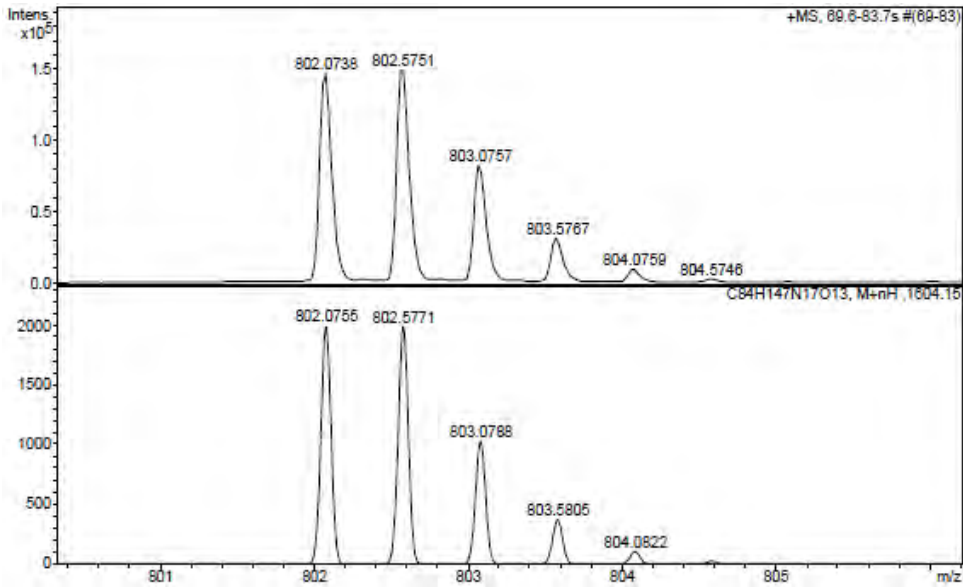
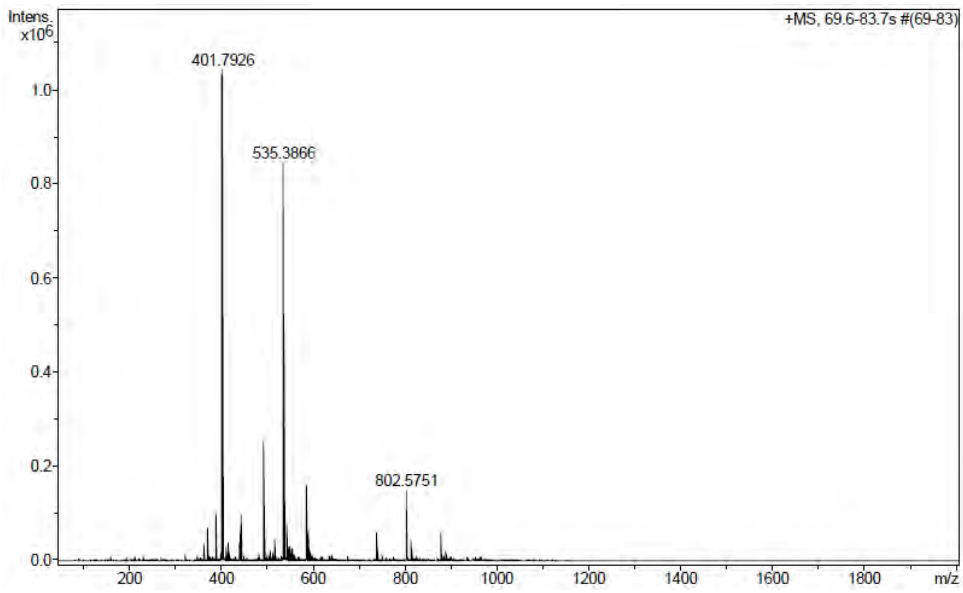
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	8,11	746,197	78,152	84,86
2	8,26	168,248	13,942	15,14
Total:		914,445	92,093	100,00

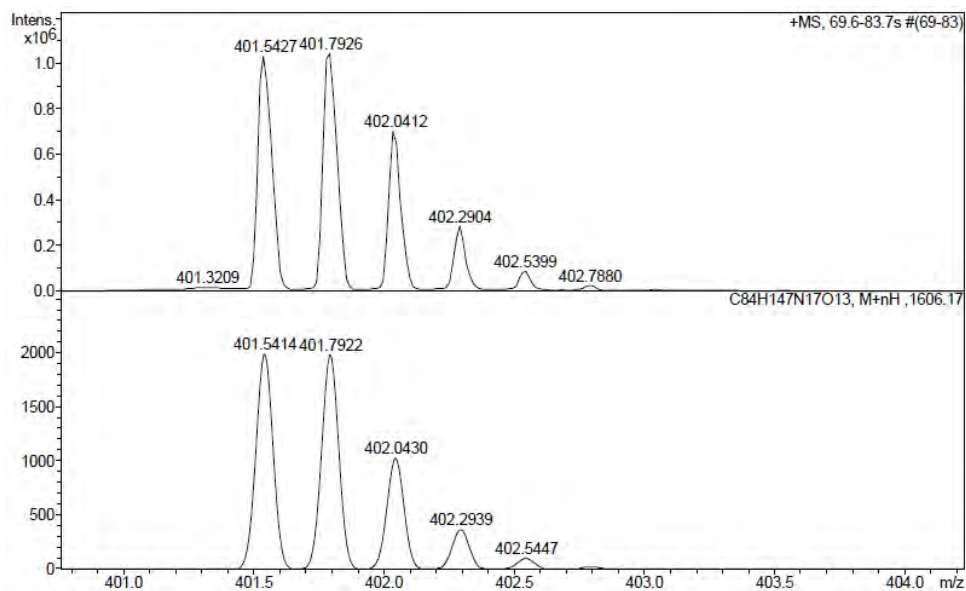
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	8,06	371,606	32,445	100,00
Total:		371,606	32,445	100,00

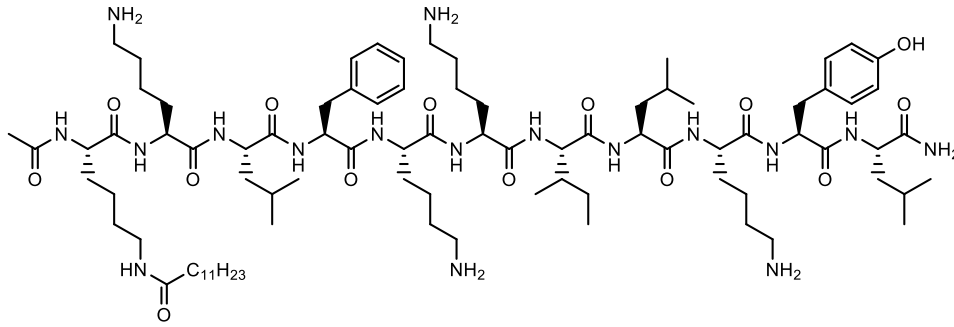
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

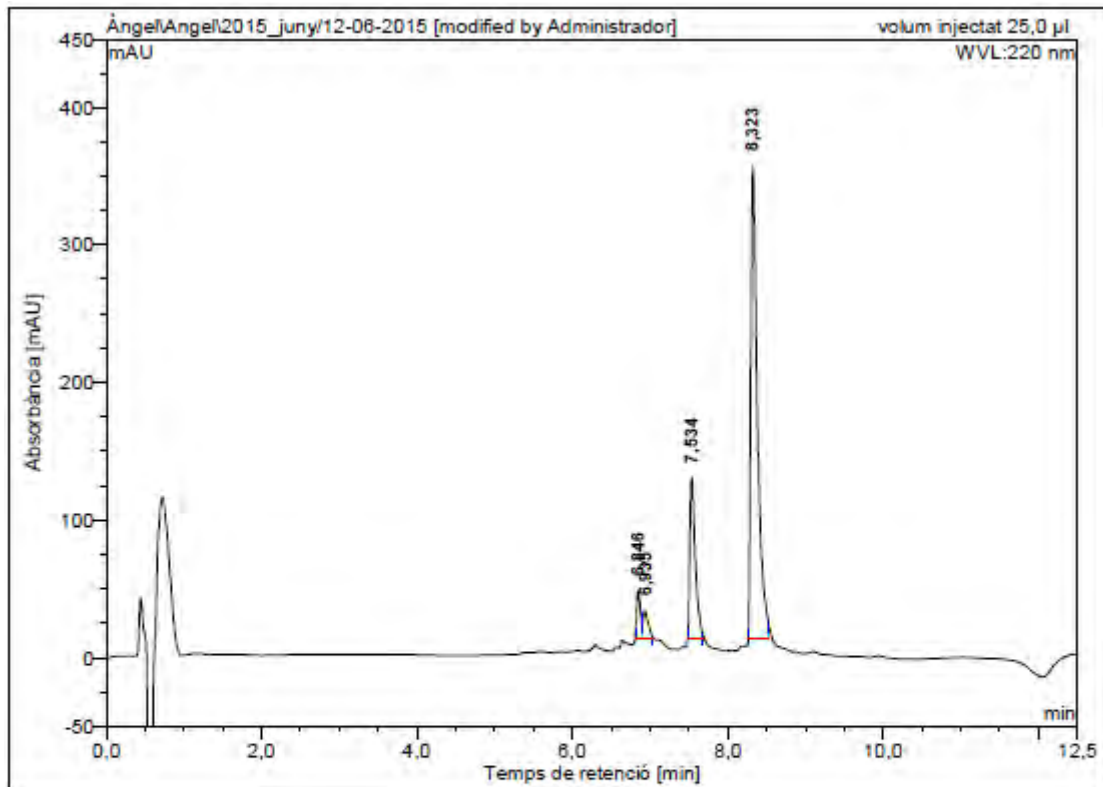




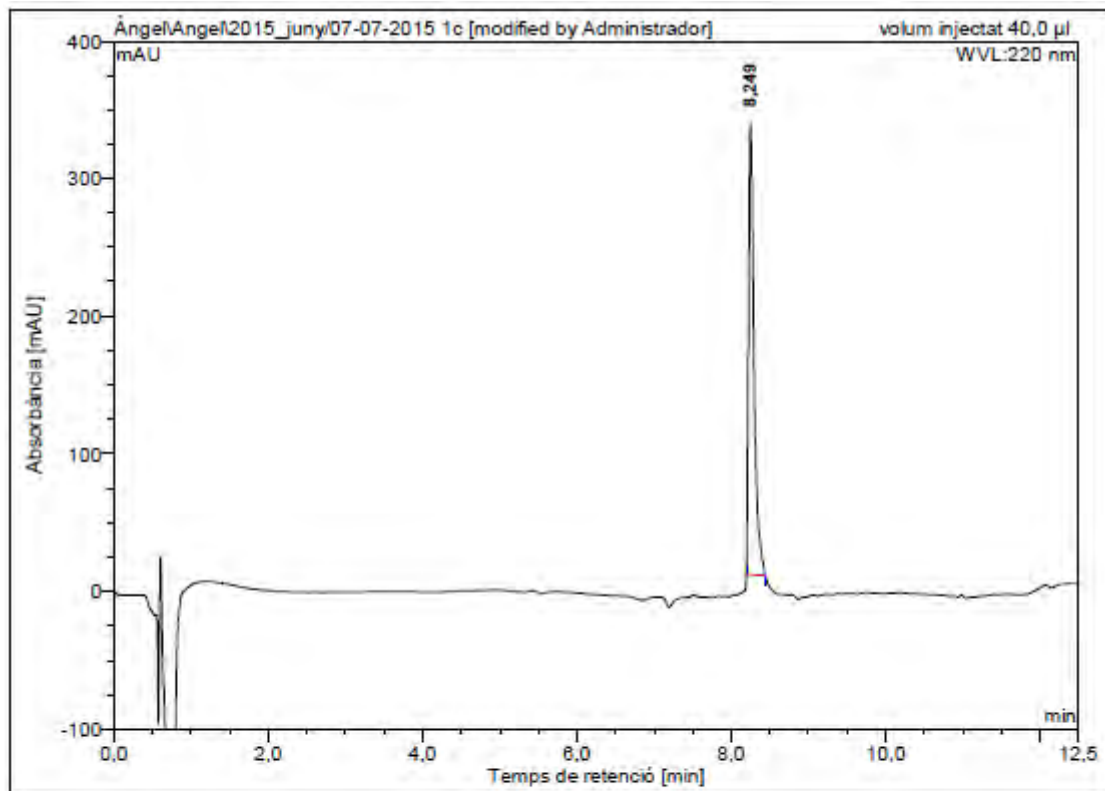
Ac-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP392)



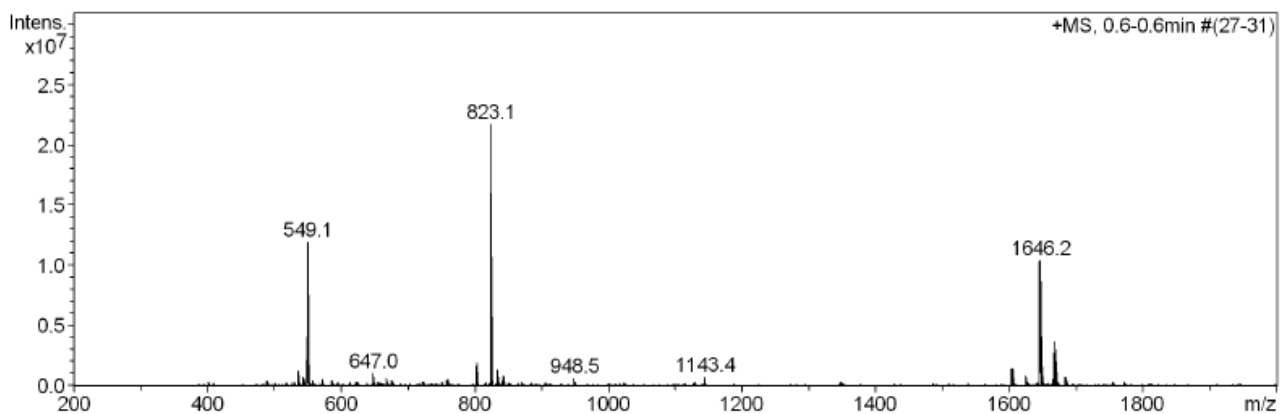
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



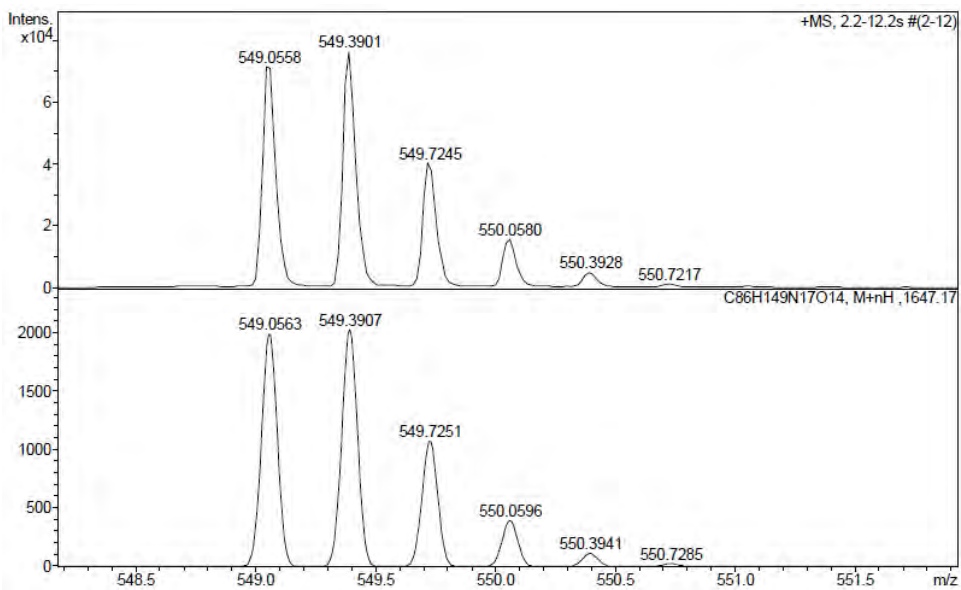
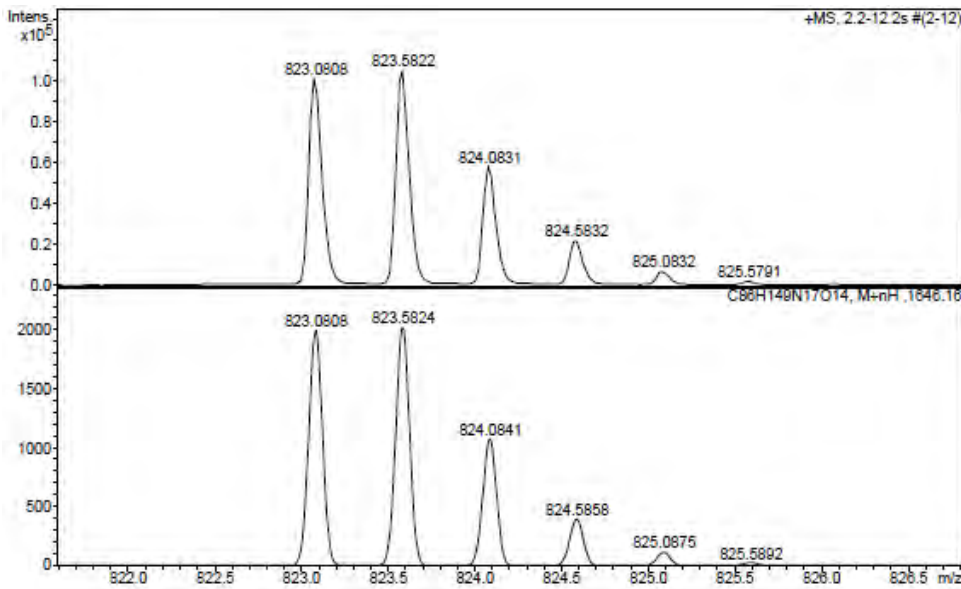
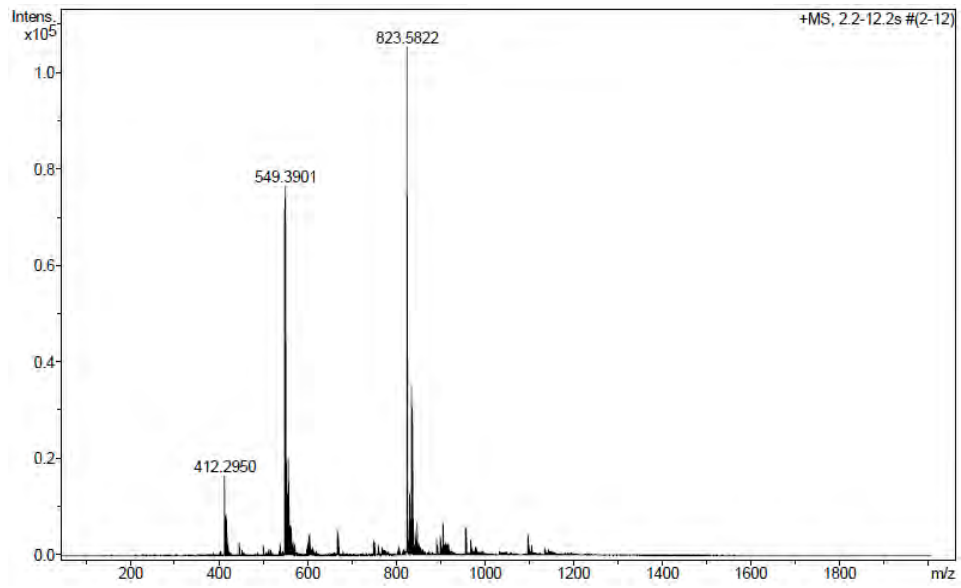
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,85	34,448	1,872	4,00
2	6,94	19,777	1,534	3,28
3	7,53	116,711	9,544	20,39
4	8,32	343,030	33,847	72,33
Total:		513,966	46,798	100,00

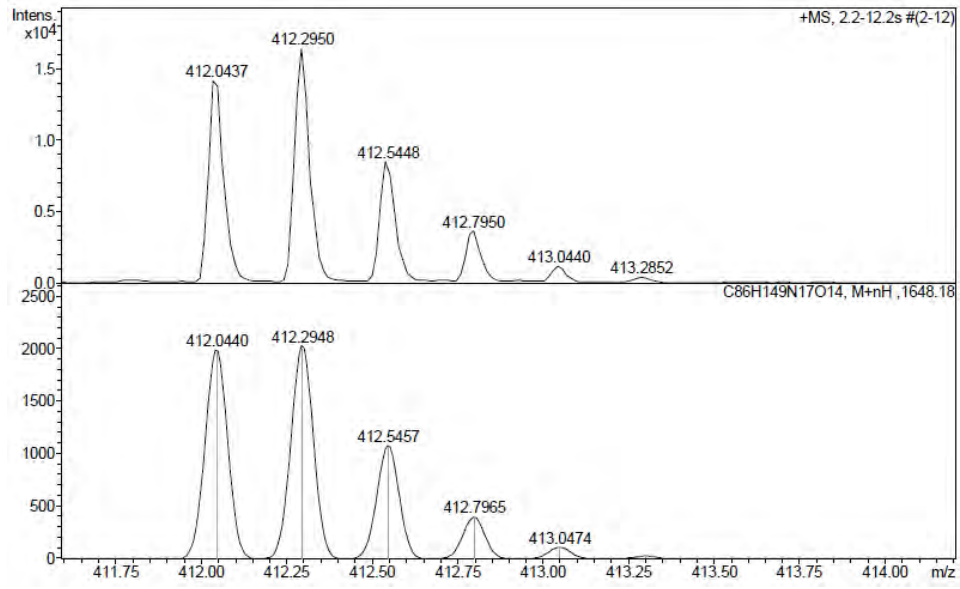
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	8,25	327,932	26,627	100,00
Total:		327,932	26,627	100,00

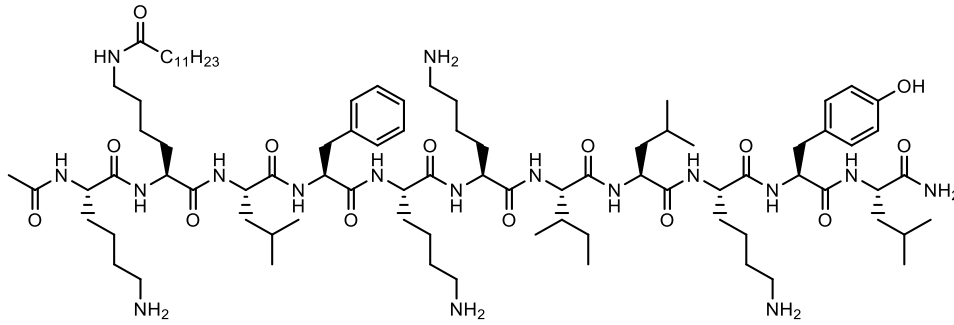
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

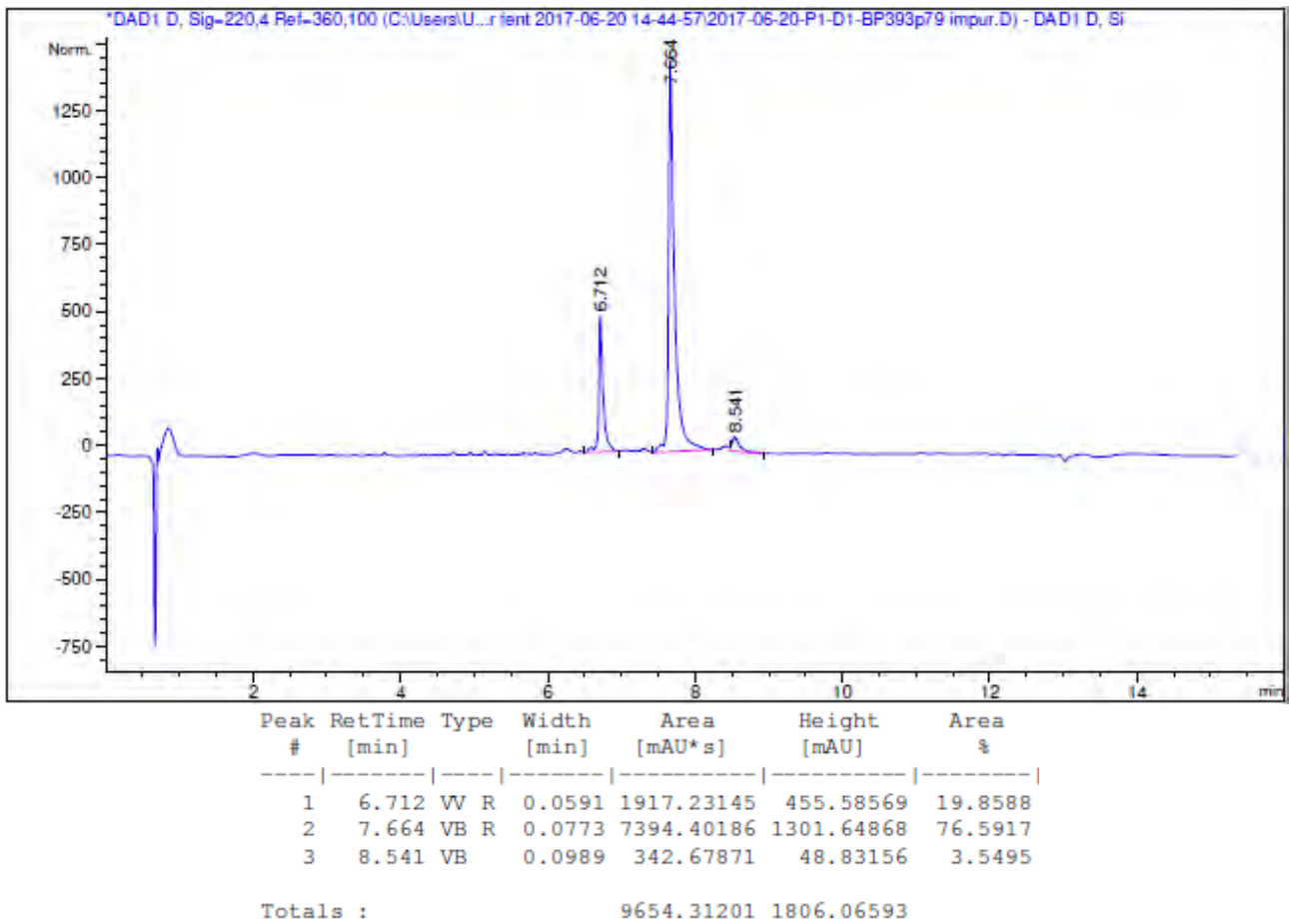


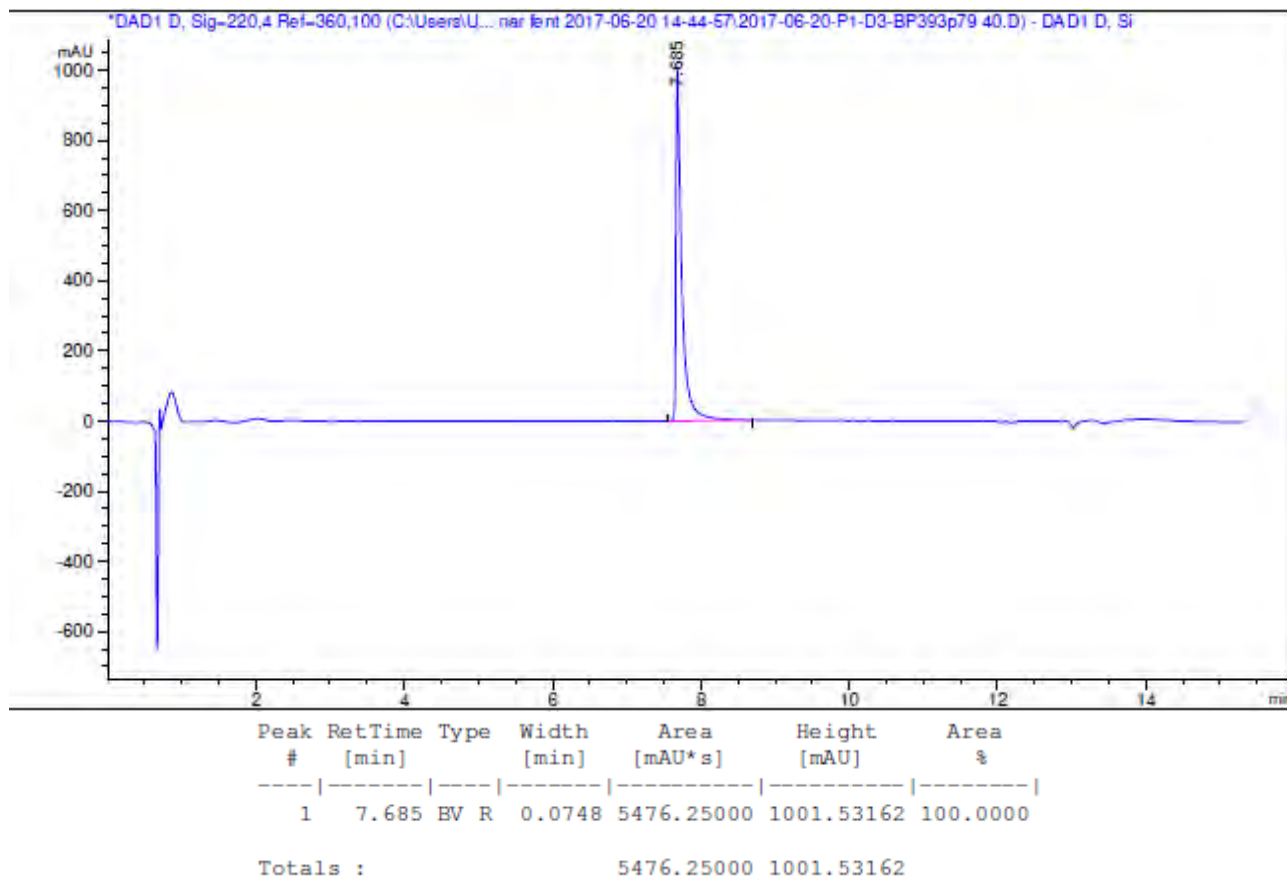
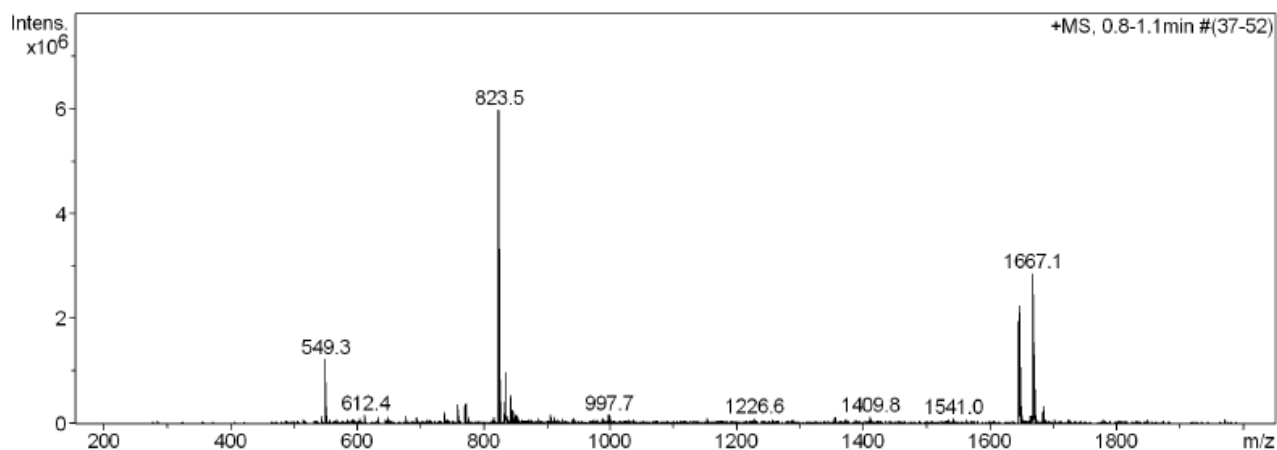


Ac-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP393)

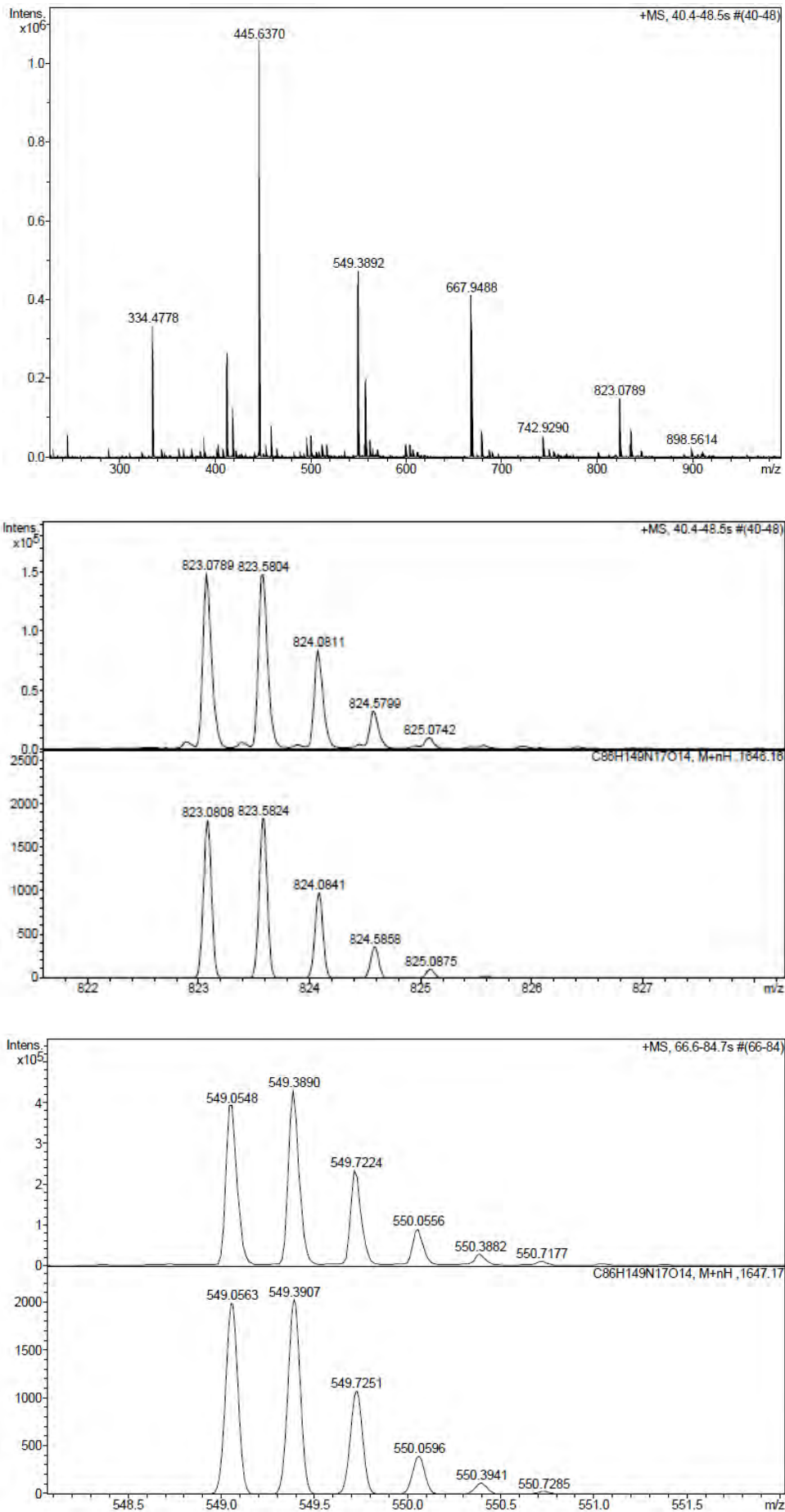


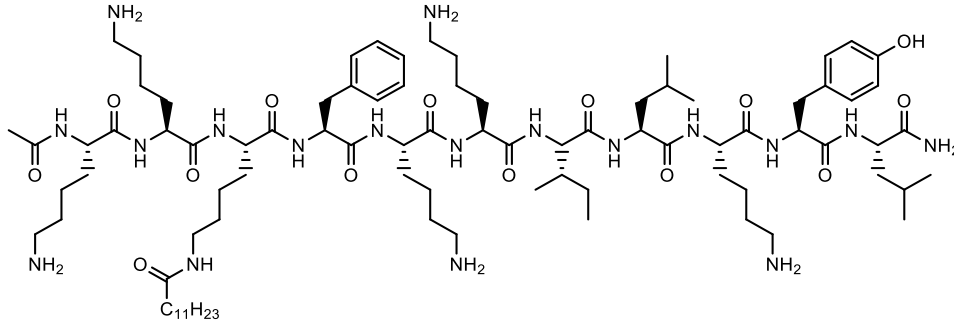
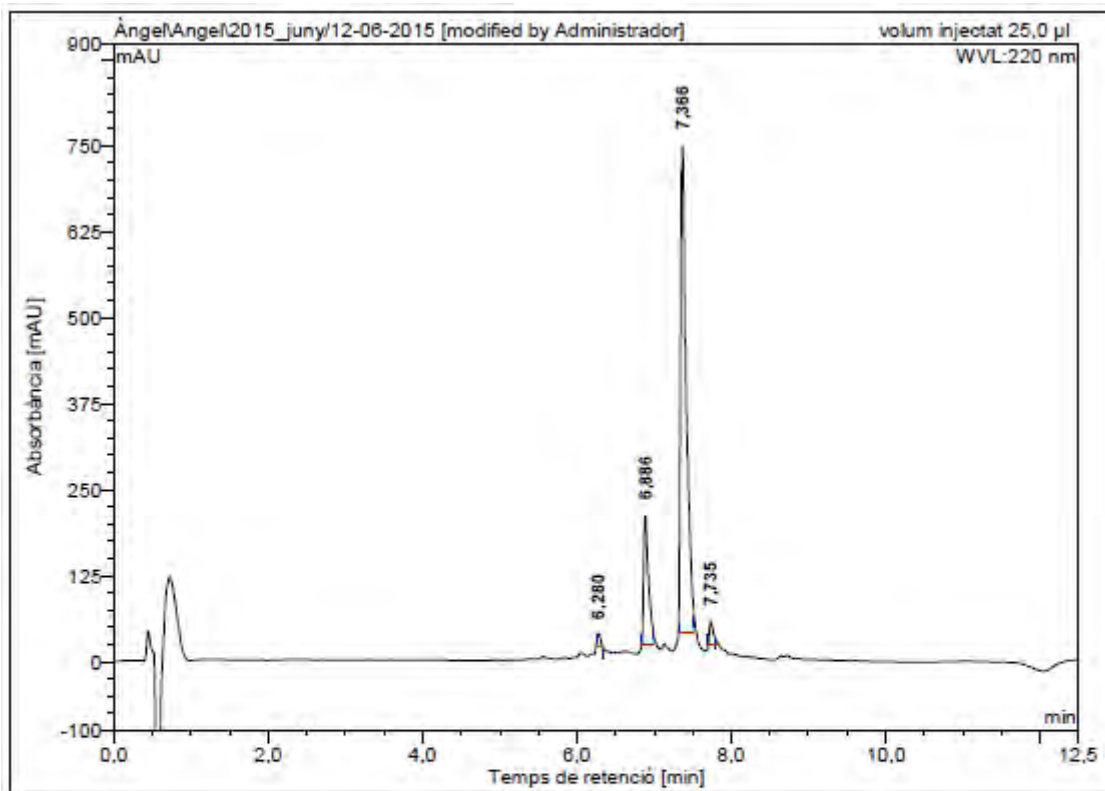
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

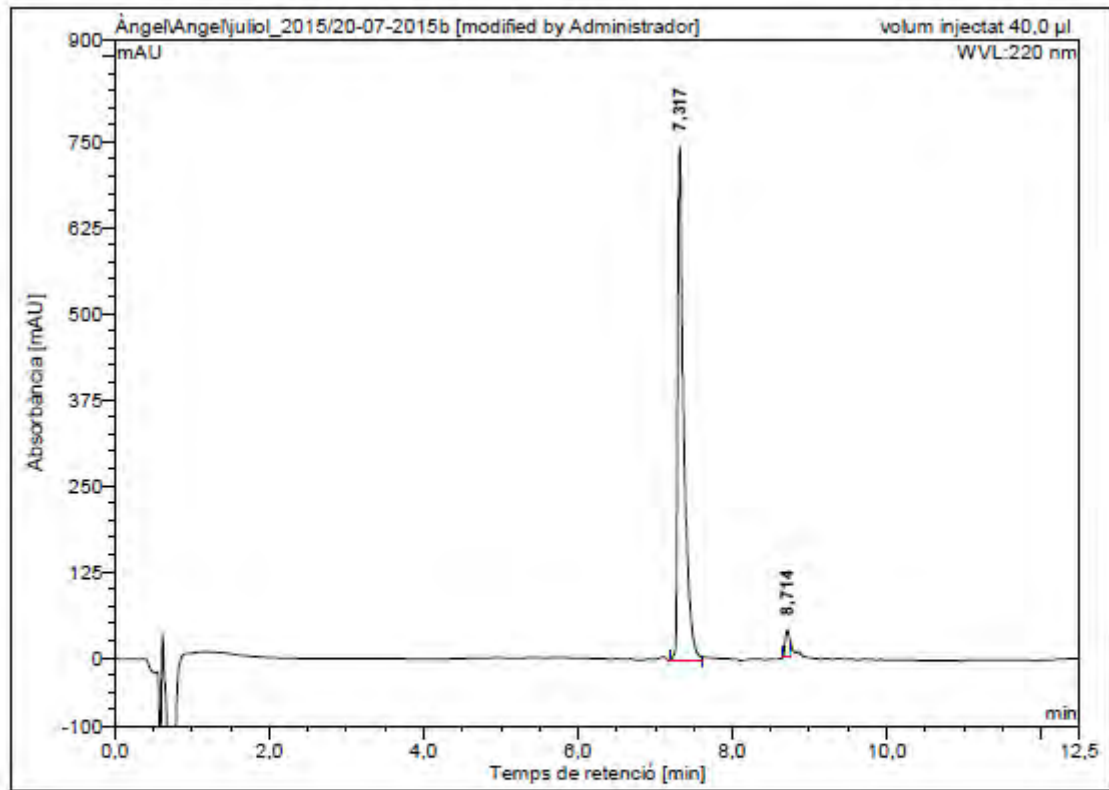
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys(Lys(COC₁₁H₂₃))-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP394)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

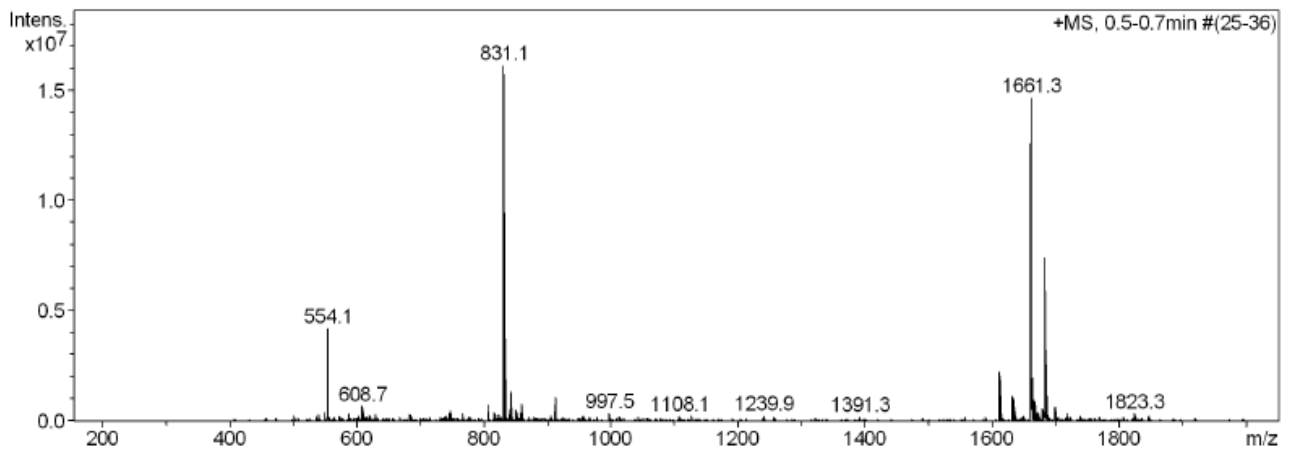
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,28	16,698	0,824	1,06
2	6,89	188,087	13,325	17,19
3	7,37	709,203	61,388	79,19
4	7,73	33,524	1,979	2,55
Total:		947,512	77,516	100,00

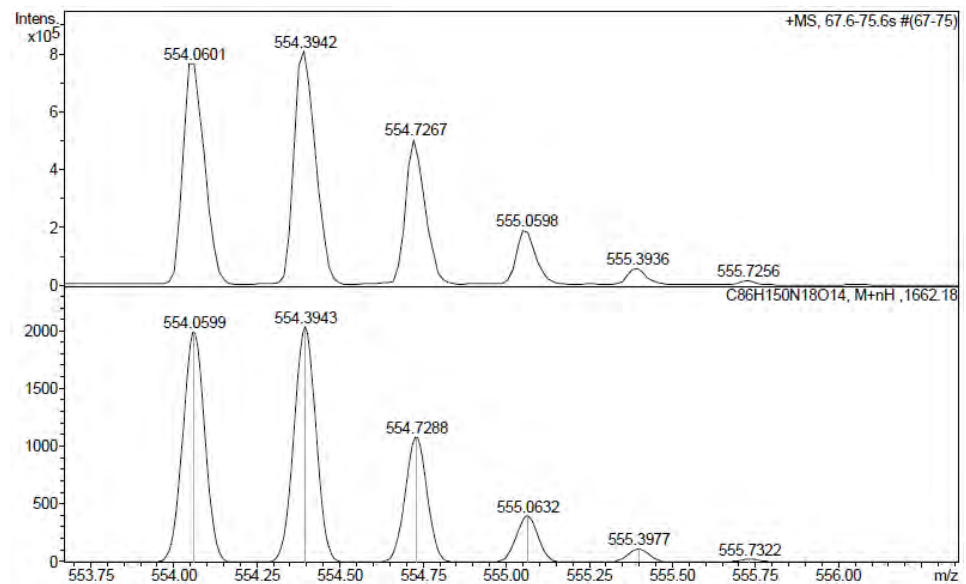
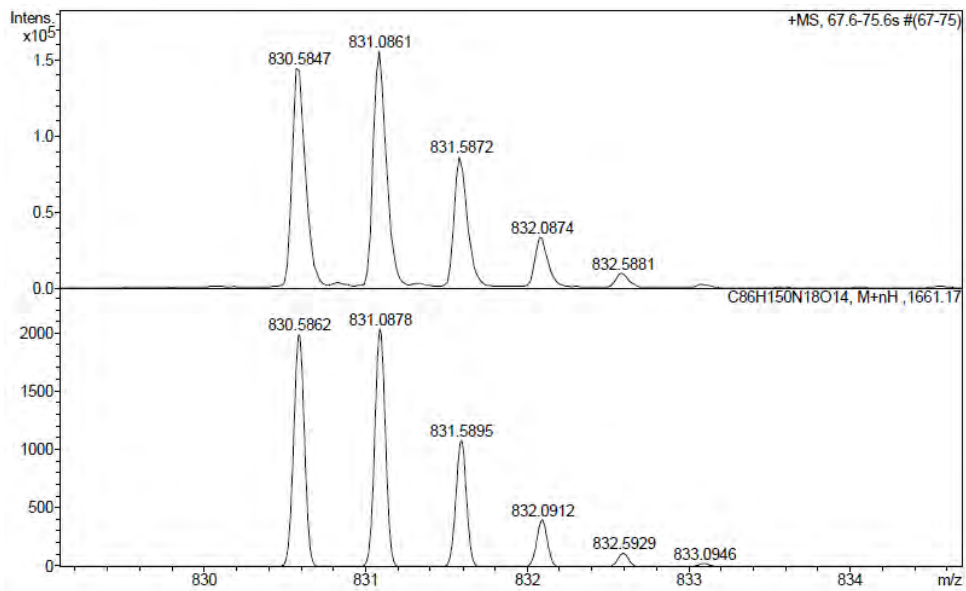
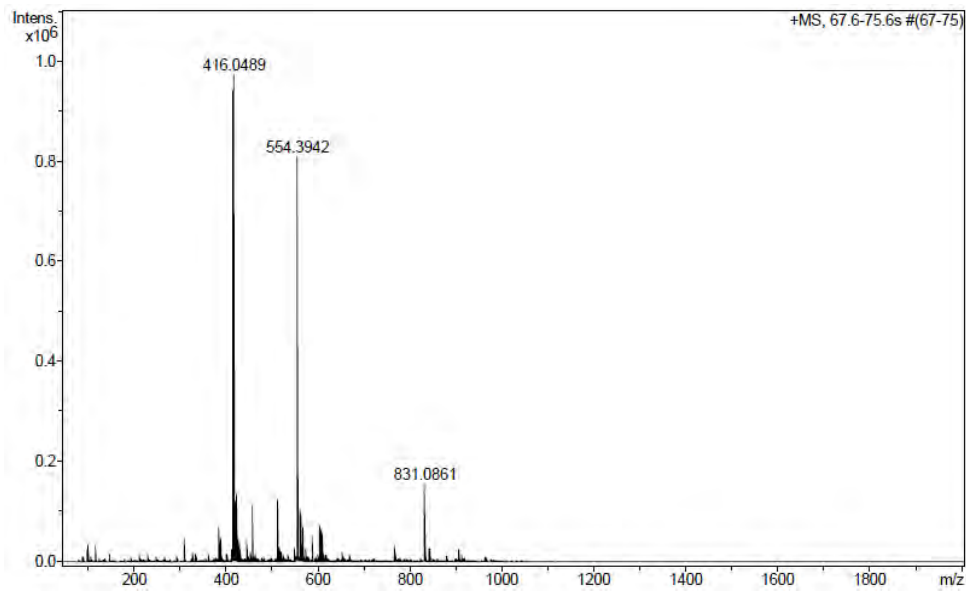
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

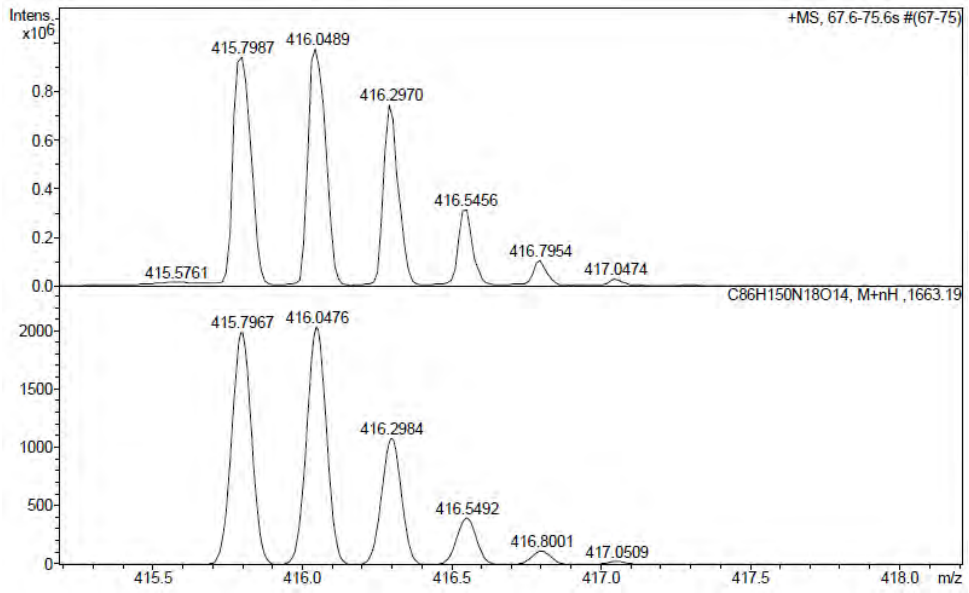


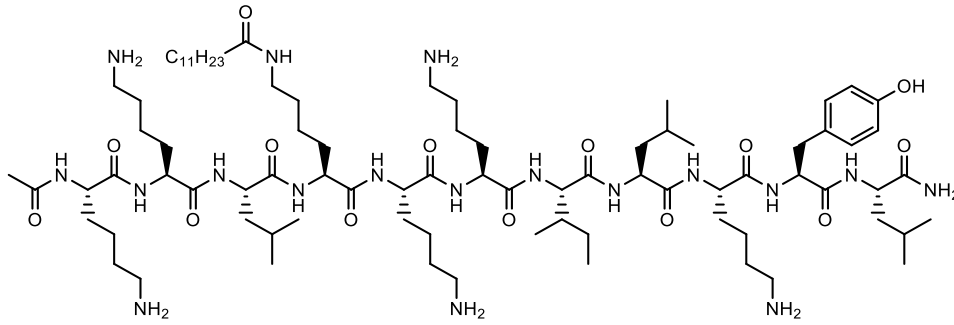
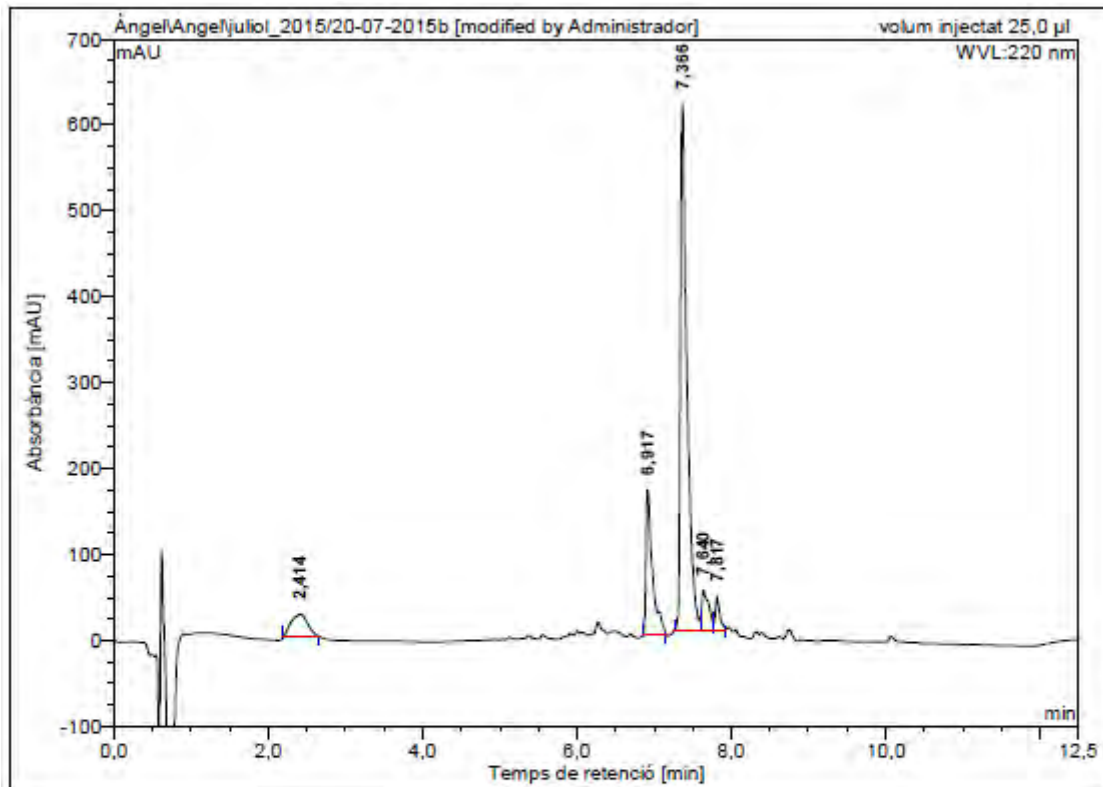
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,32	748,607	69,484	96,84
2	8,71	37,432	2,269	3,16
Total:		786,039	71,753	100,00

ESI-MS (m/z)



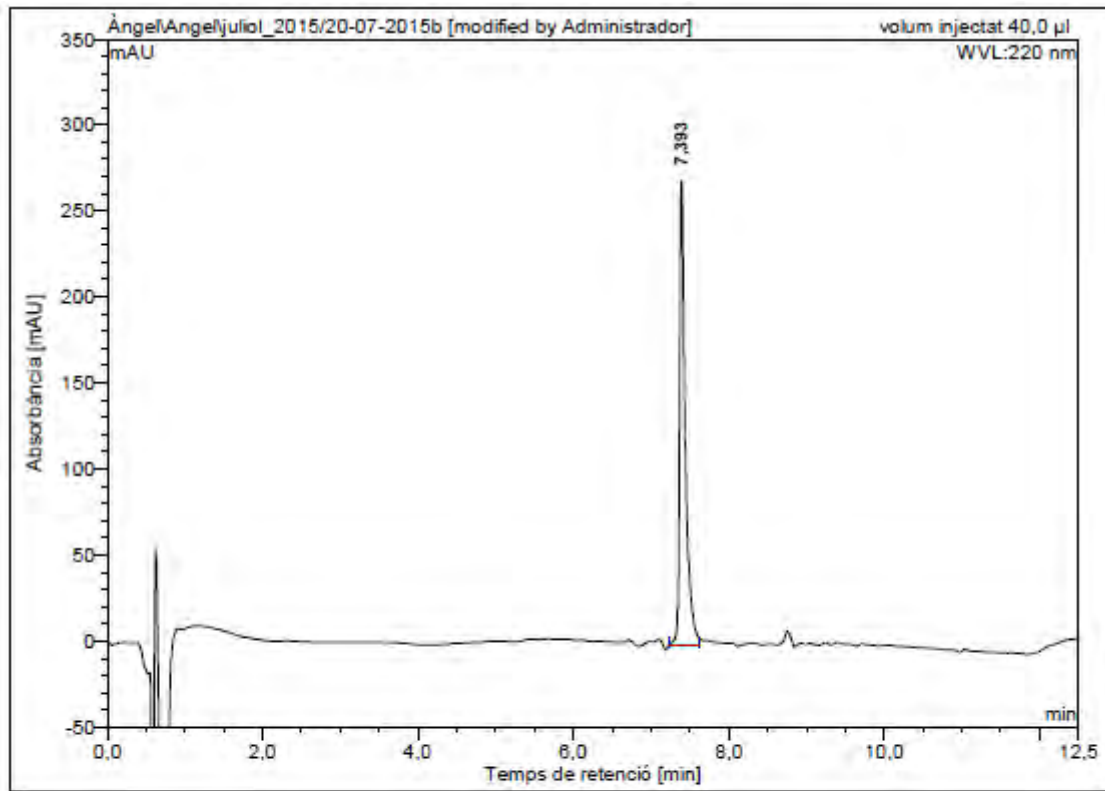
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP395)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

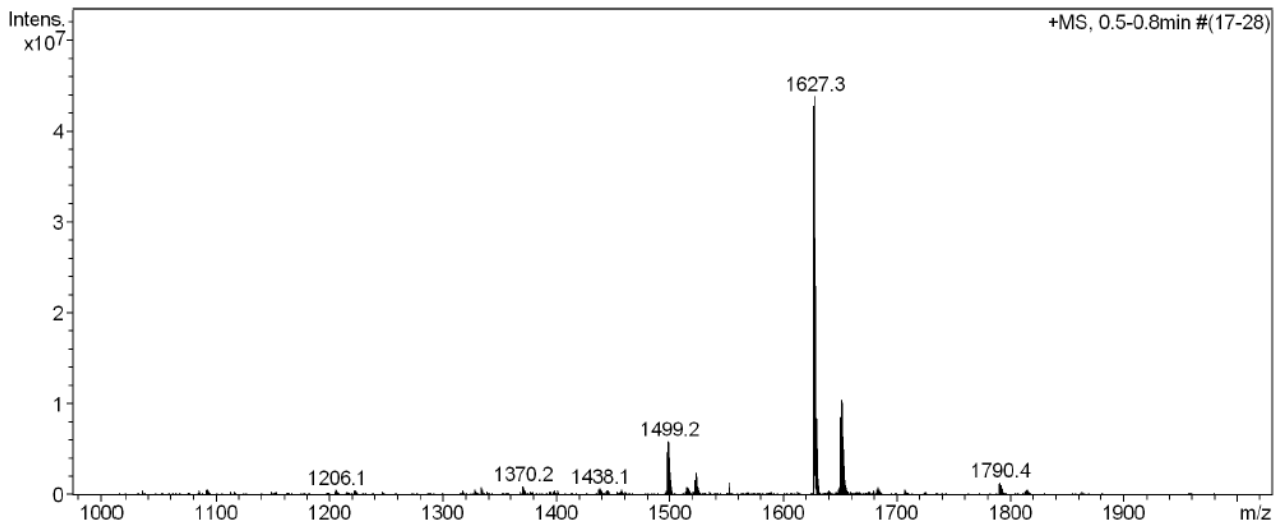
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	2,41	26,660	6,826	7,56
2	6,92	169,022	16,254	18,00
3	7,37	611,413	59,858	66,28
4	7,64	45,647	4,813	5,33
5	7,82	38,161	2,564	2,84
Total:		890,902	90,316	100,00

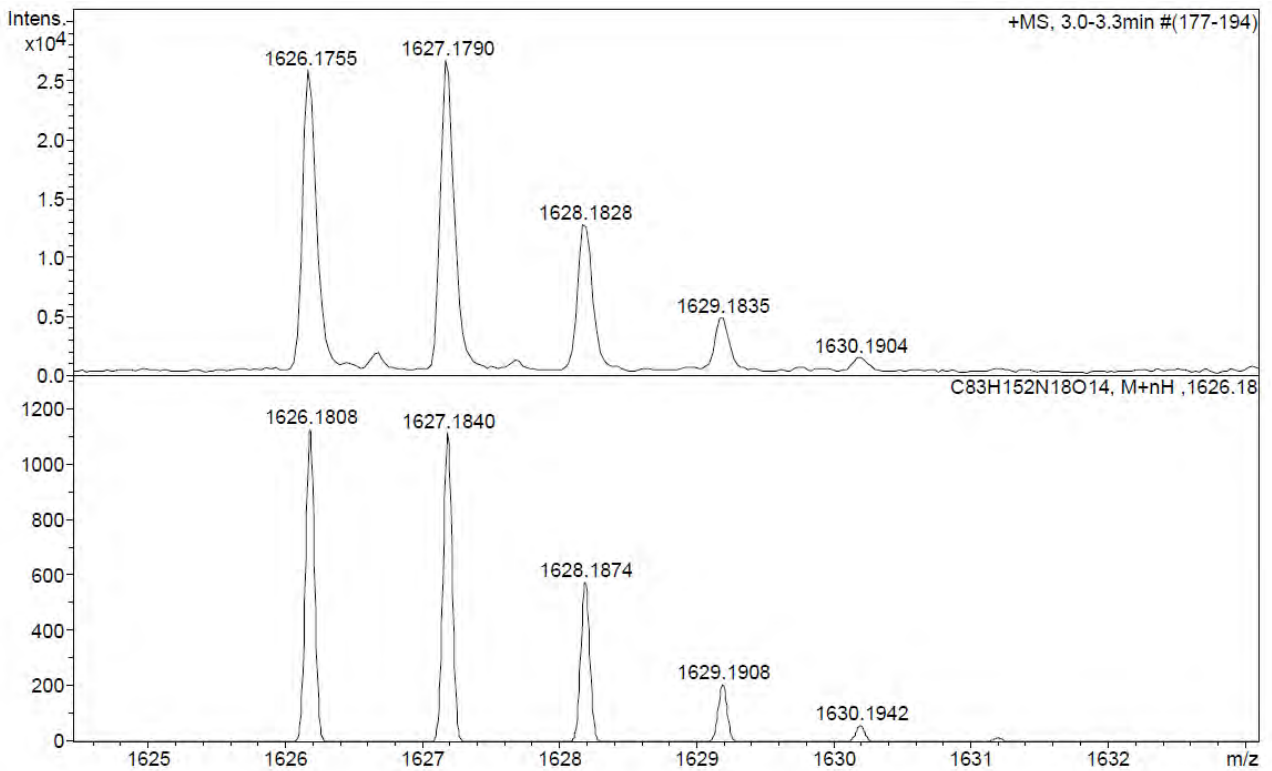
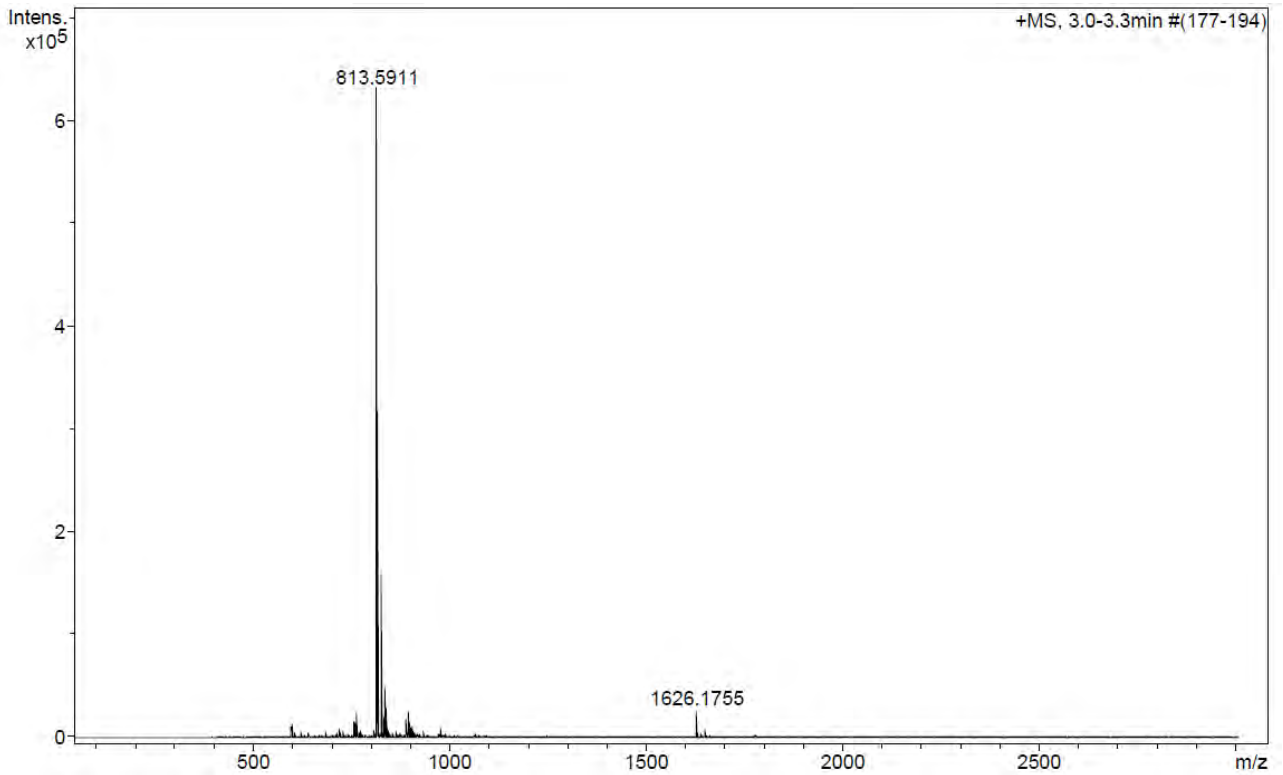
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

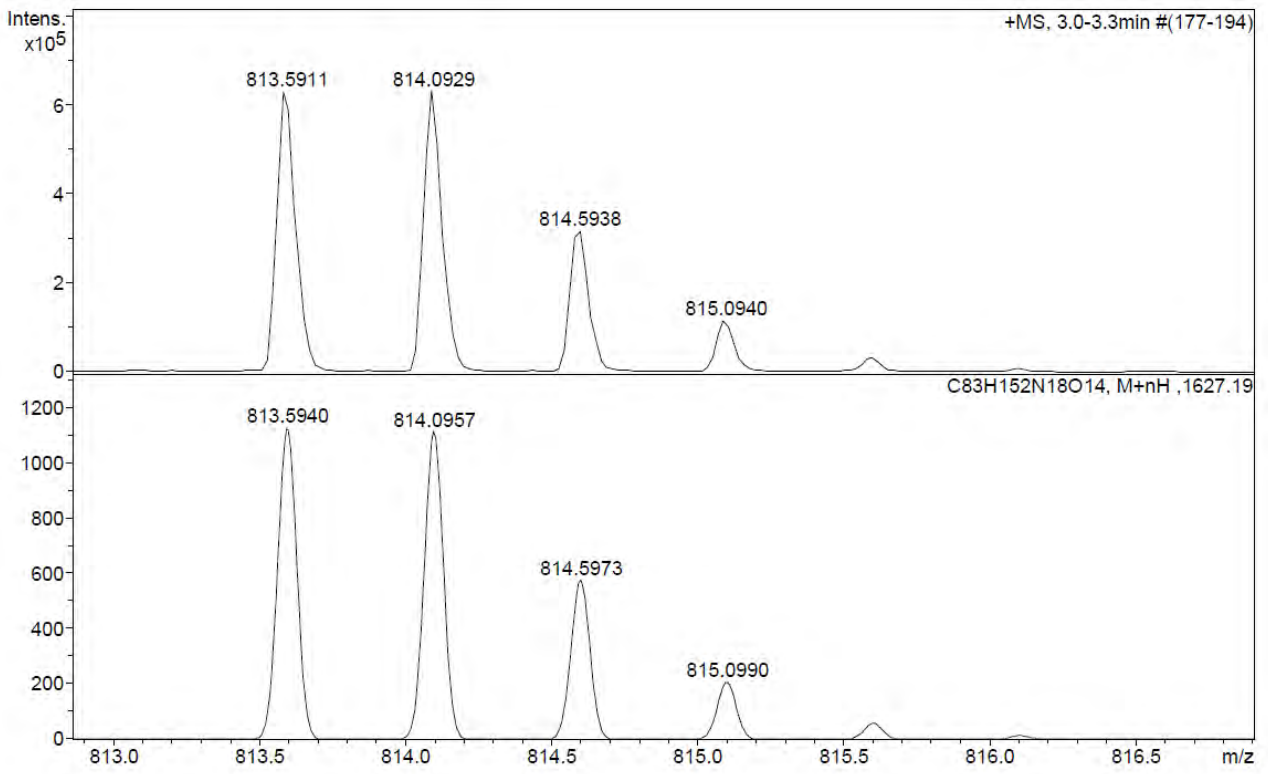


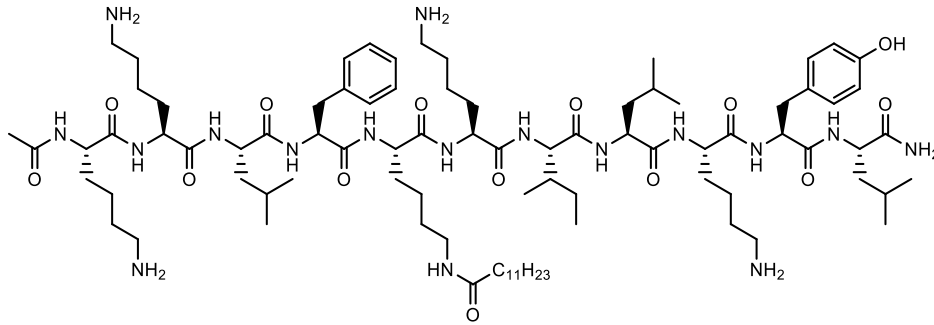
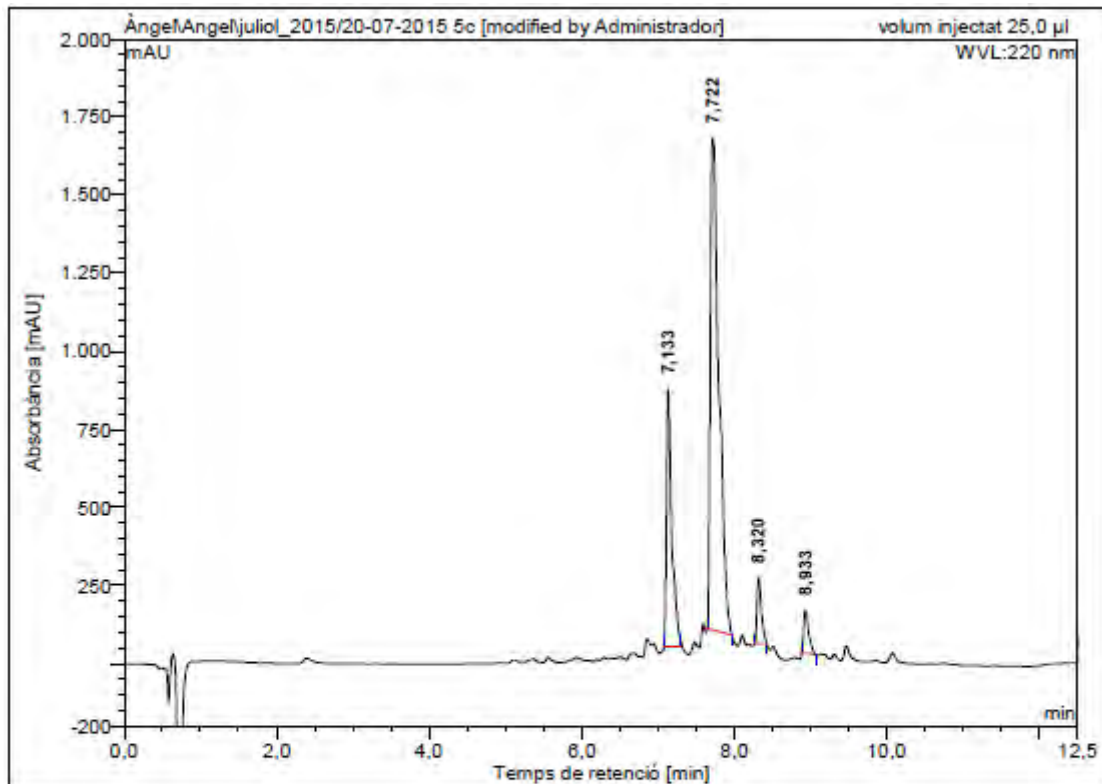
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,39	269,946	23,056	100,00
Total:		269,946	23,056	100,00

ESI-MS (m/z)



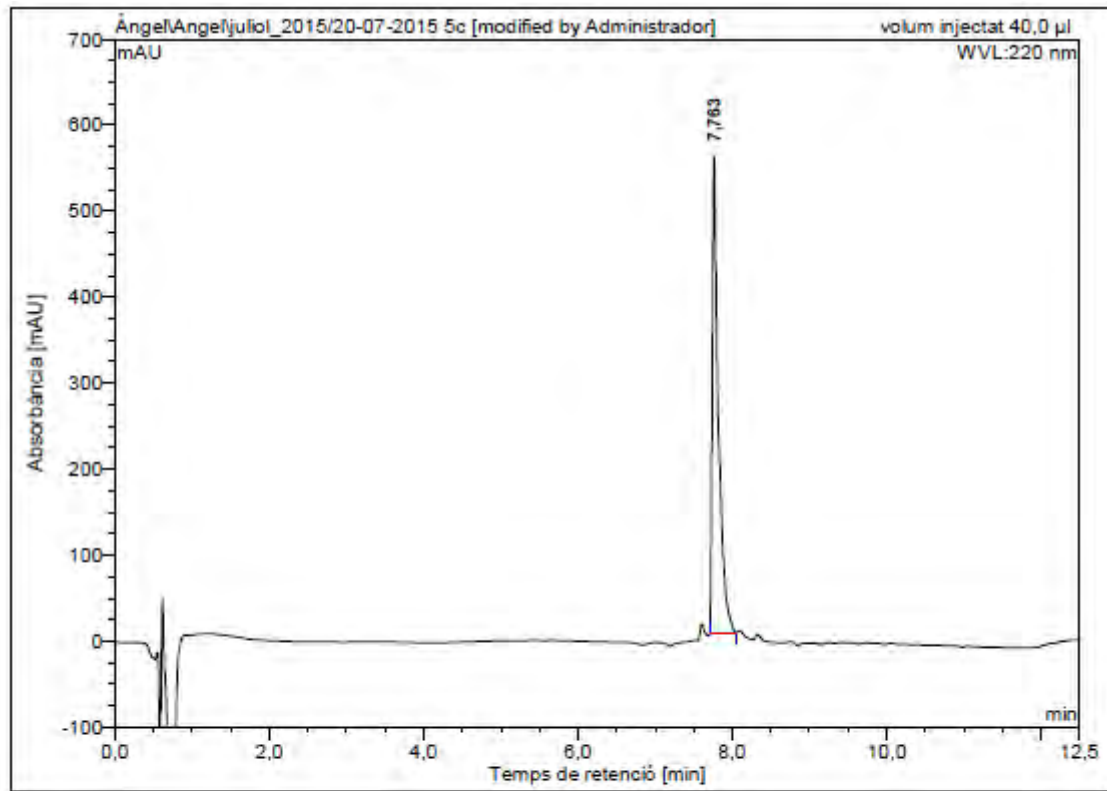
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP396)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

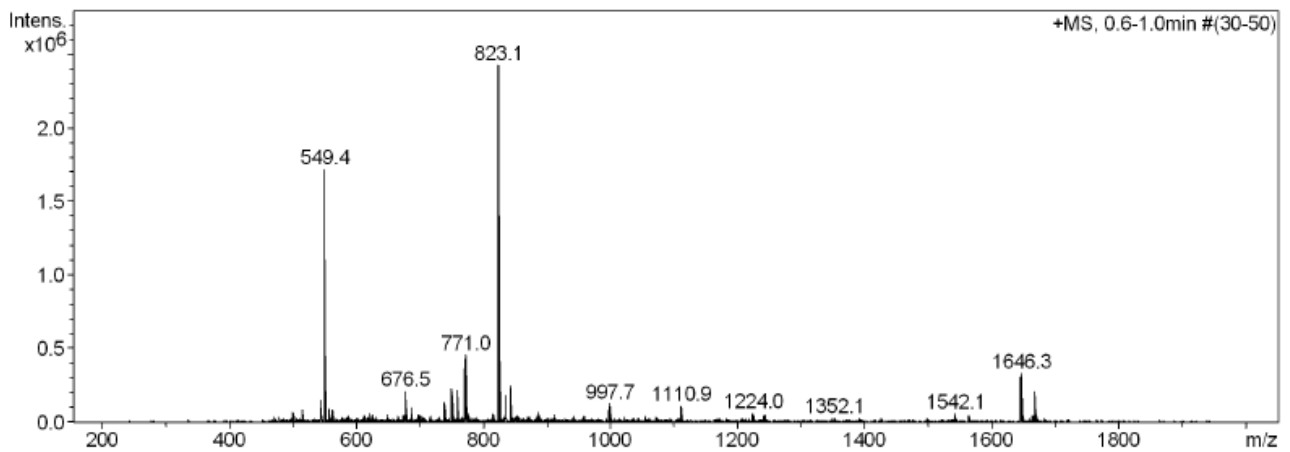
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,13	823,490	65,569	22,07
2	7,72	1572,407	206,739	69,60
3	8,32	210,668	14,235	4,79
4	8,93	137,039	10,506	3,54
Total:		2743,604	297,049	100,00

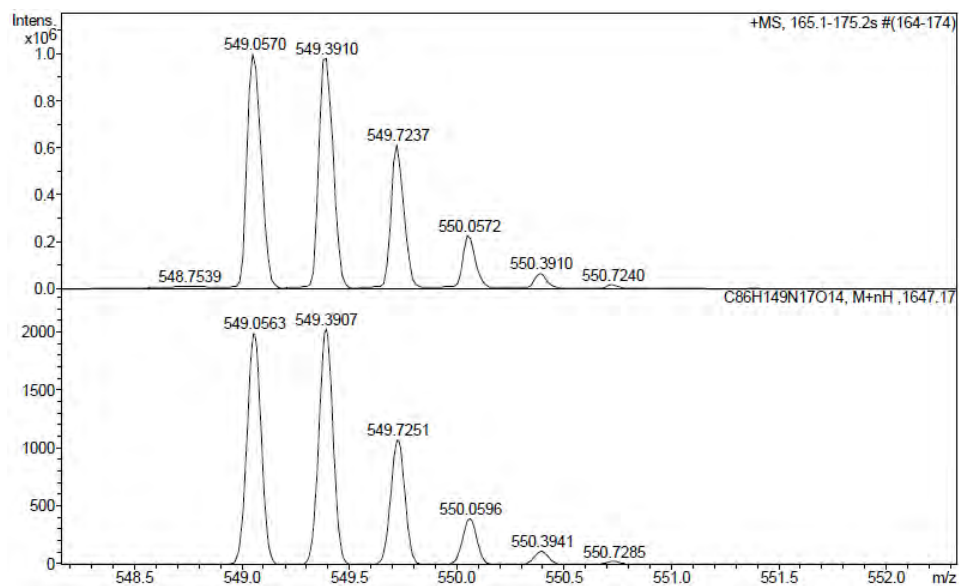
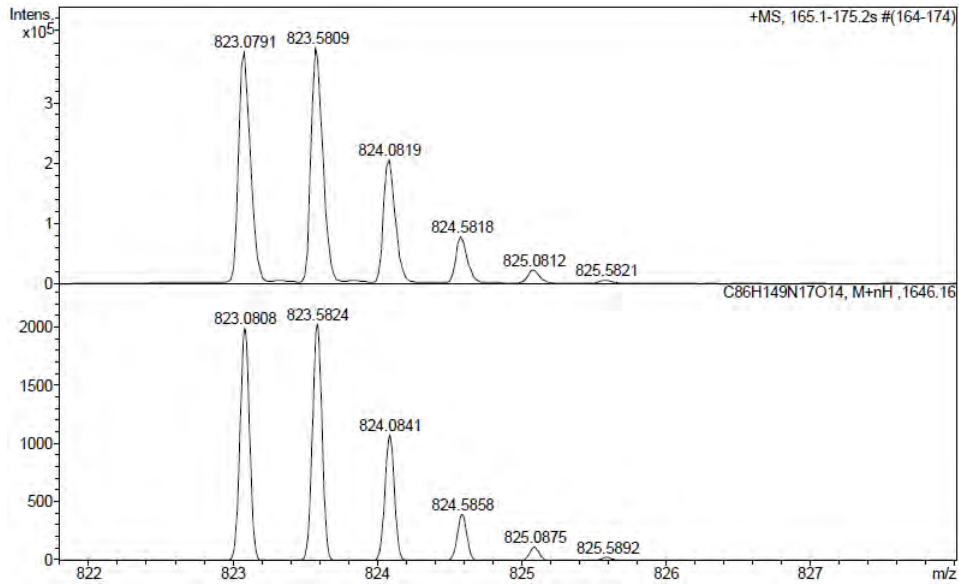
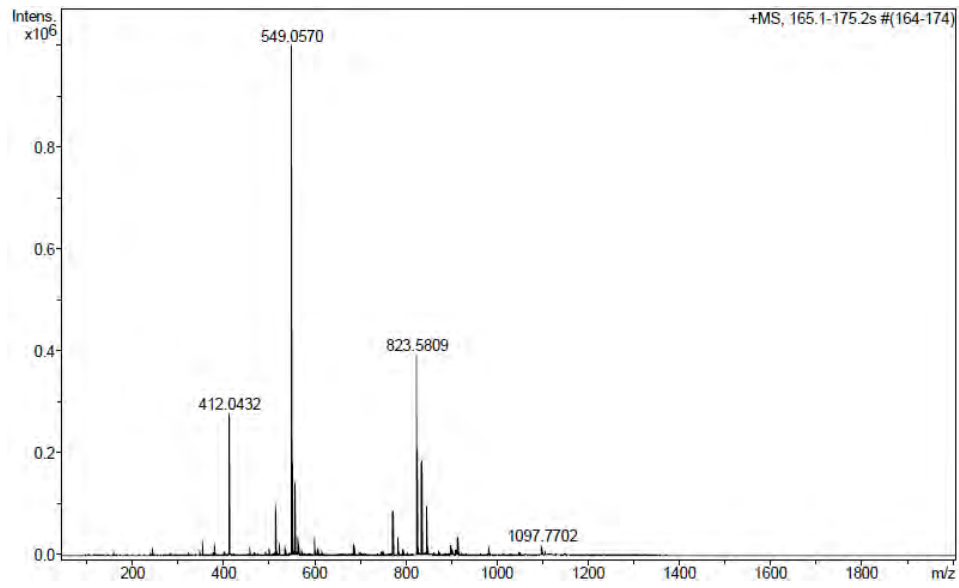
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

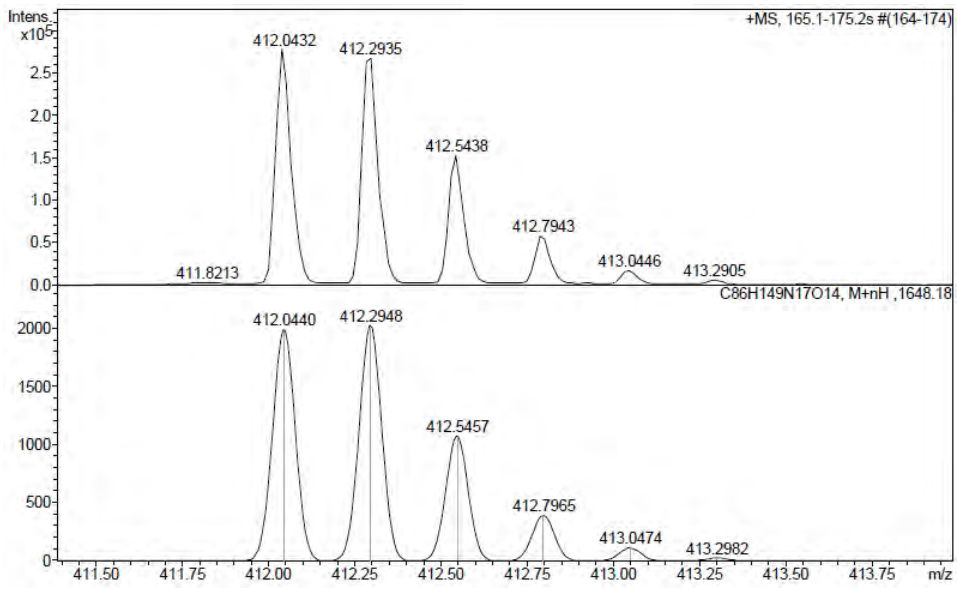


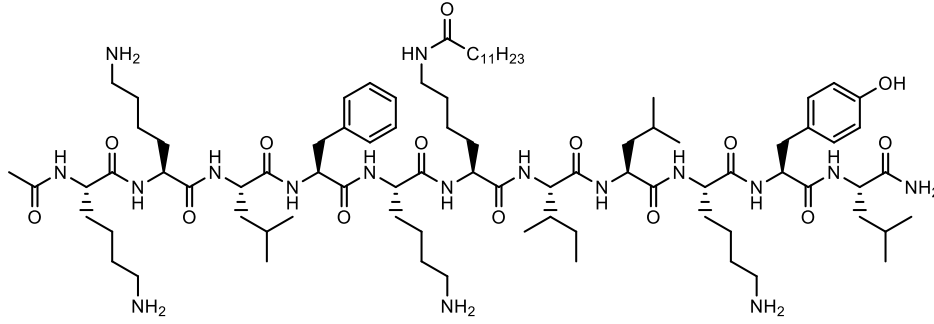
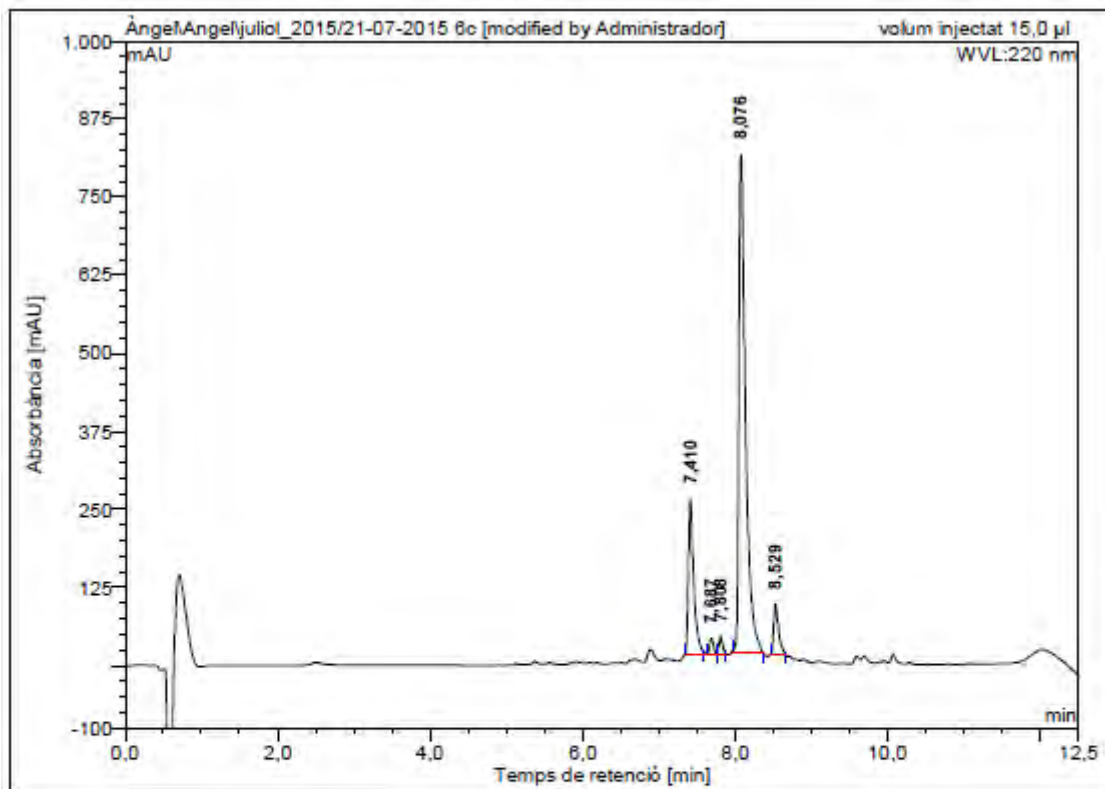
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,76	553,498	51,363	100,00
Total:		553,498	51,363	100,00

ESI-MS (m/z)

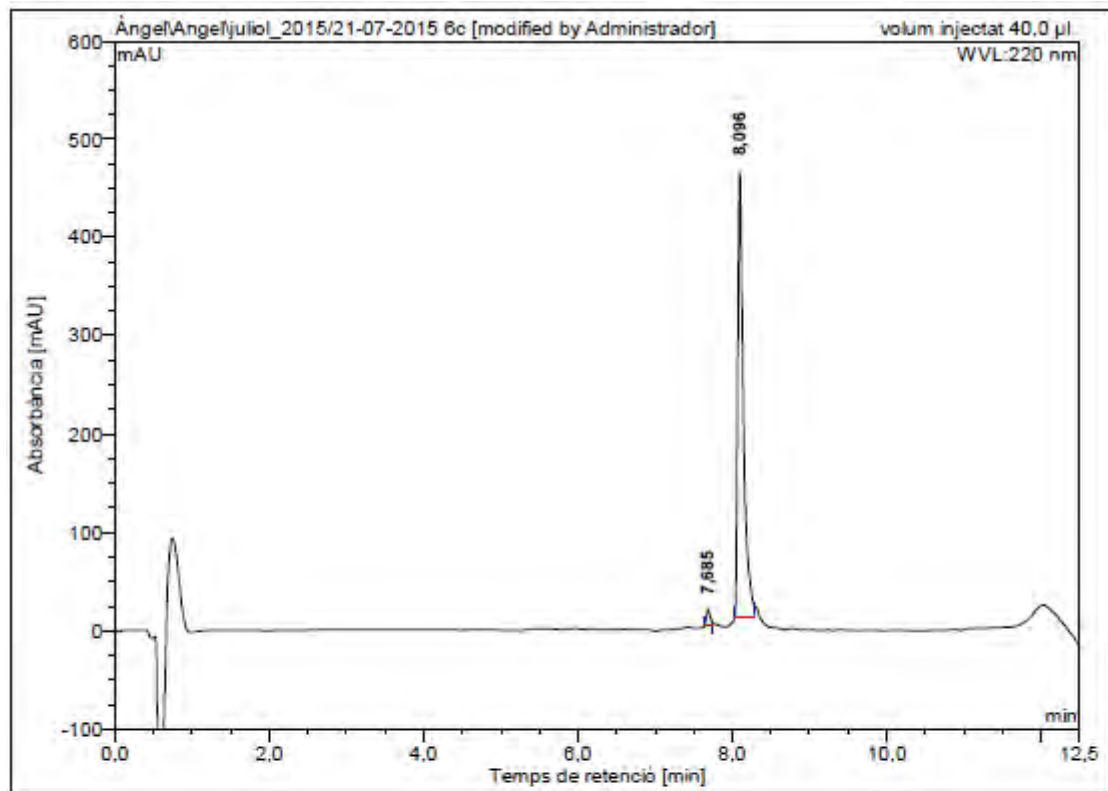


HRMS (m/z)

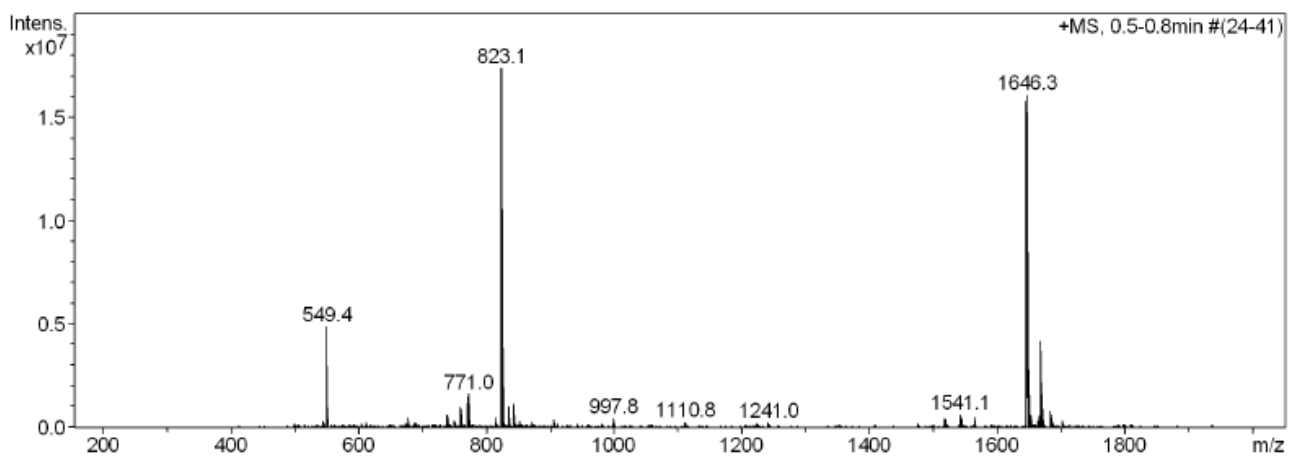


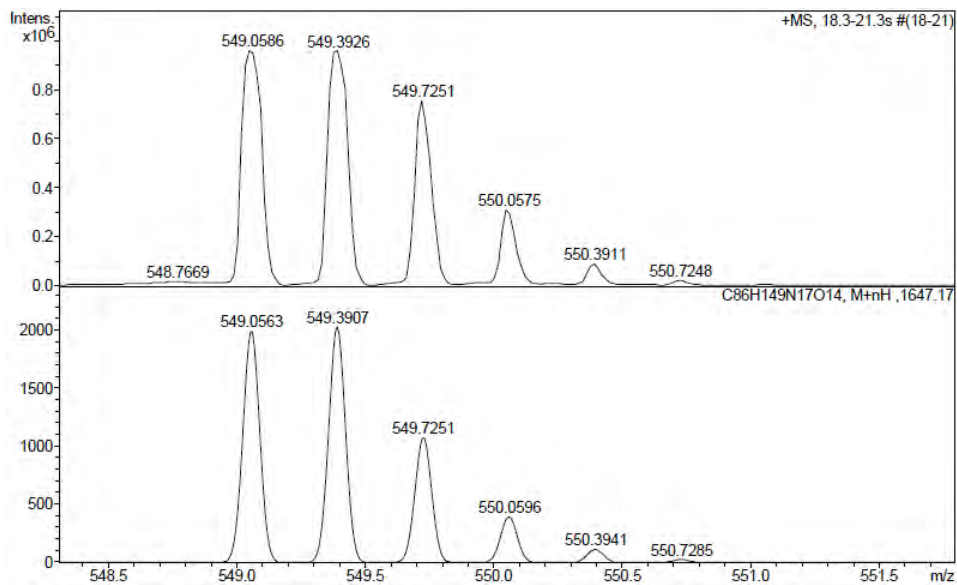
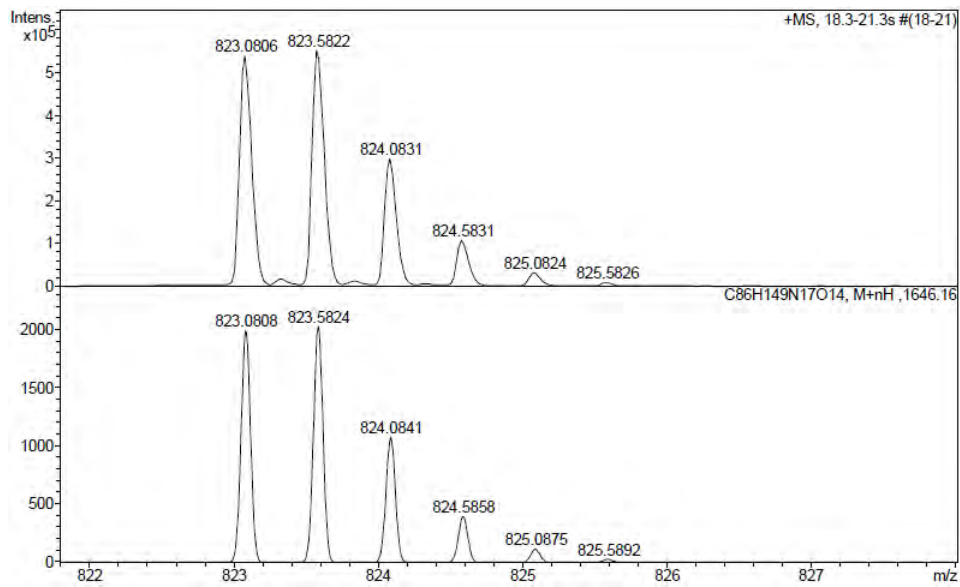
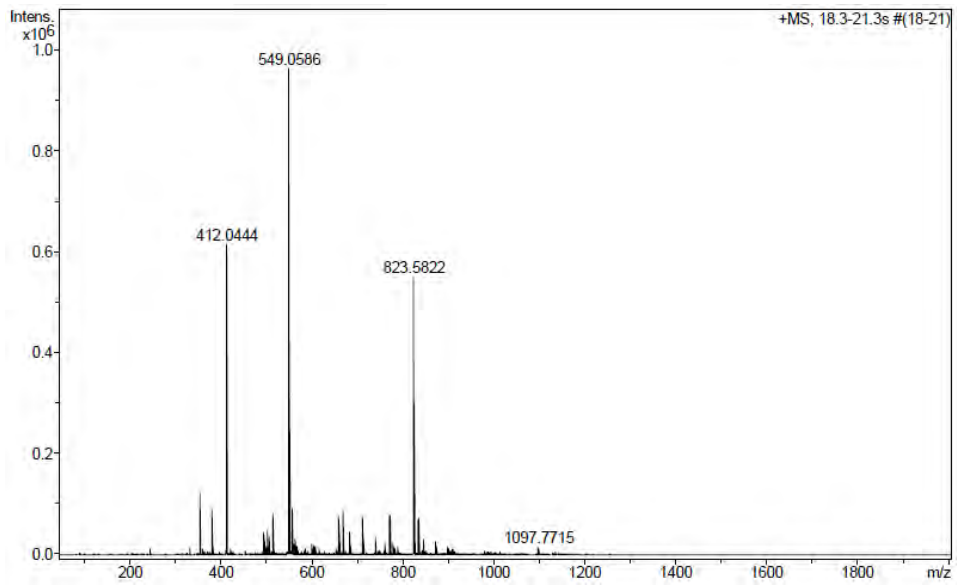
Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP397)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

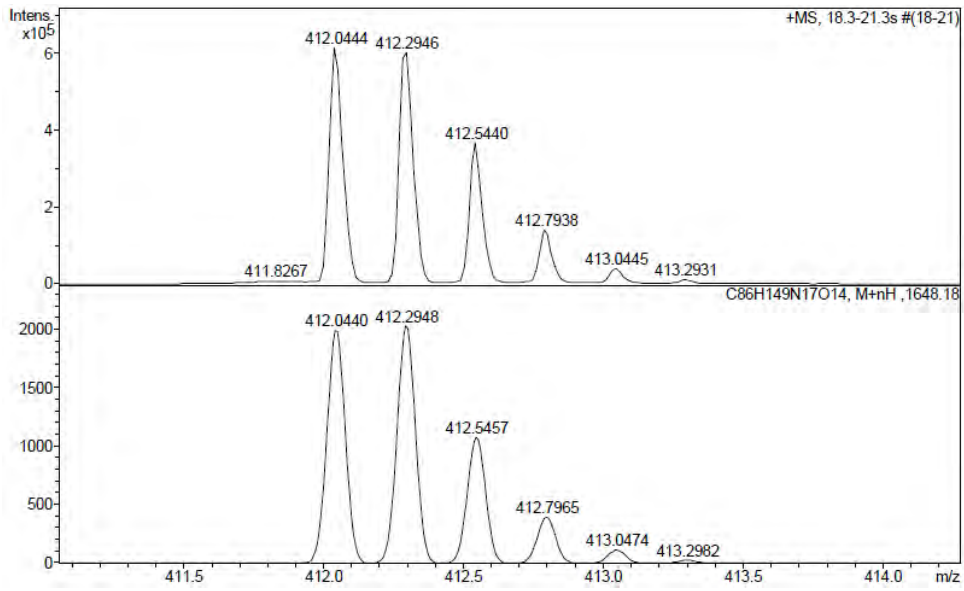
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,41	249,174	20,133	18,19
2	7,69	25,870	1,525	1,38
3	7,81	27,742	1,394	1,26
4	8,08	796,771	81,638	73,74
5	8,53	80,745	6,016	5,43
Total:		1180,302	110,706	100,00

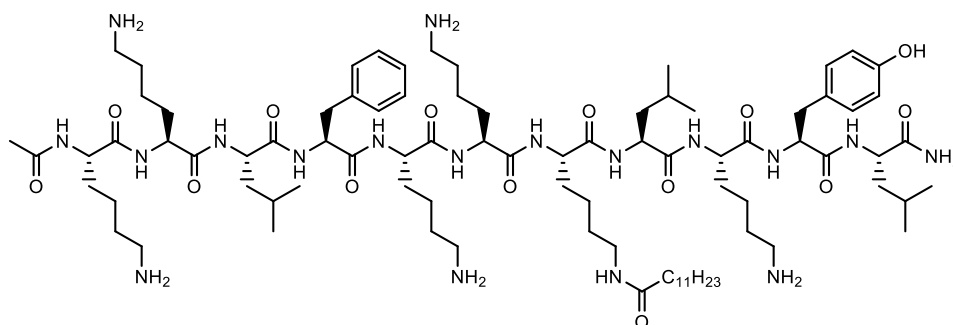
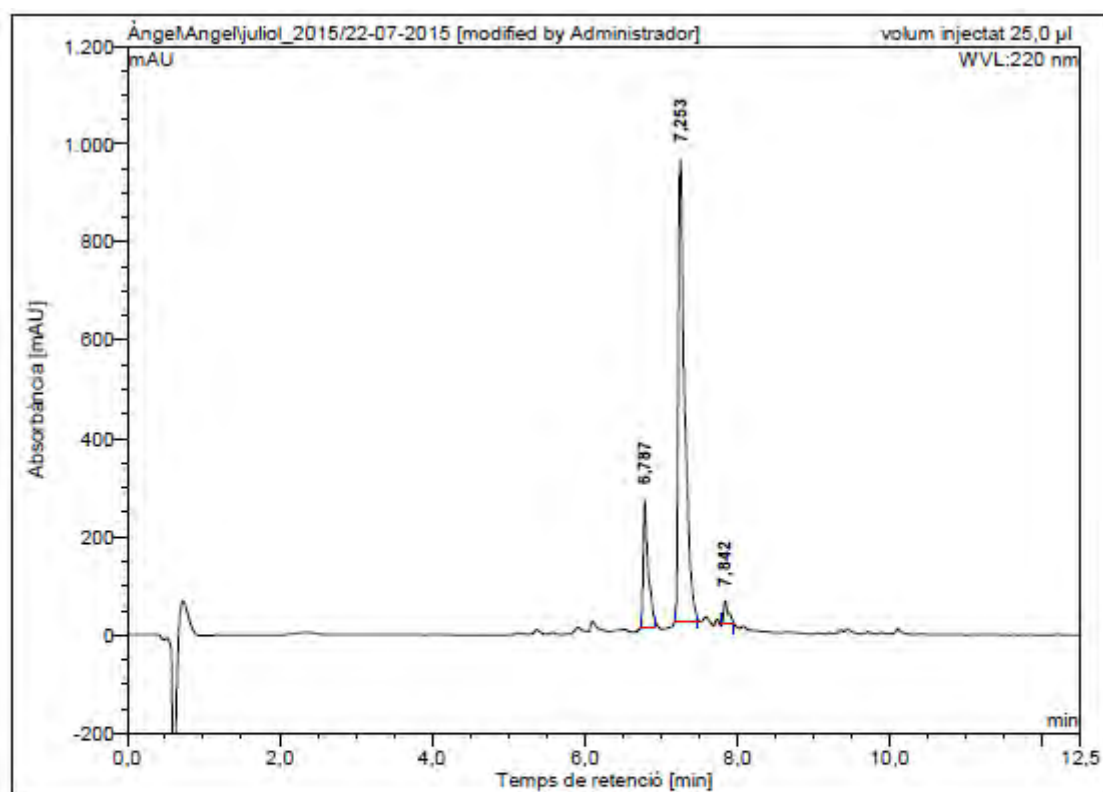
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,68	15,962	0,995	2,51
2	8,10	452,427	38,610	97,49
Total:		468,389	39,606	100,00

ESI-MS (m/z)

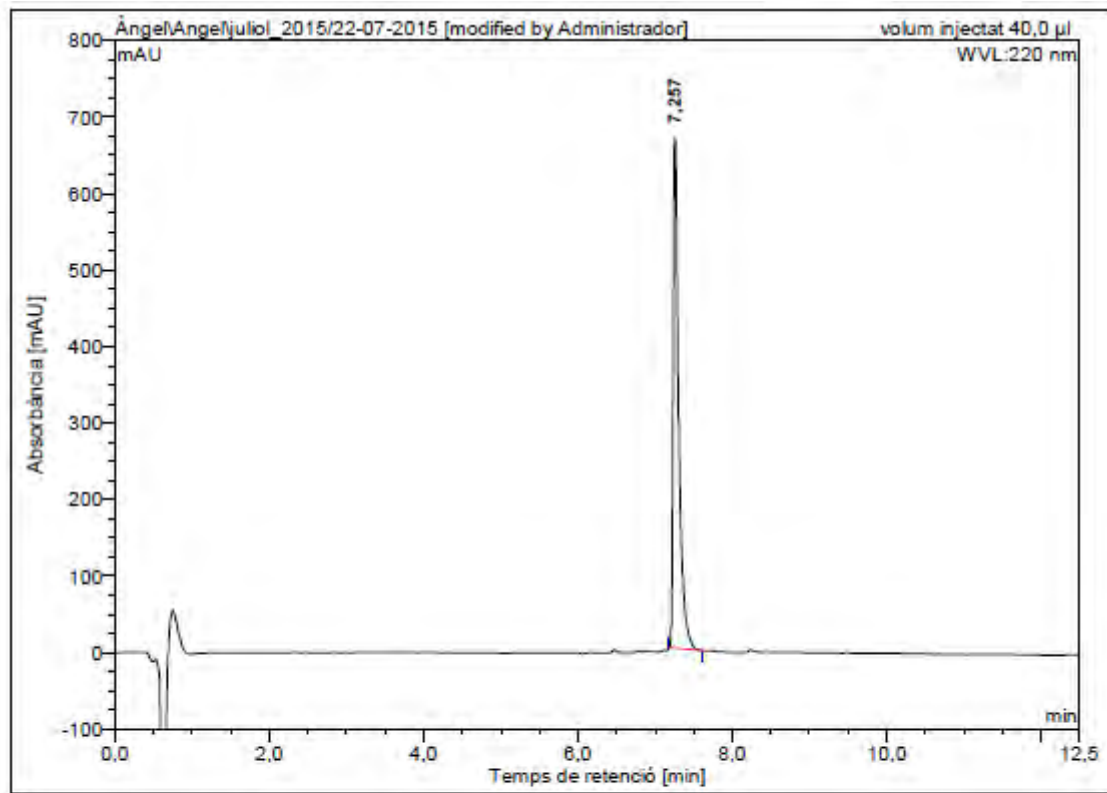
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP398)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

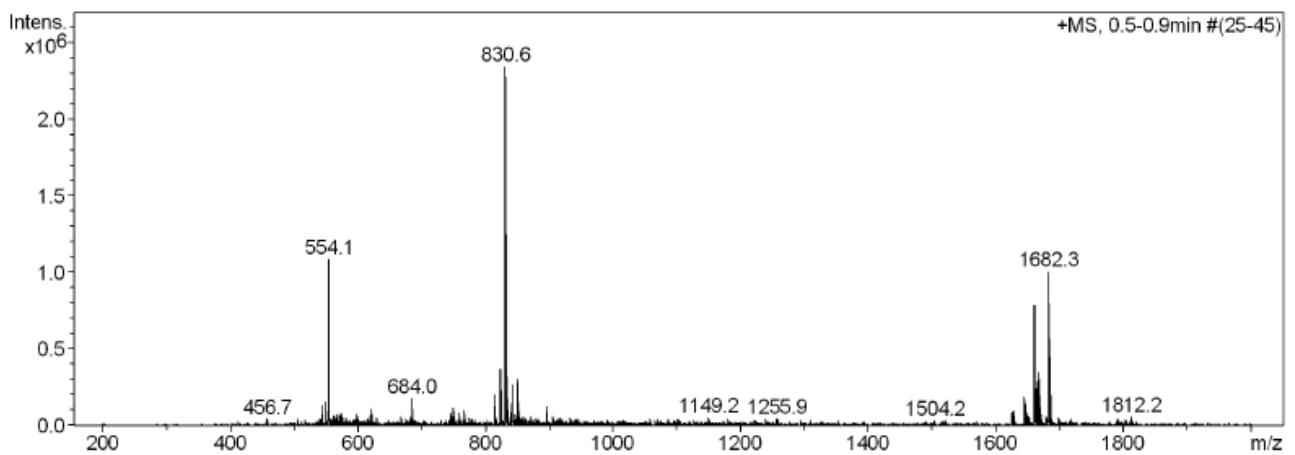
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,79	255,948	19,043	16,63
2	7,25	941,040	92,119	80,44
3	7,84	46,558	3,356	2,93
Total:		1243,546	114,517	100,00

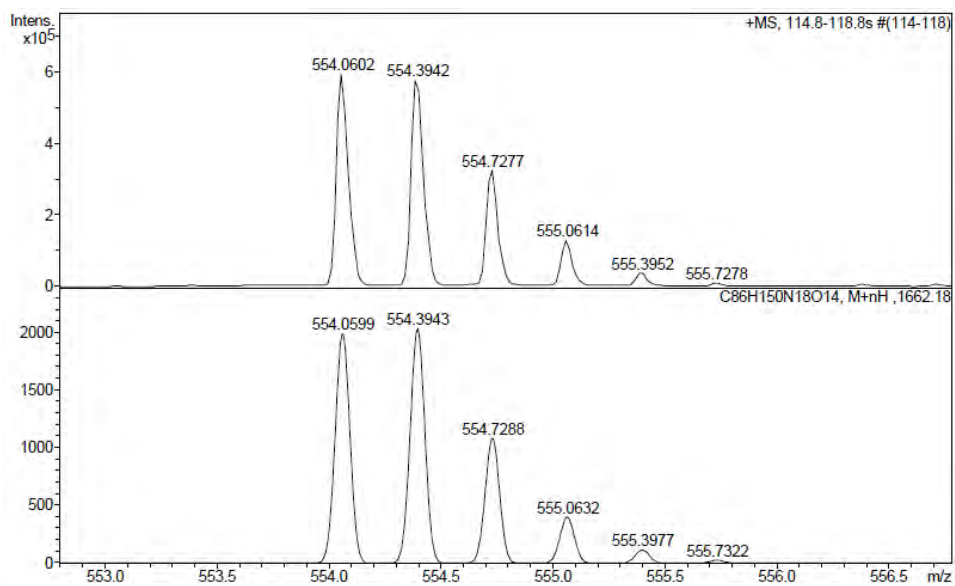
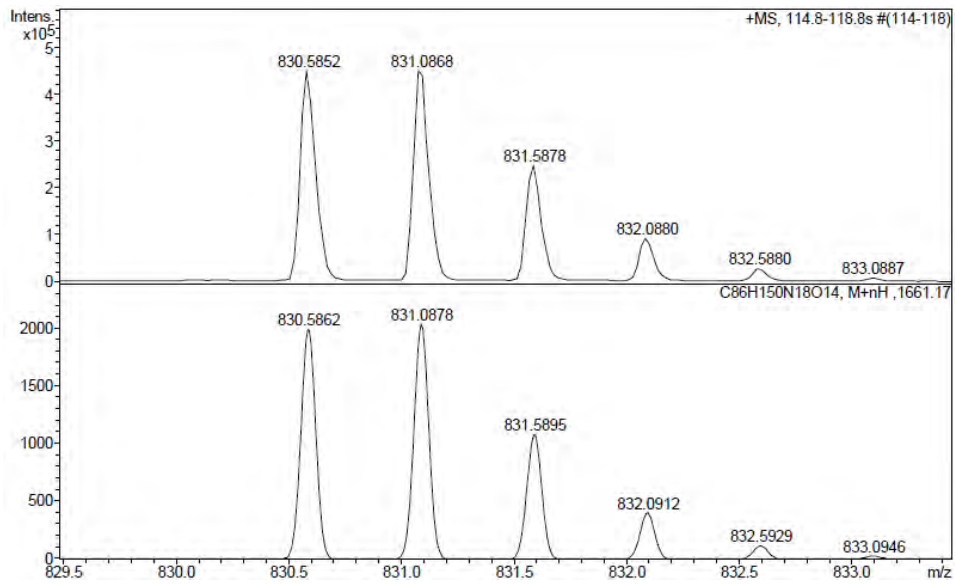
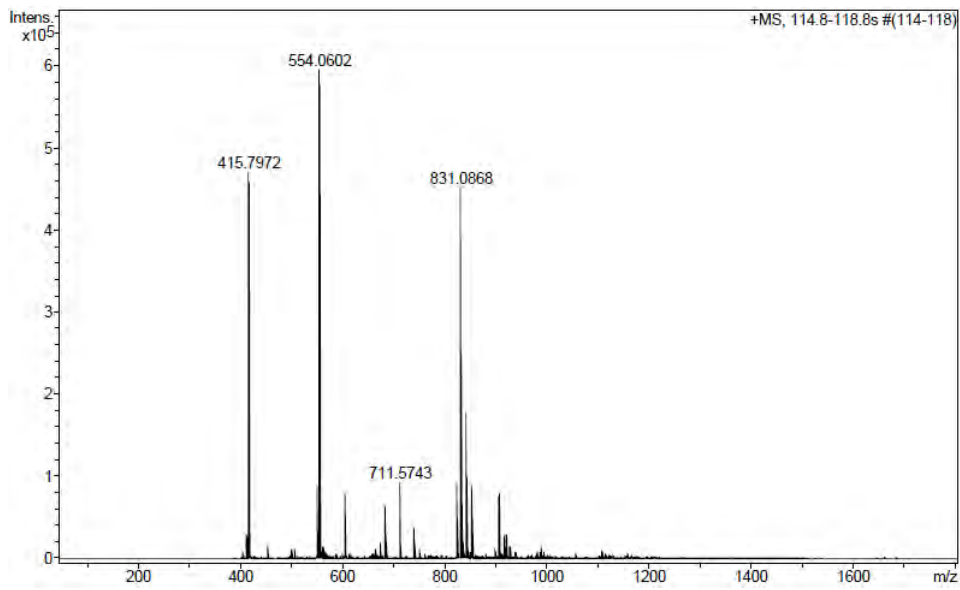
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

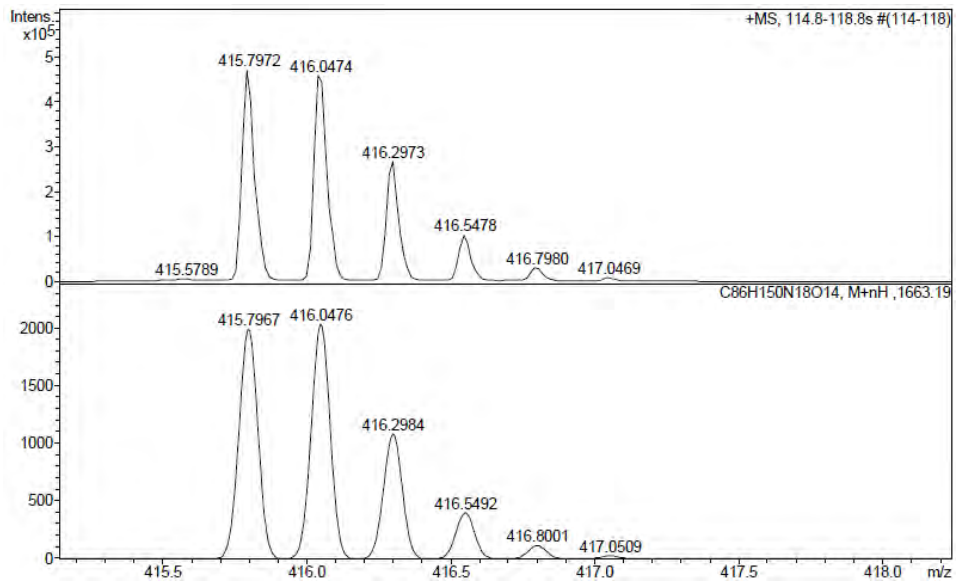


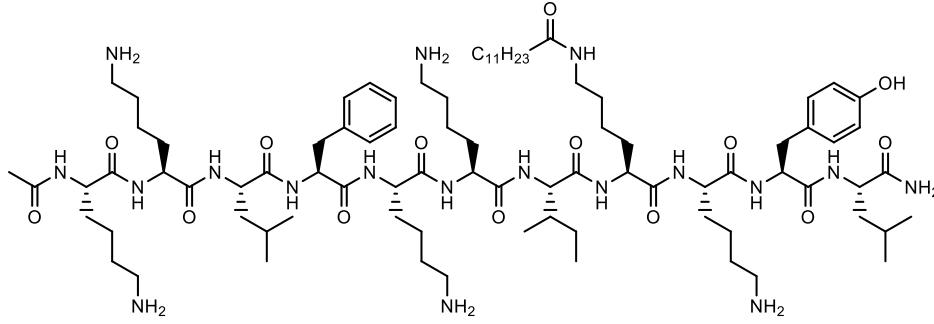
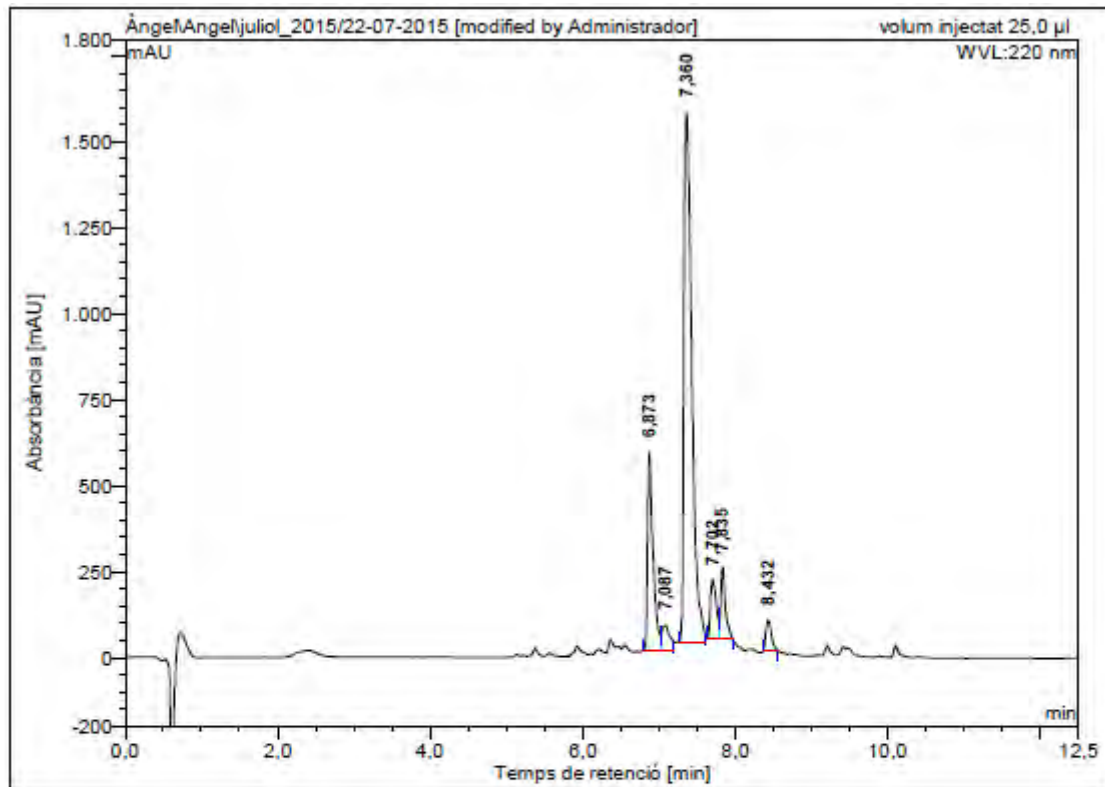
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,26	666,796	56,101	100,00
Total:		666,796	56,101	100,00

ESI-MS (m/z)



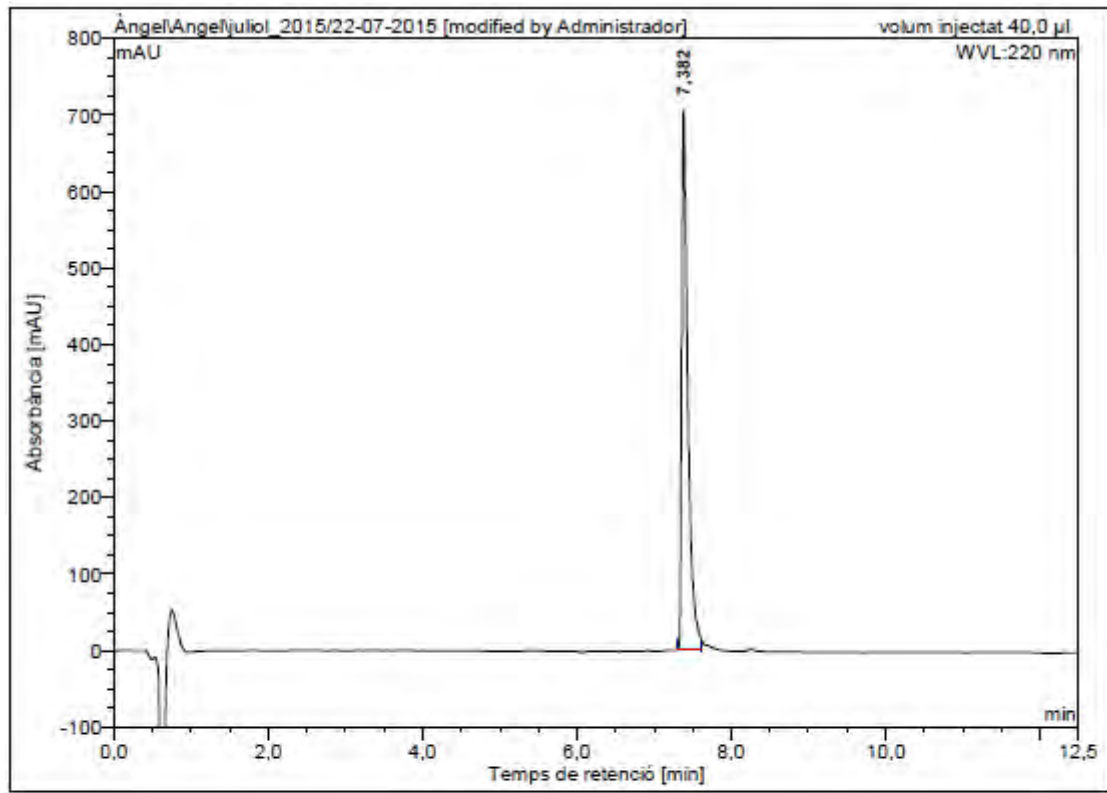
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP399)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

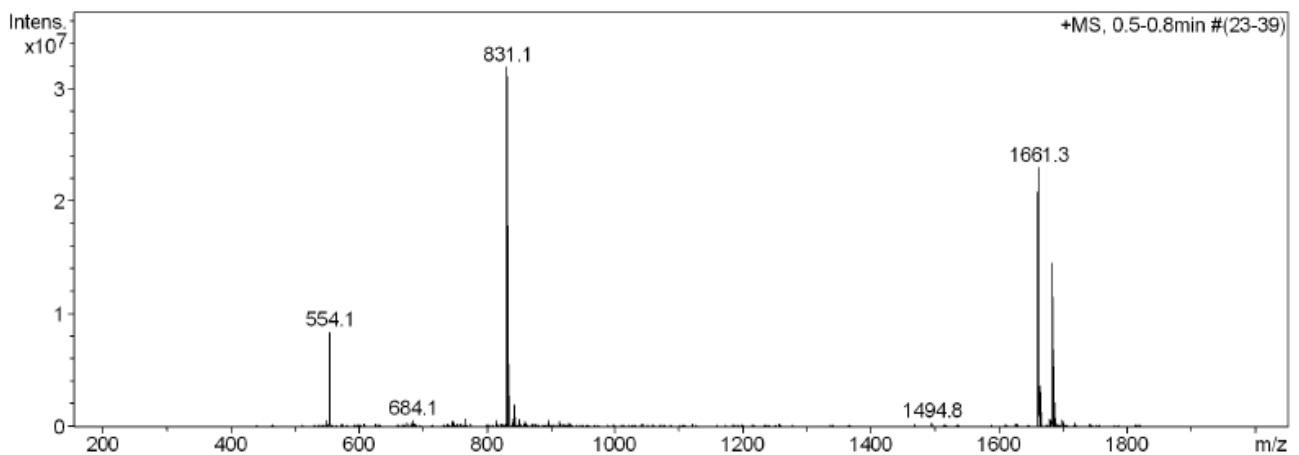
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,87	572,985	47,760	17,15
2	7,09	71,293	8,638	3,10
3	7,36	1538,740	184,103	66,12
4	7,70	173,523	16,079	5,77
5	7,84	210,519	14,740	5,29
6	8,43	86,993	7,105	2,55
Total:		2654,054	278,426	100,00

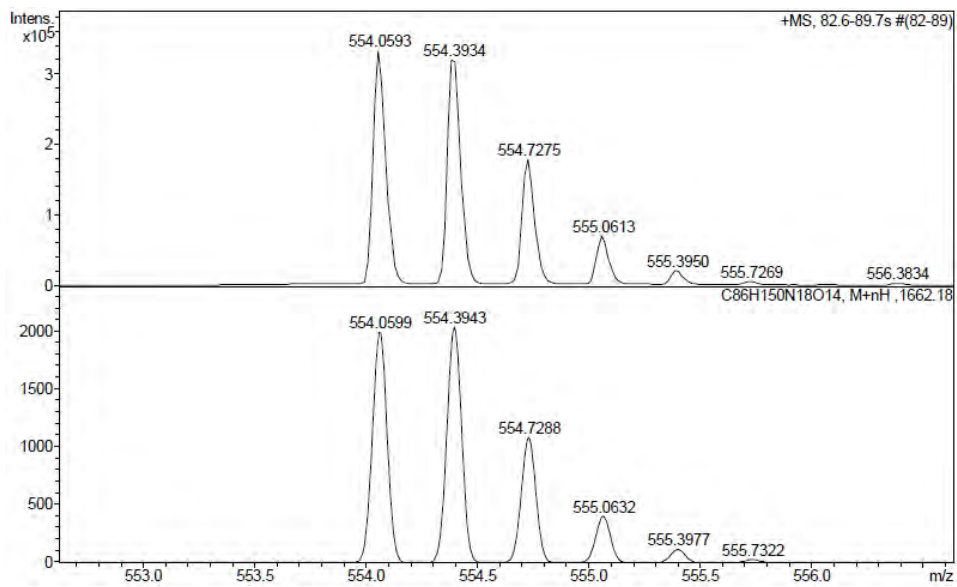
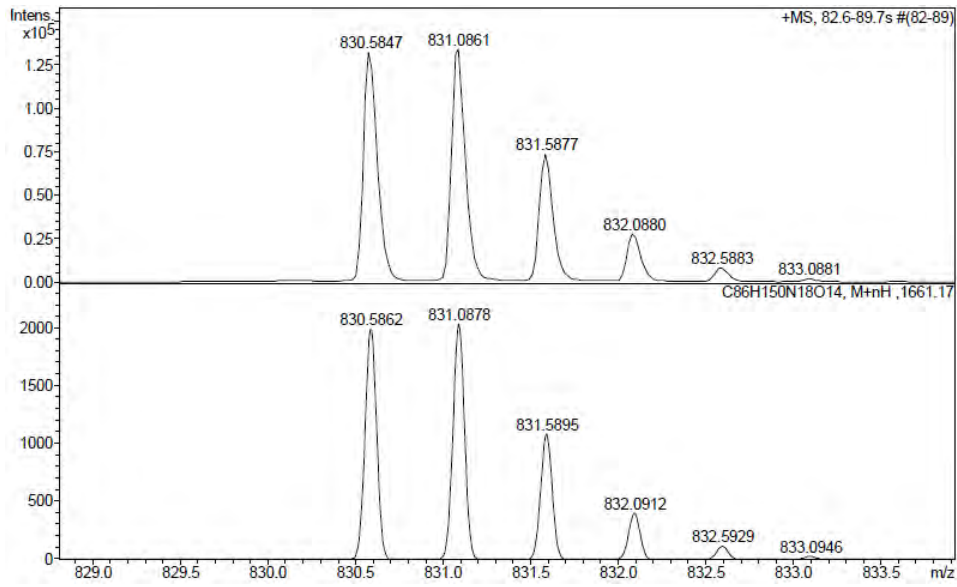
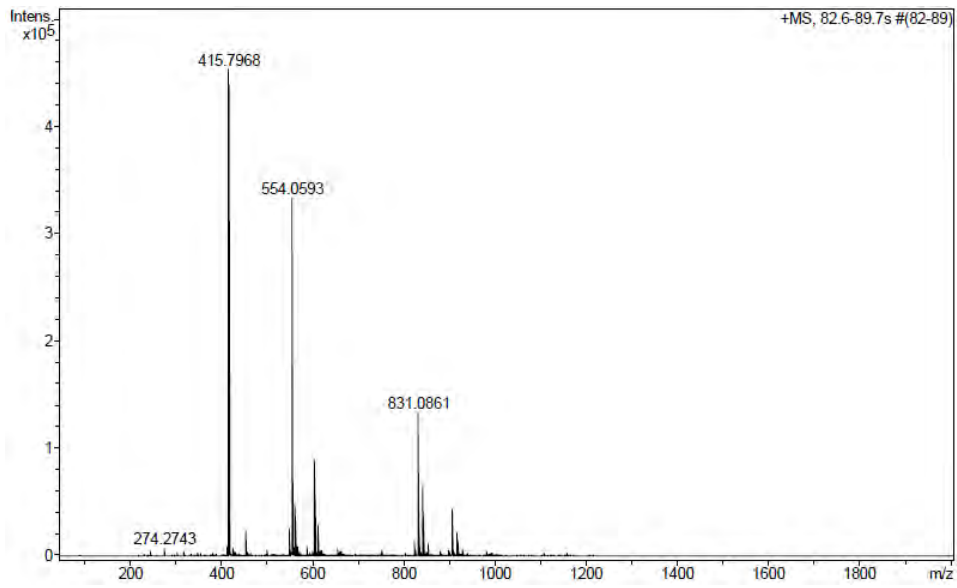
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

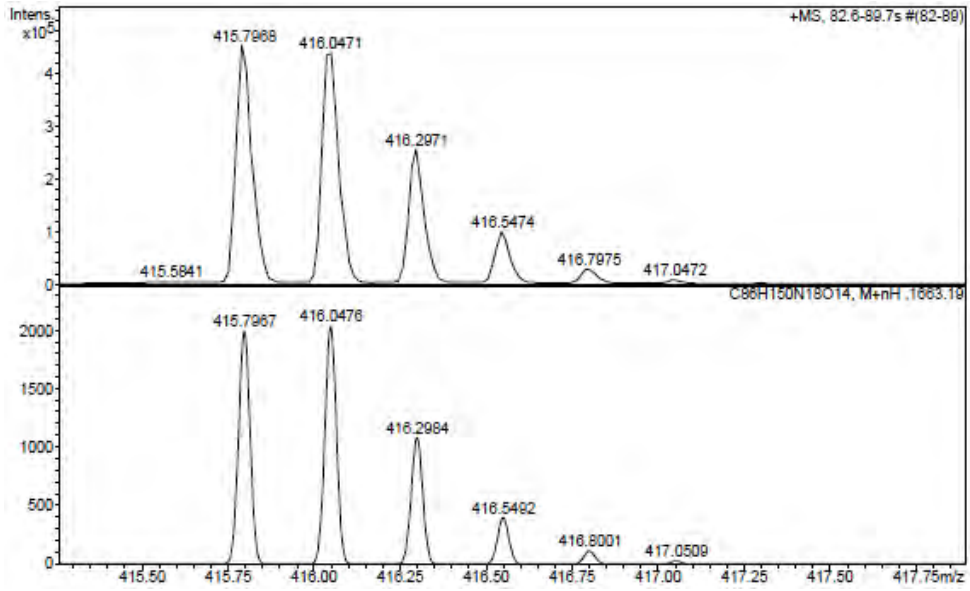


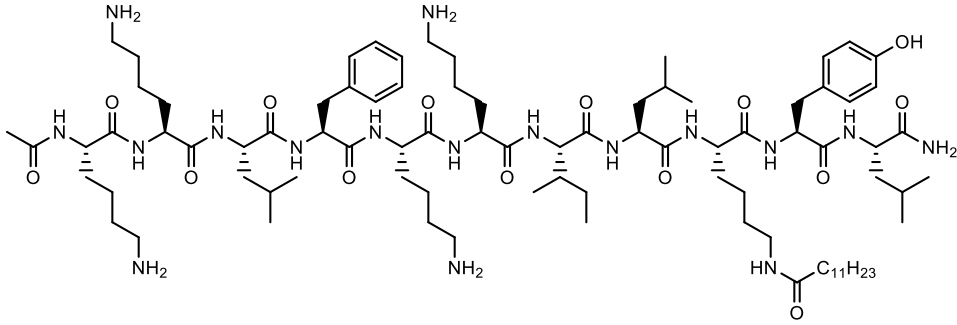
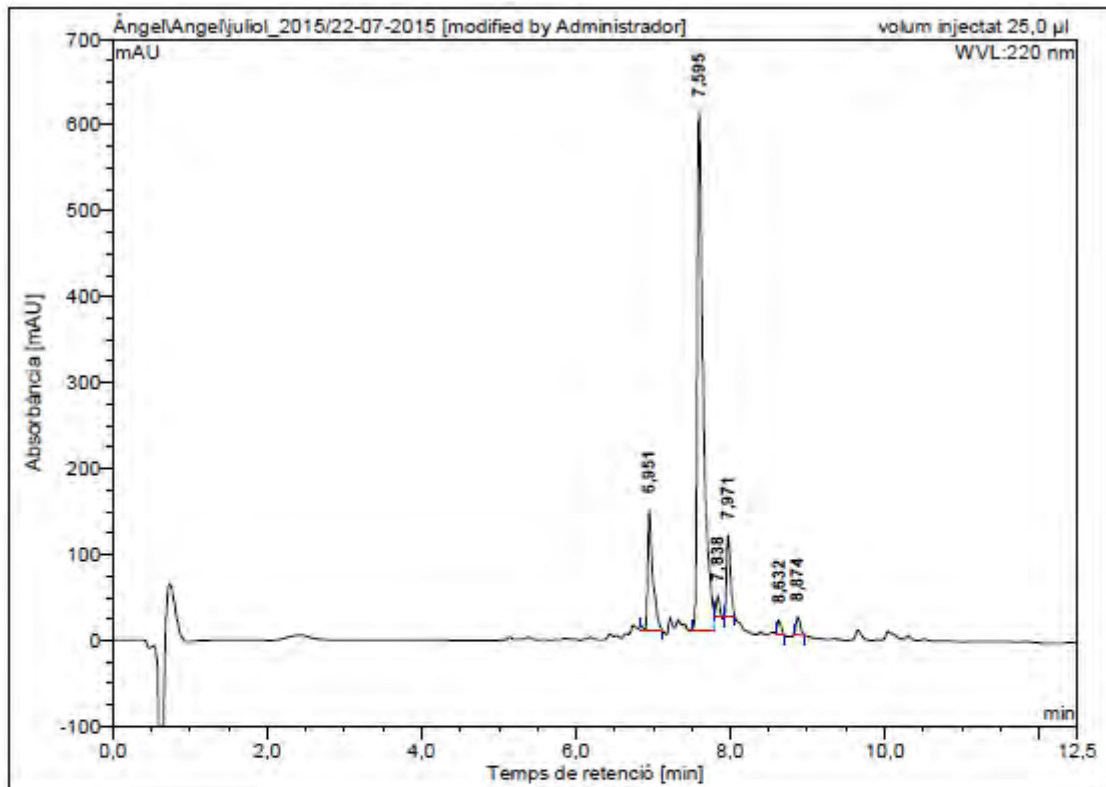
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,38	705,265	64,787	100,00
Total:		705,265	64,787	100,00

ESI-MS (m/z)



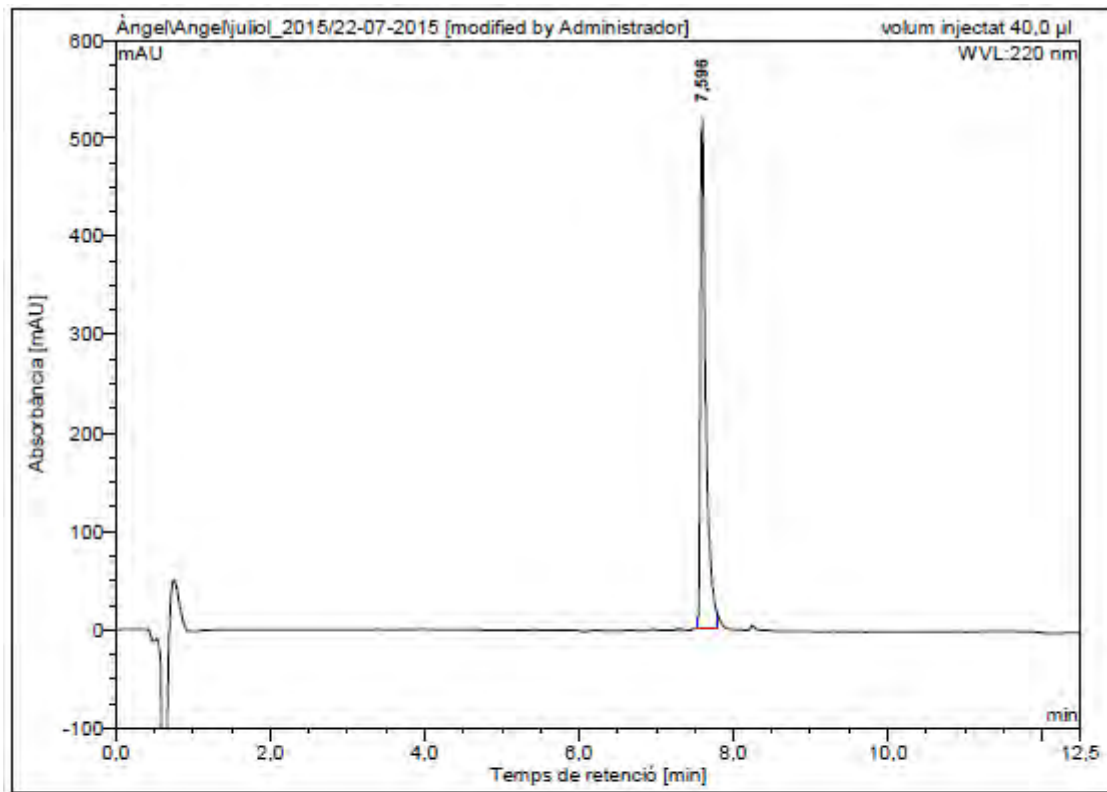
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (BP400)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

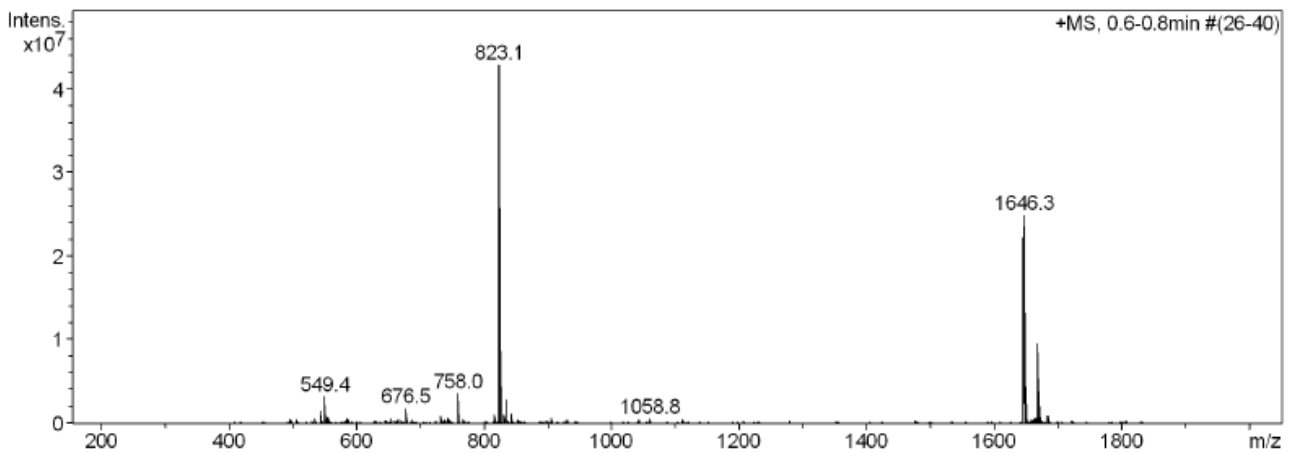
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,95	139,996	10,696	14,22
2	7,60	601,296	55,148	73,32
3	7,84	24,928	1,222	1,63
4	7,97	95,266	5,750	7,64
5	8,63	17,523	1,090	1,45
6	8,87	20,128	1,311	1,74
Total:		899,138	75,217	100,00

HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

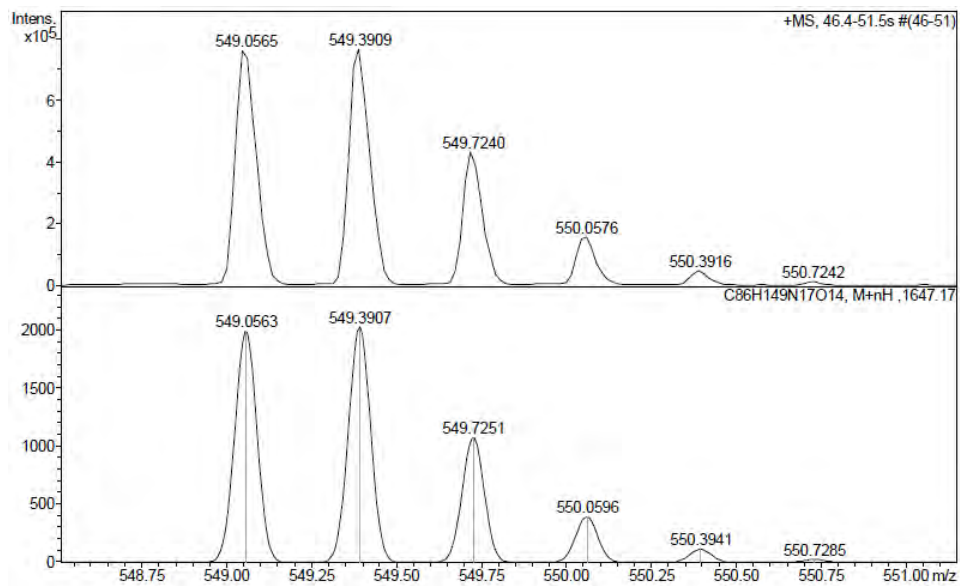
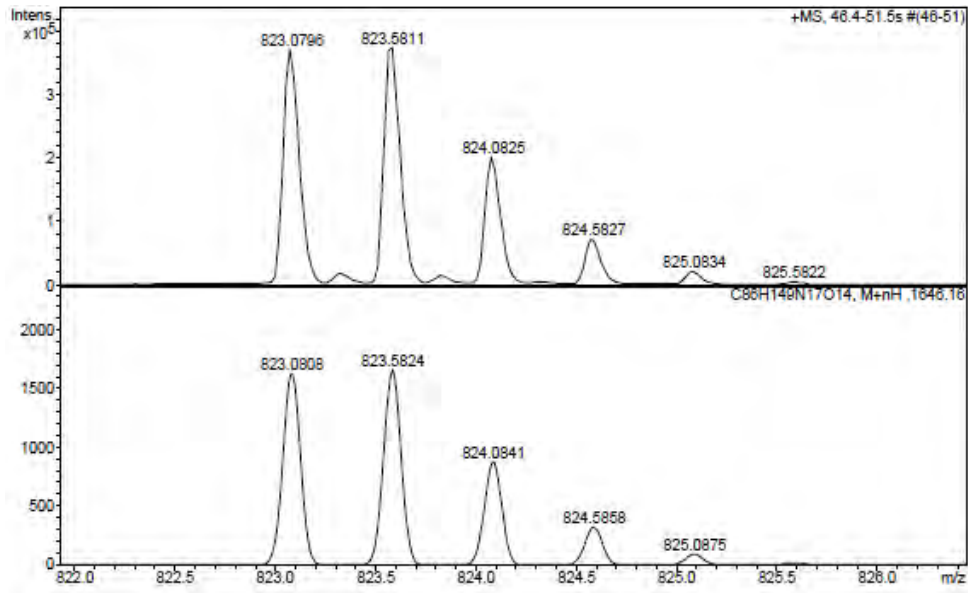
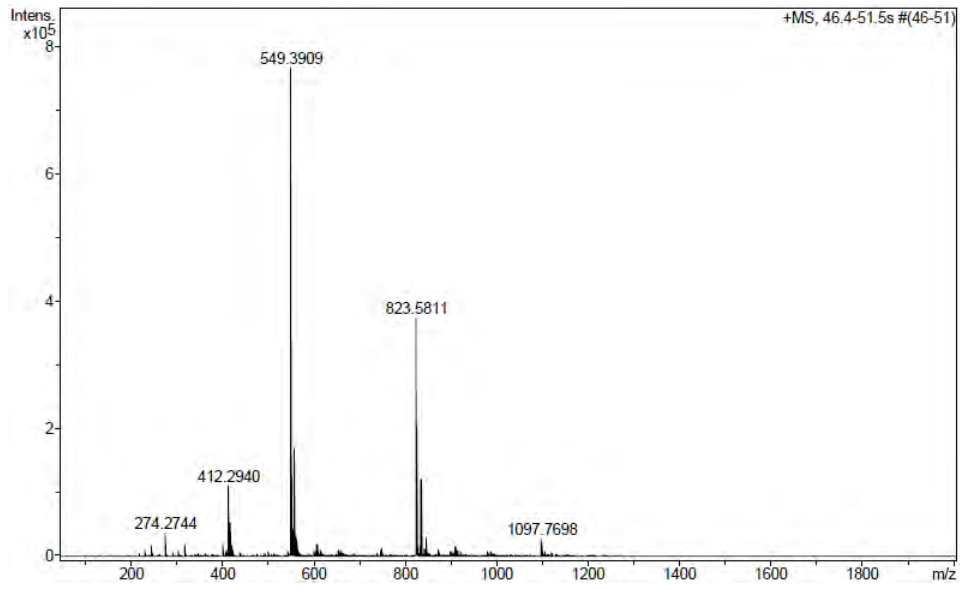


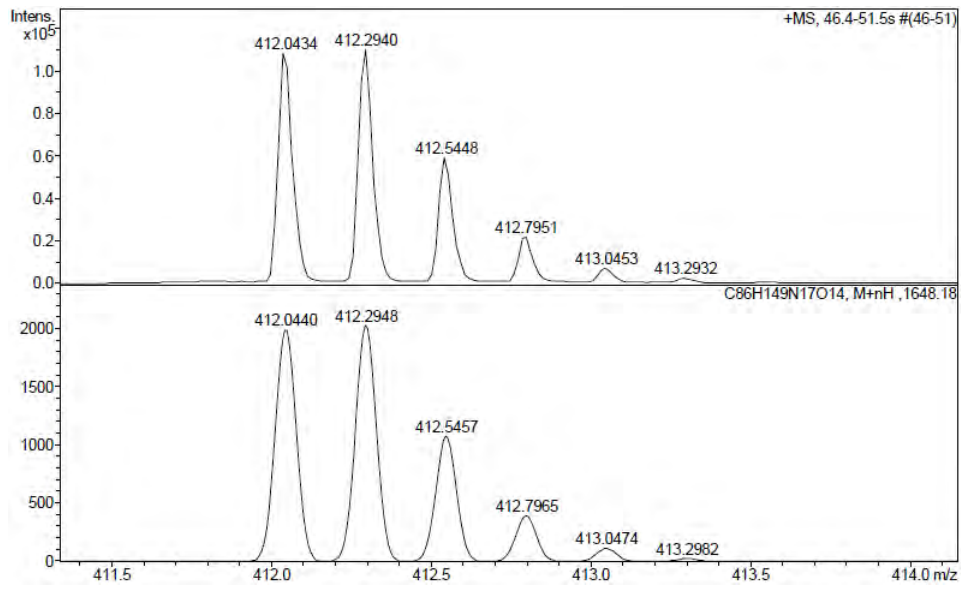
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,60	518,077	42,421	100,00
Total:		518,077	42,421	100,00

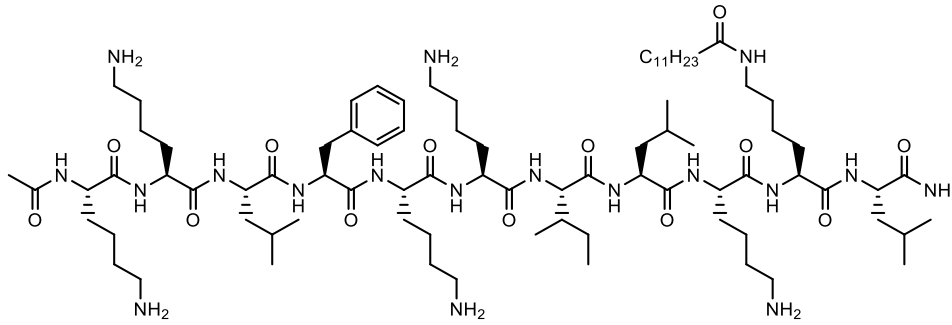
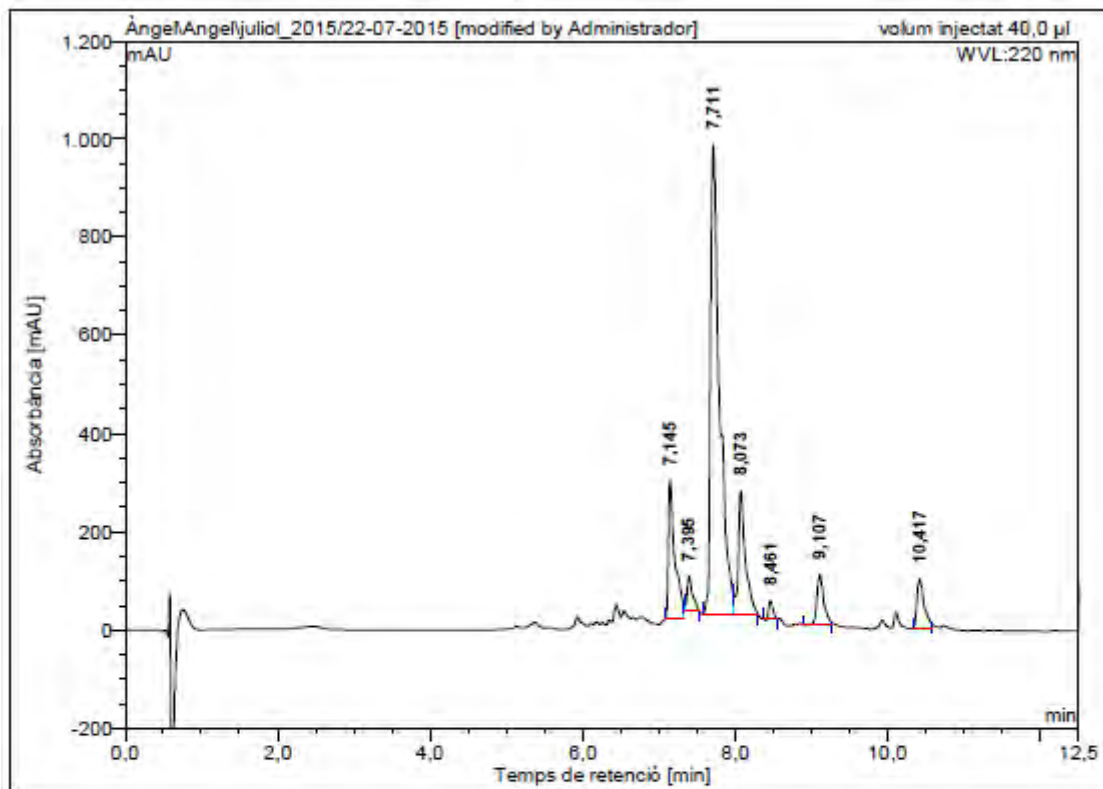
ESI-MS (m/z)



HRMS (m/z)

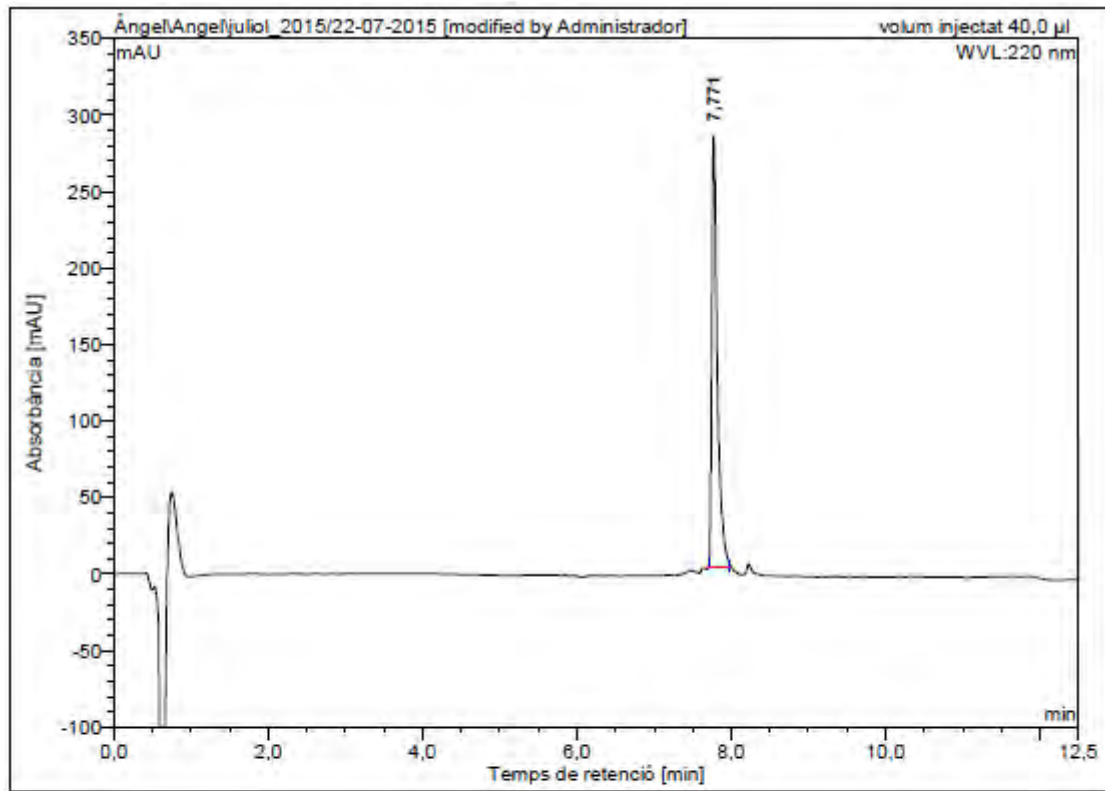




Ac-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-NH₂ (BP401)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

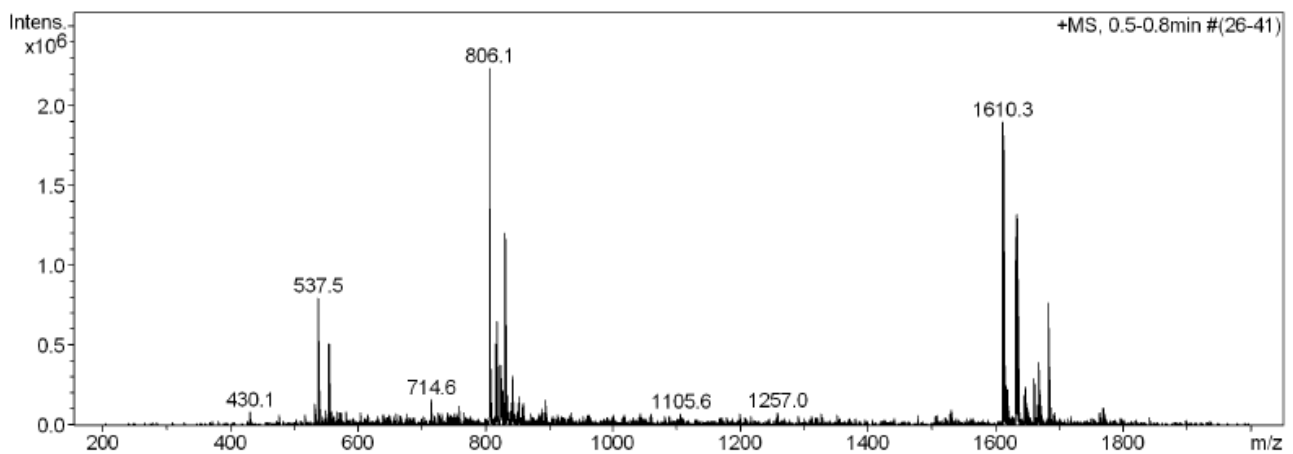
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,15	281,402	27,972	12,86
2	7,39	69,176	5,638	2,59
3	7,71	955,947	132,927	61,10
4	8,07	251,104	27,182	12,49
5	8,46	36,744	2,231	1,03
6	9,11	103,107	10,872	5,00
7	10,42	100,065	10,747	4,94
Total:		1797,546	217,569	100,00

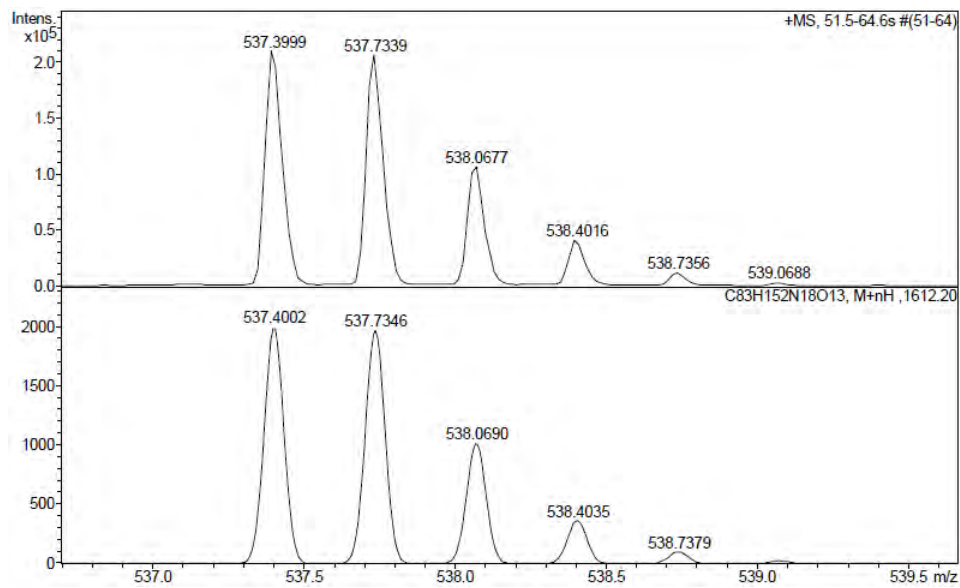
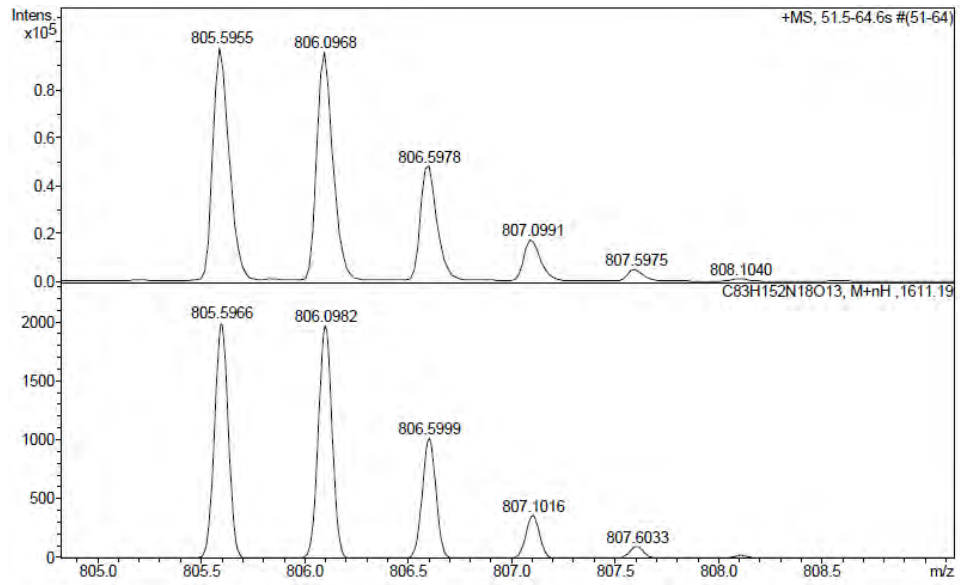
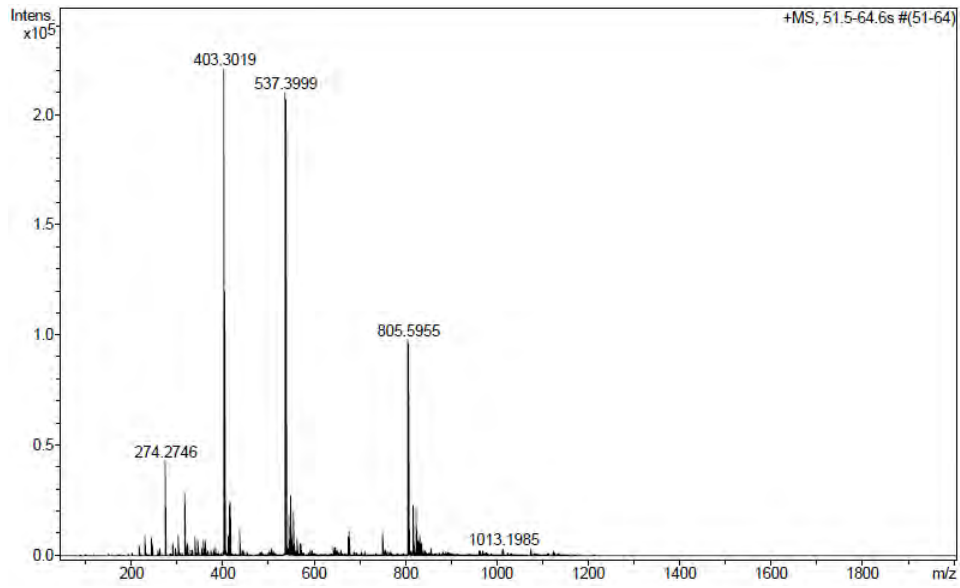
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

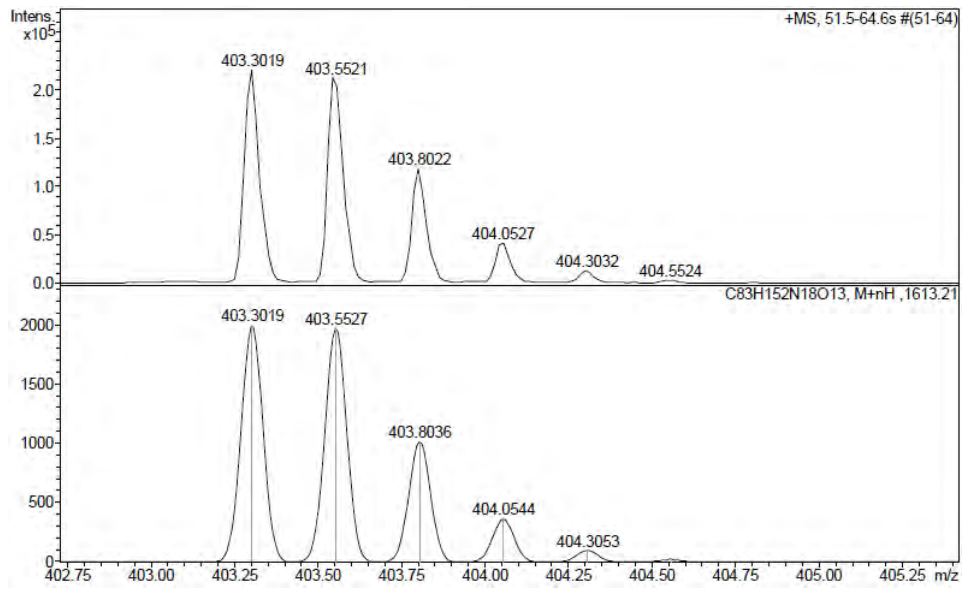


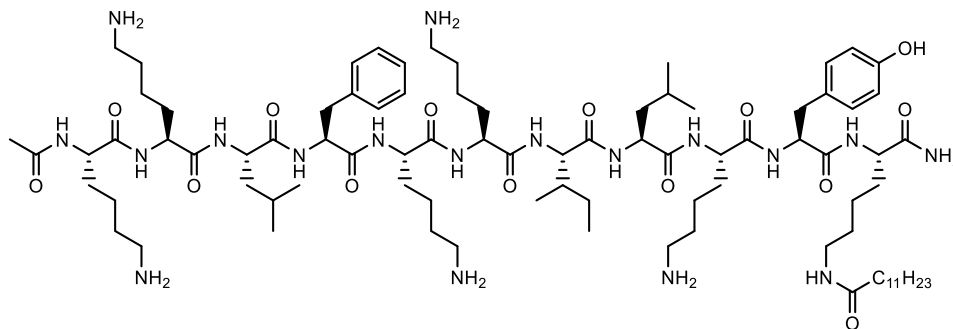
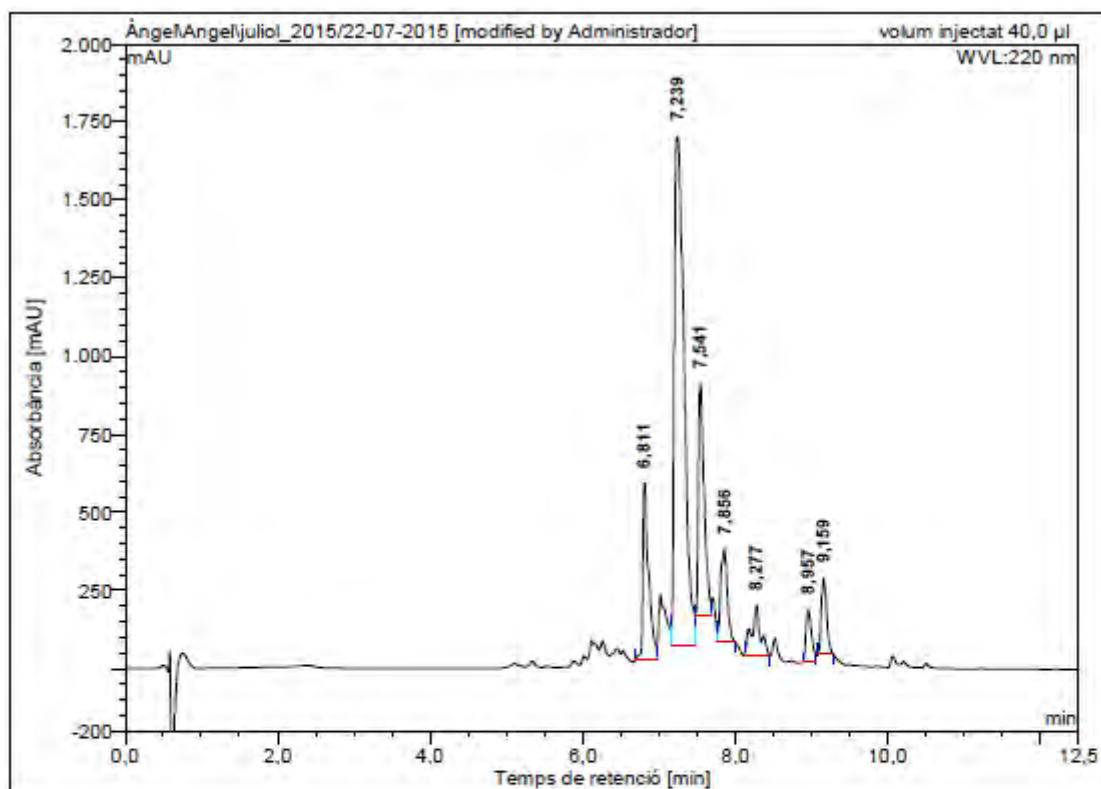
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,77	281,578	23,709	100,00
Total:		281,578	23,709	100,00

ESI-MS (m/z)

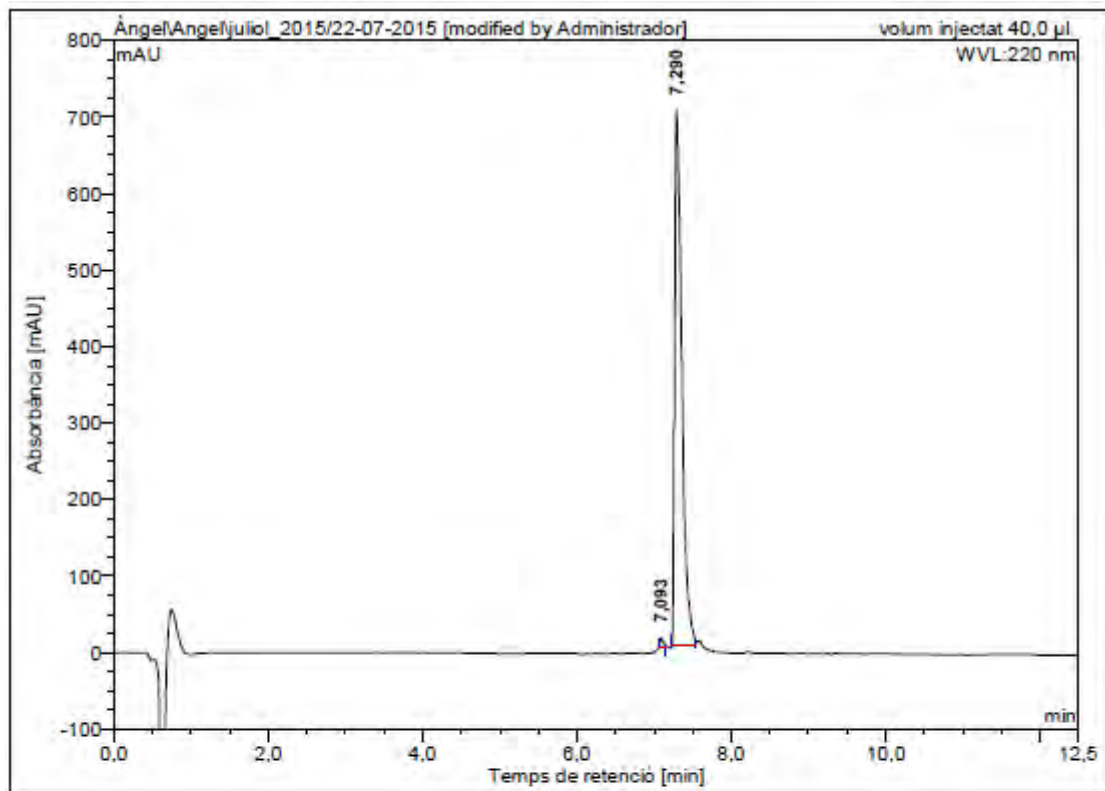


HRMS (m/z)

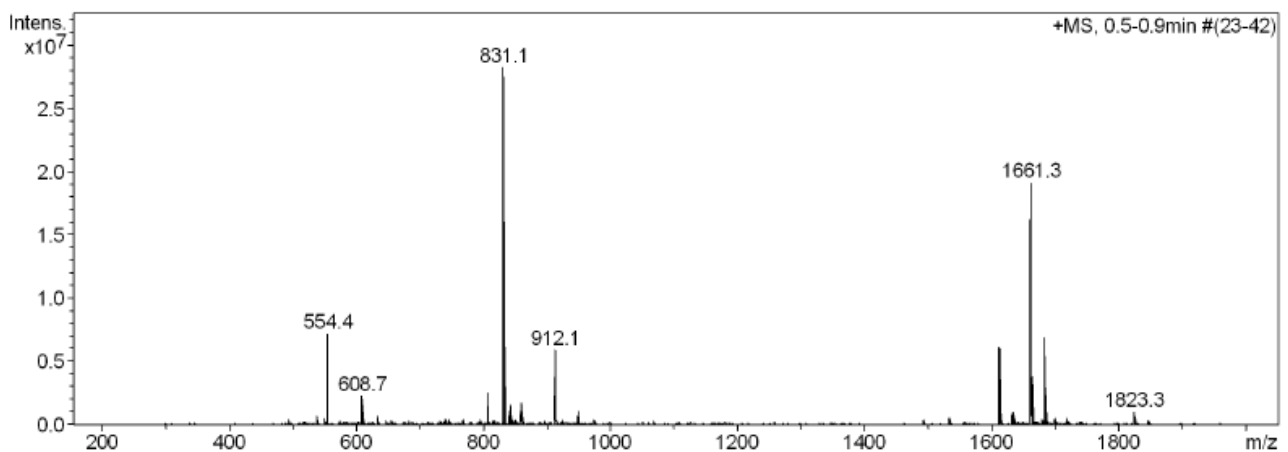


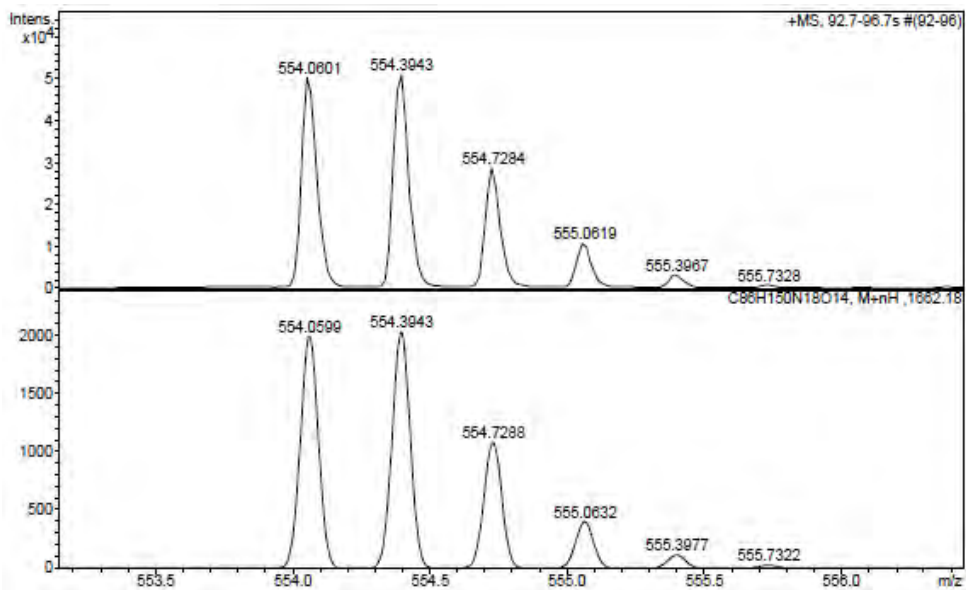
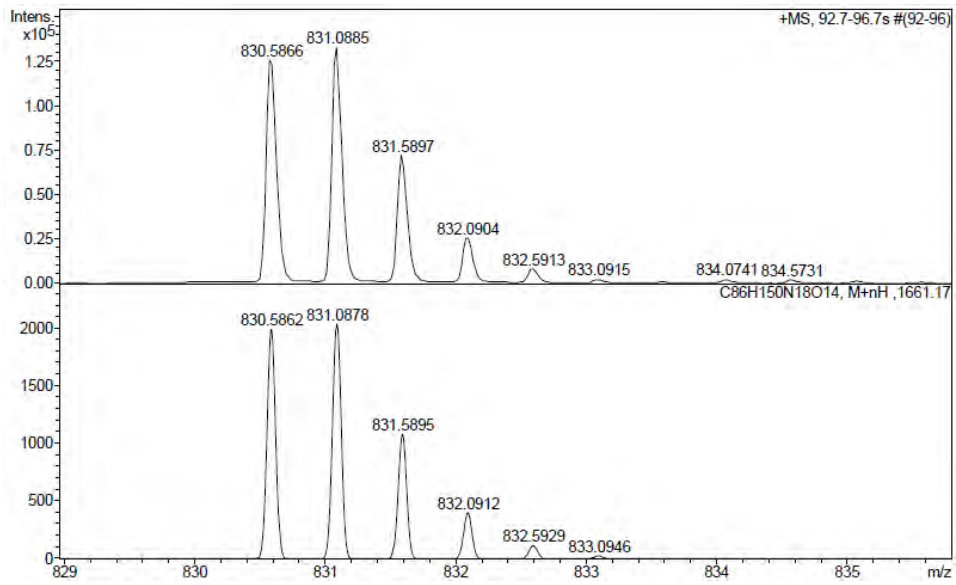
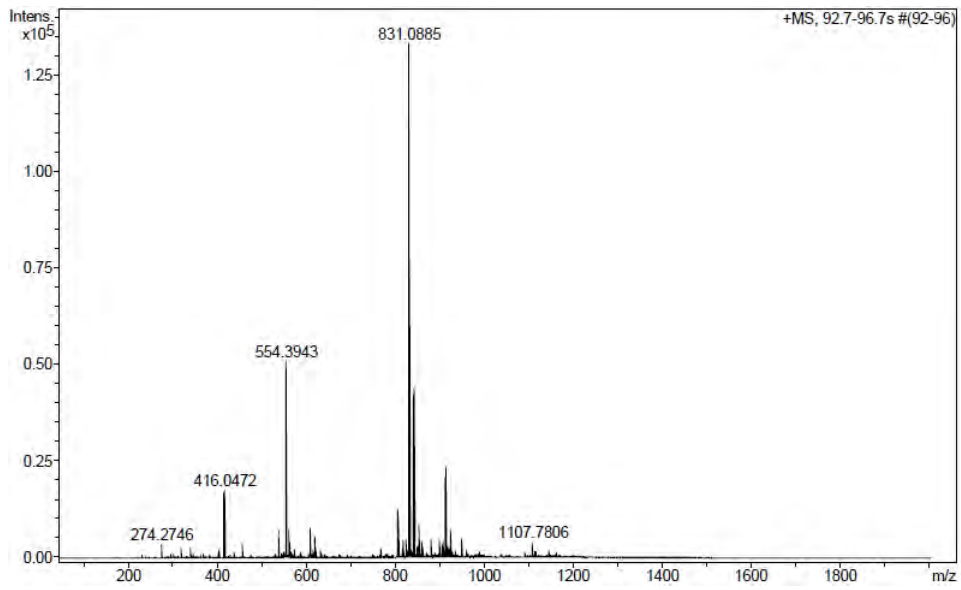
Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₁₁H₂₃)-NH₂ (BP402)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

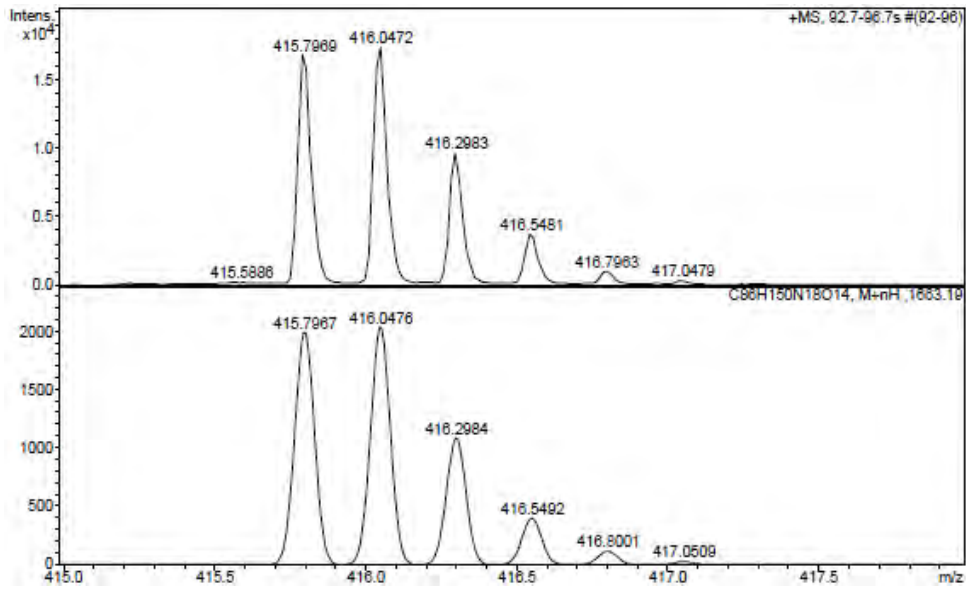
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,81	566,169	49,463	11,20
2	7,24	1628,606	241,328	54,65
3	7,54	739,921	65,463	14,82
4	7,86	294,068	29,598	6,70
5	8,28	160,723	21,558	4,88
6	8,96	169,549	14,511	3,29
7	9,16	241,635	19,678	4,46
Total:		3800,670	441,600	100,00

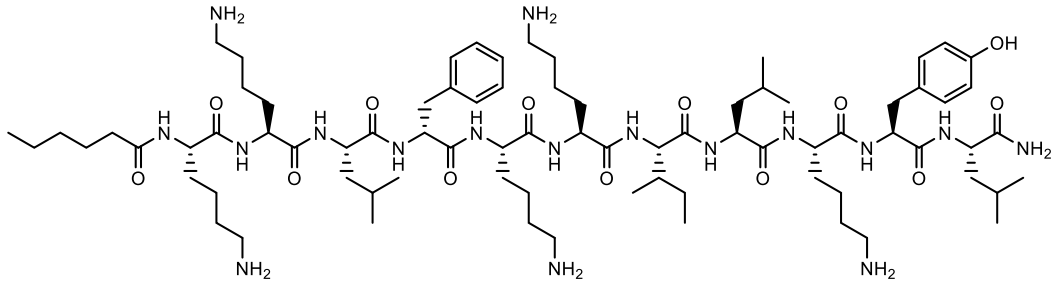
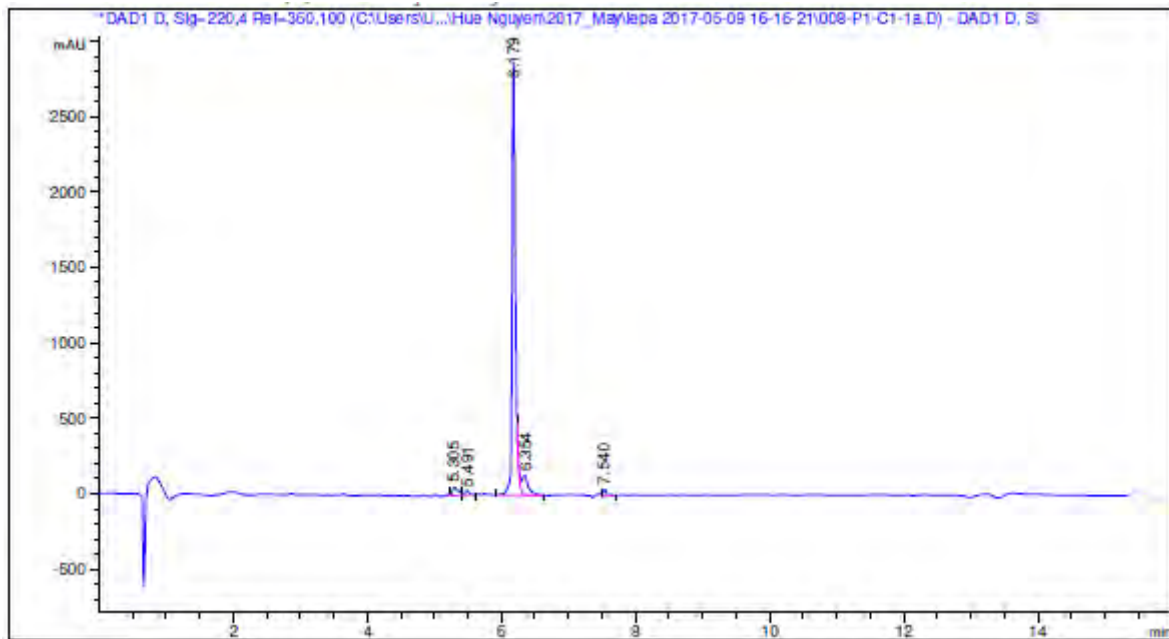
HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,09	13,668	0,753	1,00
2	7,29	698,961	74,585	99,00
Total:		712,628	75,339	100,00

ESI-MS (m/z)

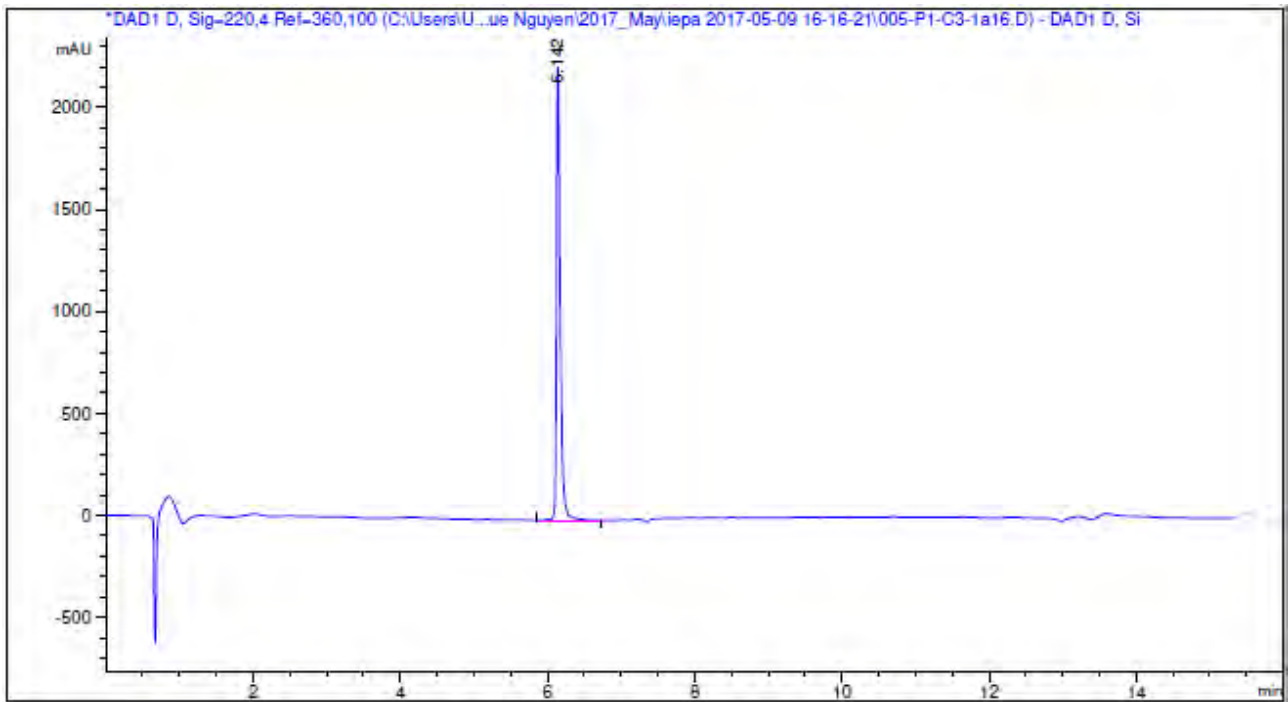
HRMS (m/z)



C₅H₁₁CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP472)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

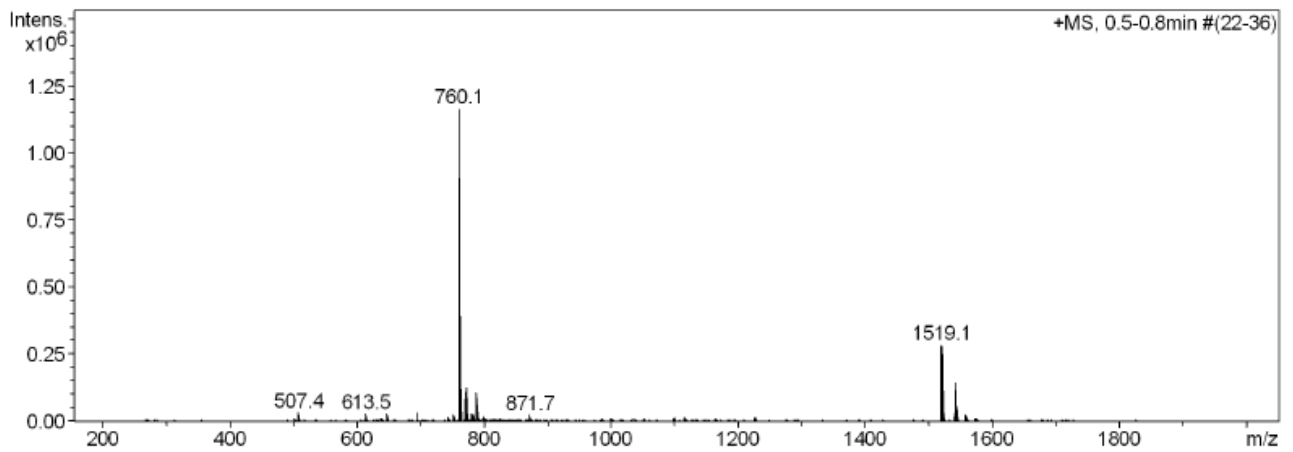
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.305	VV	0.0871	334.45099	54.91665	2.8671
2	5.491	VB	0.0577	135.30244	32.39536	1.1599
3	6.179	BV R	0.0529	1.00572e4	2871.68335	86.2160
4	6.354	VB E	0.0962	953.29431	126.04663	8.1722
5	7.540	VV R	0.0572	184.87265	46.71790	1.5848

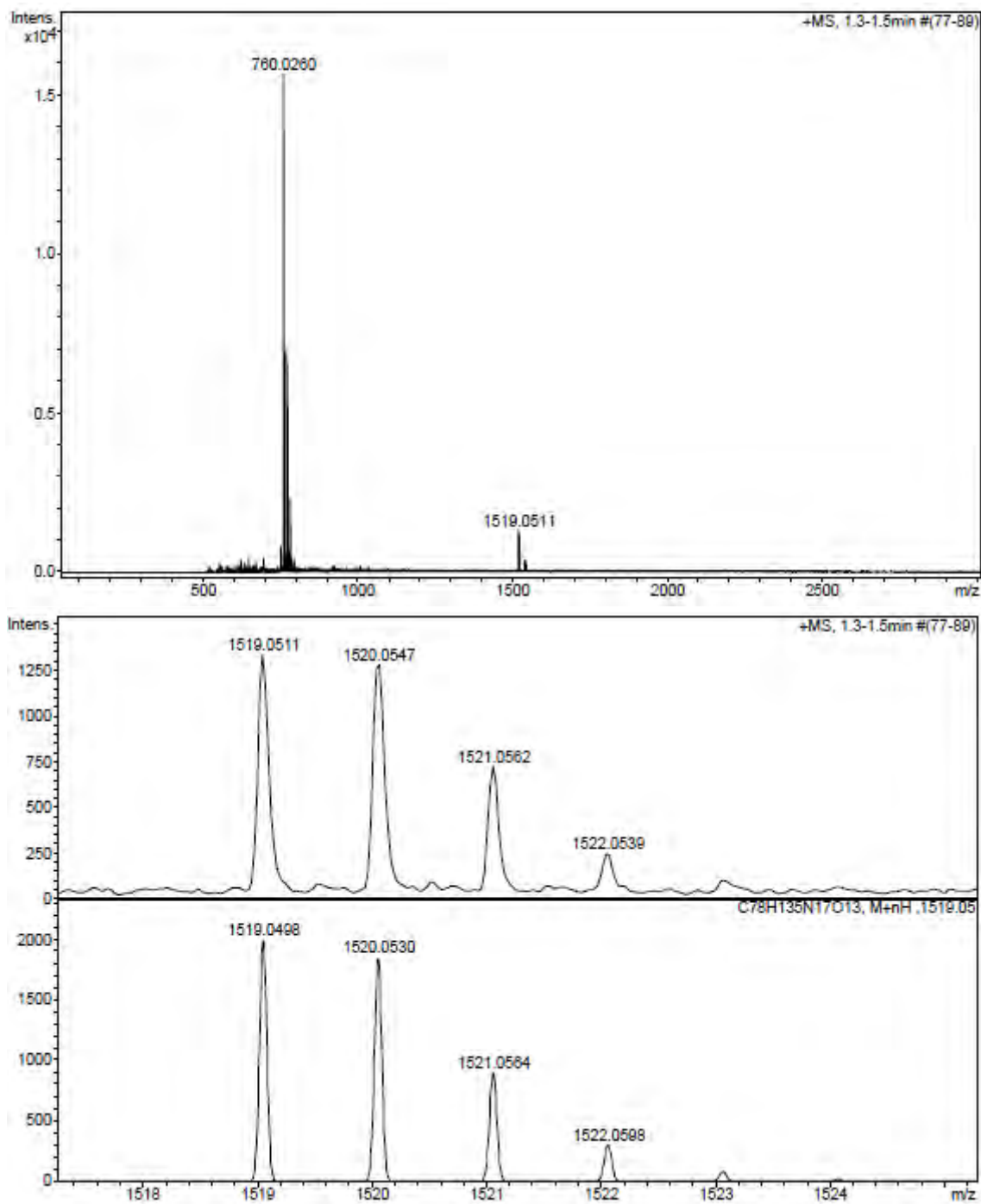
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

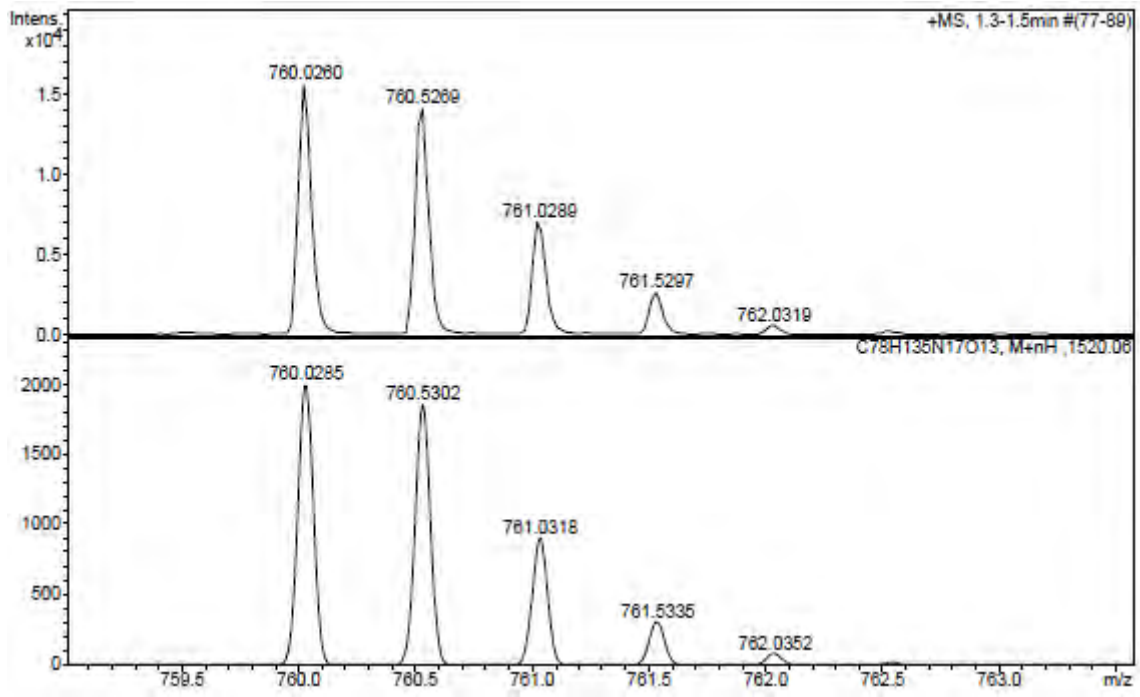


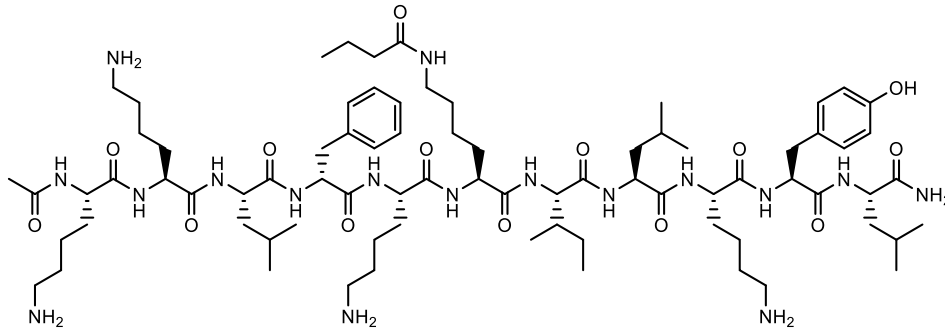
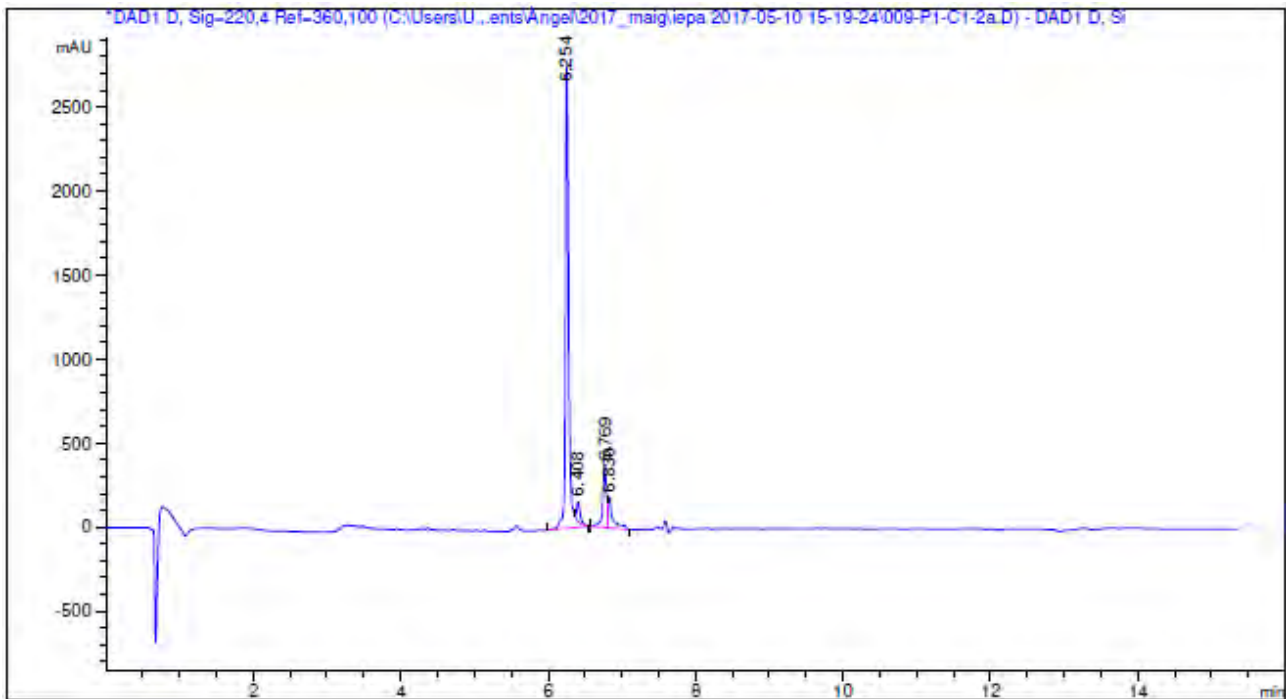
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.142	BB	0.0530	8007.58594	2222.06152	100.0000

ESI-MS (m/z)



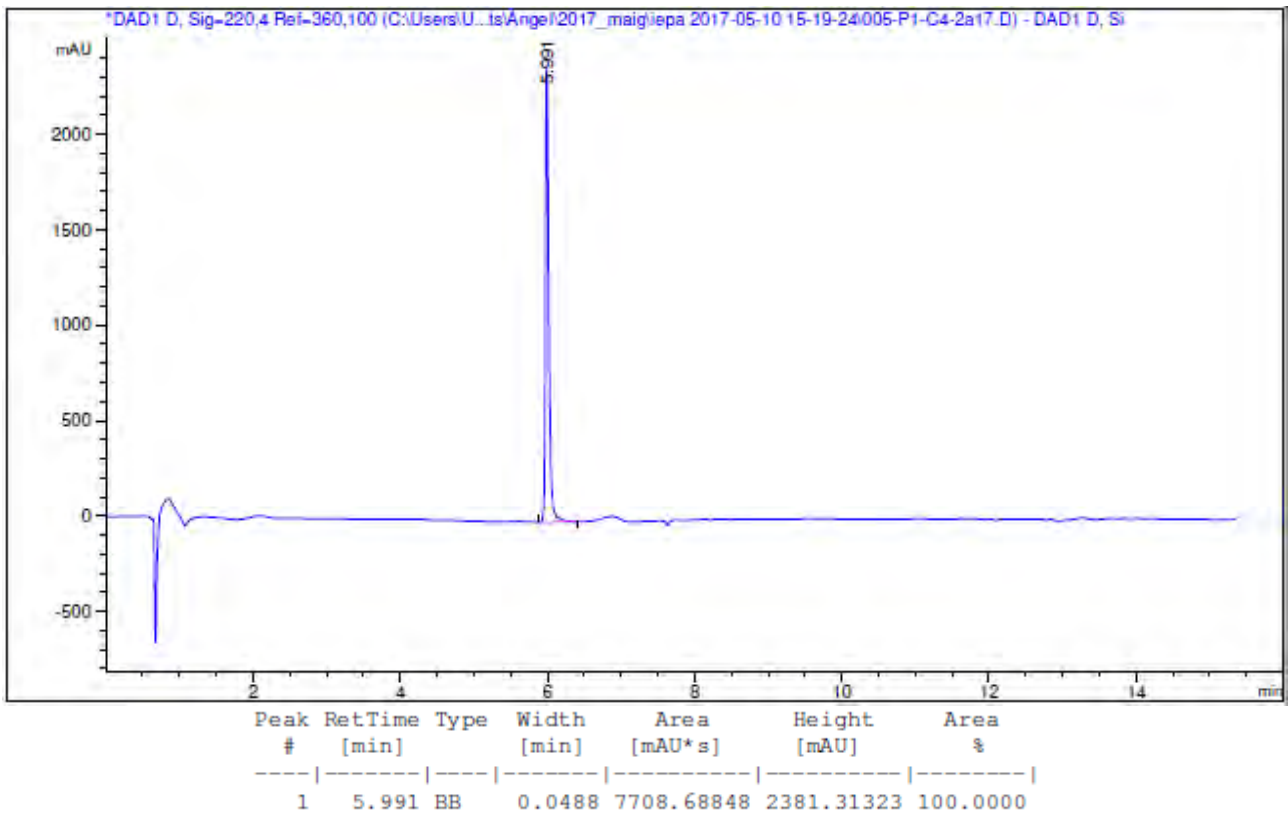
HRMS (m/z)



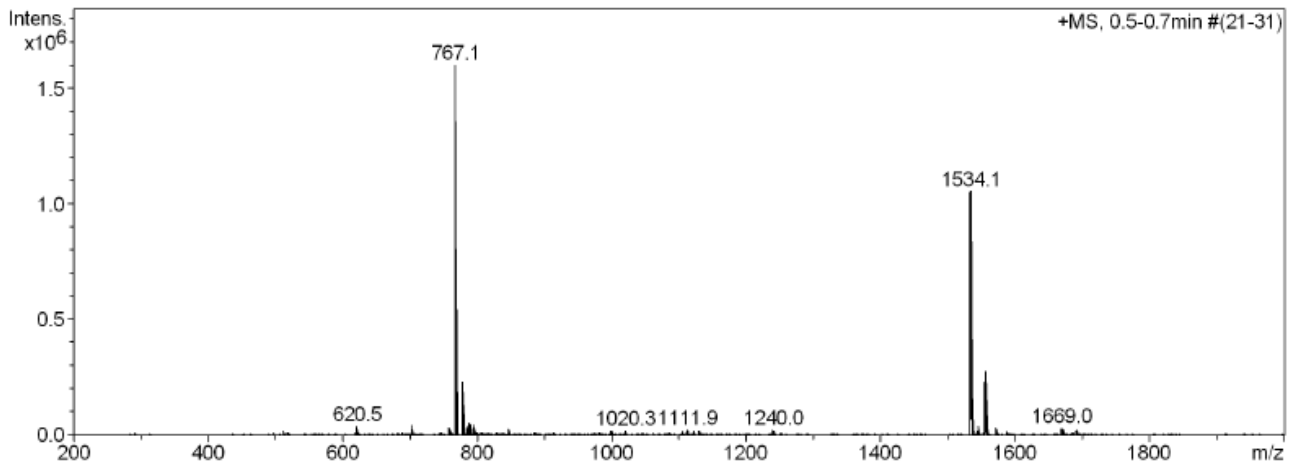
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys(COC₃H₇)-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP473)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

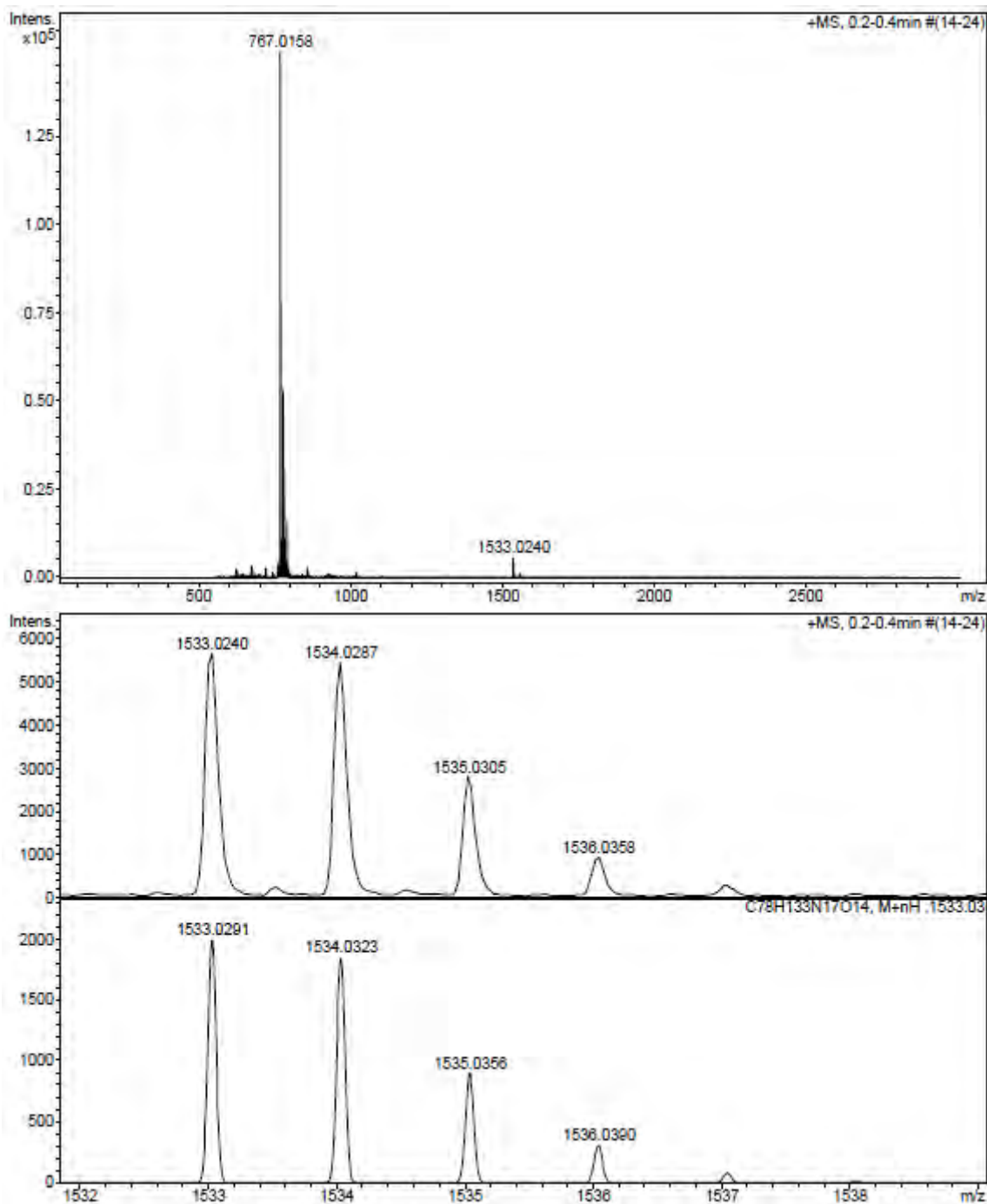
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.254	BV R	0.0464	8589.29297	2749.92847	77.4871
2	6.408	VB E	0.0496	383.71664	115.83309	3.4616
3	6.769	BV	0.0511	1300.70288	369.00027	11.7341
4	6.830	W R	0.0589	811.08887	182.18036	7.3171

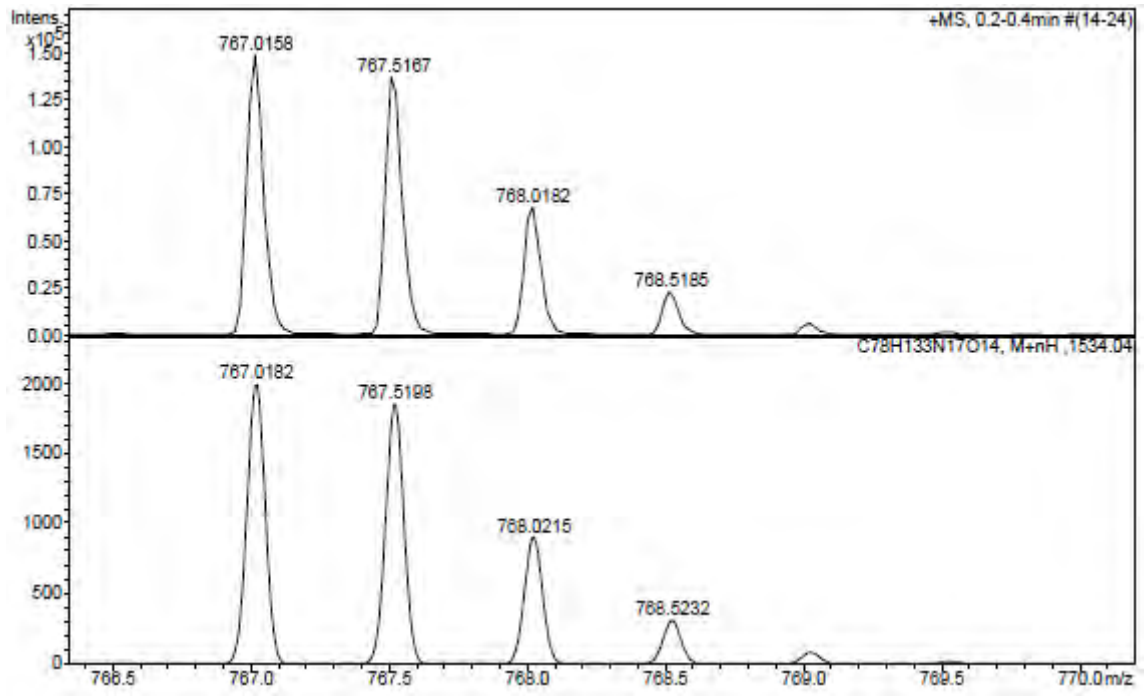
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

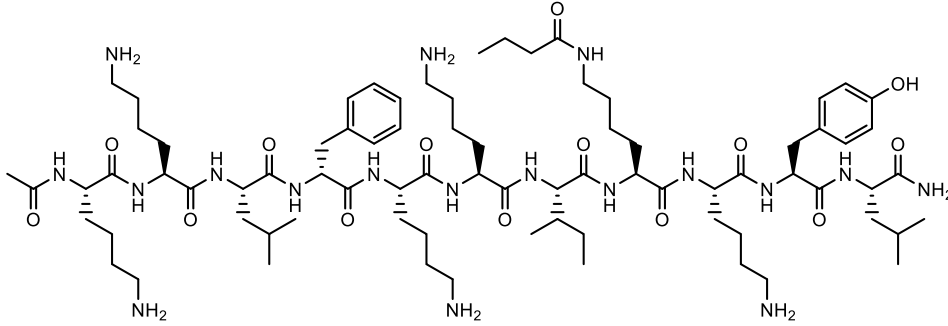
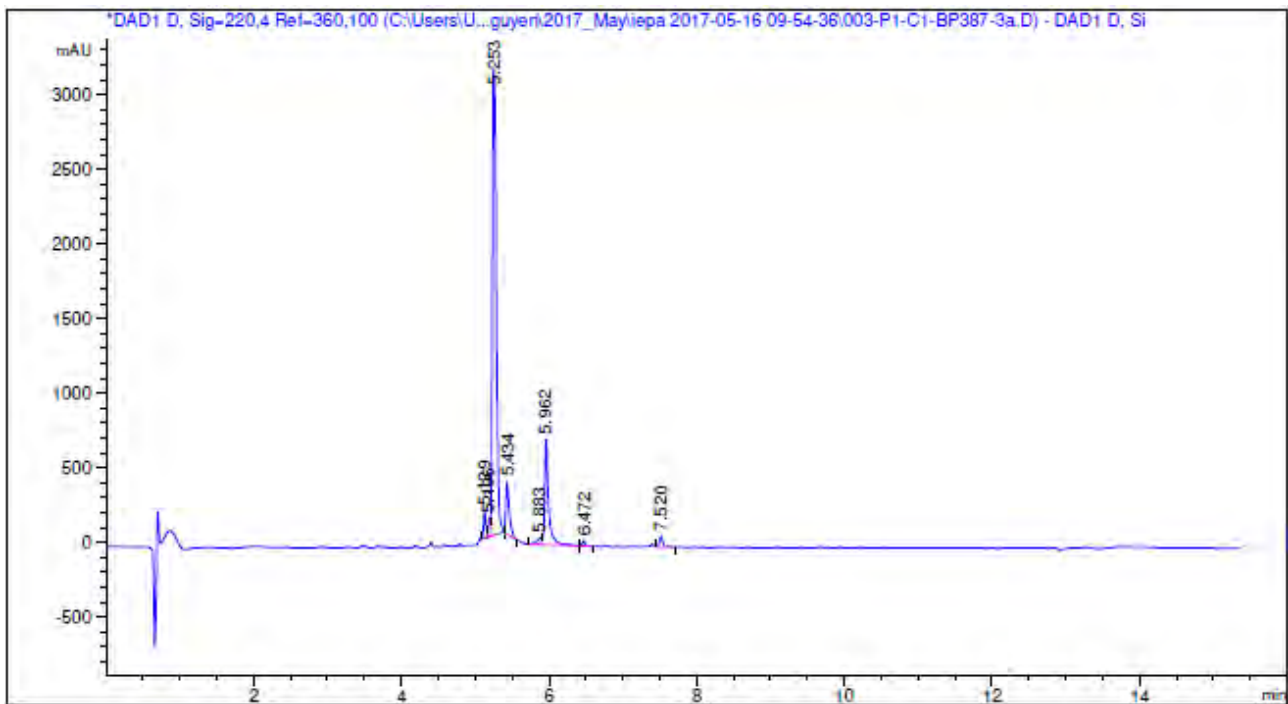


ESI-MS (m/z)



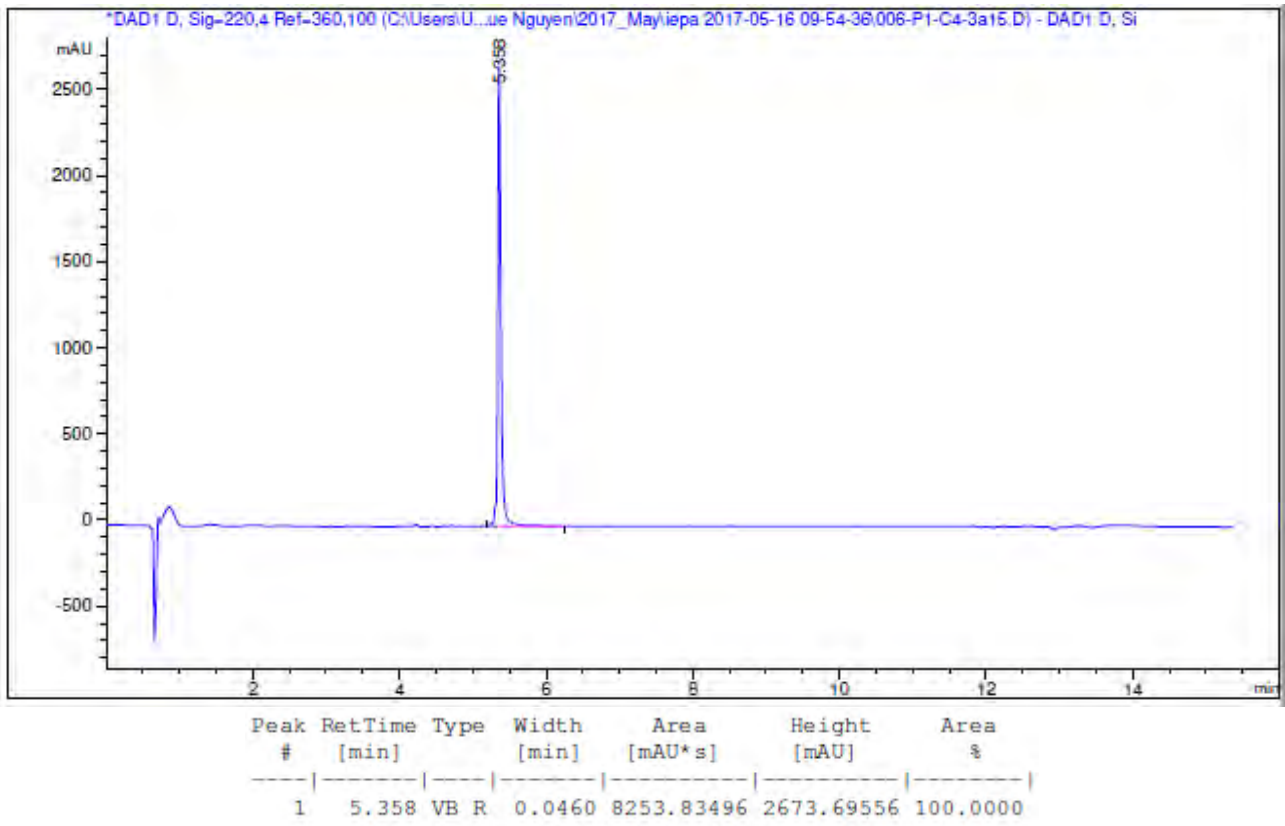
HRMS (m/z)



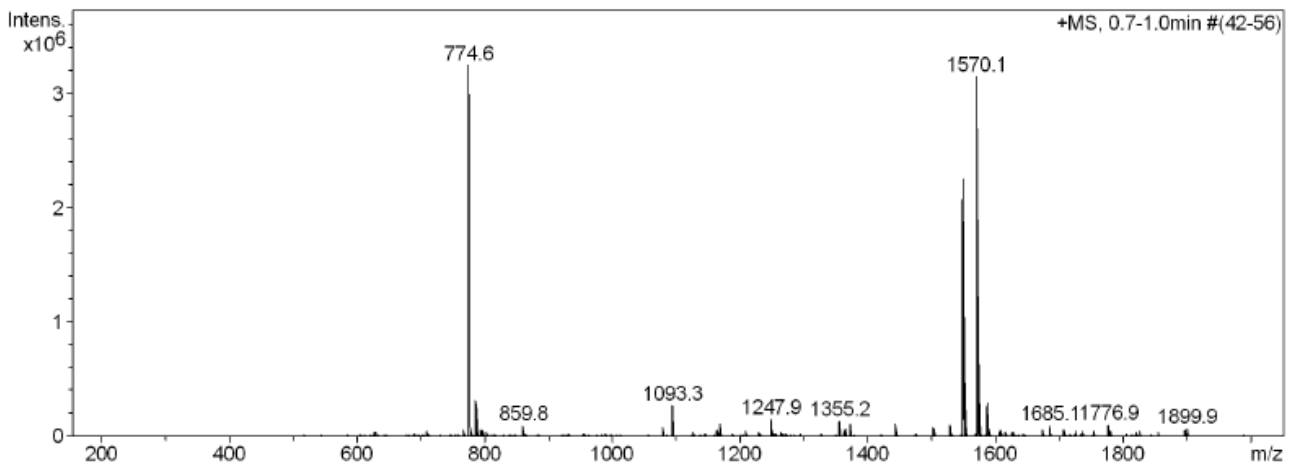
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP474)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

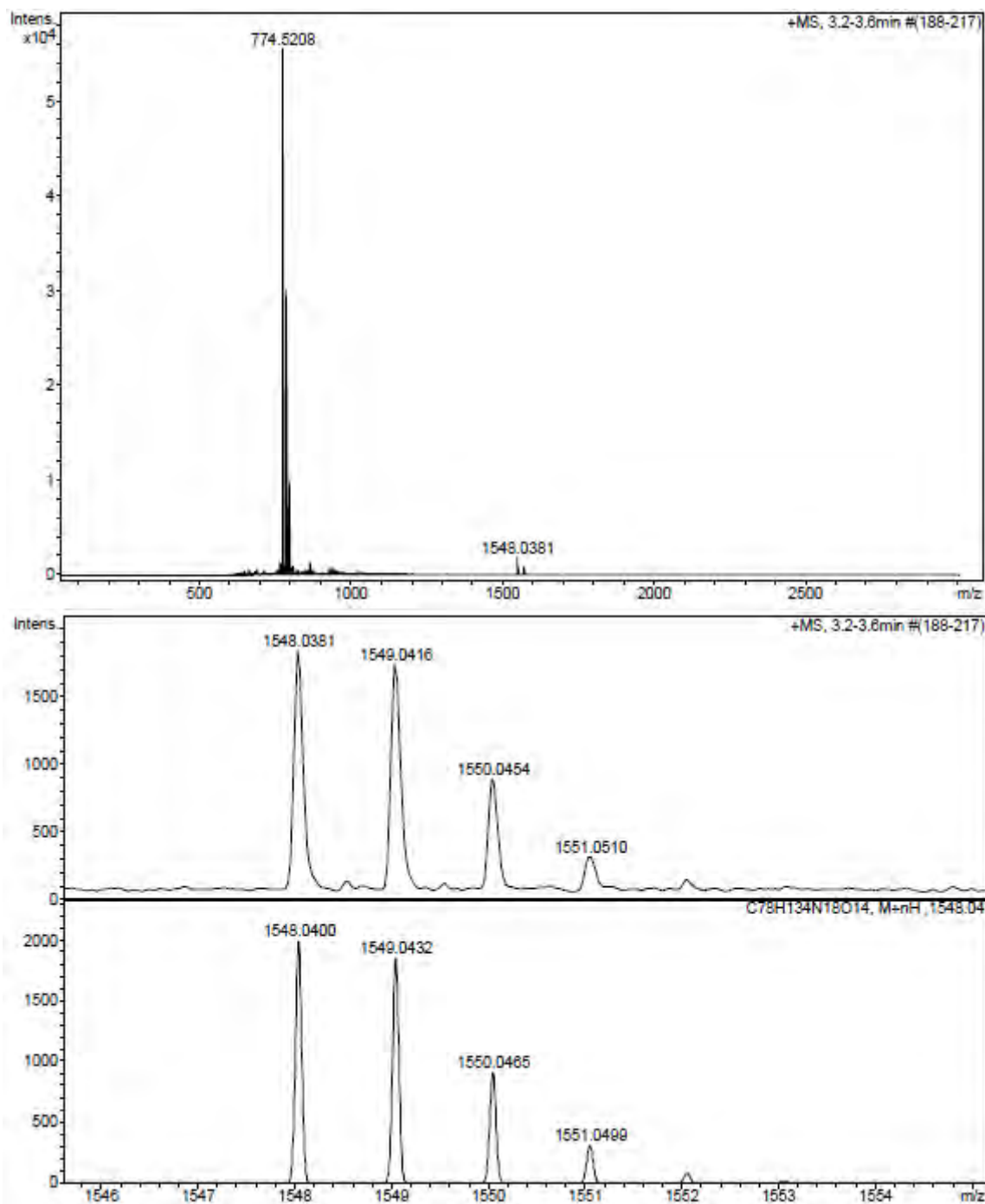
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.129	BV E	0.0323	377.93021	181.34412	2.2820
2	5.196	W E	0.0268	212.25146	119.26482	1.2816
3	5.253	VB R	0.0595	1.16522e4	3125.37207	70.3588
4	5.434	BB	0.0460	1109.19092	349.34921	6.6976
5	5.883	BV E	0.0659	192.02771	38.04109	1.1595
6	5.962	W R	0.0532	2679.02954	707.11737	16.1766
7	6.472	BB	0.0410	95.51791	34.79841	0.5768
8	7.520	VB R	0.0507	242.96144	71.34217	1.4671

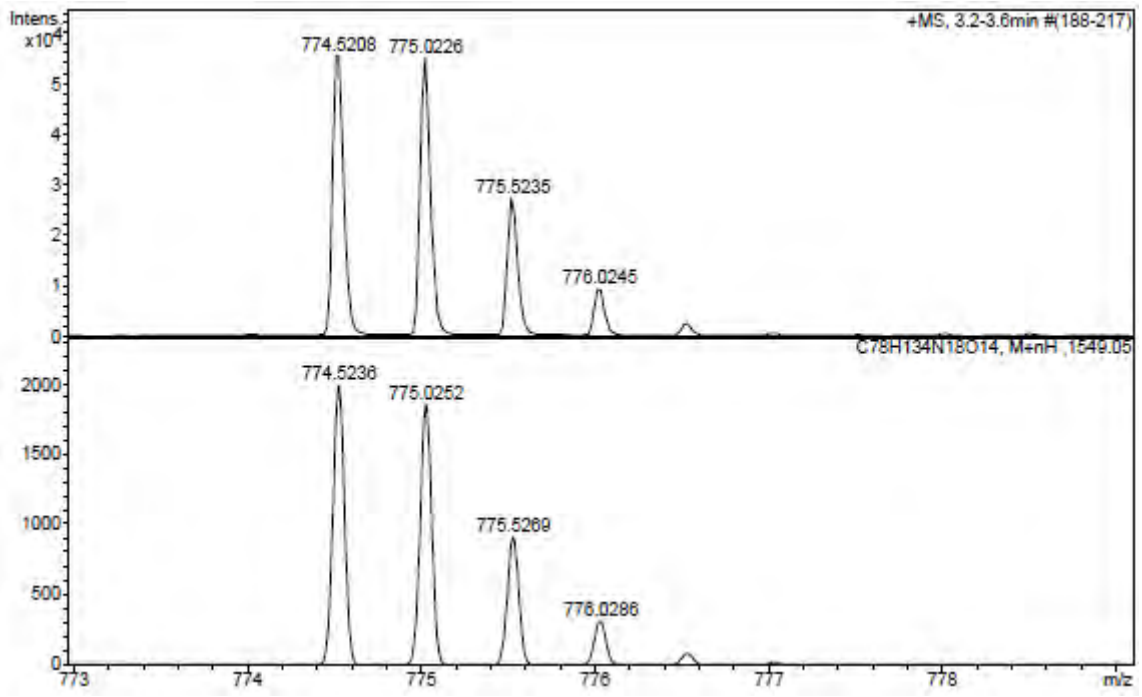
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

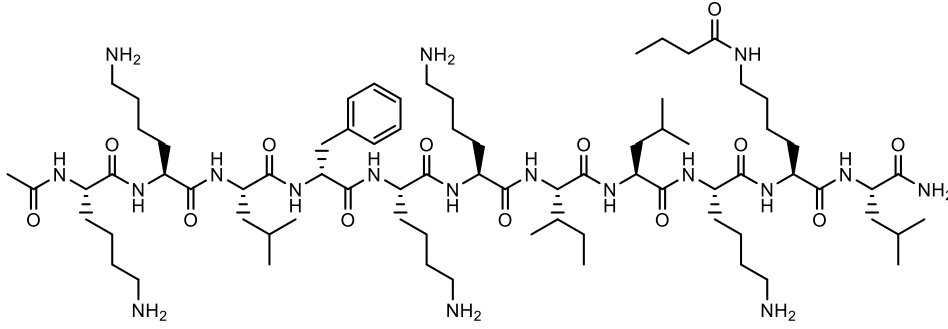
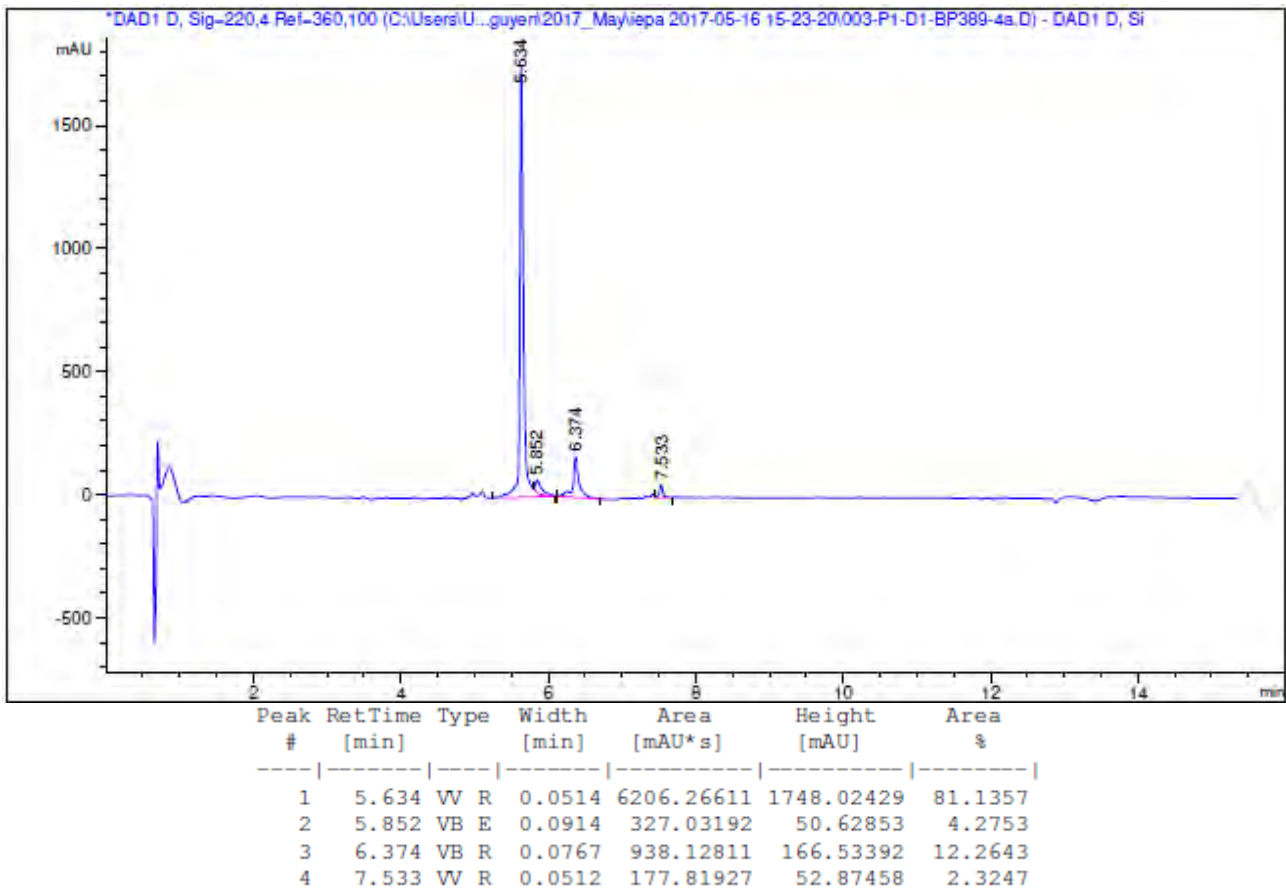


ESI-MS (m/z)

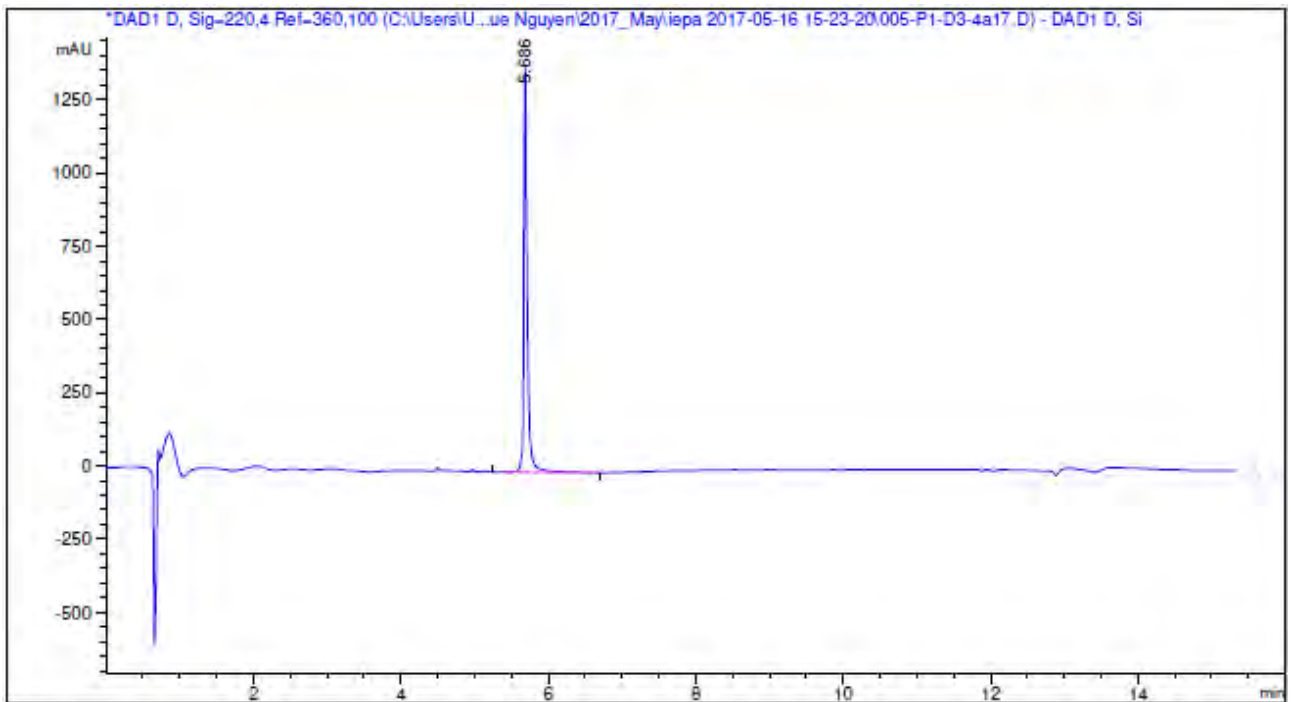


HRMS (m/z)



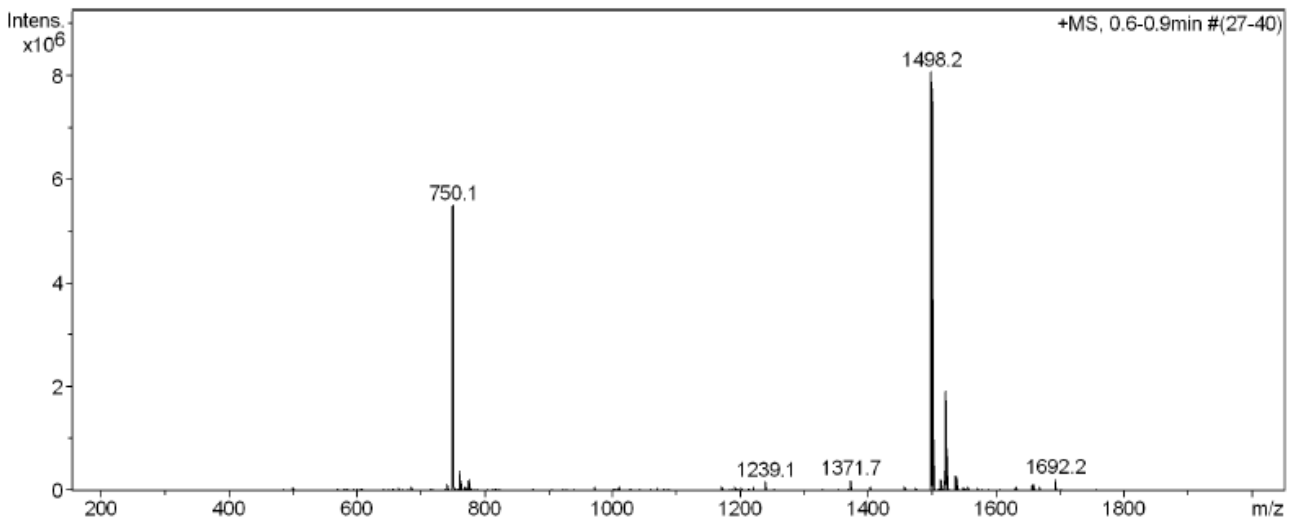
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP475)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

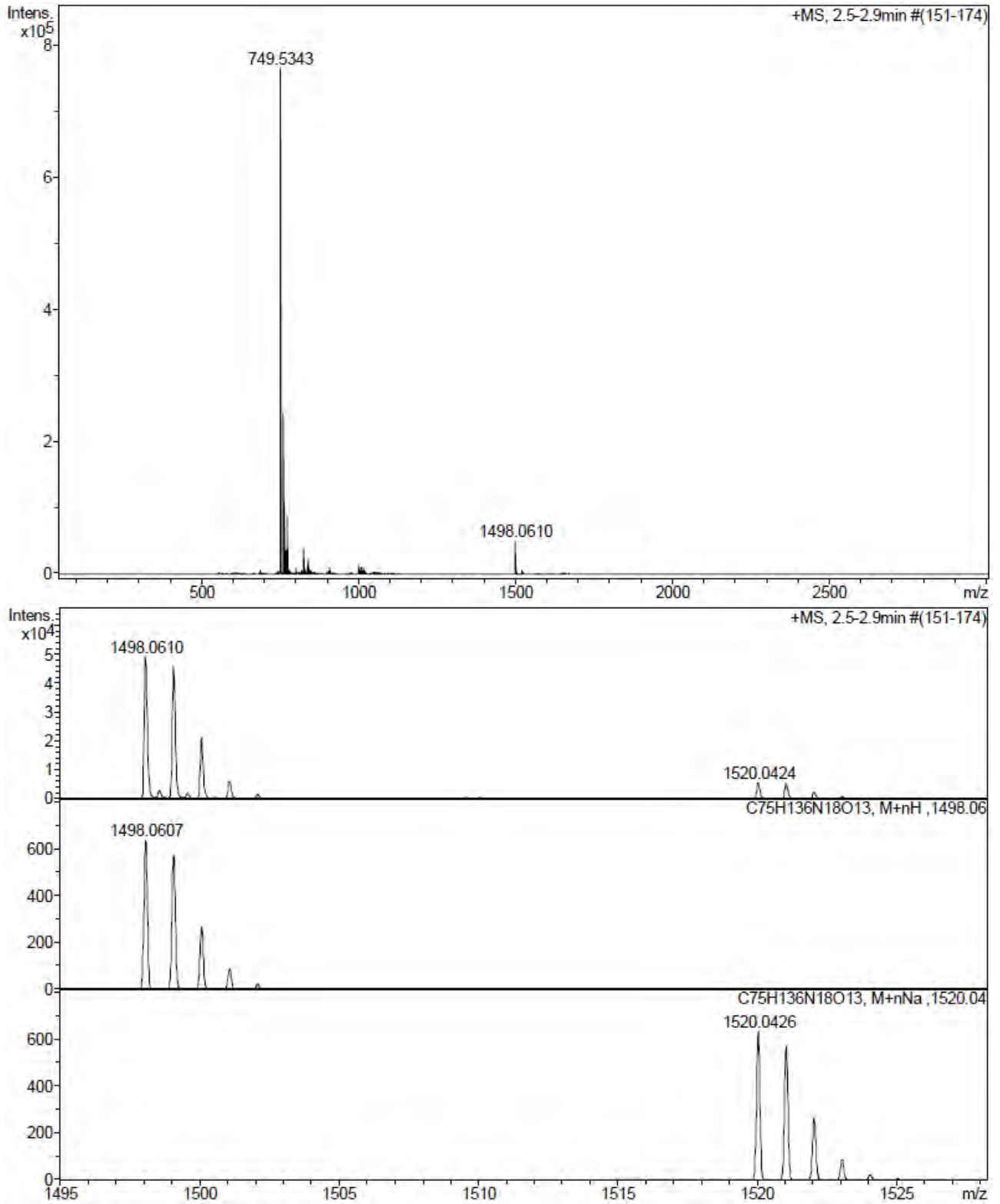
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

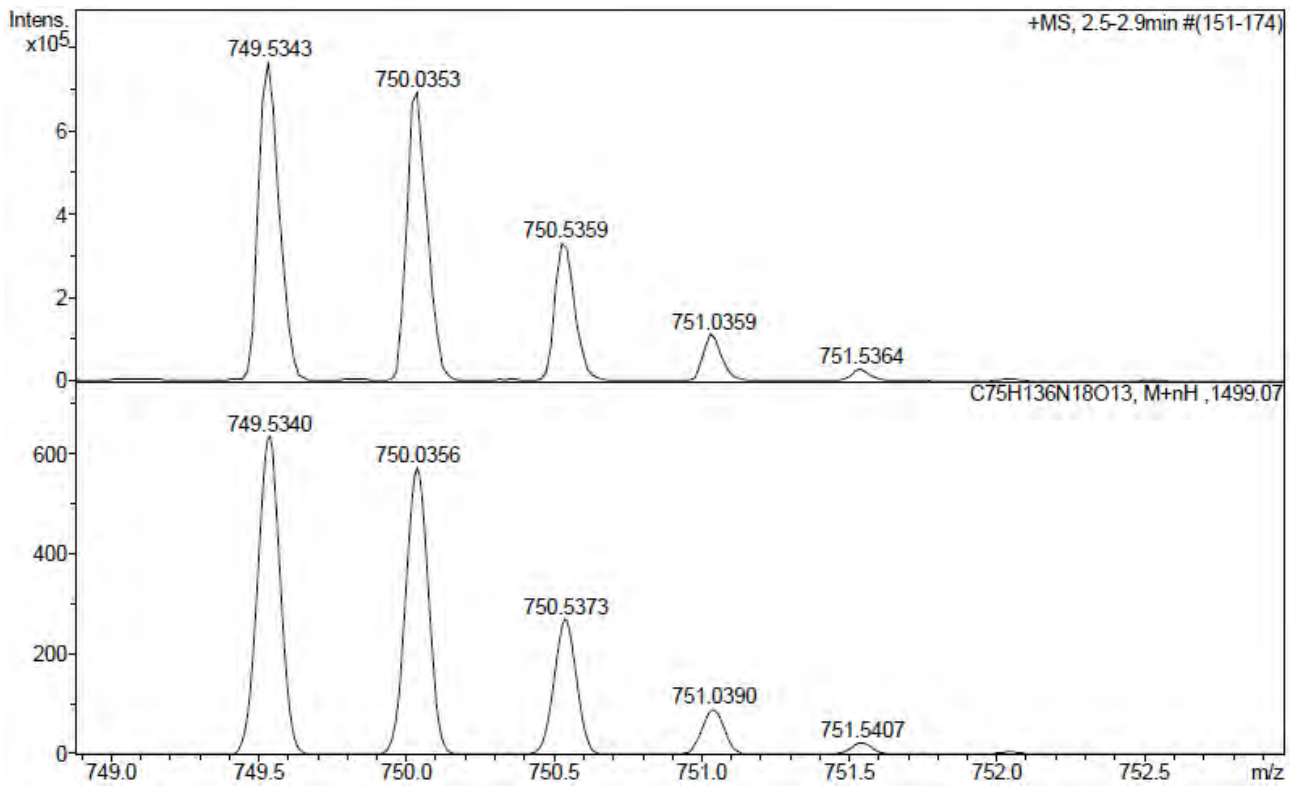


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.686	VB R	0.0485	4586.54346	1388.06421	100.0000

ESI-MS (m/z)

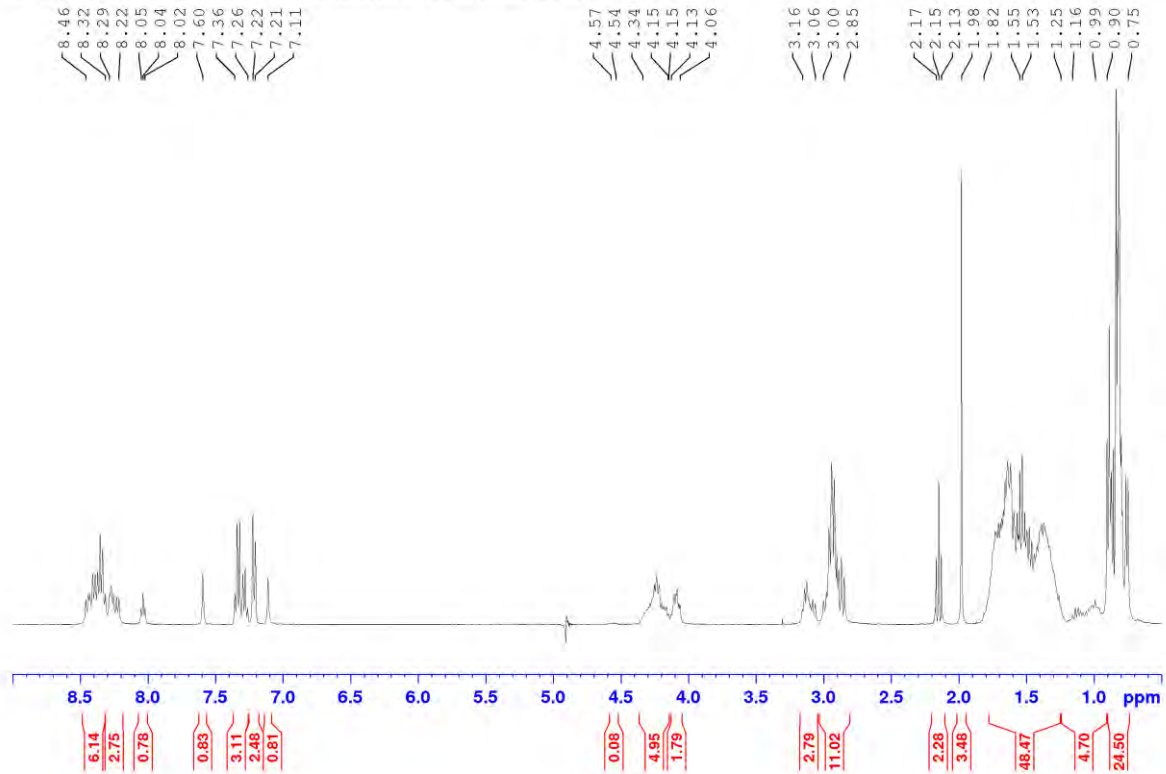


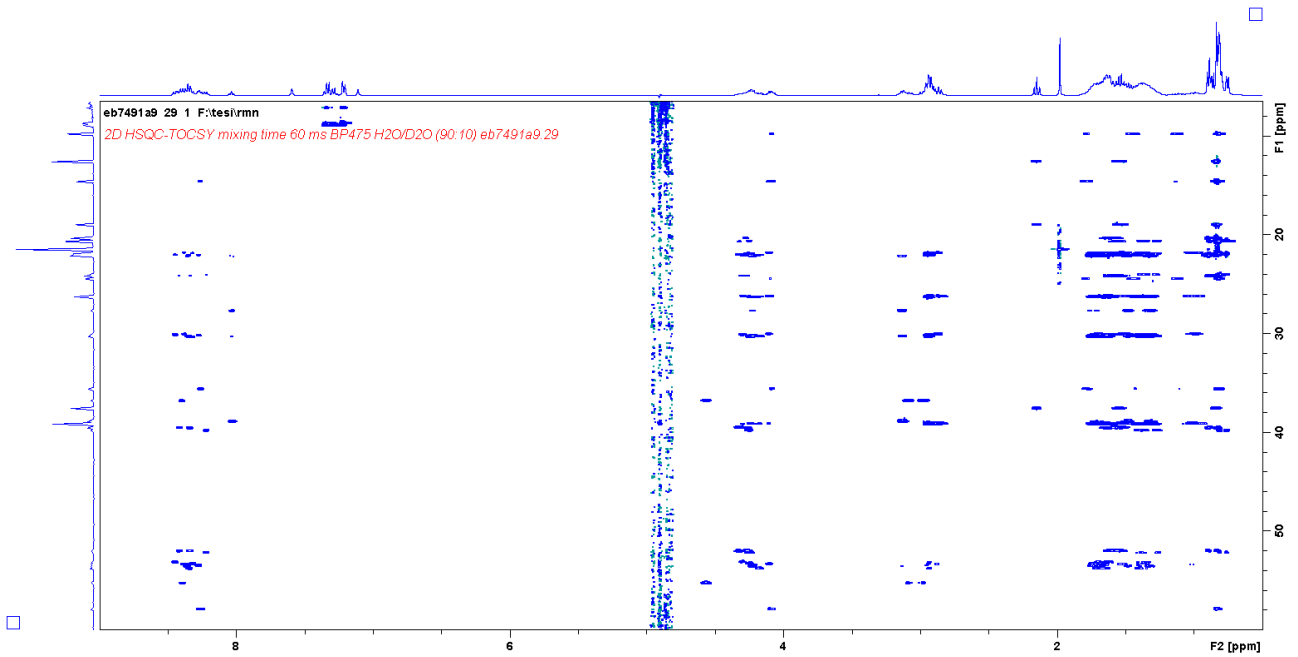
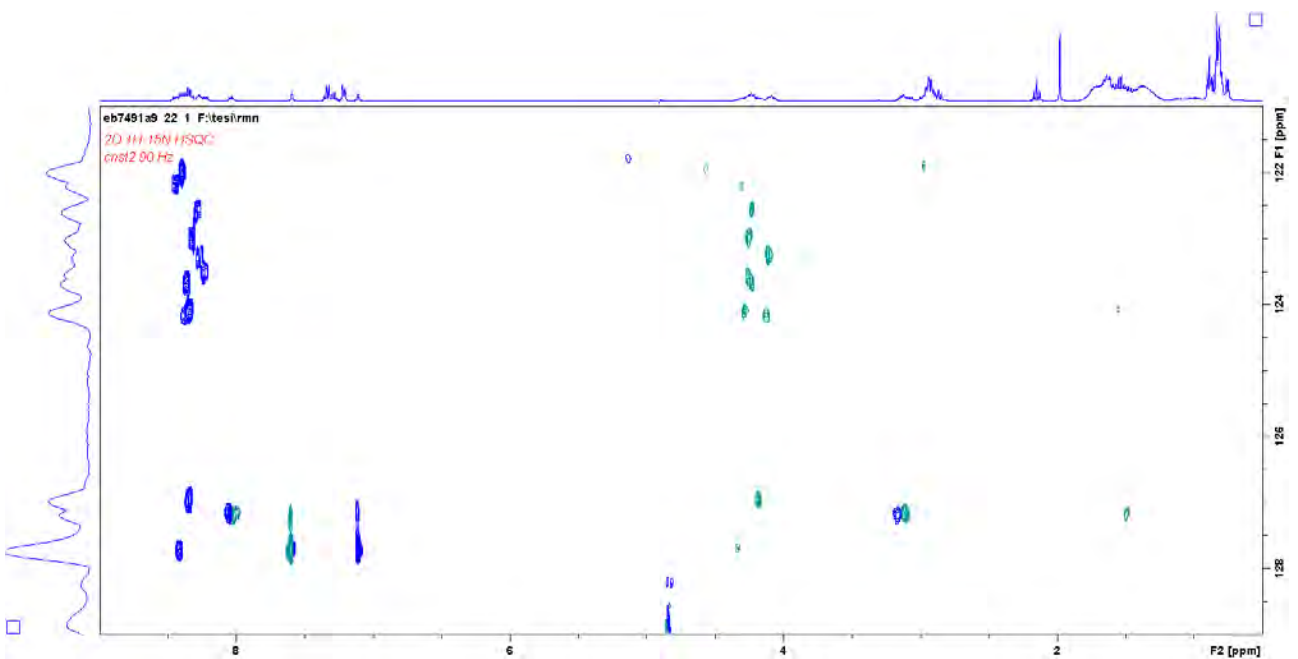
HRMS (m/z)



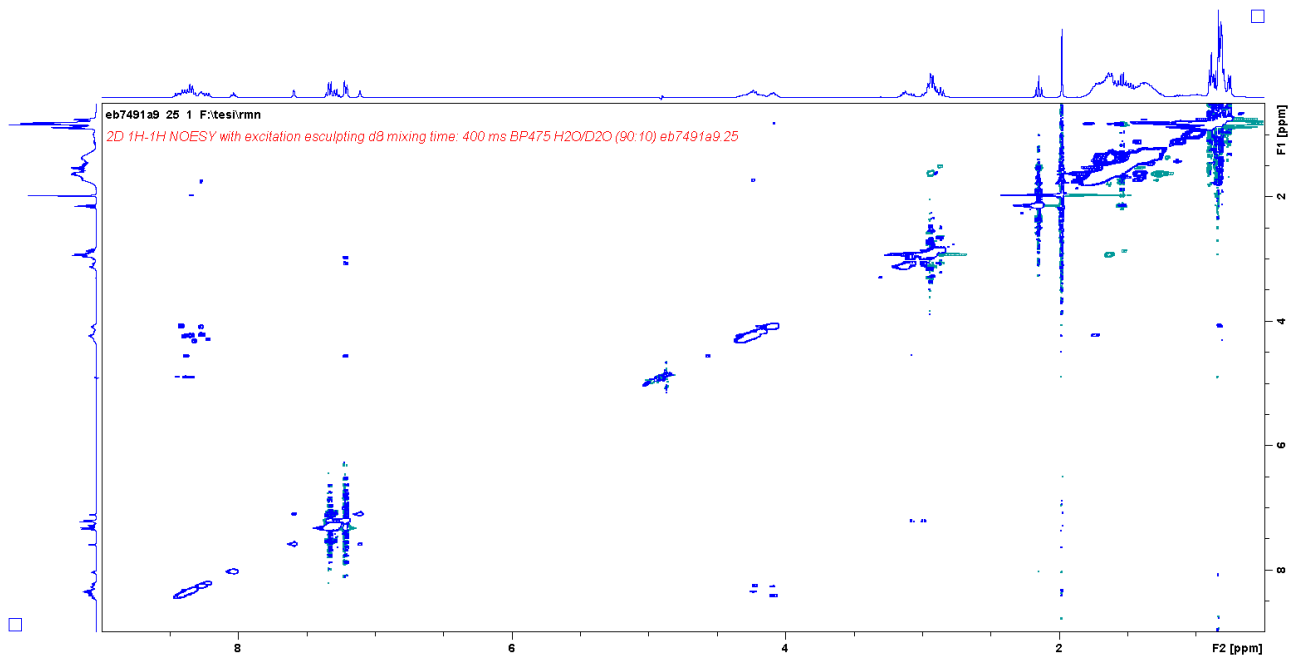
^1H -RMN (400 MHz, tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)) δ (ppm)

Espectre ^1H a 400.13MHz BP475 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) eb7491a9.20

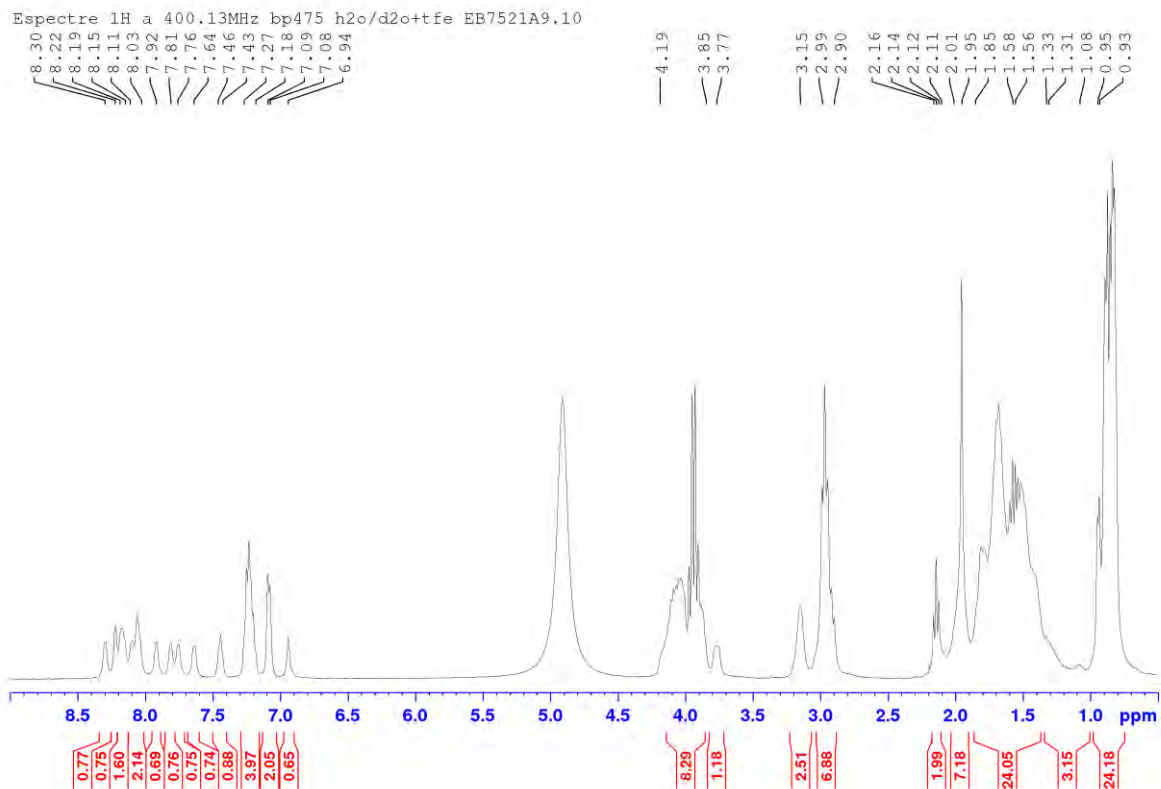


HSQC-TOCSY (400 MHz, tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)HSQC ¹H-¹⁵N (tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)

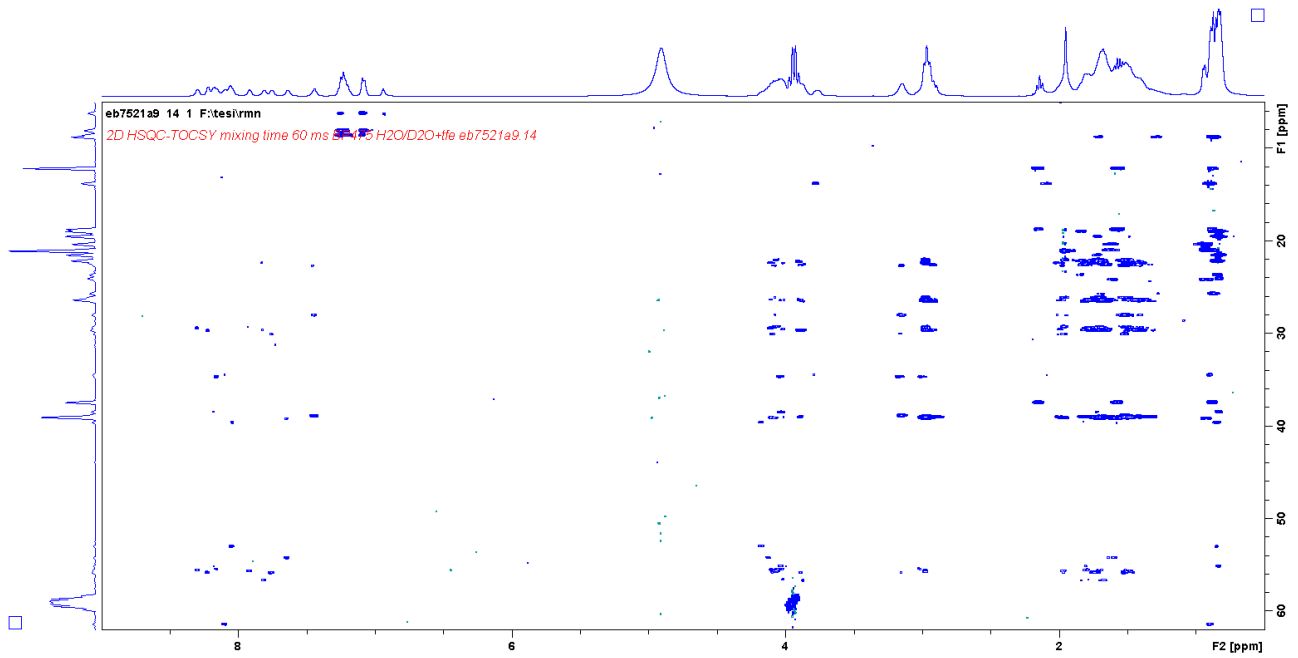
NOESY (400 MHz, tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)



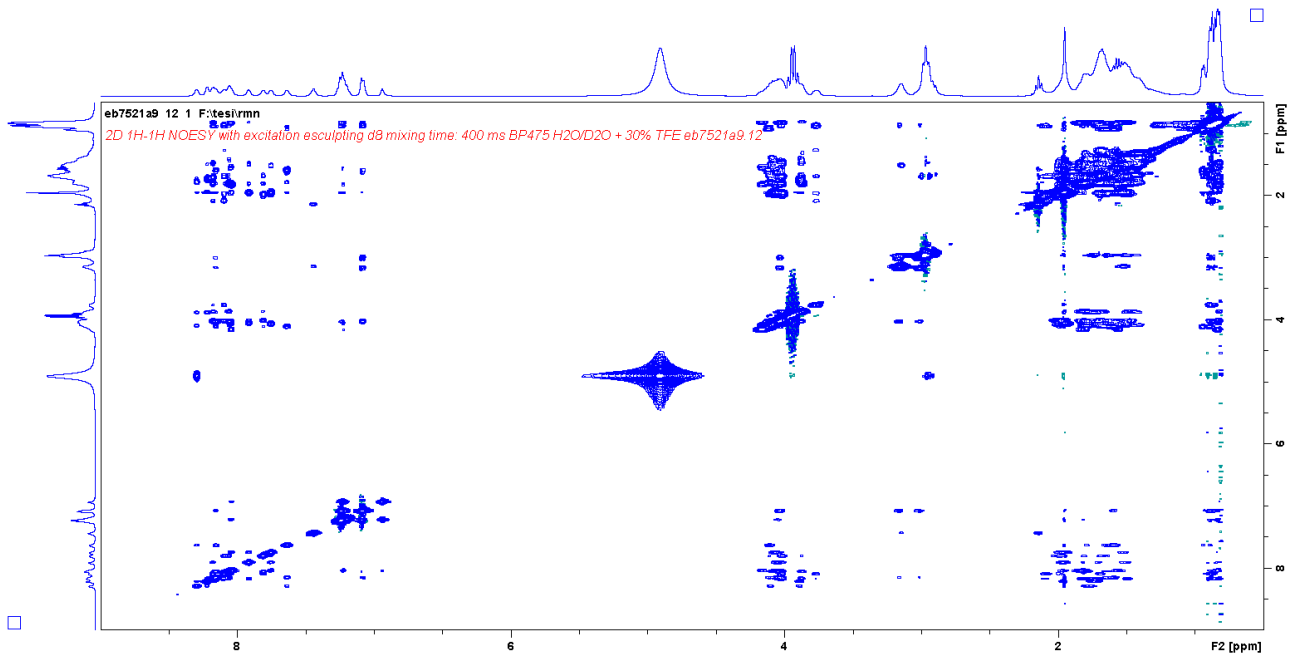
¹H-RMN (400 MHz, 30% CF₃CD₂OD en tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)



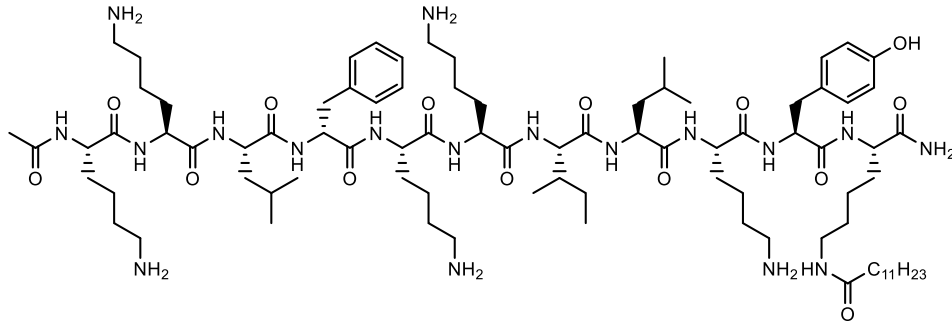
HSQC-TOCSY (400 MHz, 30% CF₃CD₂OD en tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)



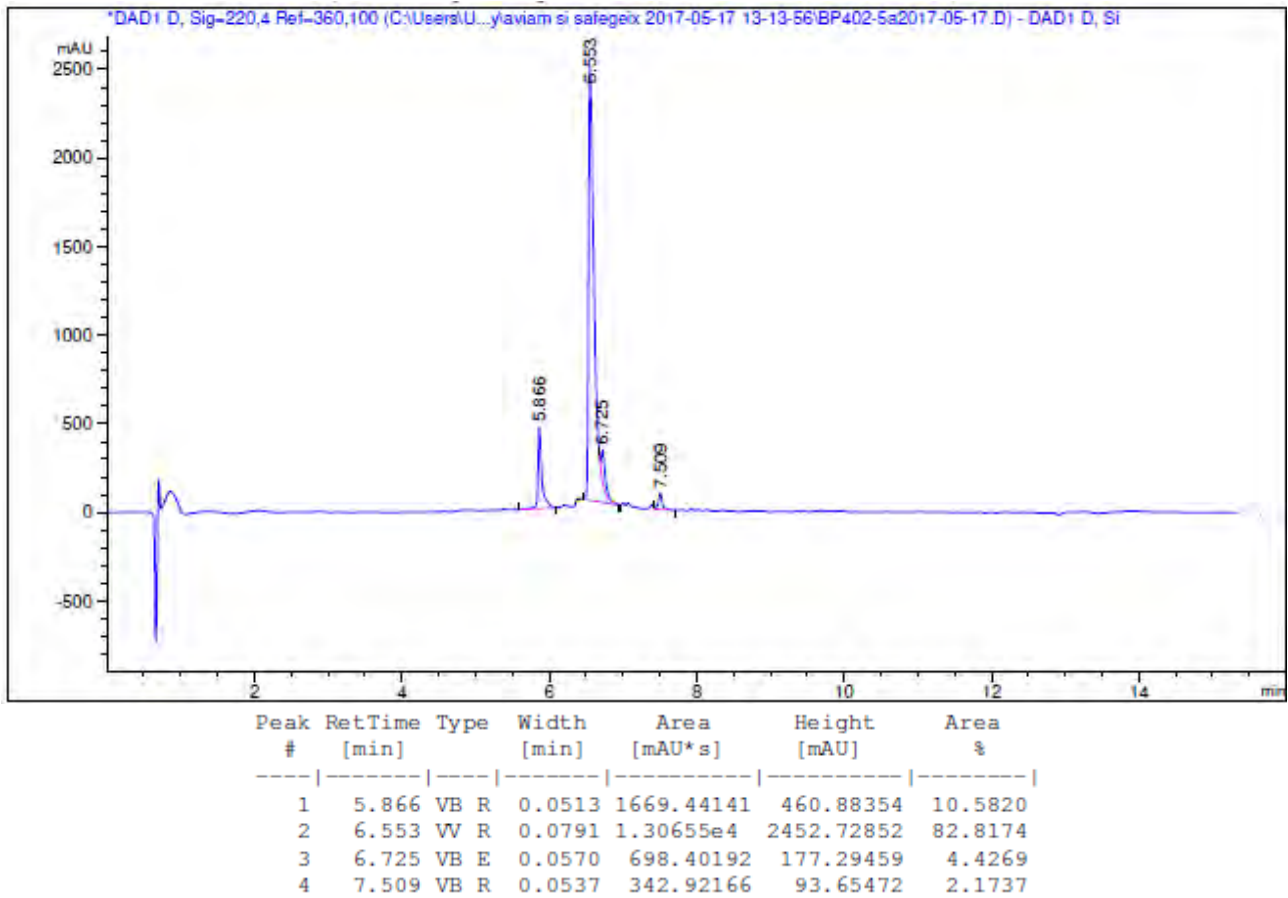
NOESY (400 MHz, 30% CF₃CD₂OD en tampó fosfat 20 mM pH = 6,5 en H₂O/D₂O (90:10)) δ (ppm)

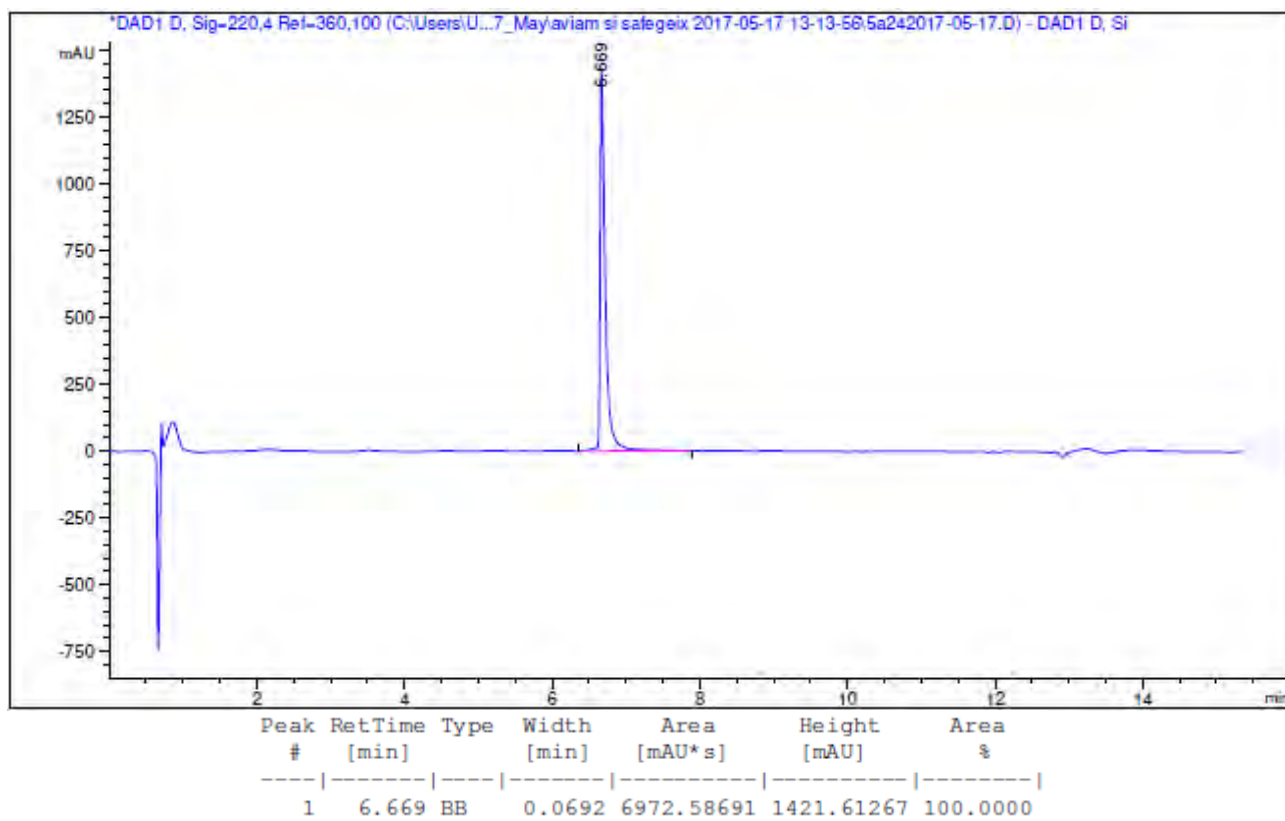
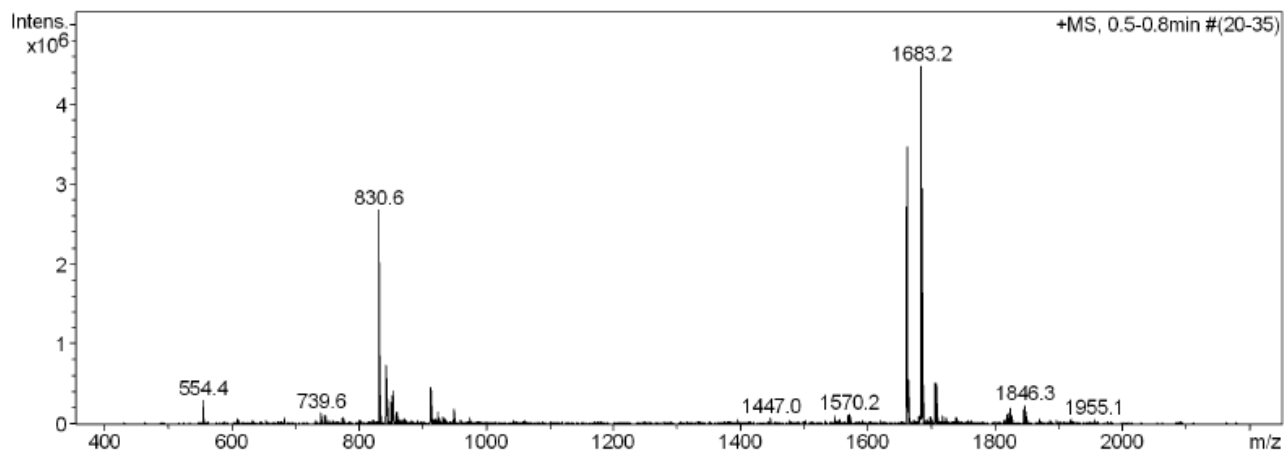


Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₁₁H₂₃)-NH₂ (BP476)

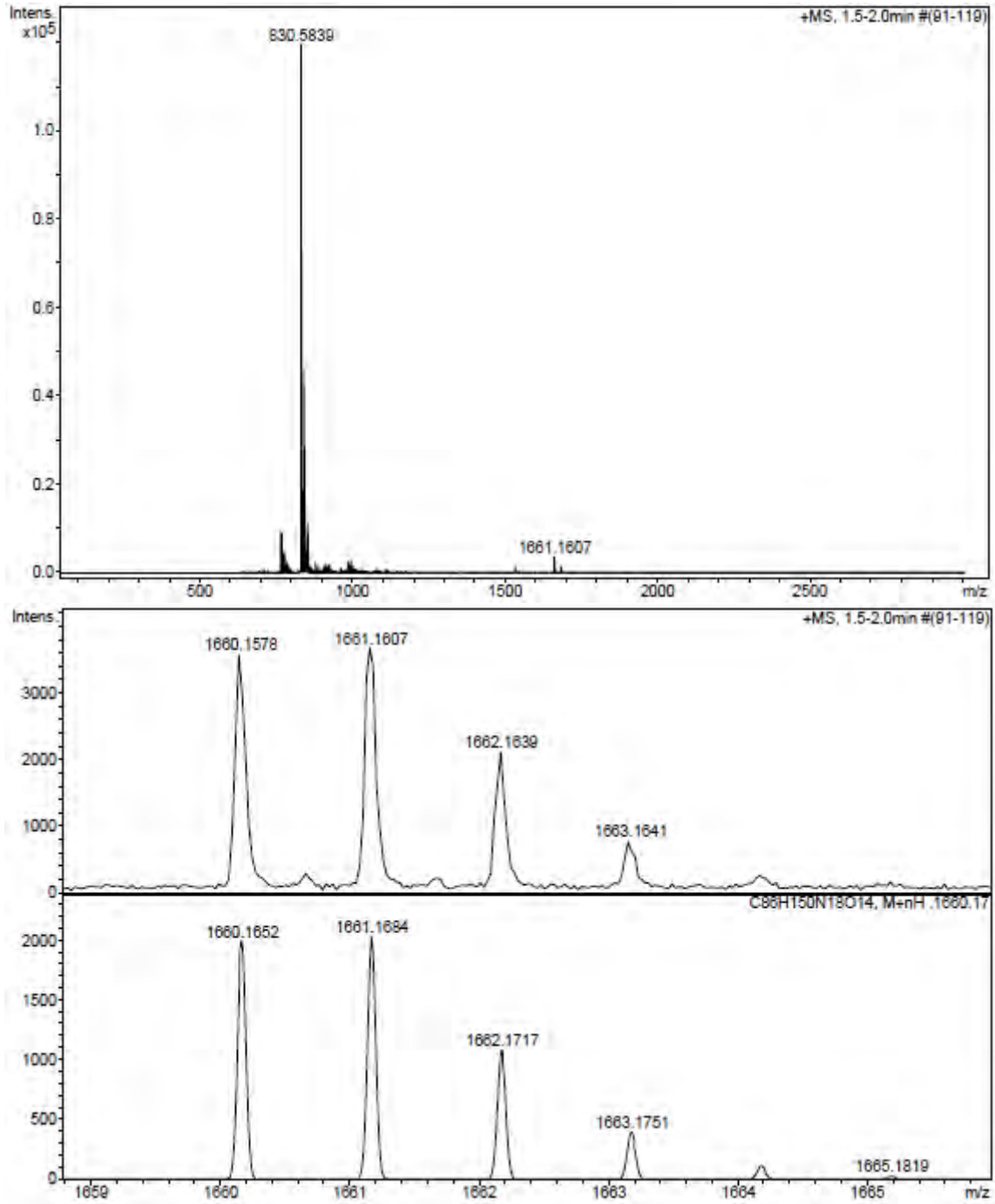


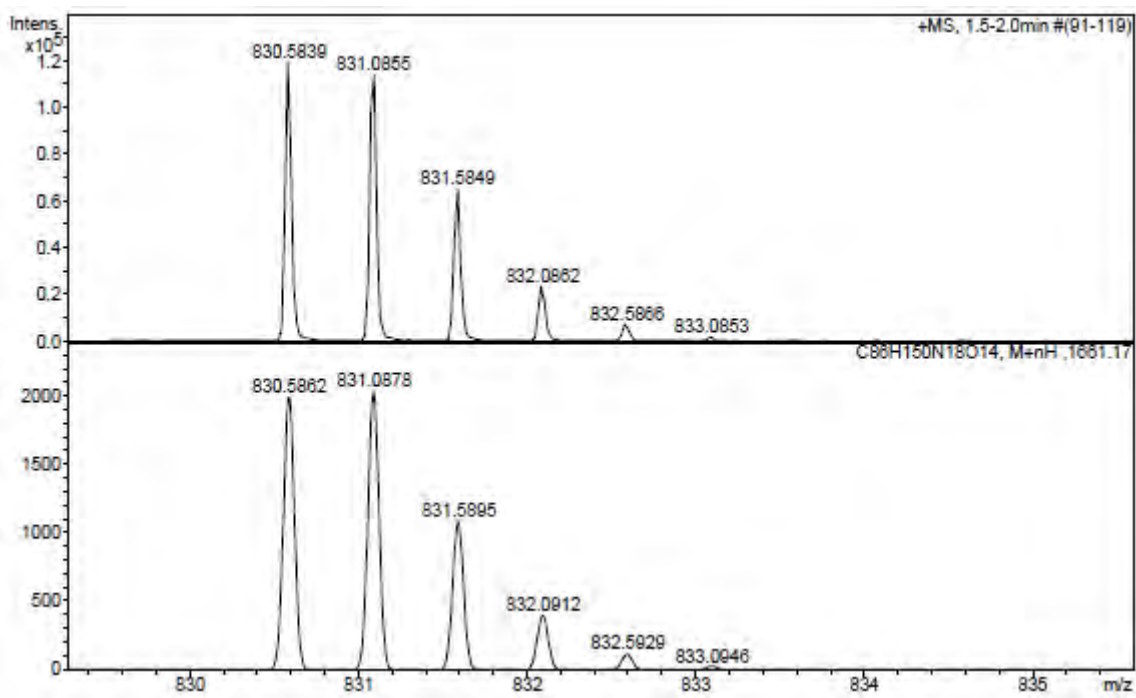
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



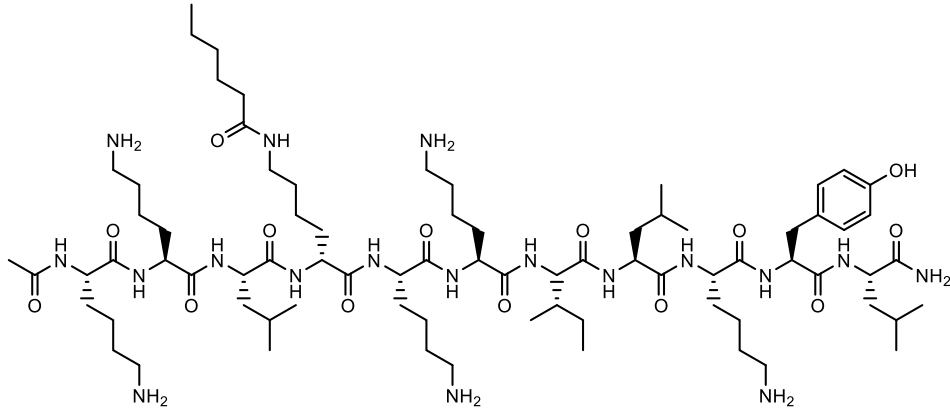
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (*m/z*)

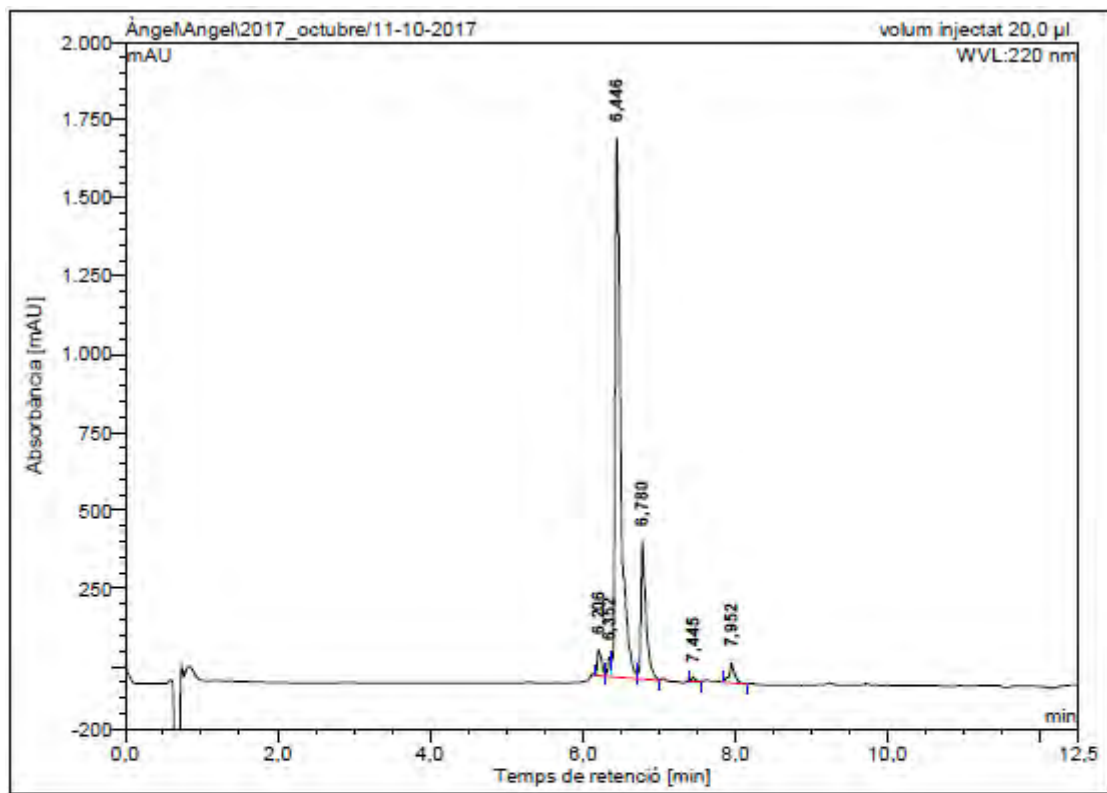




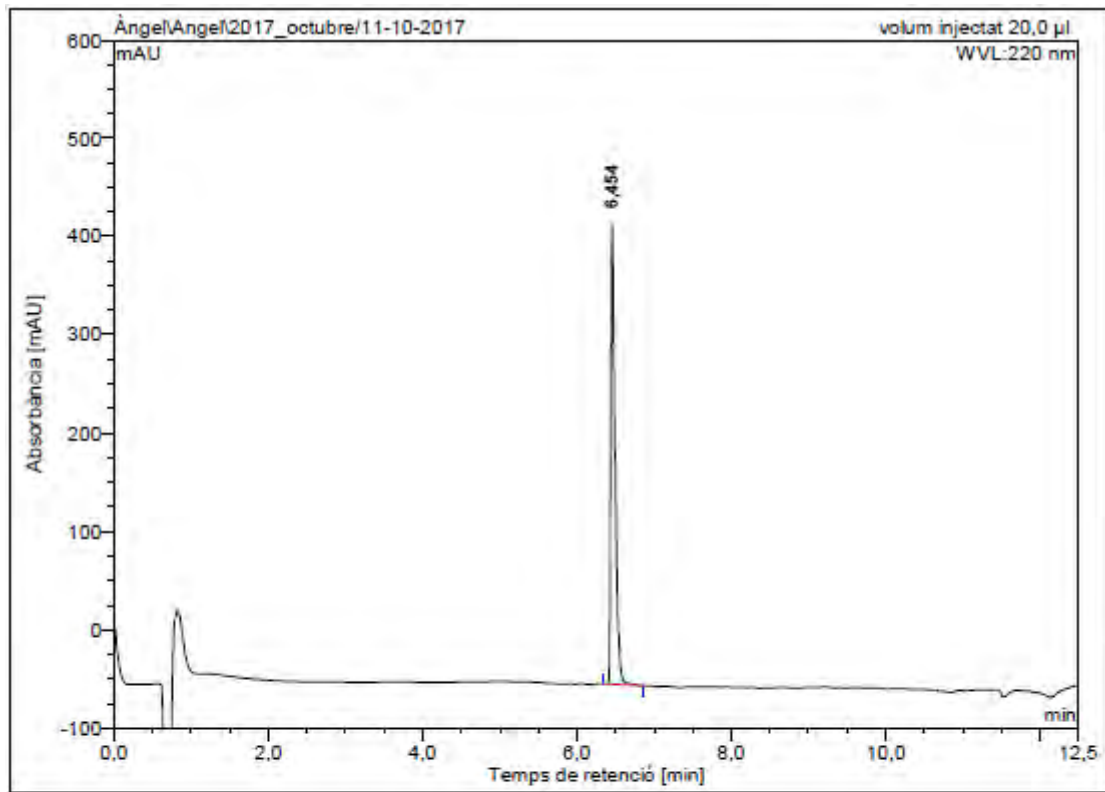
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC₅H₁₁)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP484)



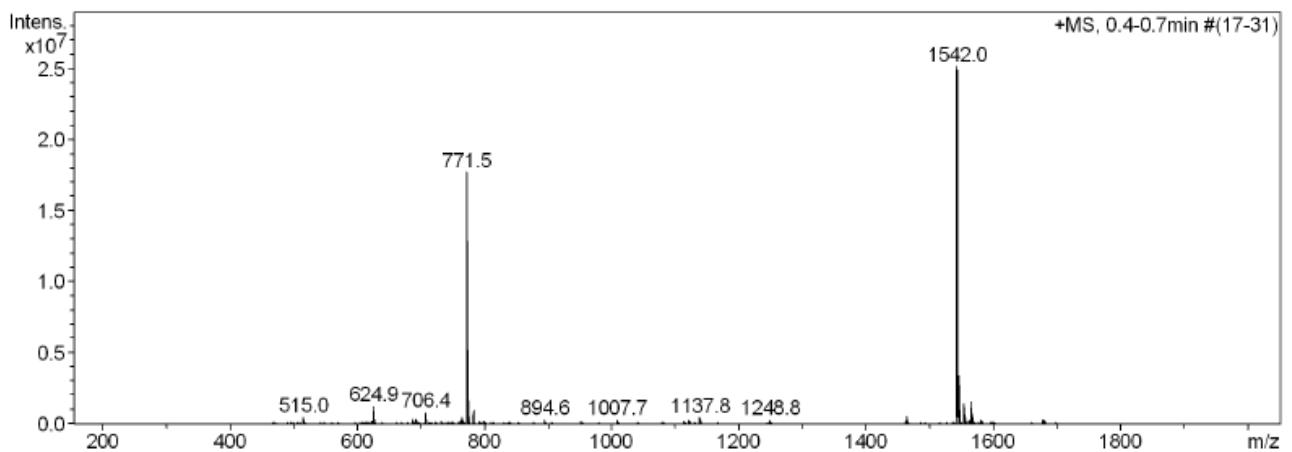
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



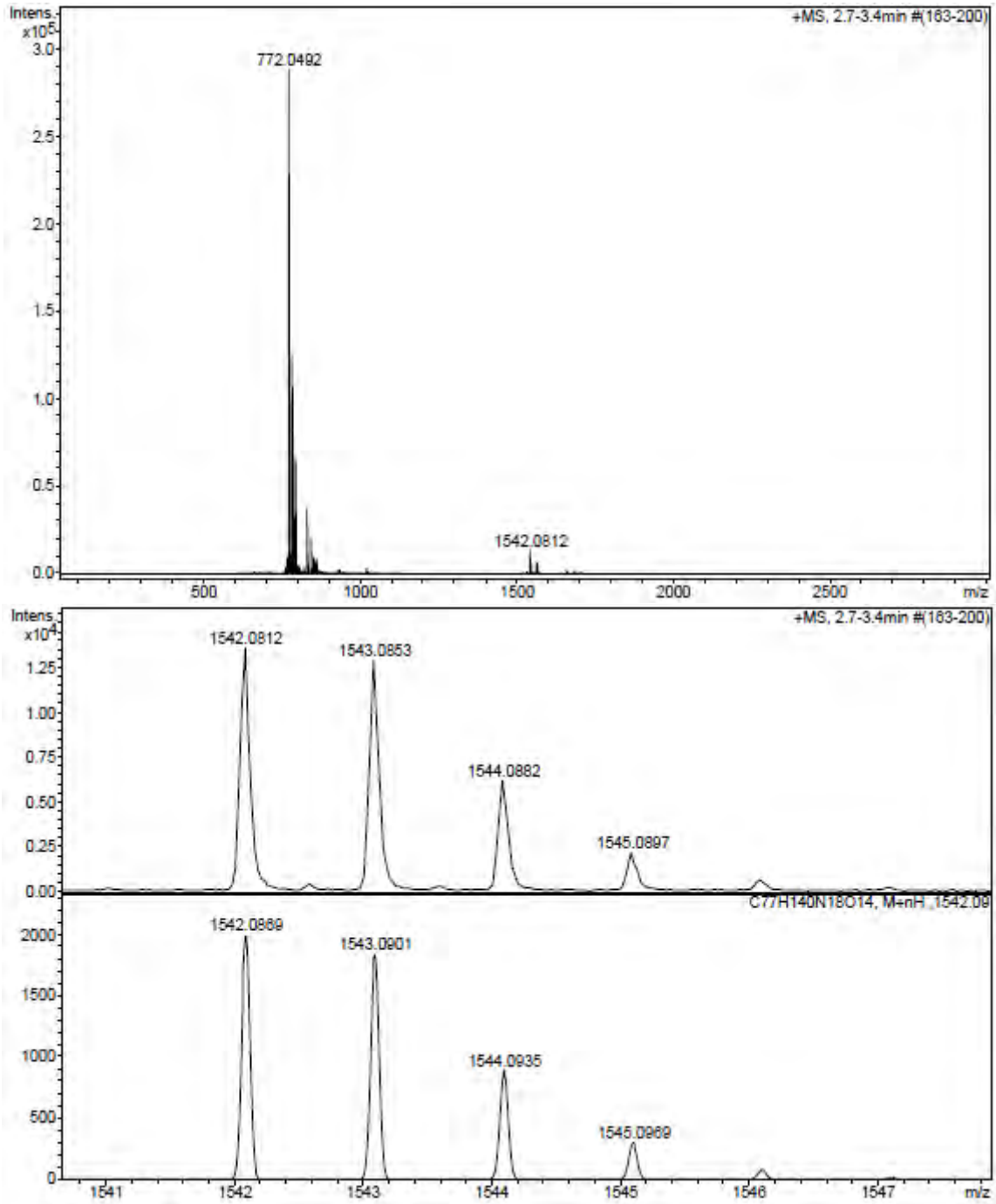
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,21	83,361	5,410	2,75
2	6,35	62,693	3,161	1,61
3	6,45	1725,101	147,916	75,14
4	6,78	441,976	34,458	17,50
5	7,45	13,446	0,734	0,37
6	7,95	63,681	5,177	2,63
Total:		2390,257	196,857	100,00

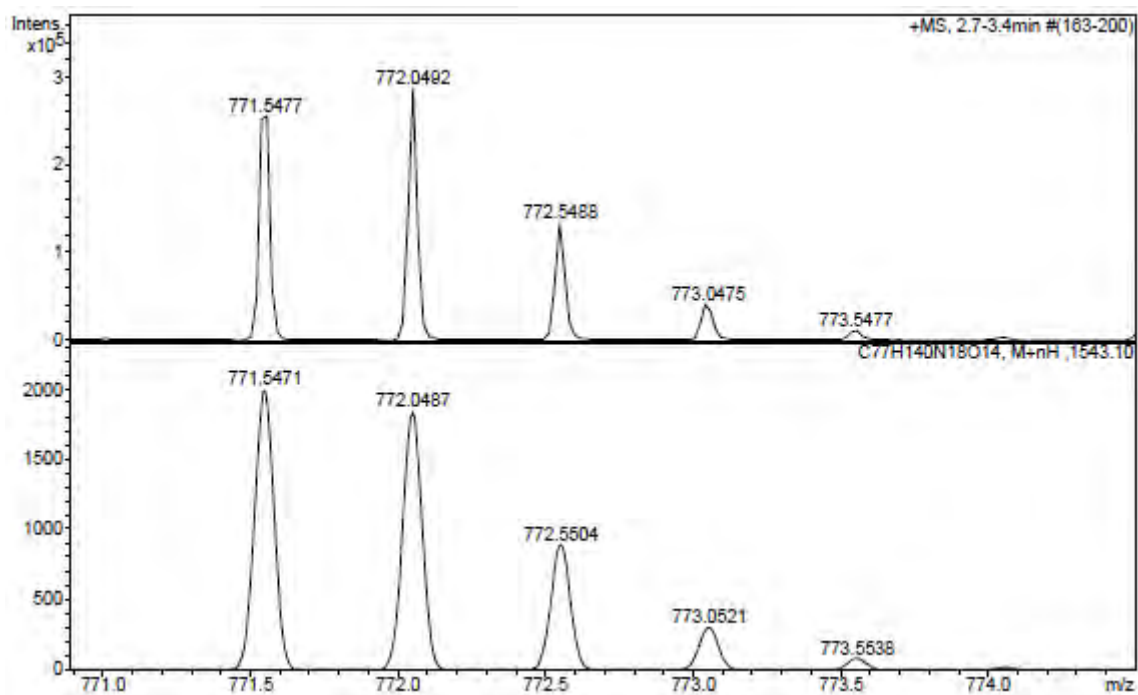
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,45	467,768	30,006	100,00
Total:		467,768	30,006	100,00

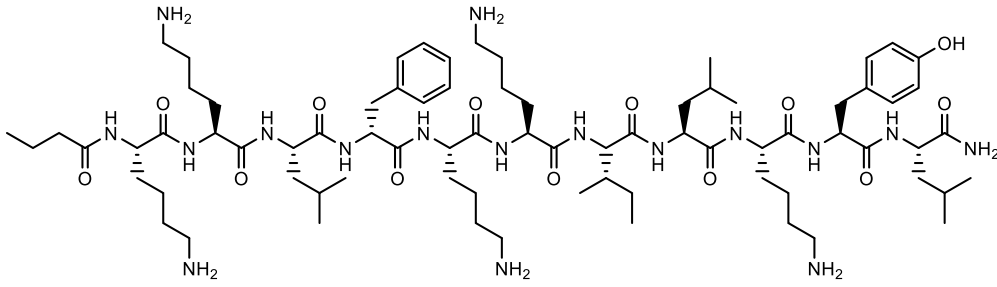
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

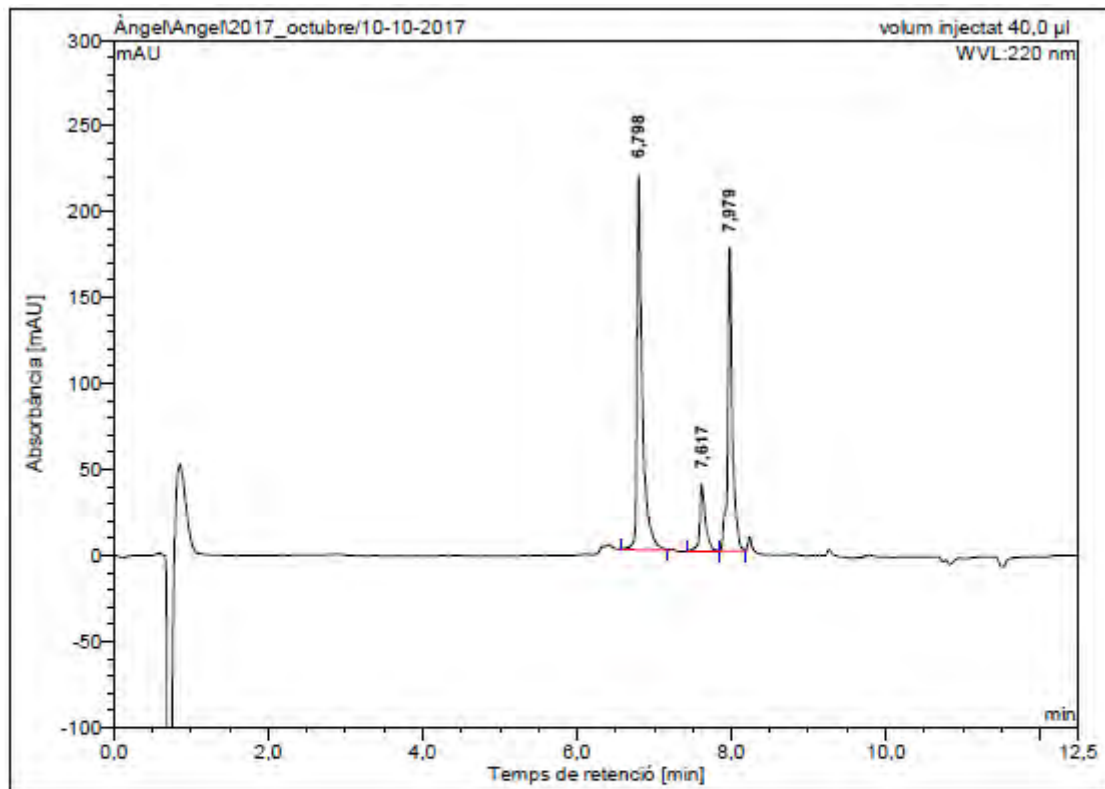




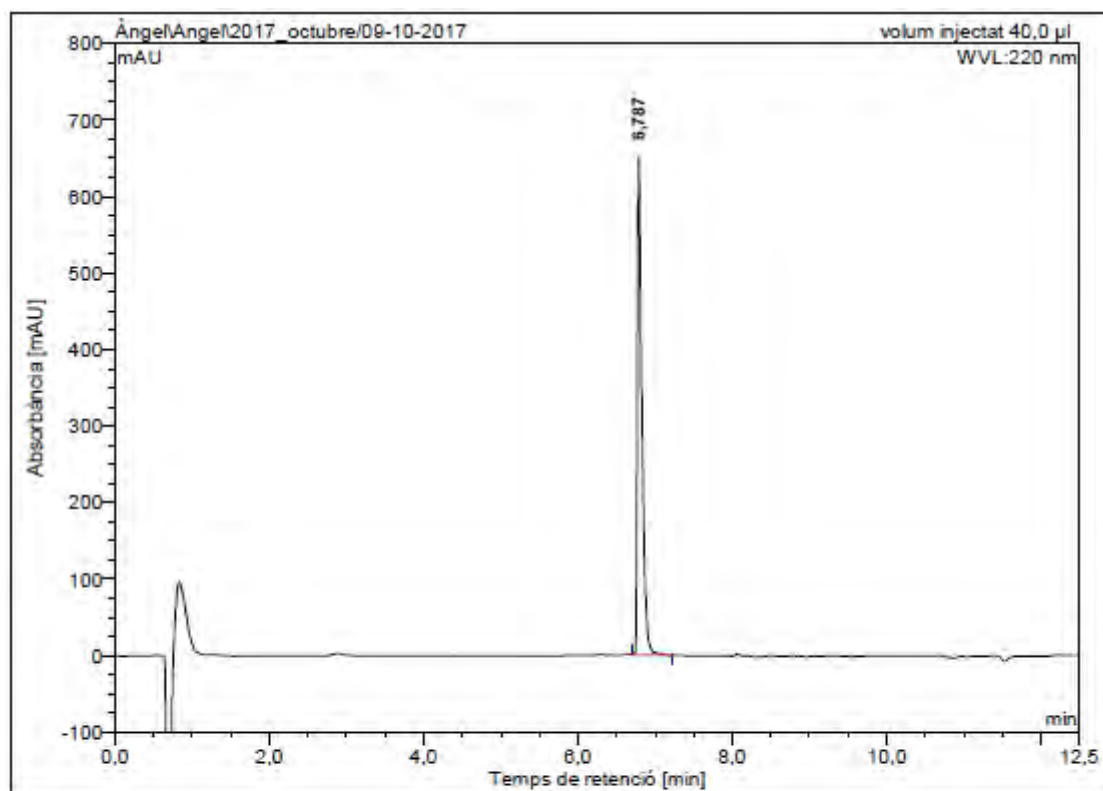
C₃H₇CO-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP485)



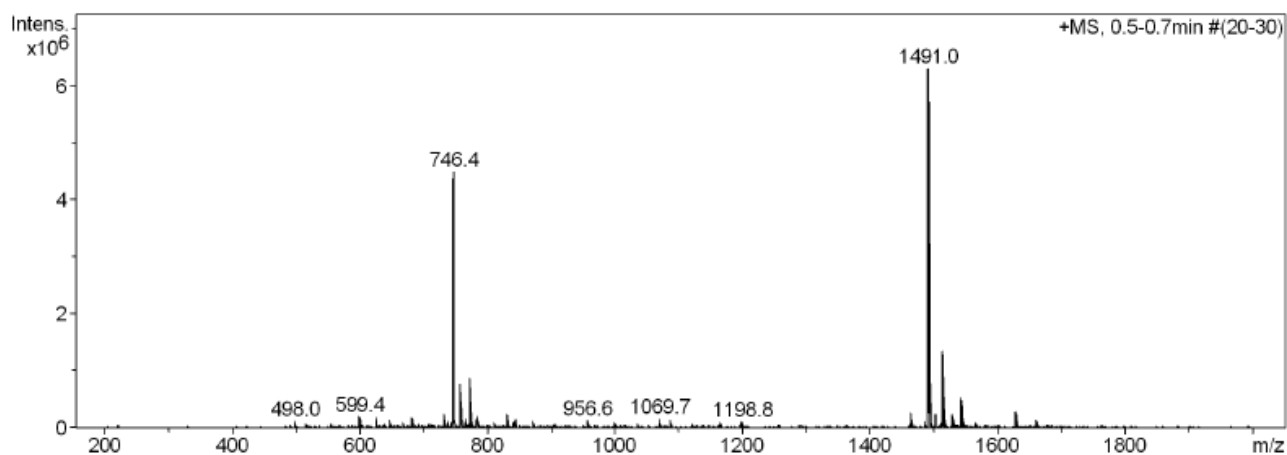
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



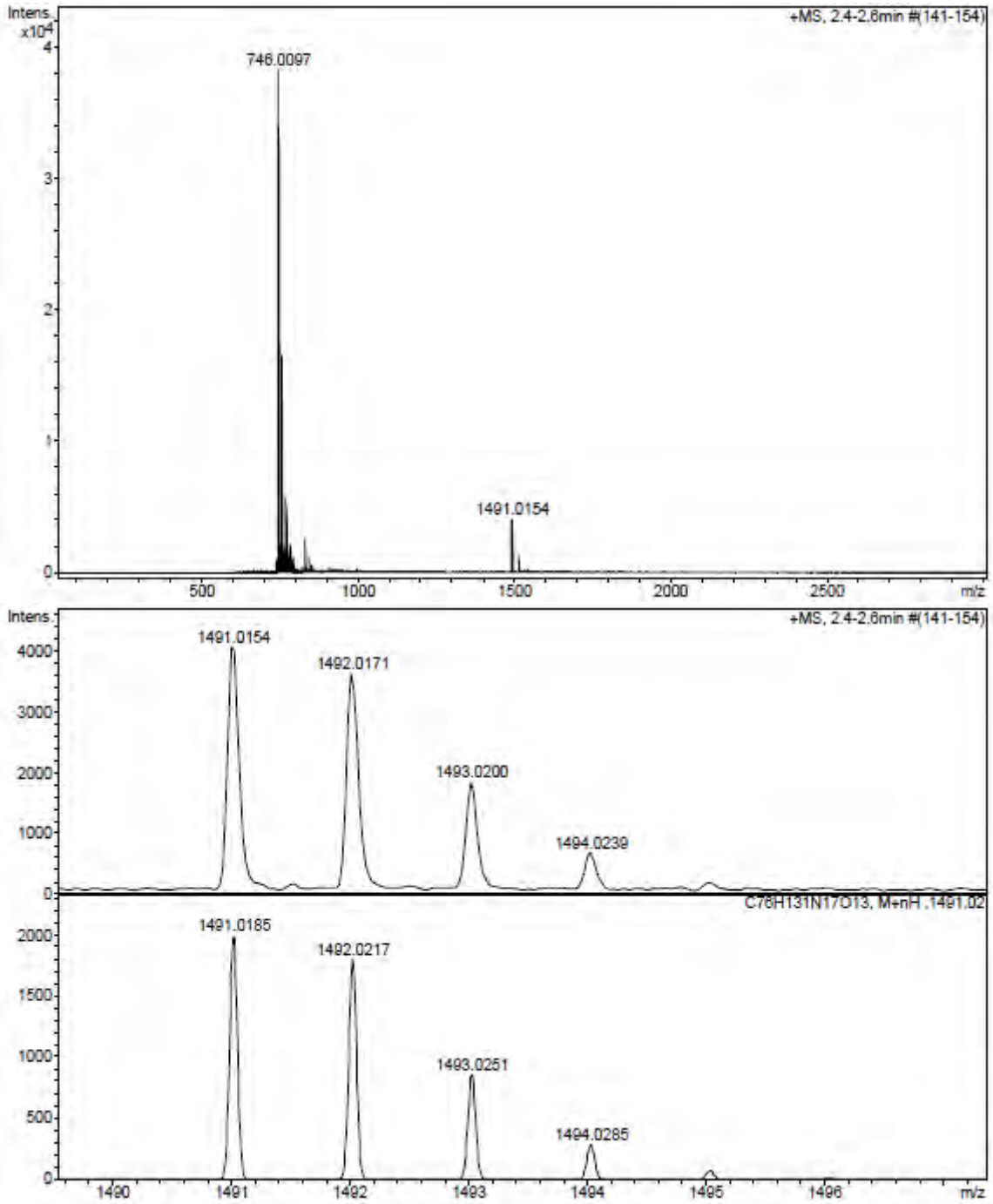
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,80	218,320	17,258	52,25
2	7,62	38,563	3,368	10,20
3	7,98	176,249	12,401	37,55
Total:		433,132	33,026	100,00

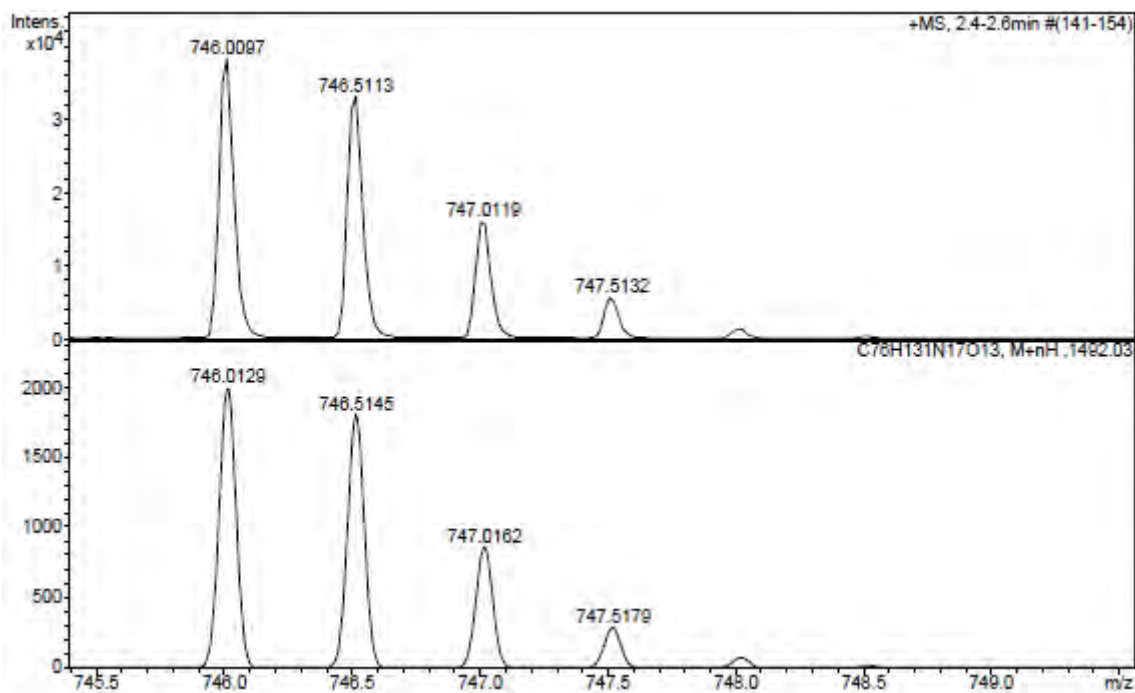
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,79	651,352	44,377	100,00
Total:		651,352	44,377	100,00

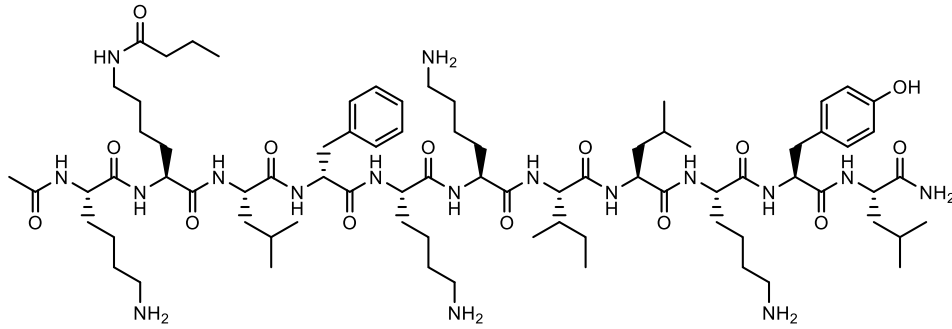
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

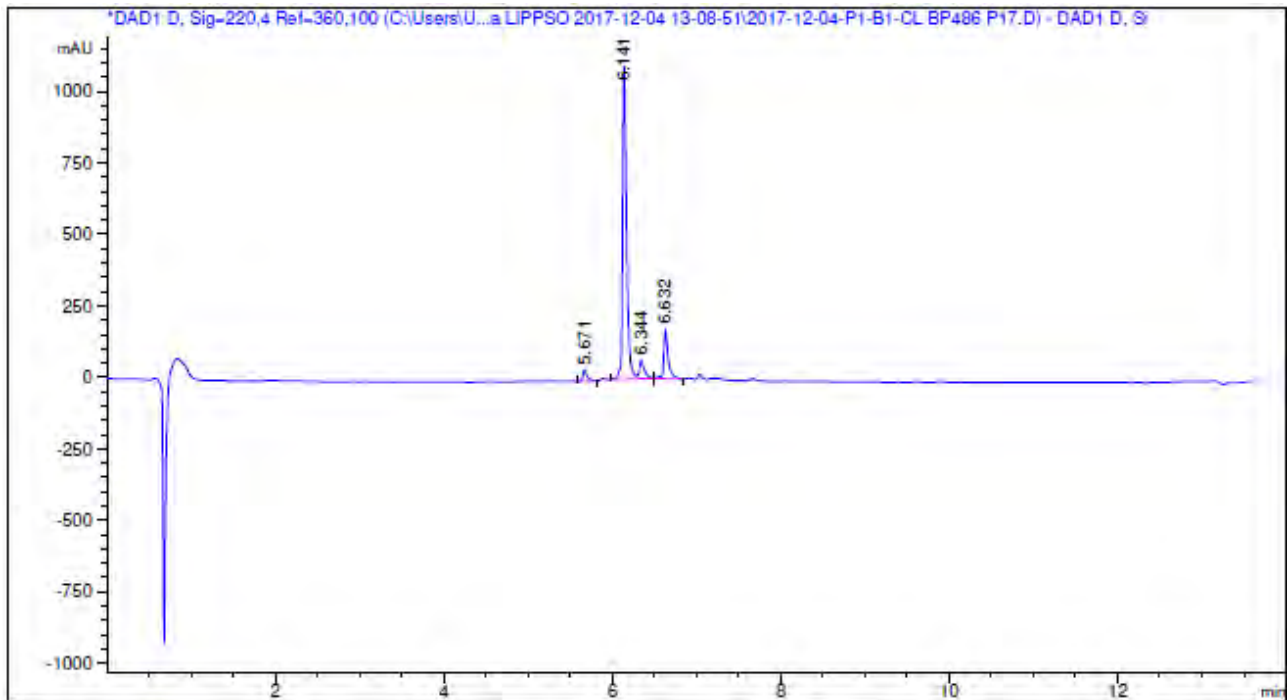




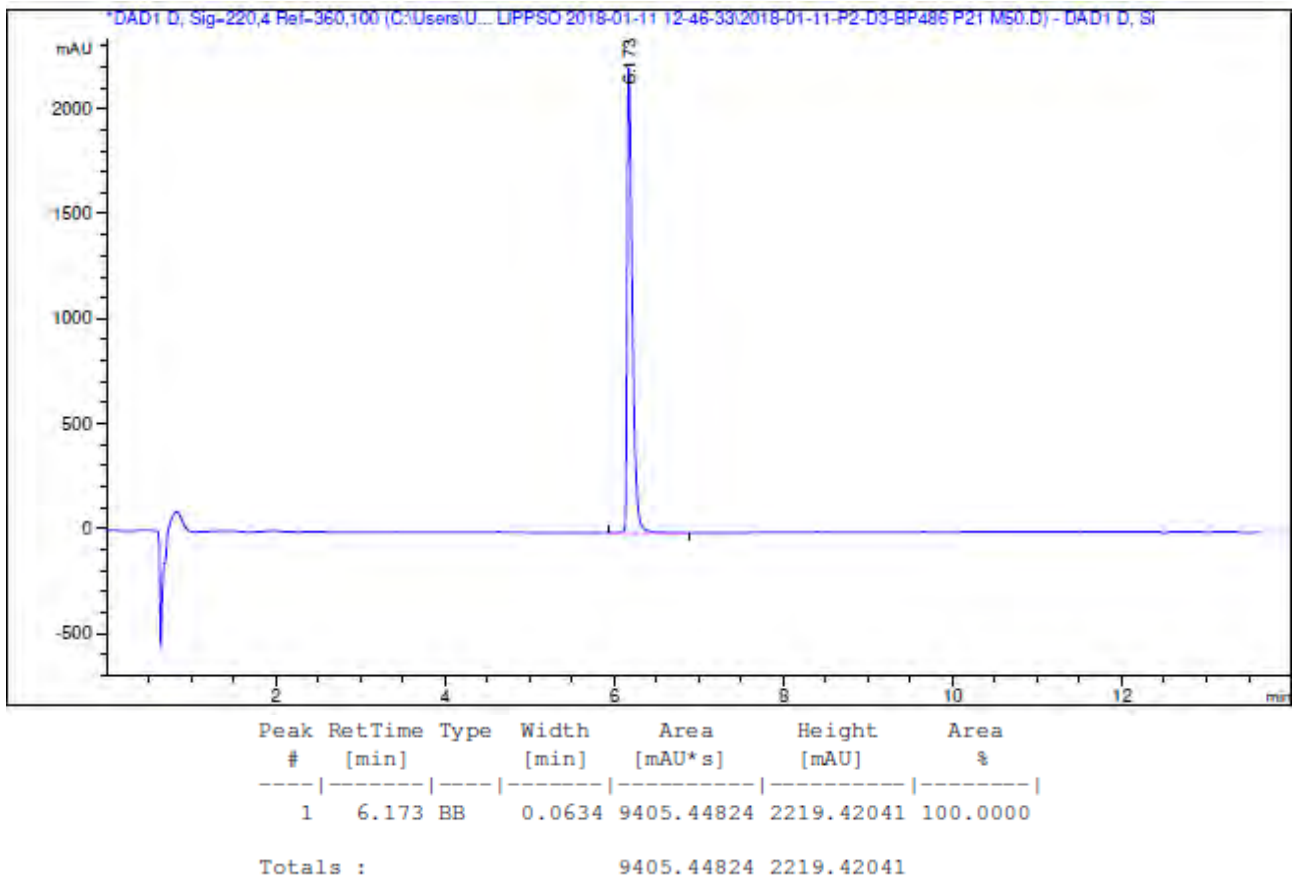
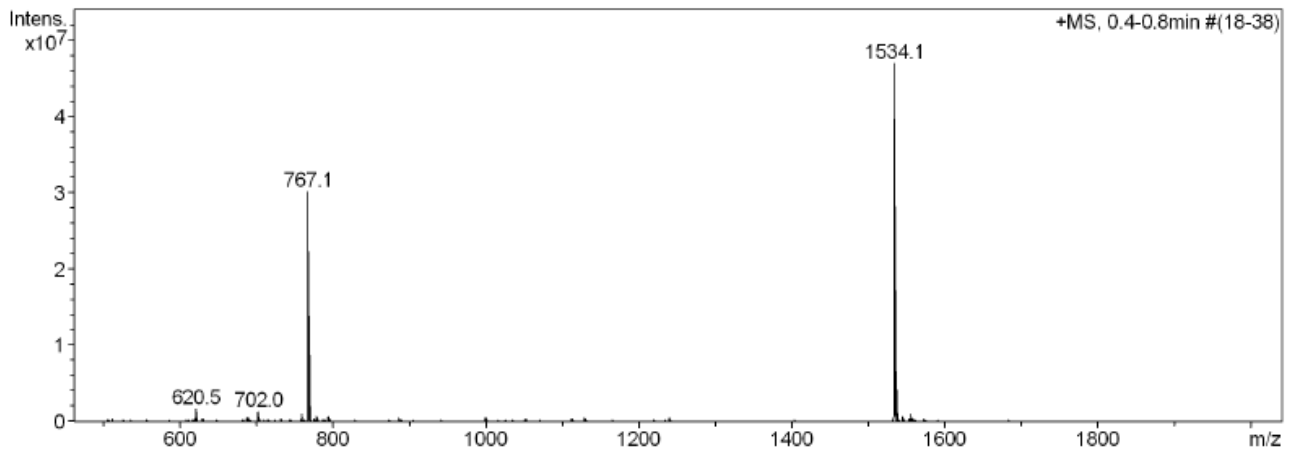
Ac-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP486)



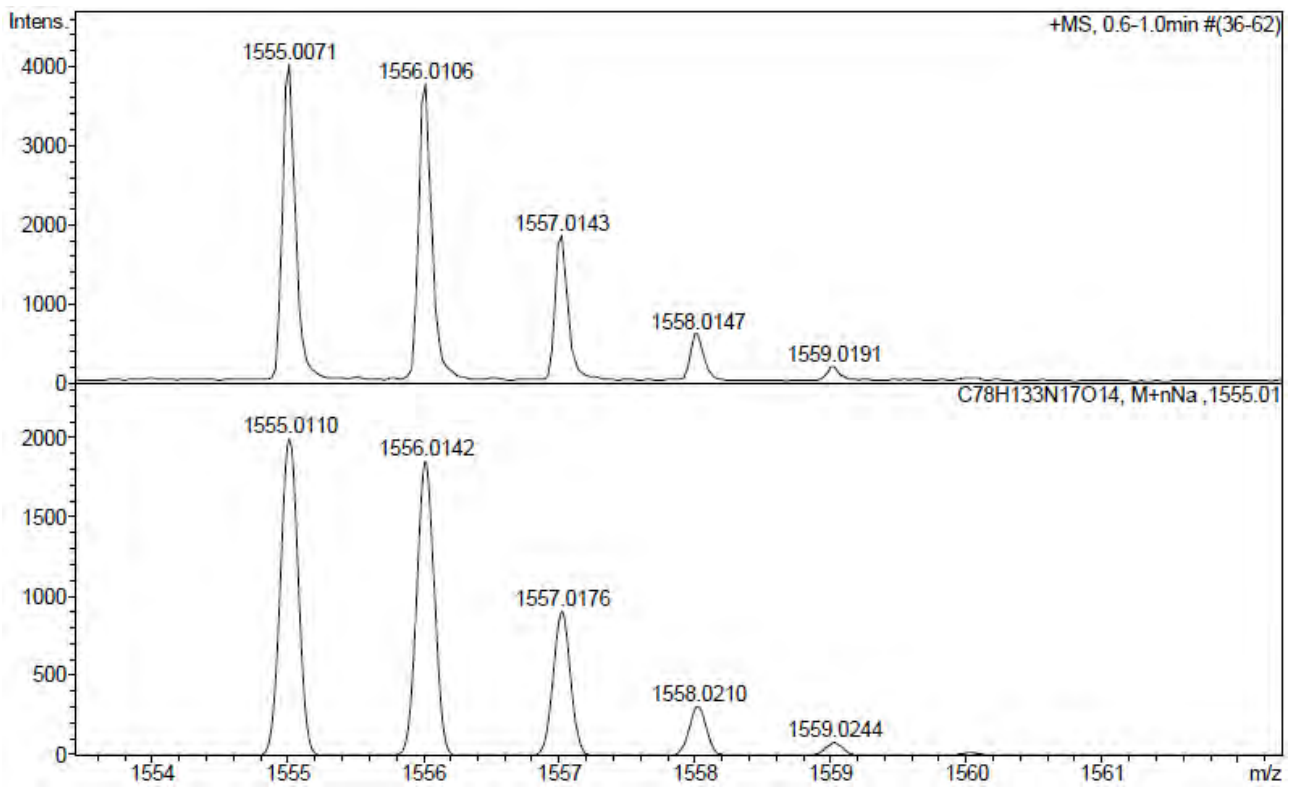
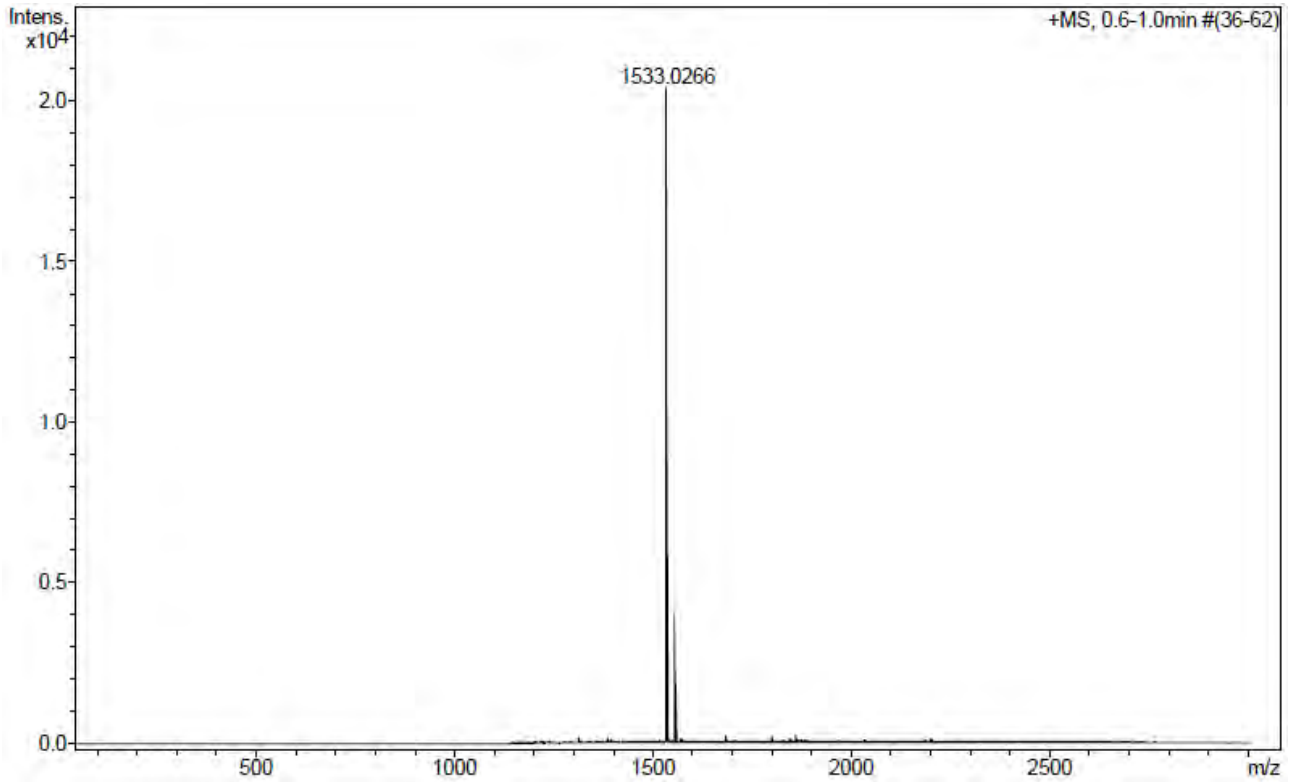
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

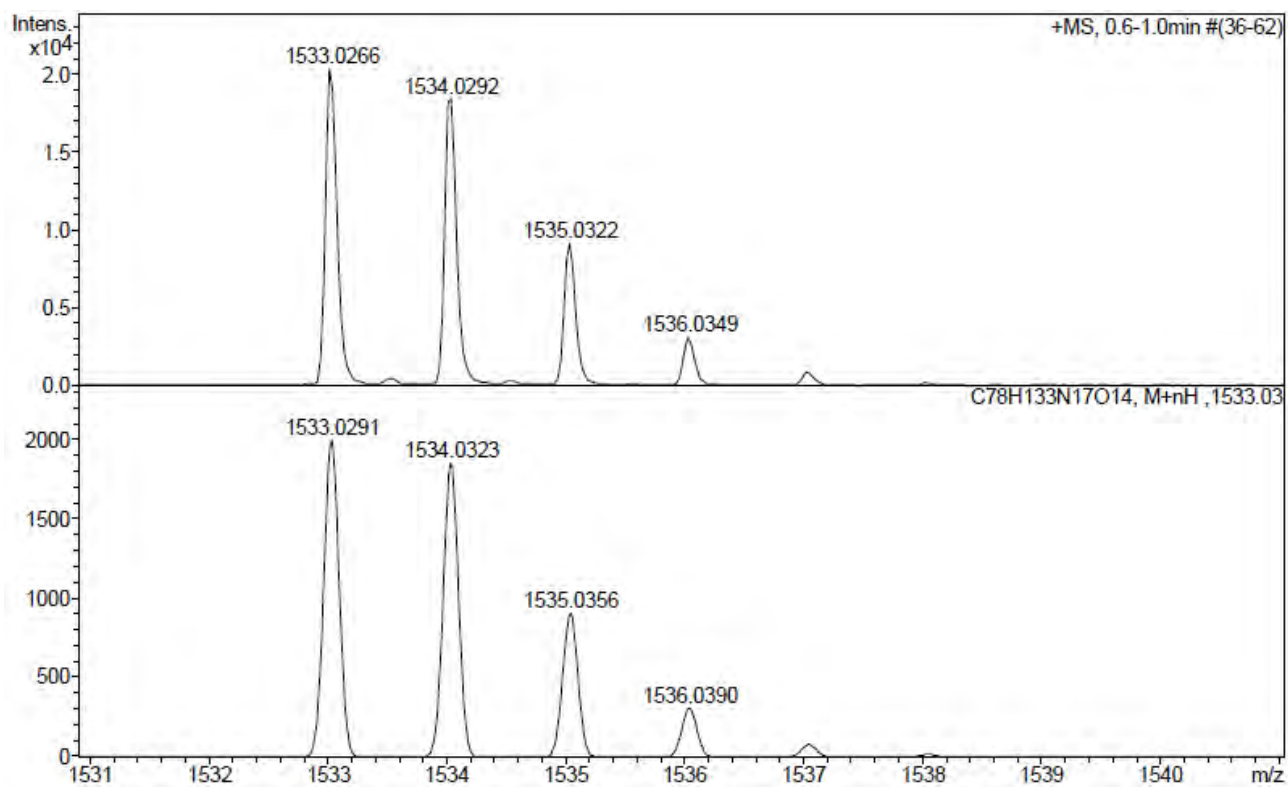


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.671	BB	0.0522	143.78764	39.70819	3.1093
2	6.141	VV R	0.0479	3568.24097	1098.94568	77.1617
3	6.344	VB E	0.0628	284.22037	63.95224	6.1461
4	6.632	VB R	0.0526	628.11932	172.08841	13.5828
Totals :				4624.36830	1374.69452	

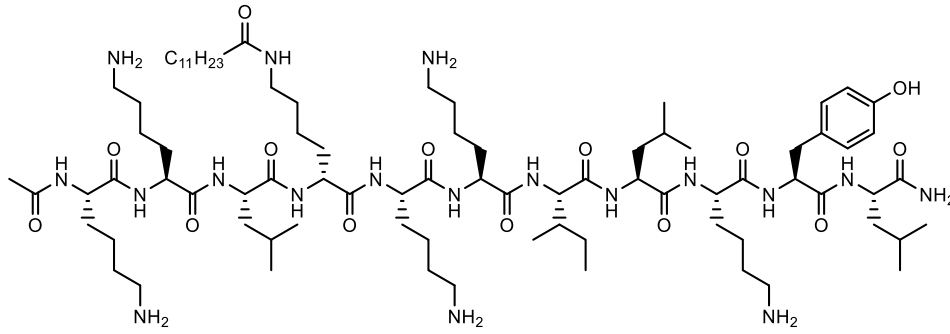
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

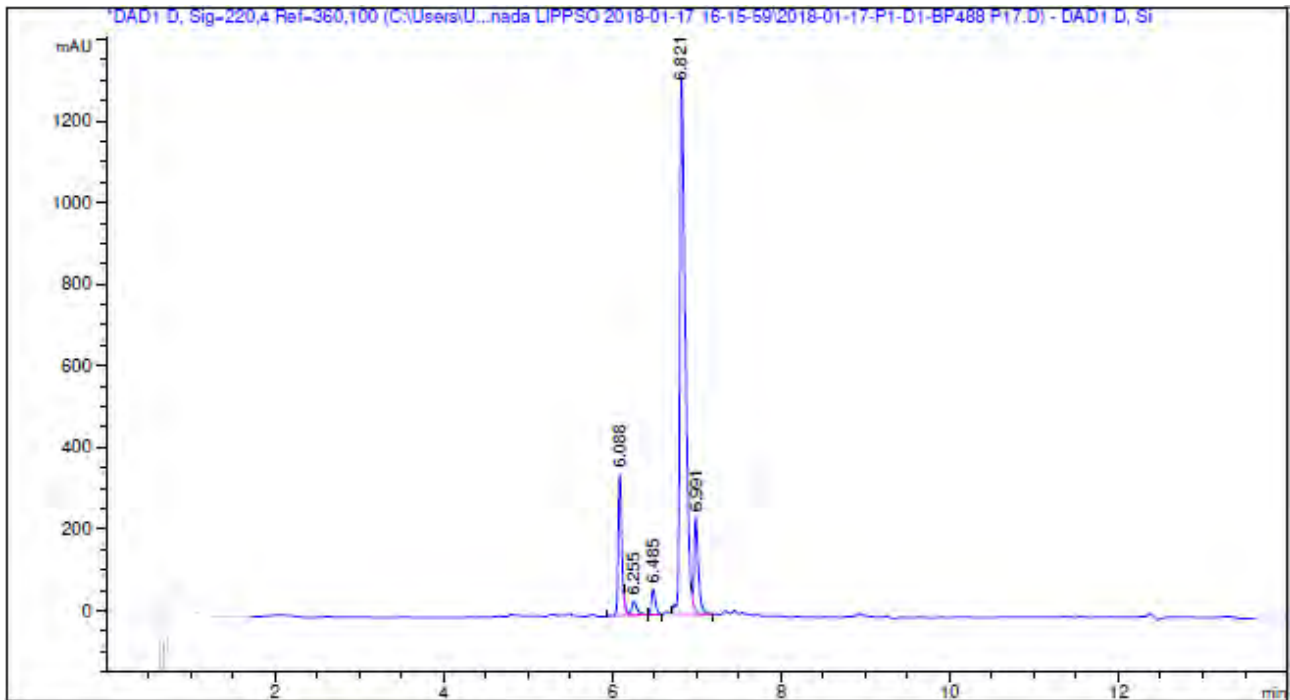




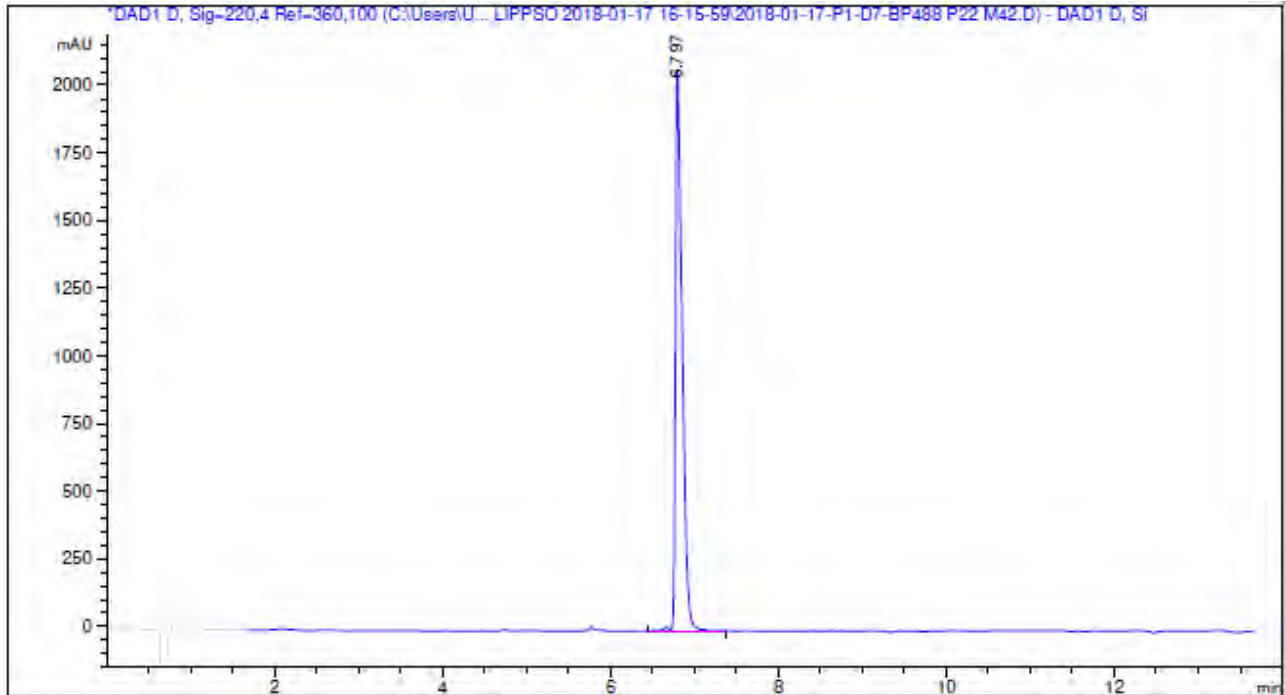
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP488)



HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

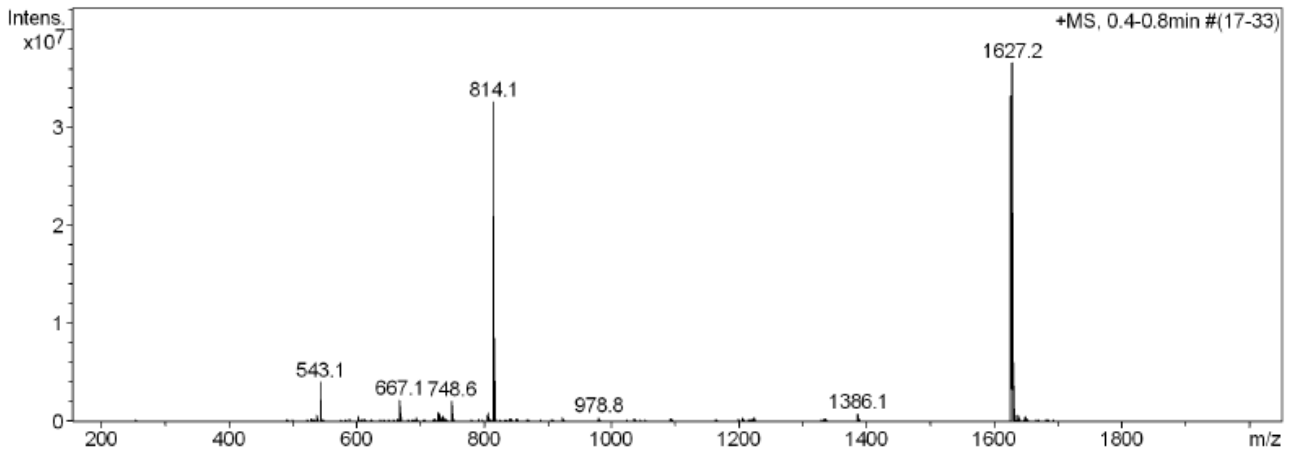


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.088	BV R	0.0441	1046.76038	347.67551	12.7178
2	6.255	VB E	0.0670	154.87279	33.46687	1.8817
3	6.485	BB	0.0487	202.15788	62.57148	2.4562
4	6.821	VV R	0.0686	6048.61426	1316.82983	73.4888
5	6.991	VB E	0.0507	778.25232	228.61604	9.4555
Totals :				8230.65762	1989.15973	

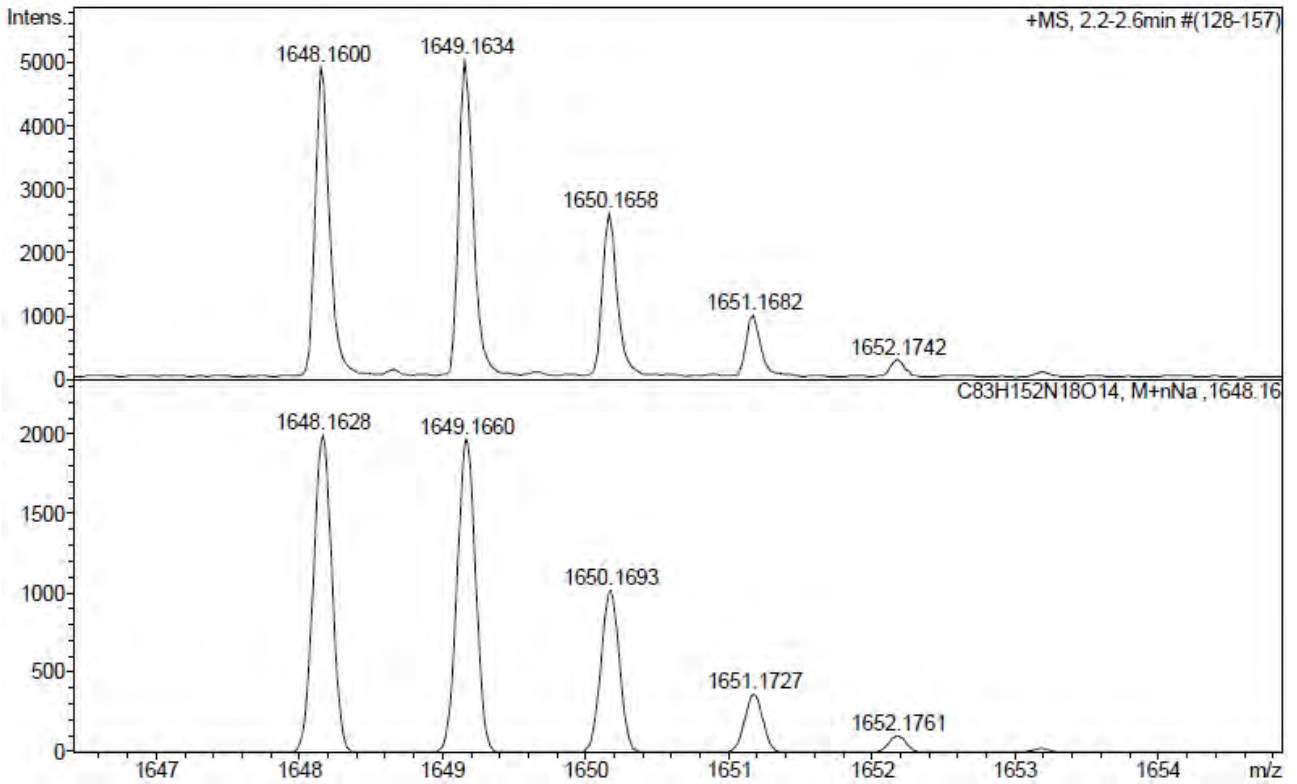
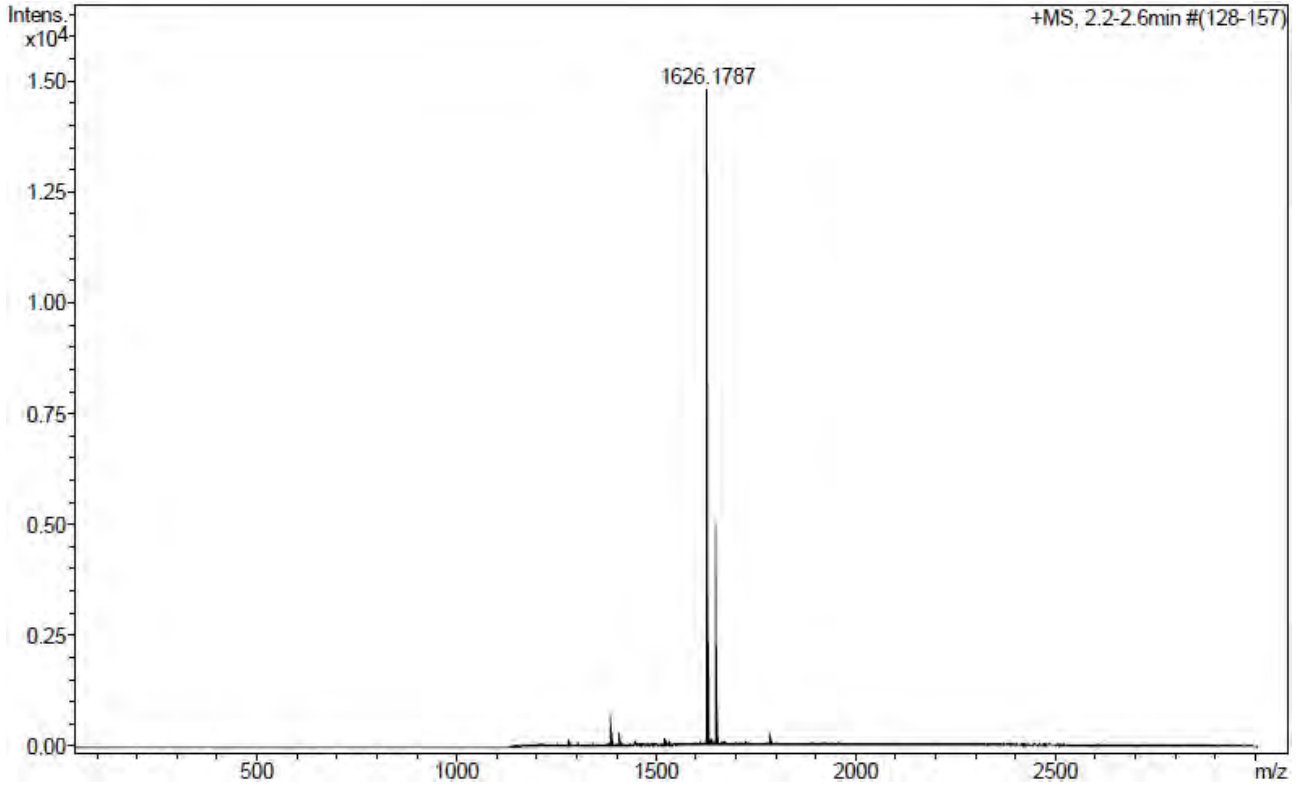
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

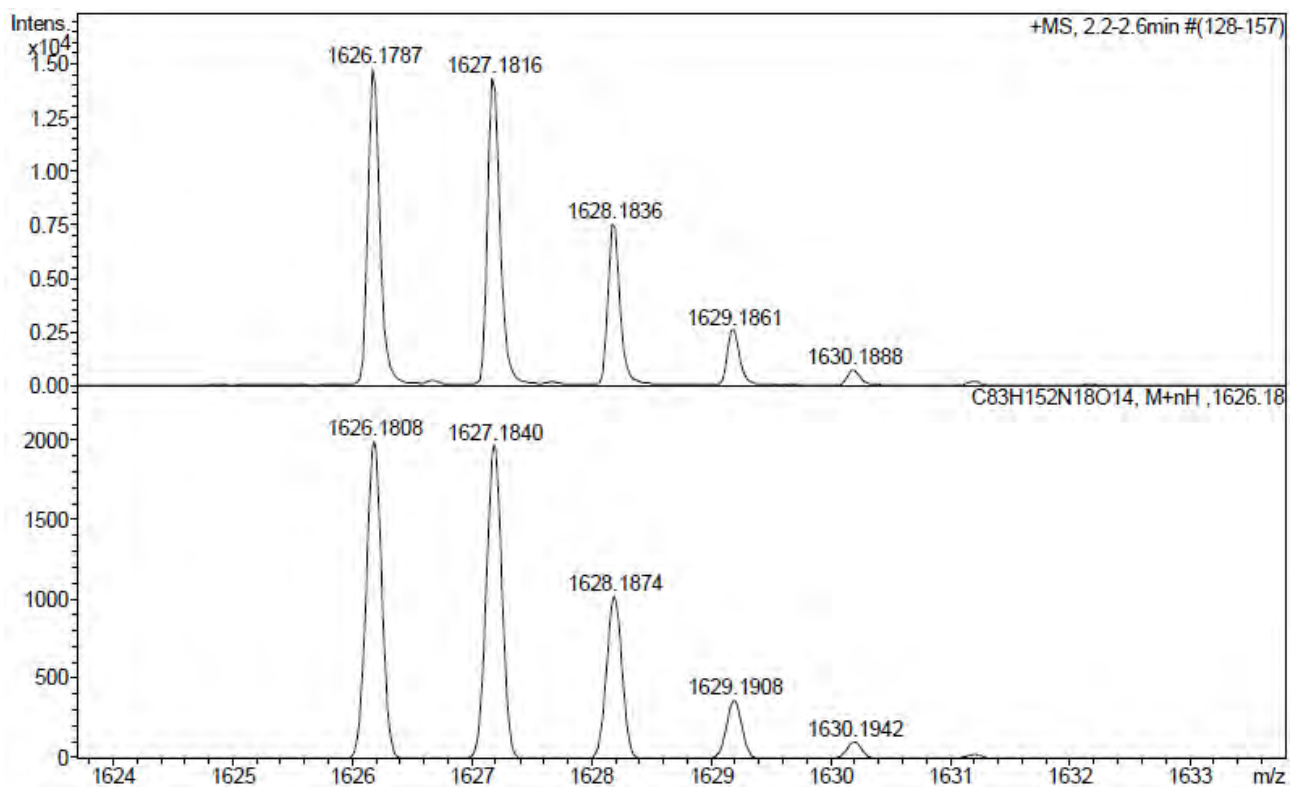
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.797	VB R	0.0858	1.14854e4	2066.89282	100.0000

Totals : 1.14854e4 2066.89282

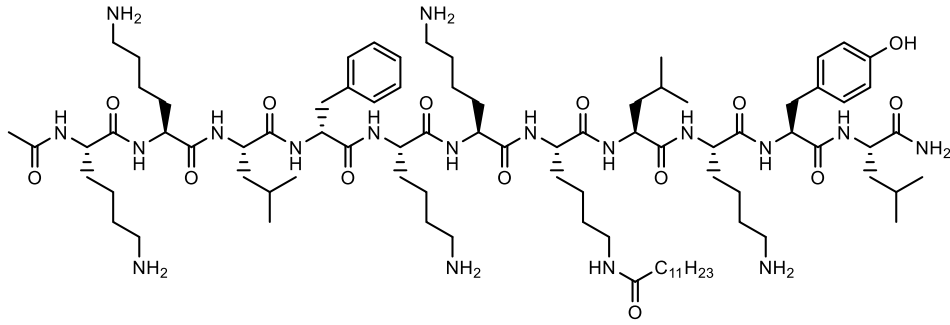
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

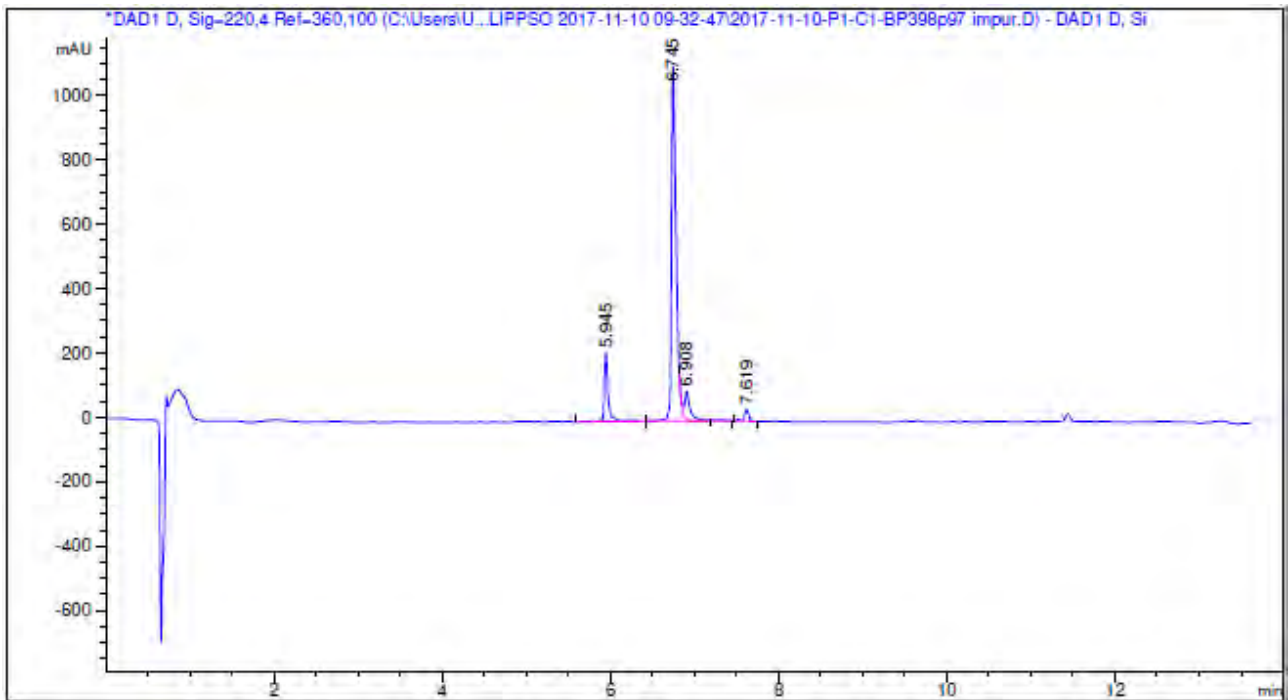




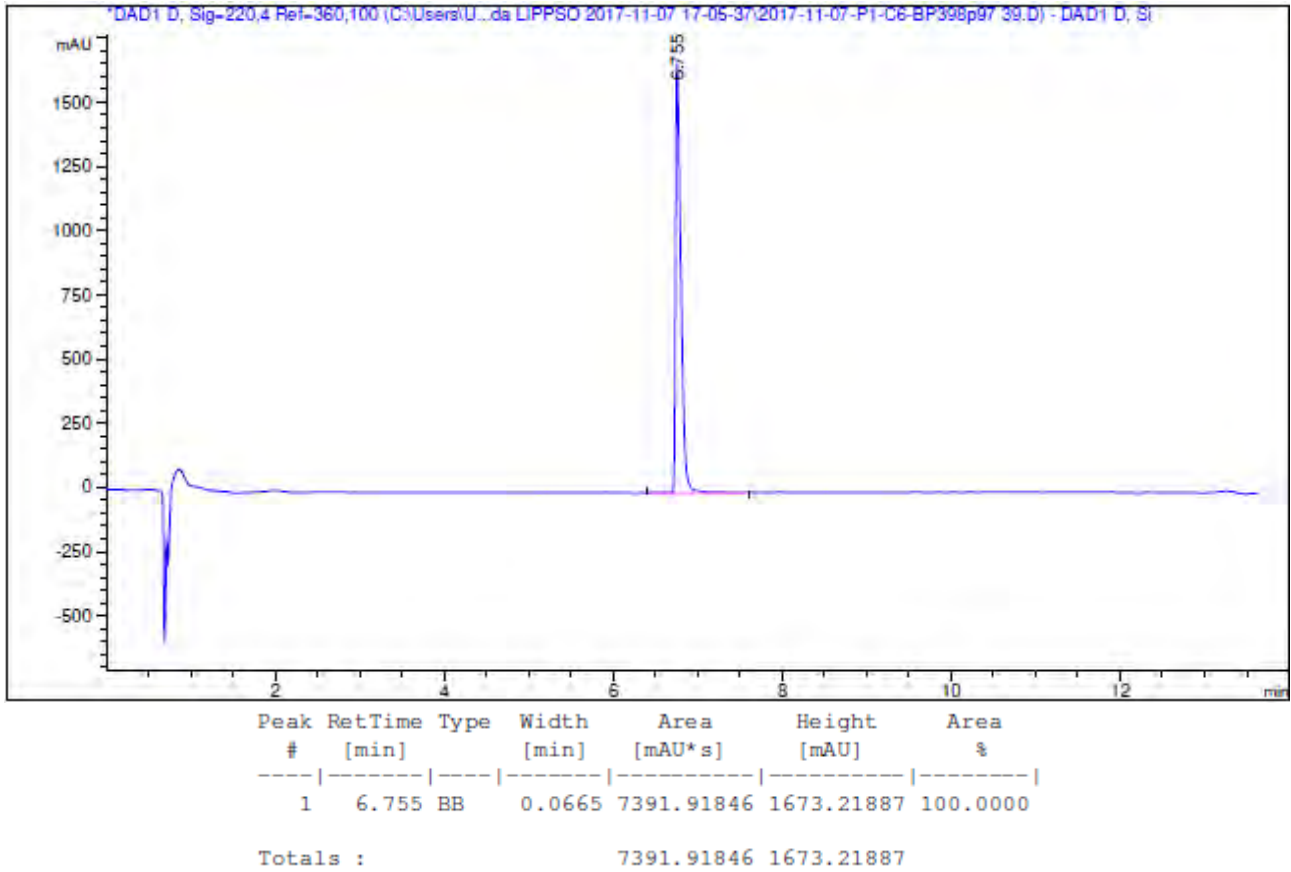
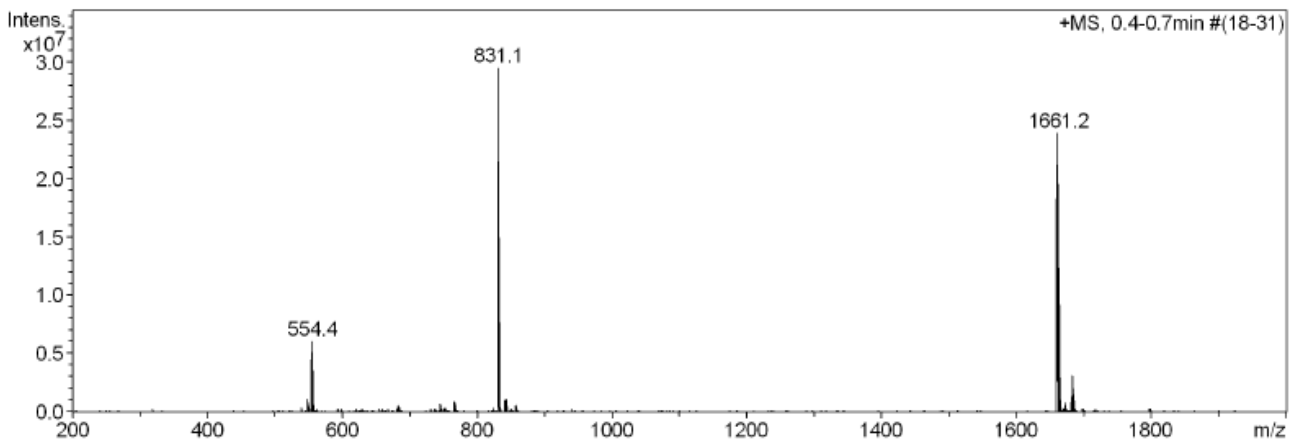
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP489)



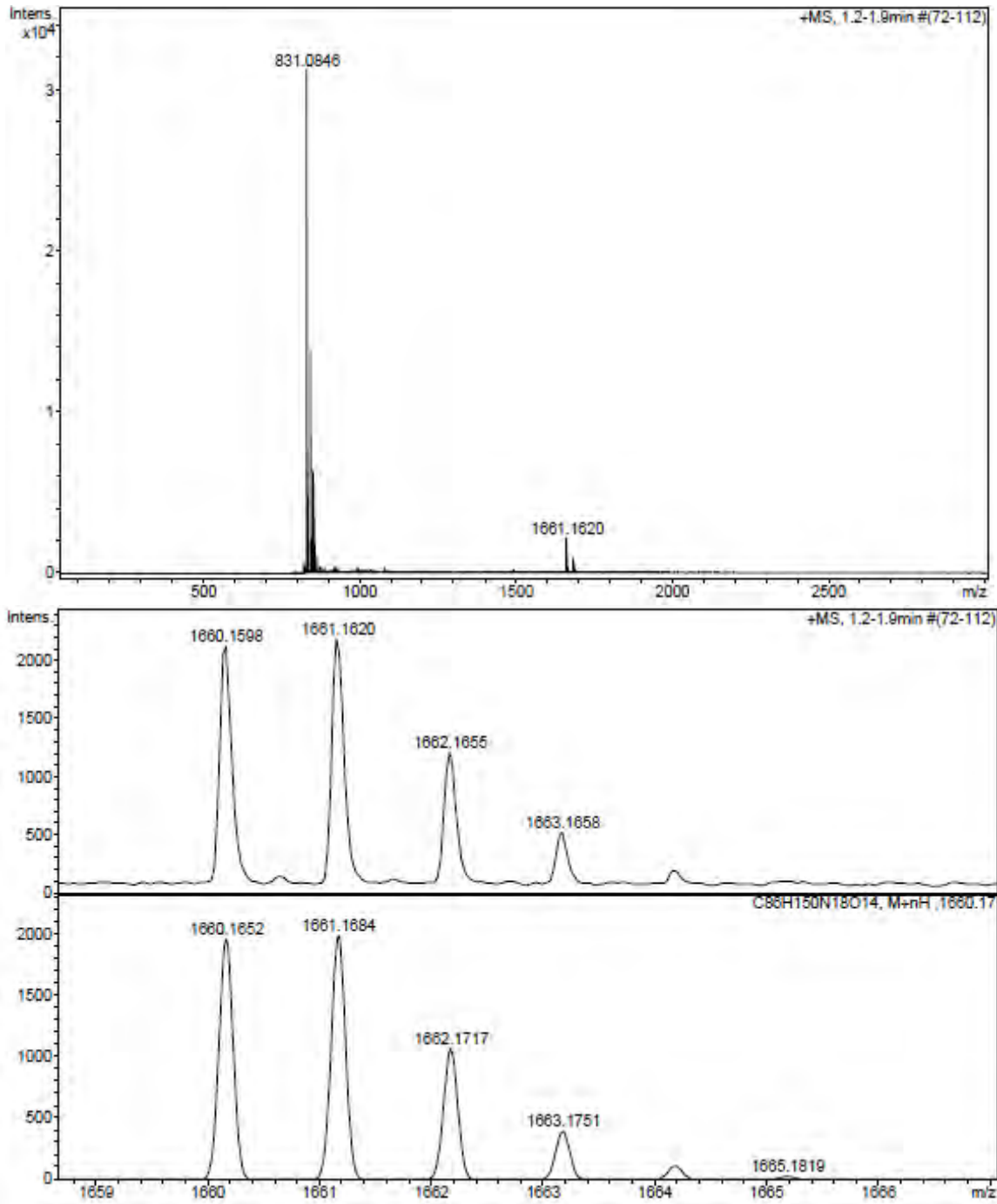
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

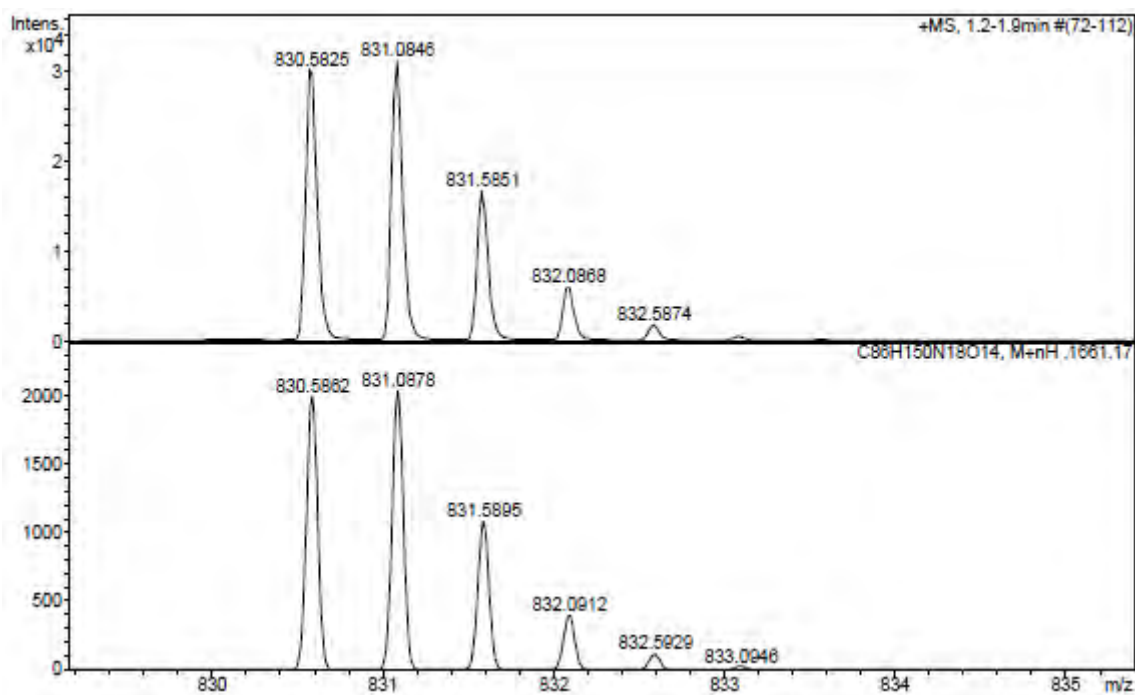


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.945	W R	0.0468	694.77289	214.59721	12.4485
2	6.745	BV R	0.0579	4328.80762	1099.50281	77.5611
3	6.908	W E	0.0672	426.74368	87.06355	7.6461
4	7.619	VB R	0.0553	130.83649	36.04453	2.3443
Totals :				5581.16068	1437.20810	

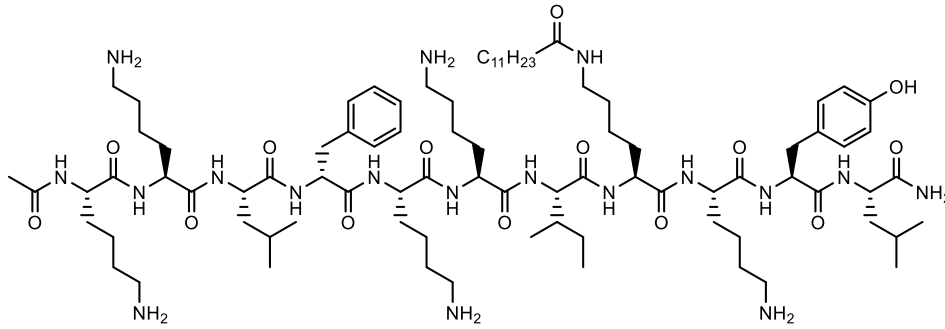
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

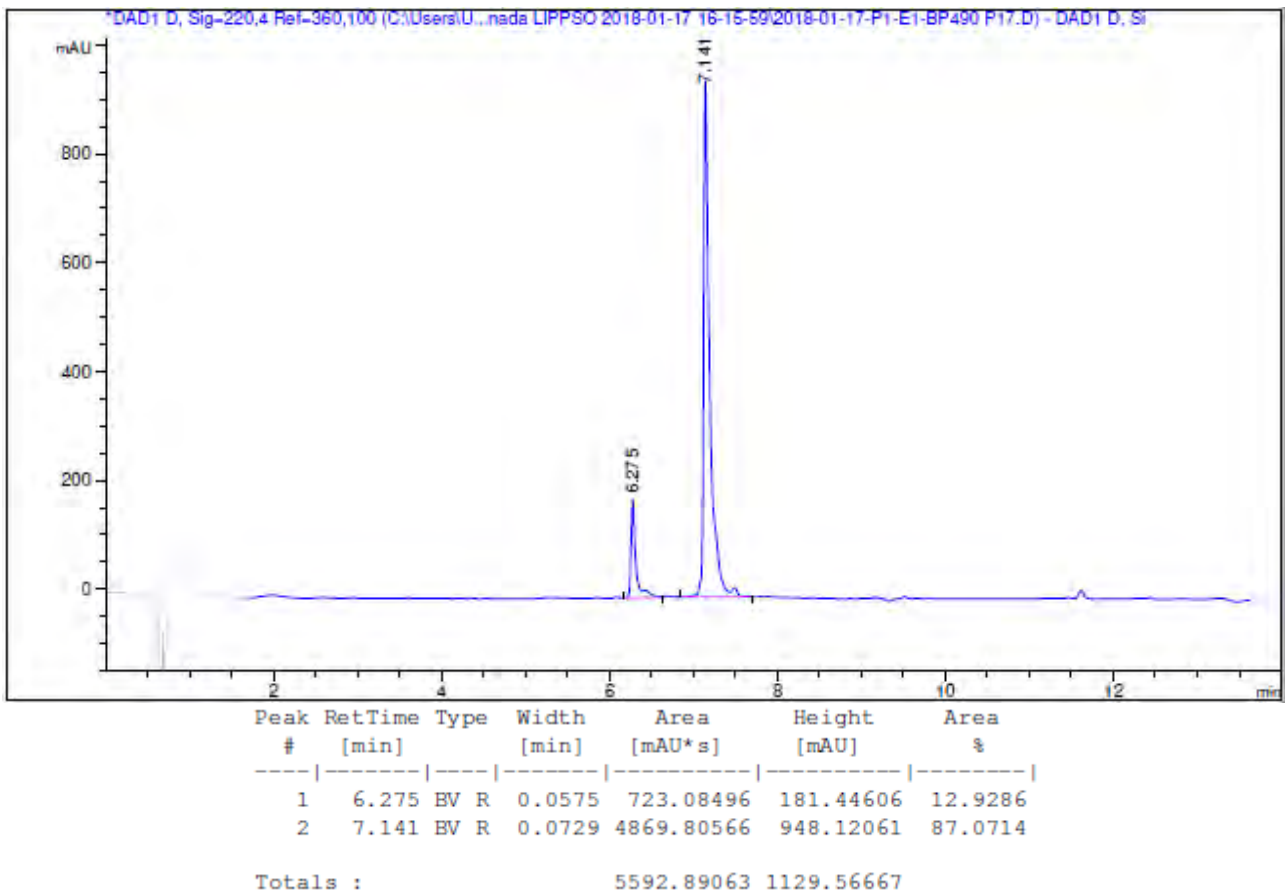


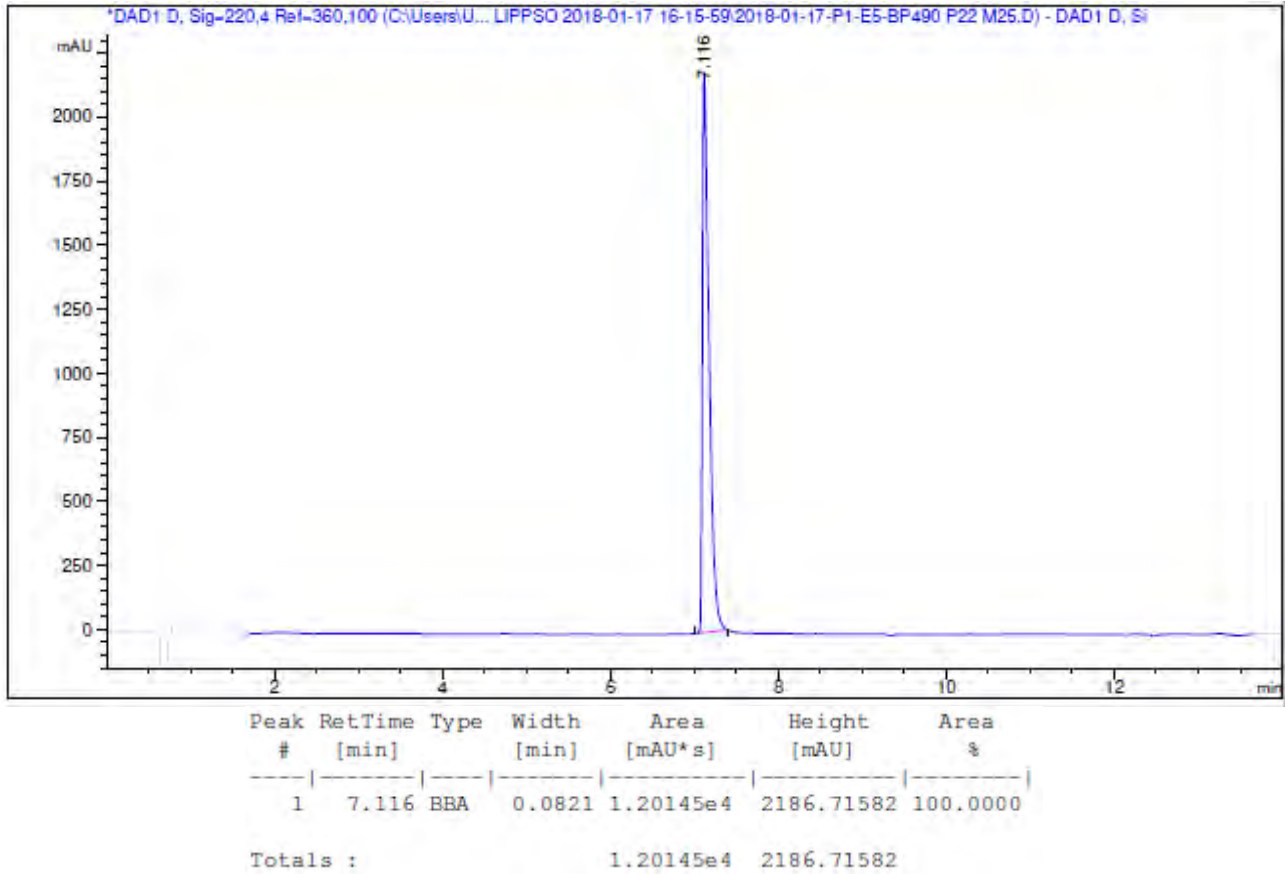
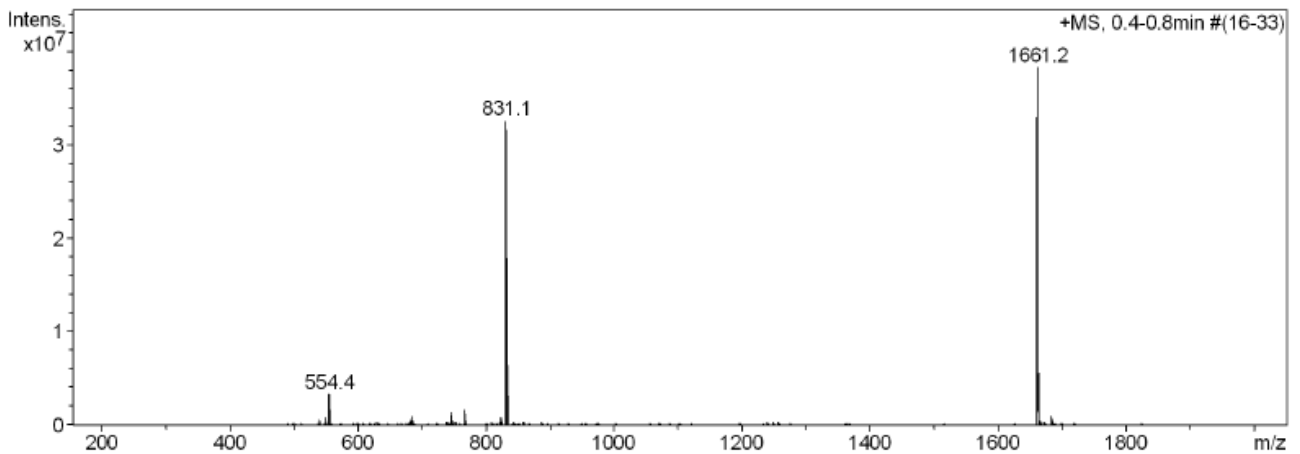


Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₁₁H₂₃)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP490)

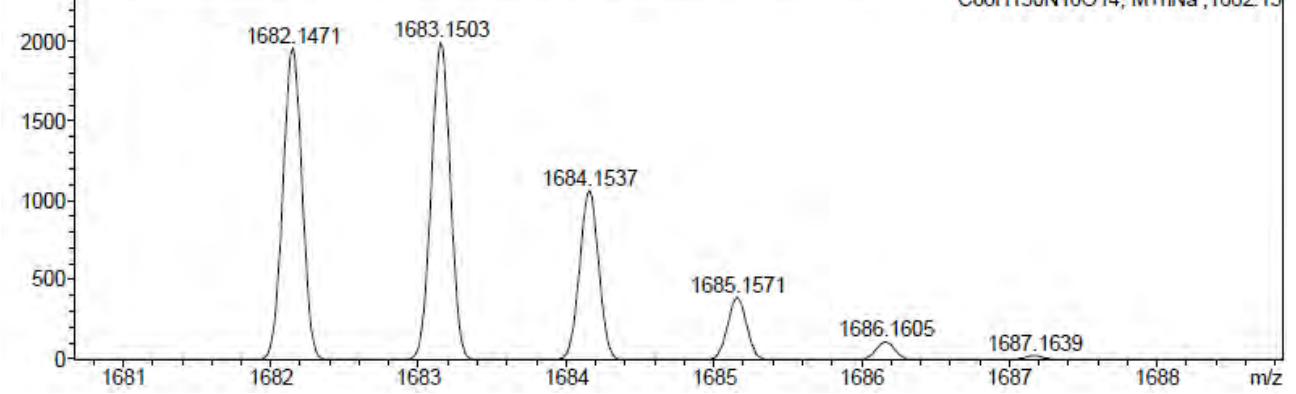
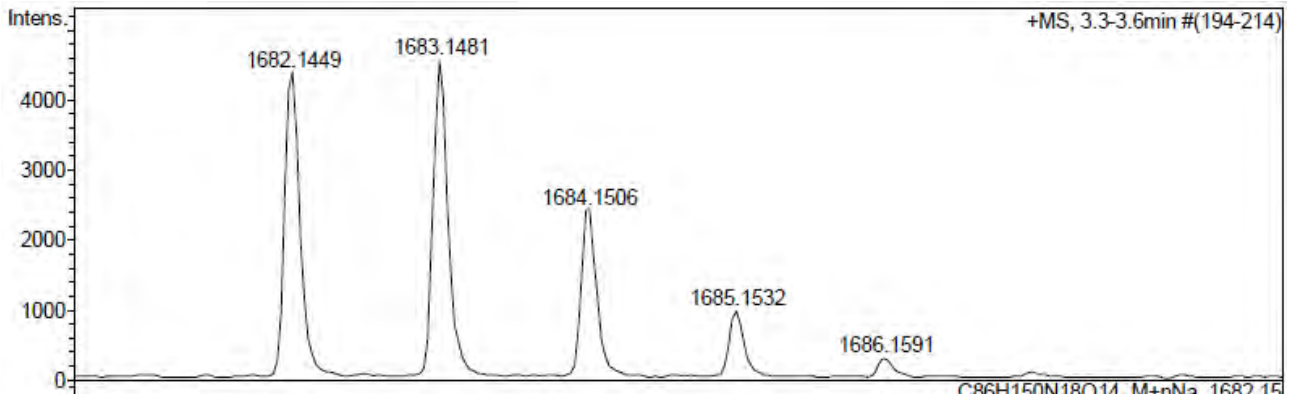
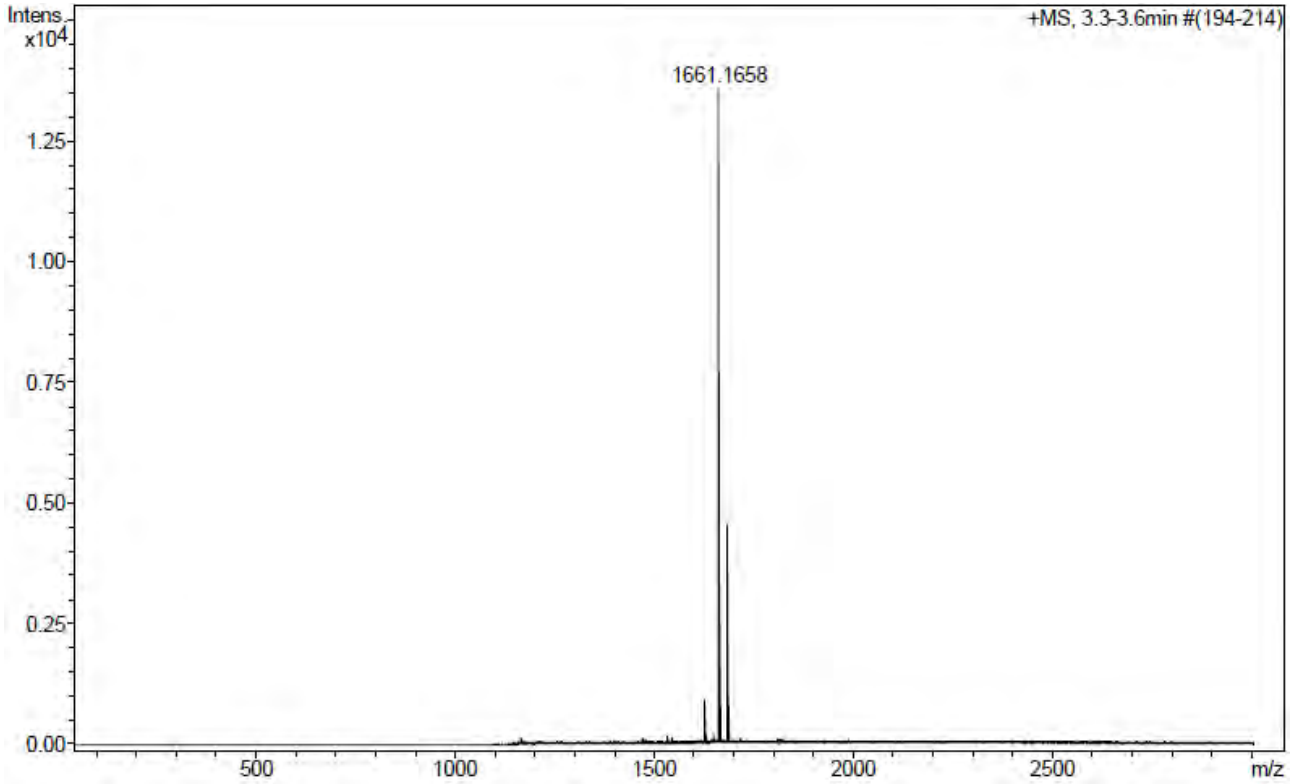


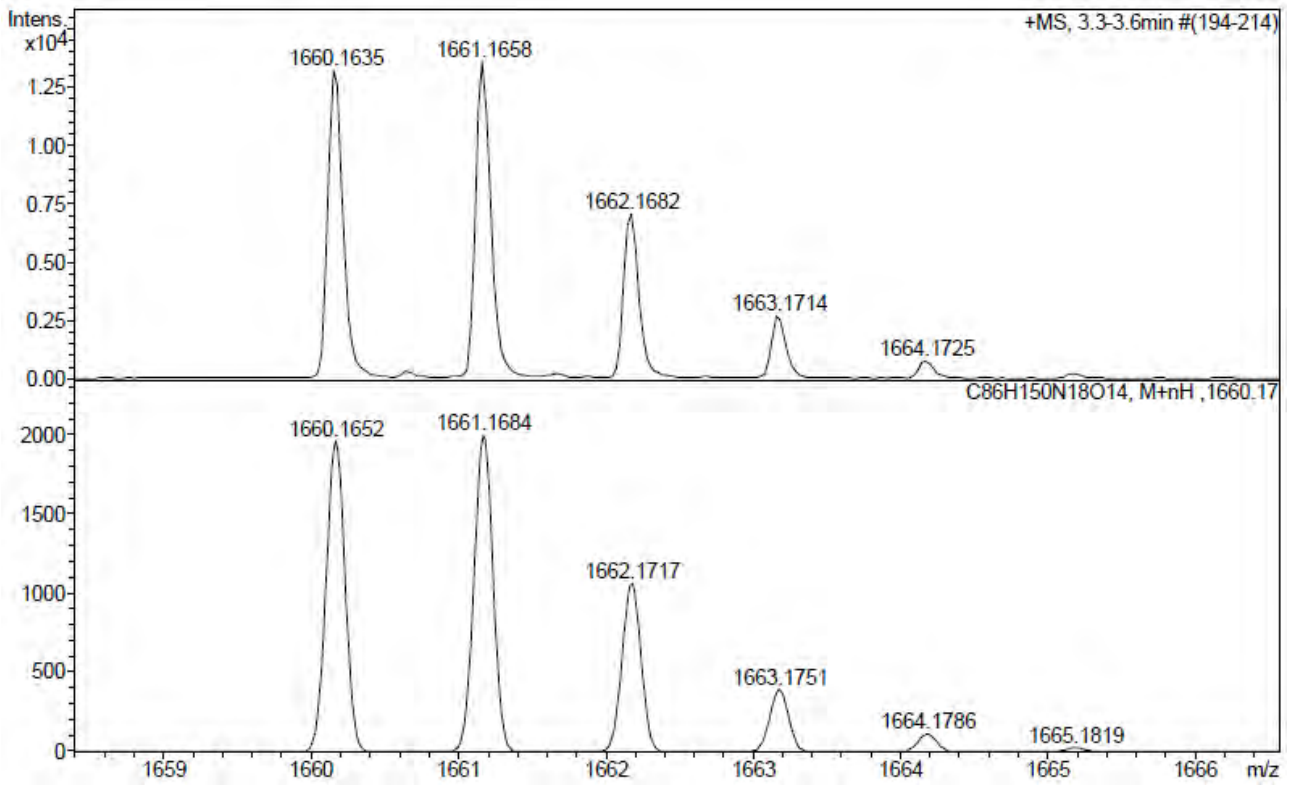
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



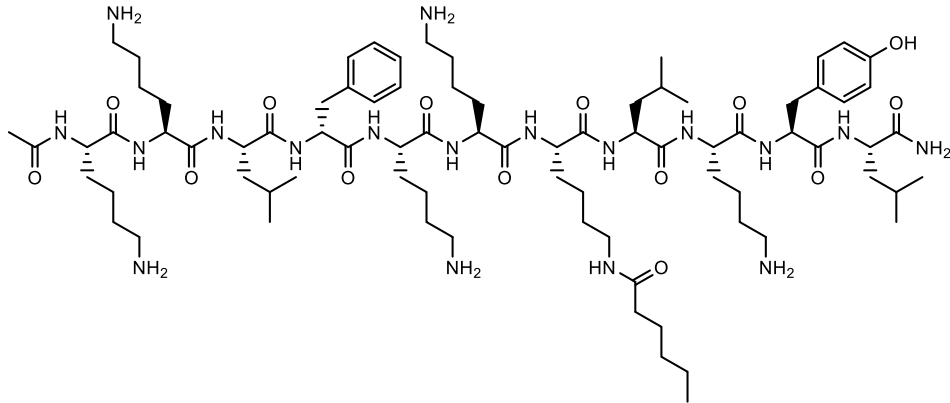
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

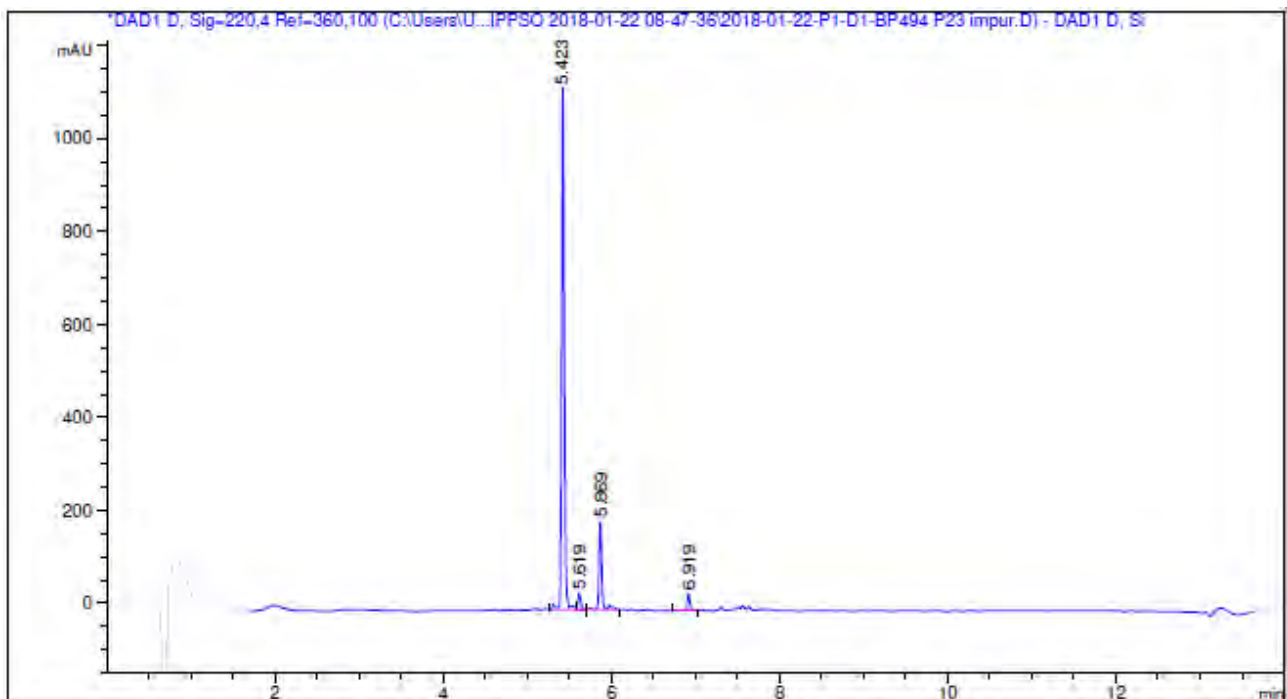




Ac-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Lys(COC₅H₁₁)-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP494)

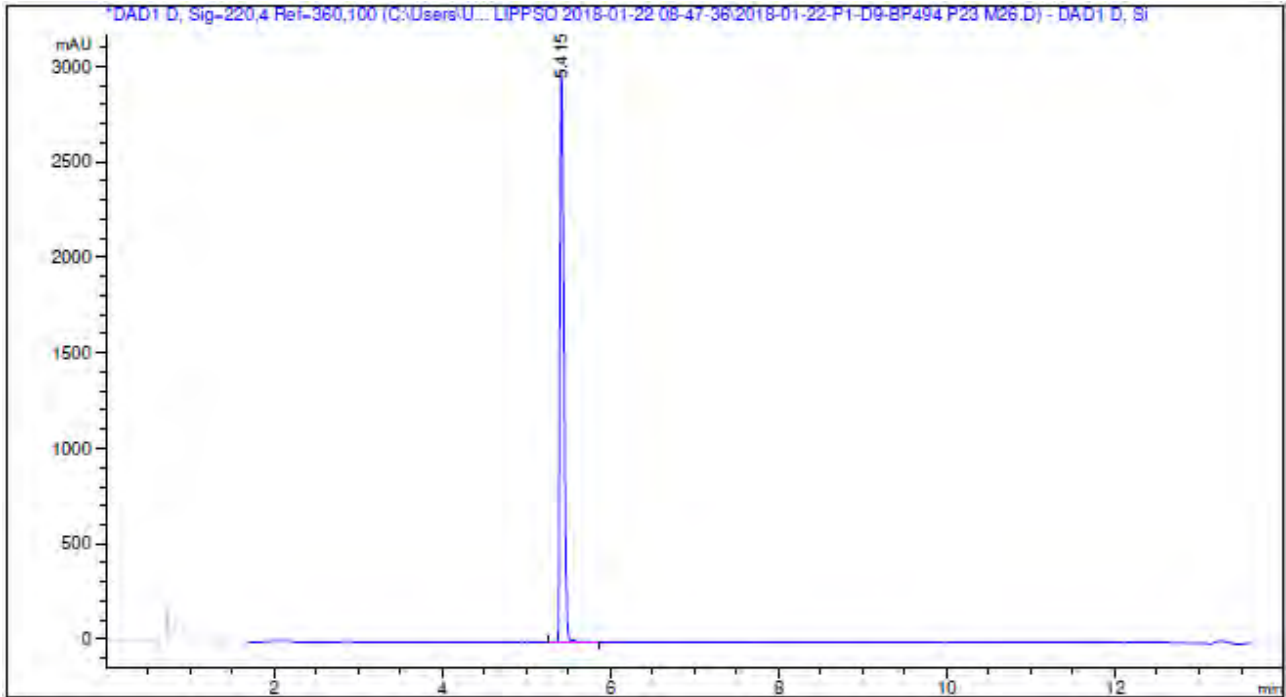


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



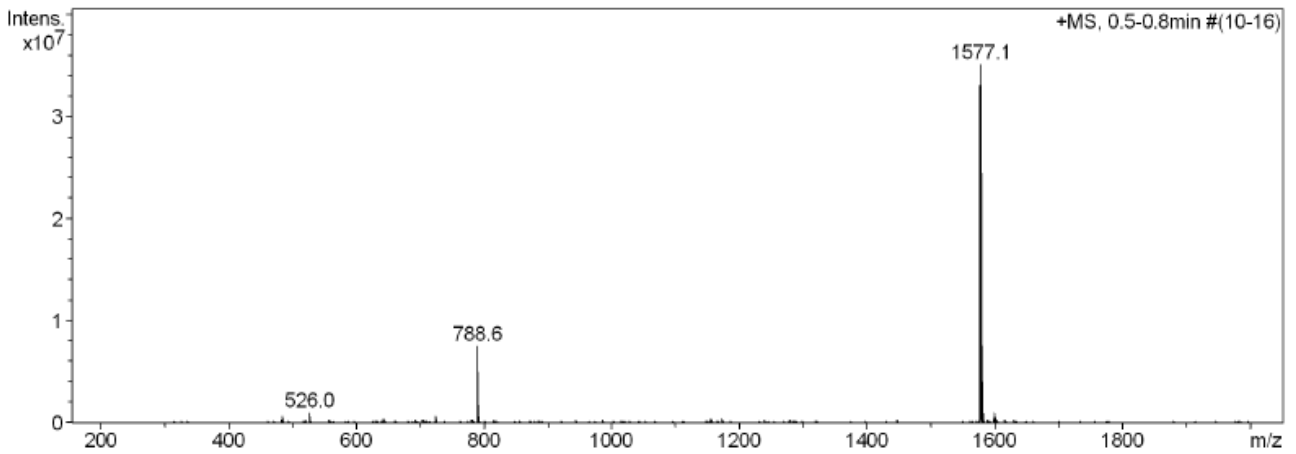
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.423	WV R	0.0340	2517.67651	1130.30176	80.8293
2	5.619	VB E	0.0374	84.14298	34.50963	2.7014
3	5.869	WV R	0.0346	432.04156	189.79099	13.8706
4	6.919	WV R	0.0340	80.94740	36.32489	2.5988

Totals : 3114.80846 1390.92727

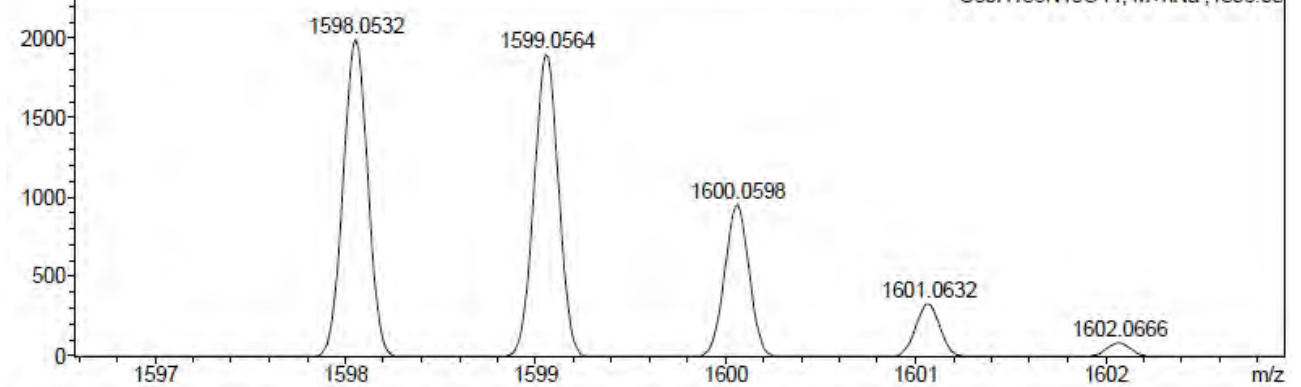
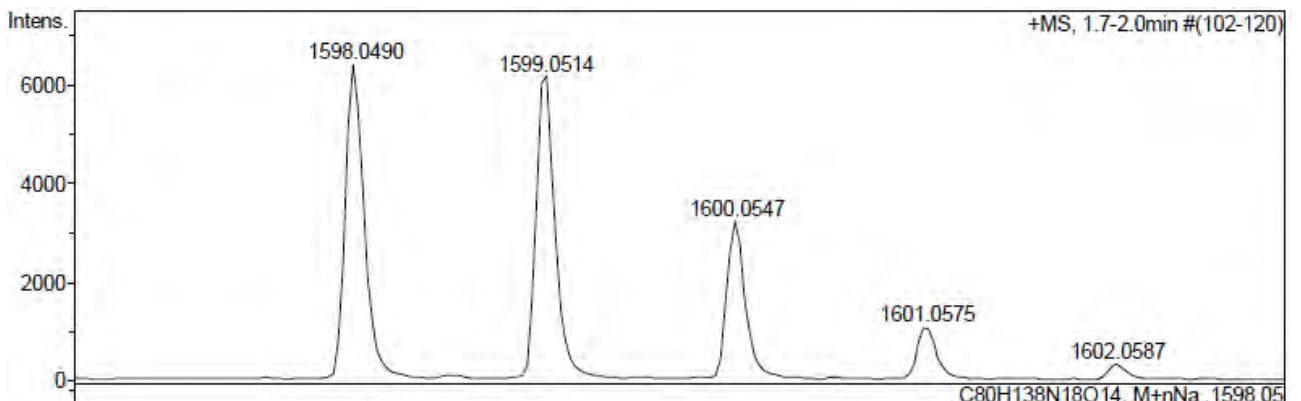
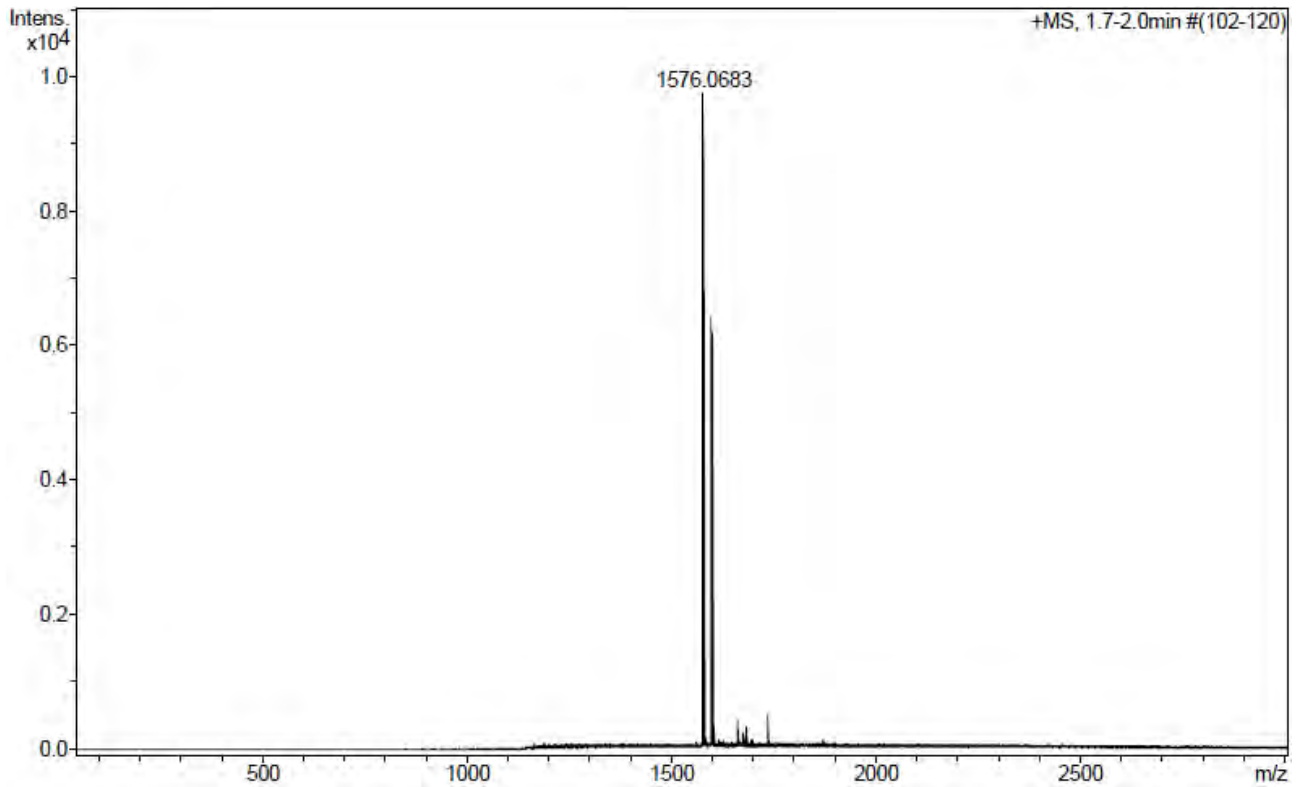
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

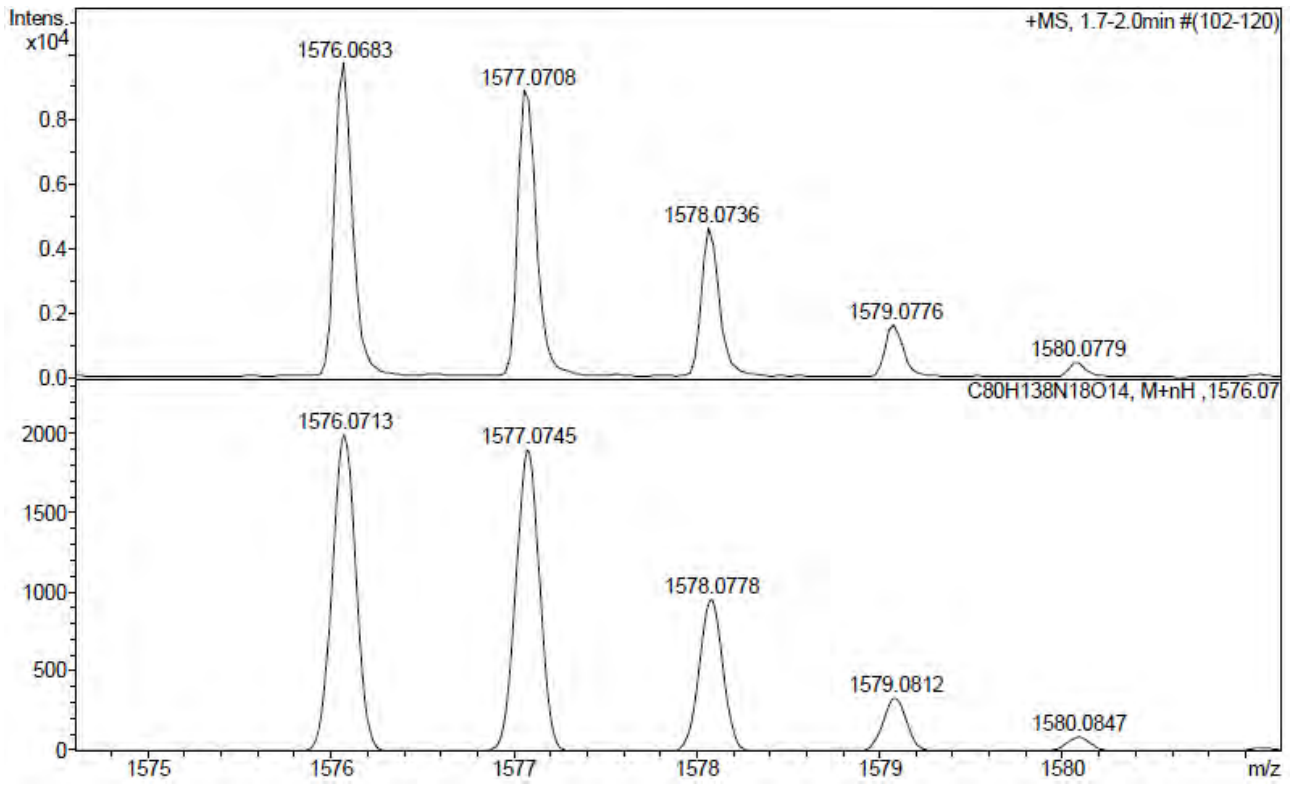
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.415	W R	0.0536	9889.14844	2990.65039	100.0000

Totals : 9889.14844 2990.65039

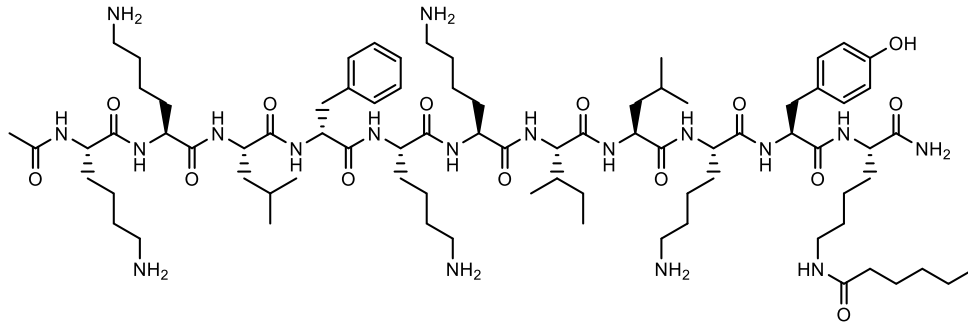
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

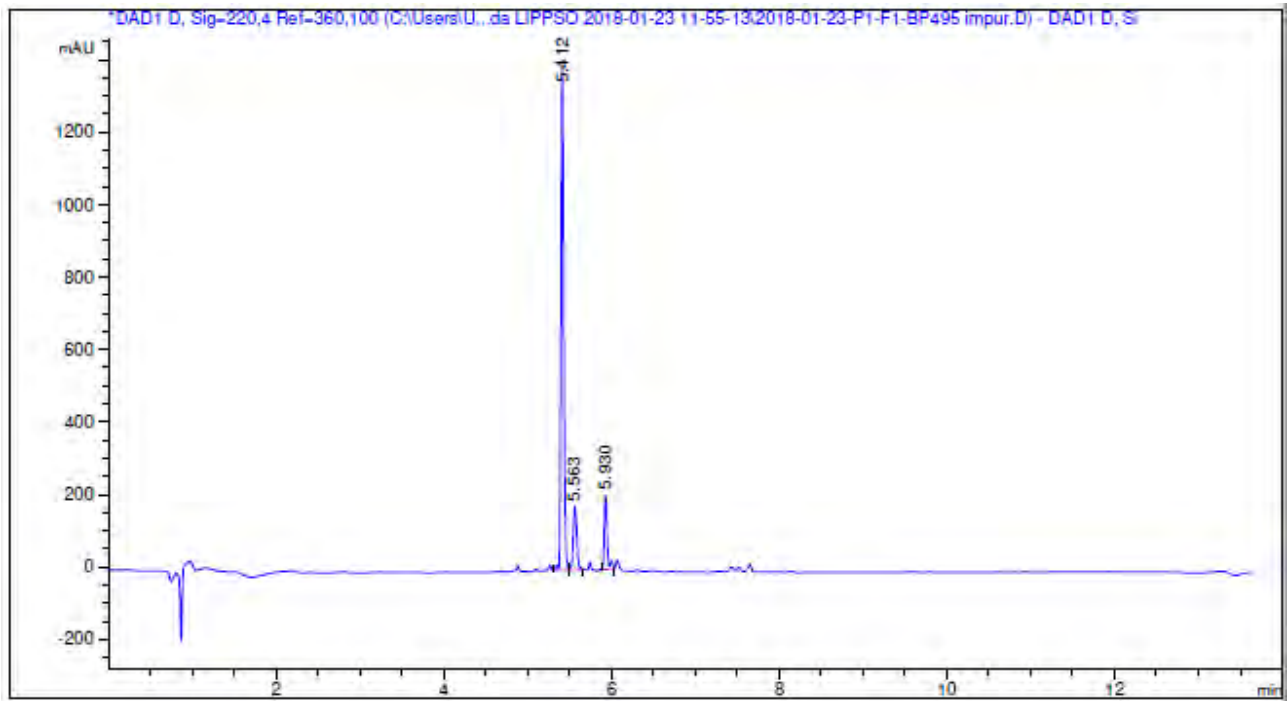




Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₅H₁₁)-NH₂ (BP495)

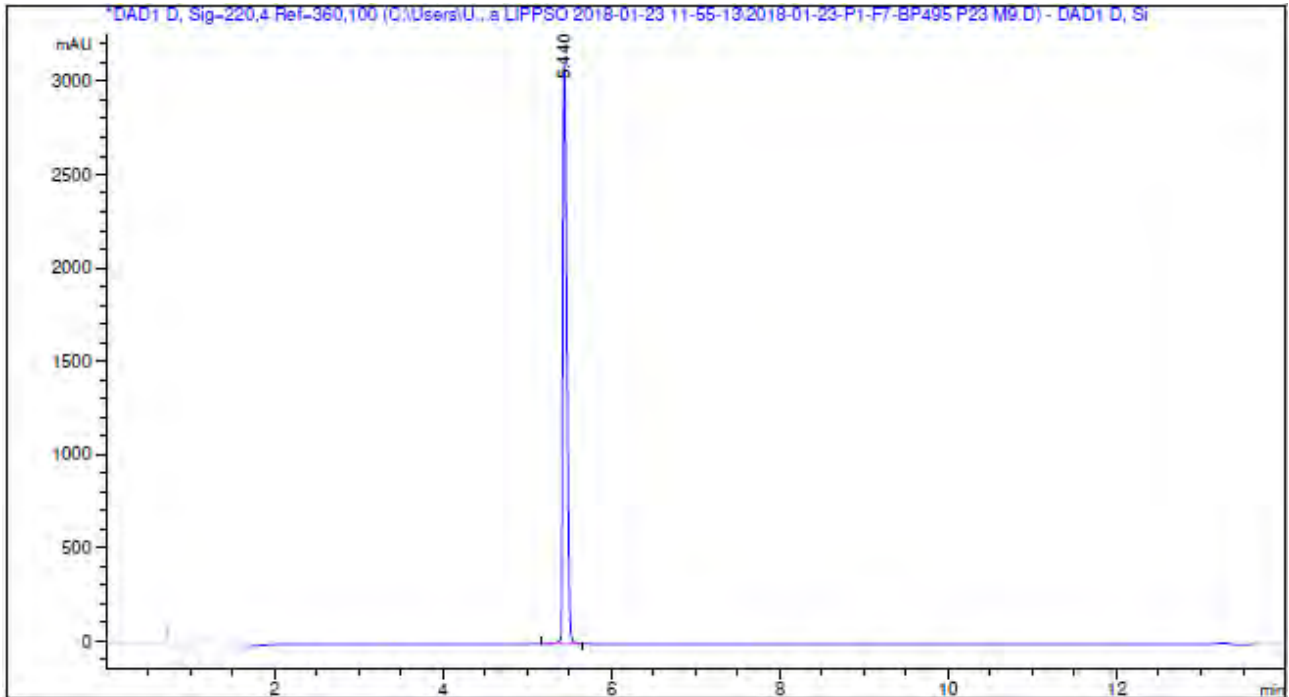


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

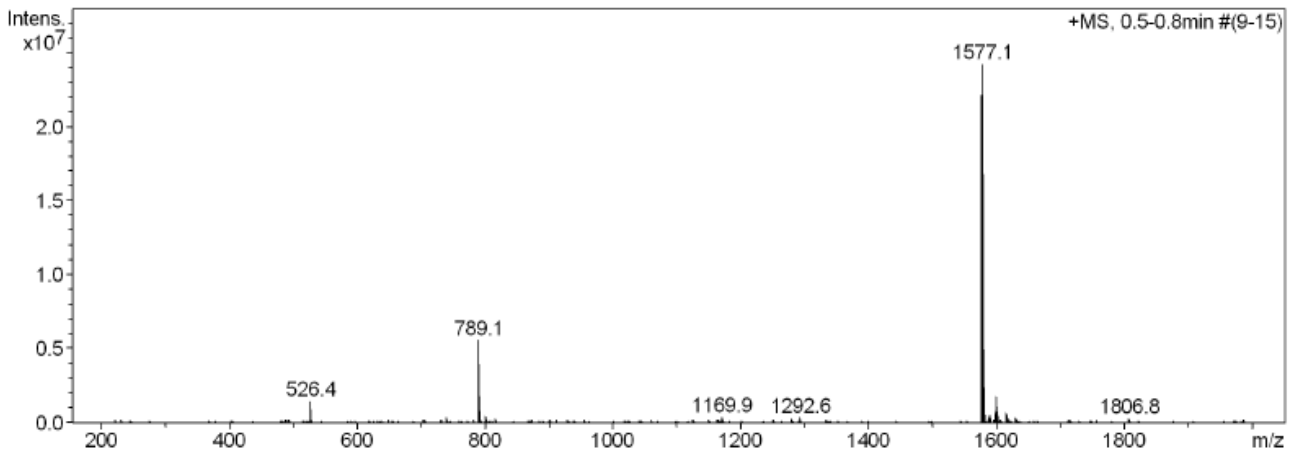


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.412	W R	0.0356	3169.20239	1389.56665	75.7298
2	5.563	VB	0.0487	535.45313	174.93906	12.7949
3	5.930	BV R	0.0353	480.22589	204.92200	11.4753

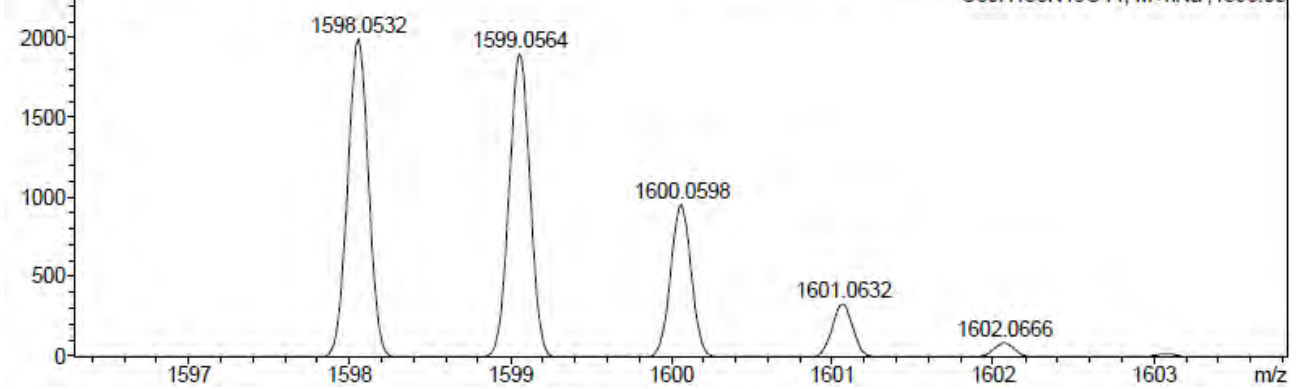
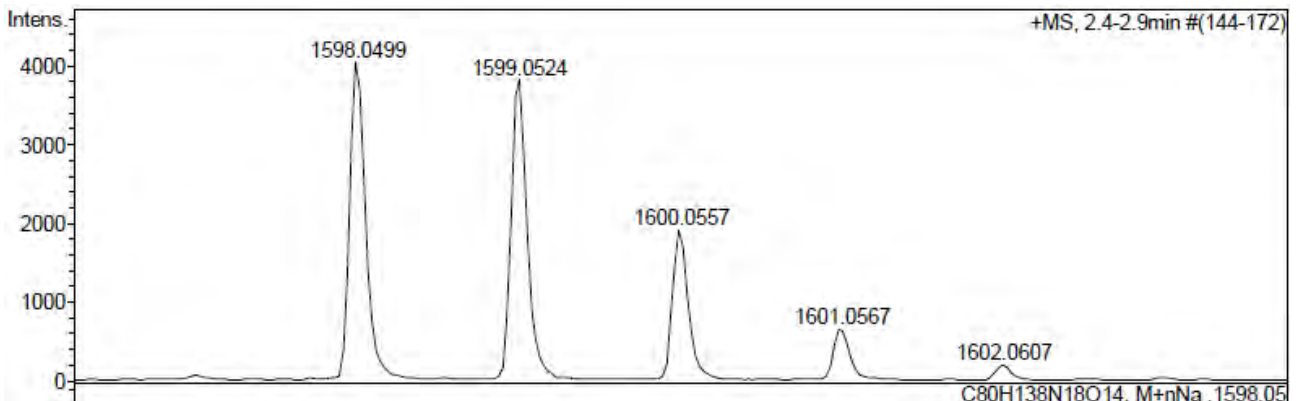
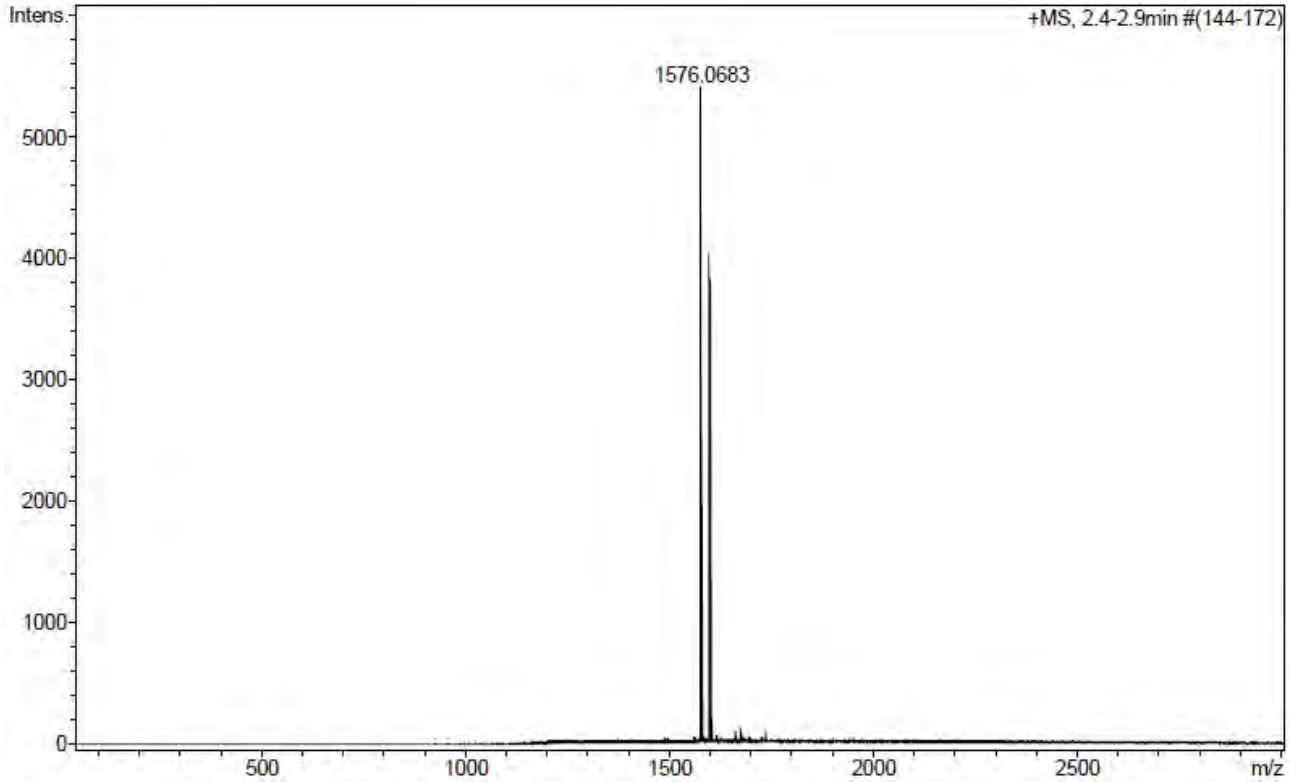
Totals : 4184.88141 1769.42770

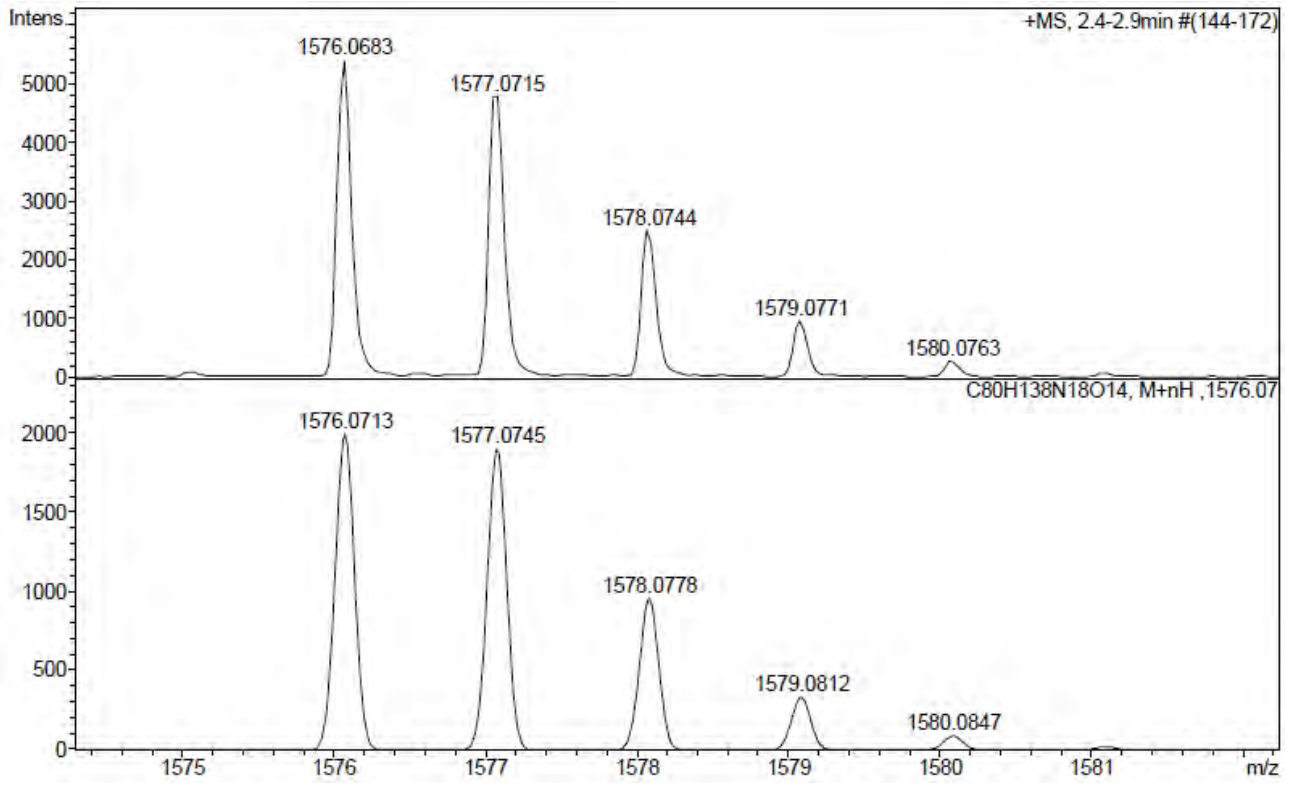
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.440	VB R	0.0545	1.04920e4	3101.66650	100.0000
Totals :				1.04920e4	3101.66650	

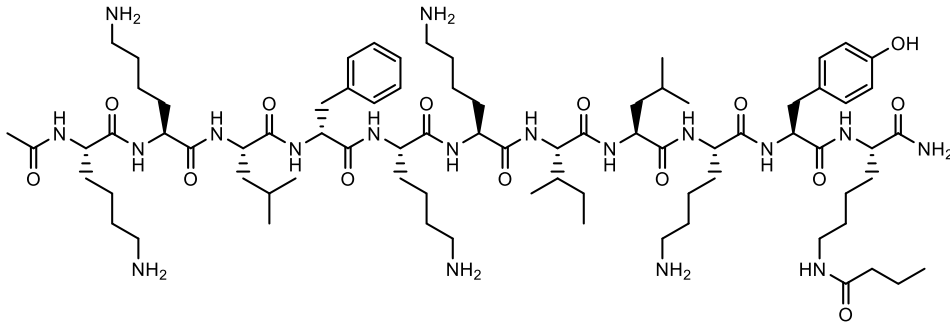
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

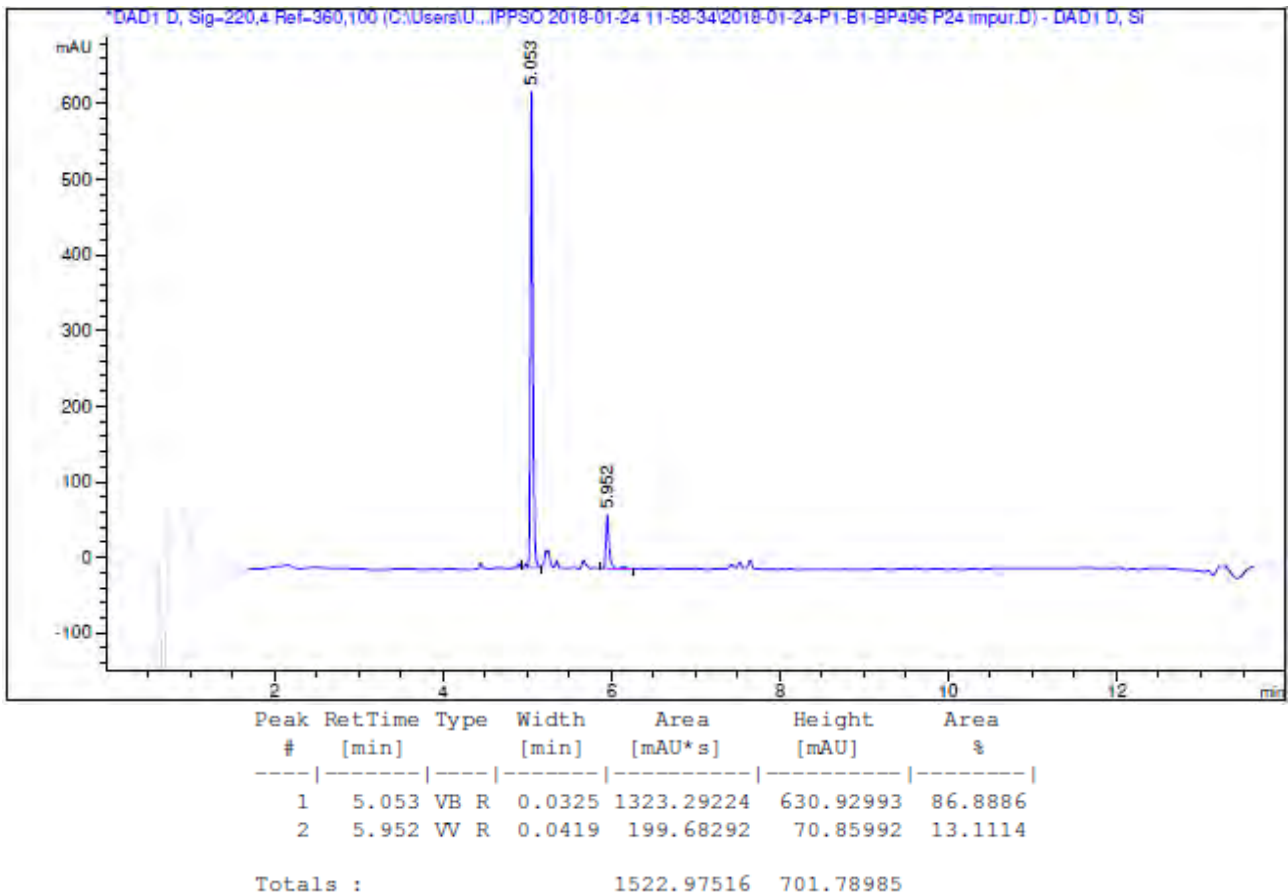


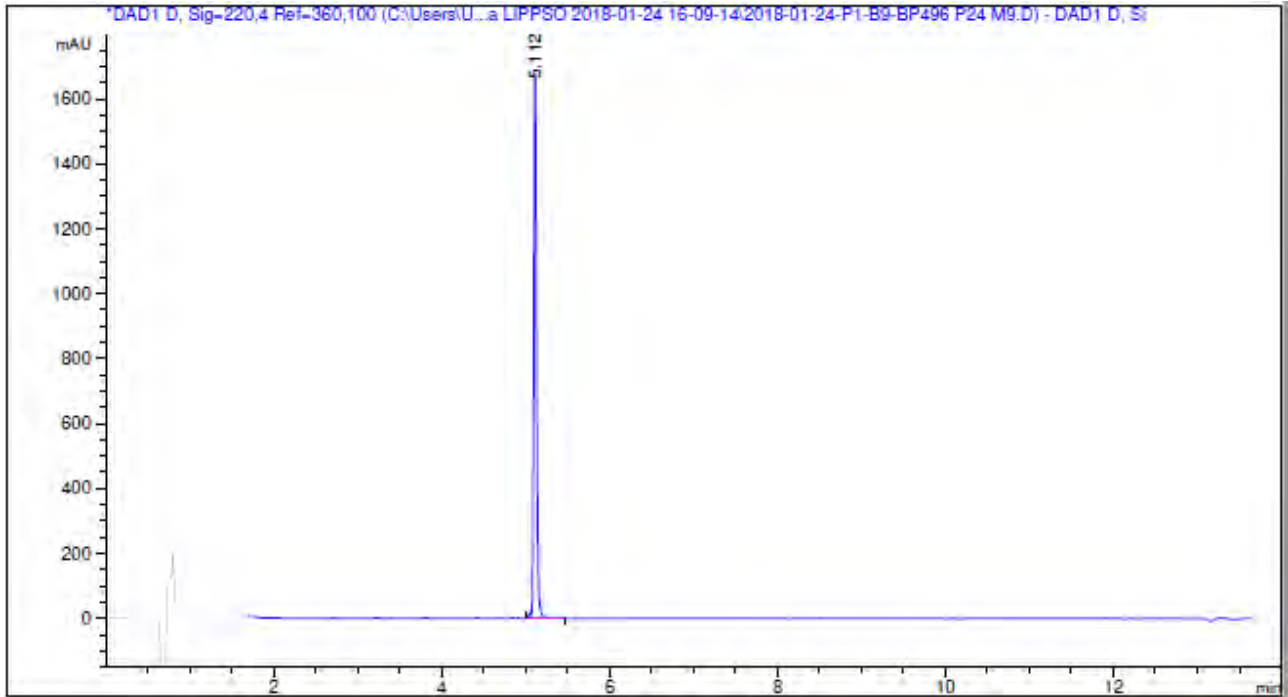


Ac-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Lys(COC₃H₇)-NH₂ (BP496)



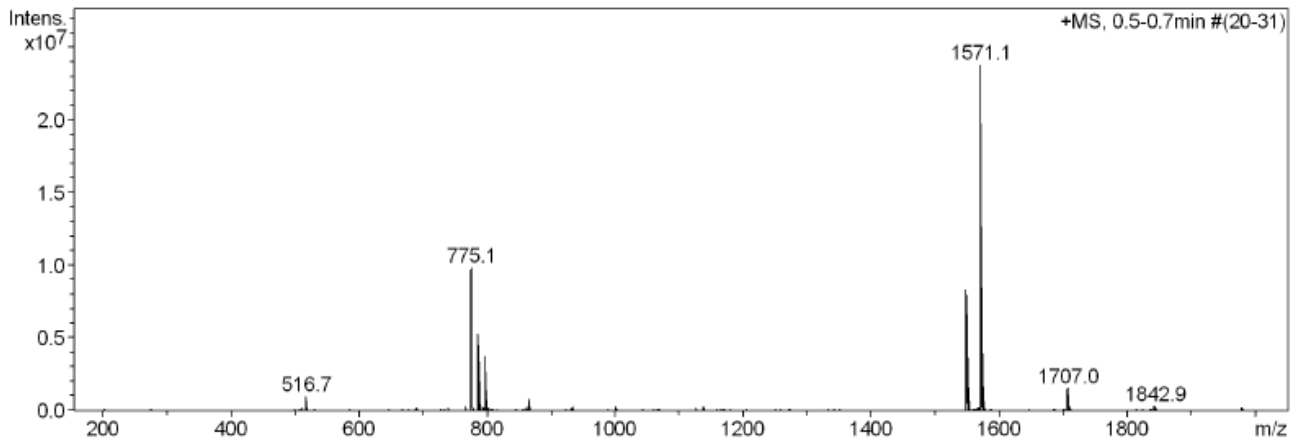
HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)



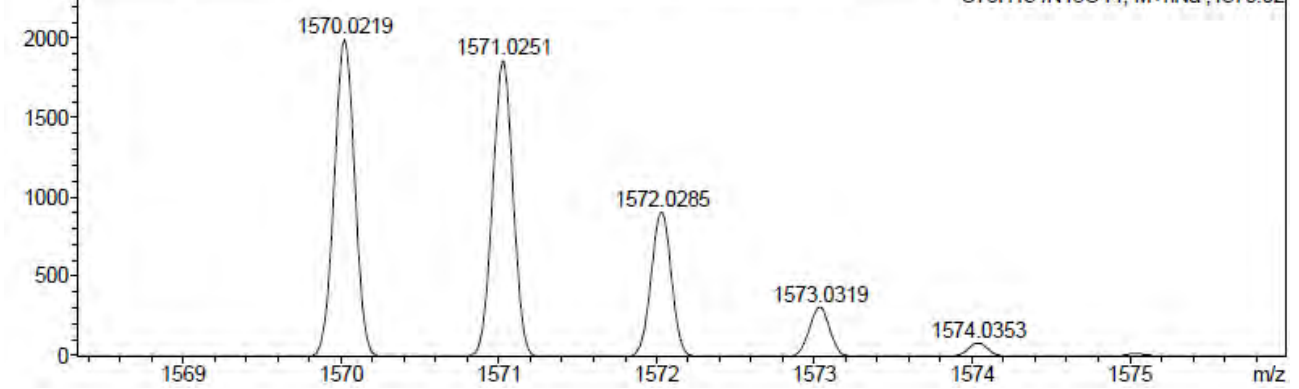
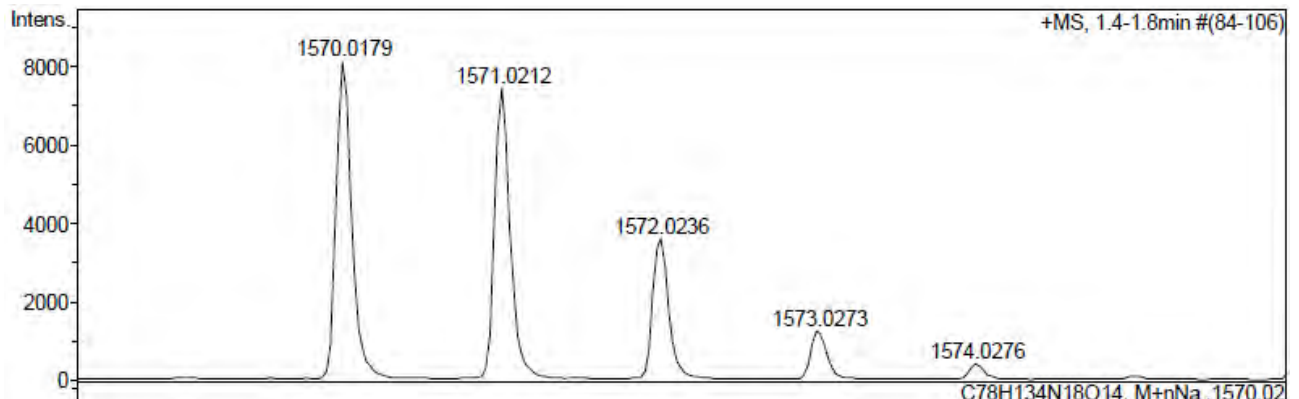
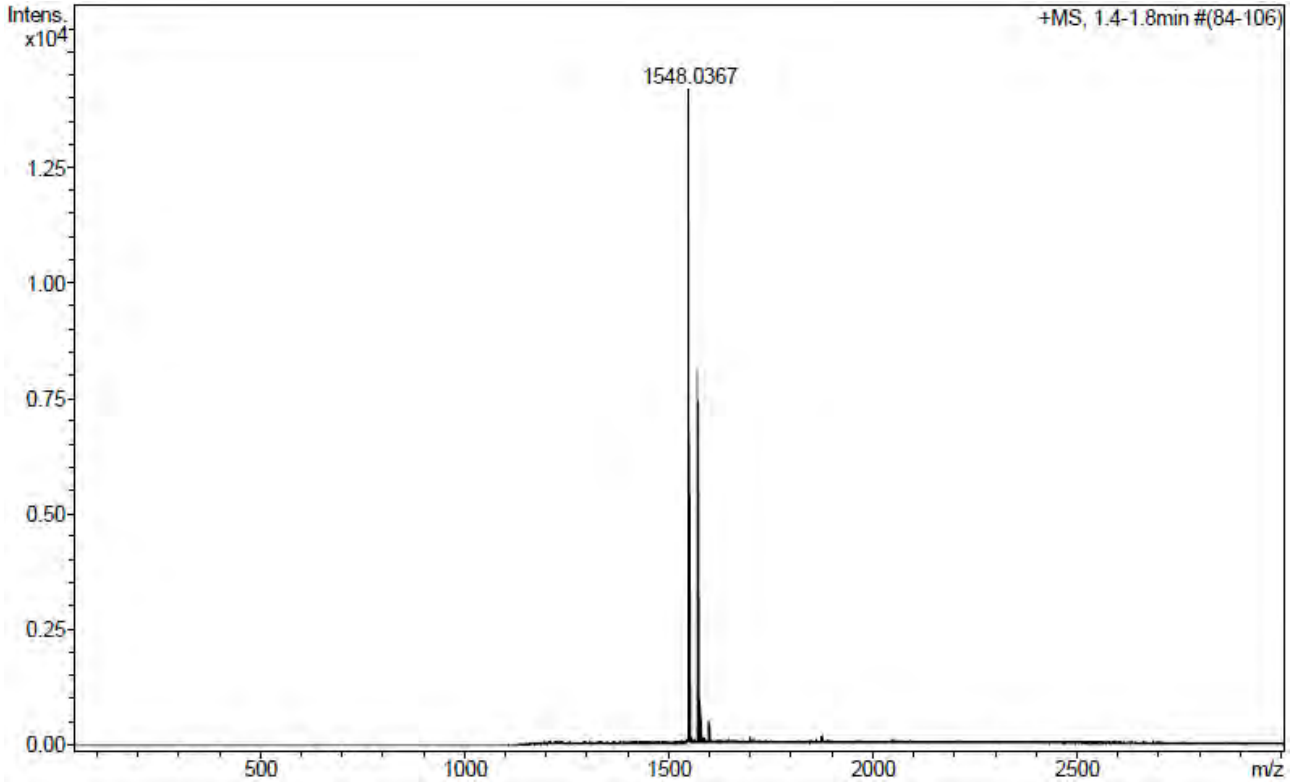
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

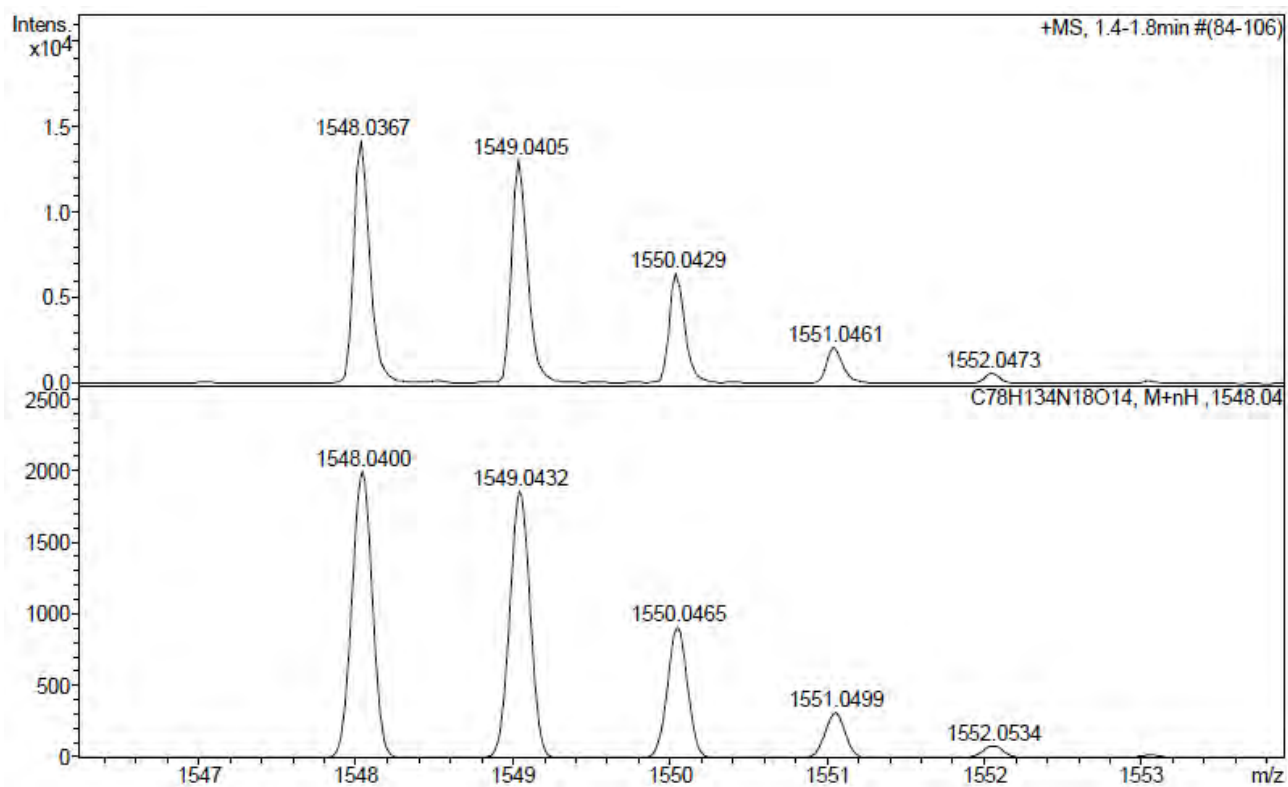
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.112	W R	0.0361	3886.18408	1673.98193	100.0000

Totals : 3886.18408 1673.98193

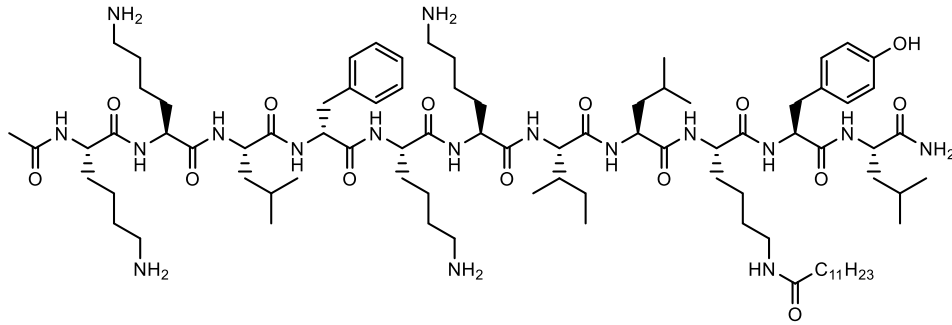
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

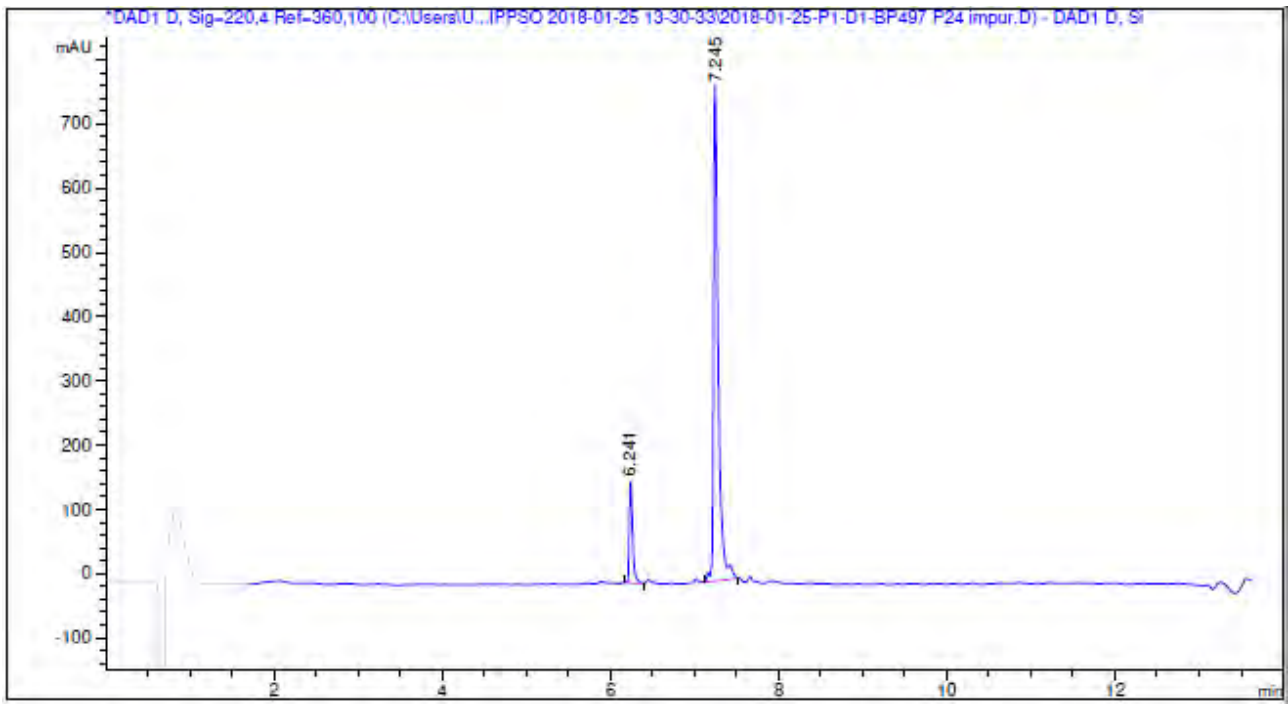




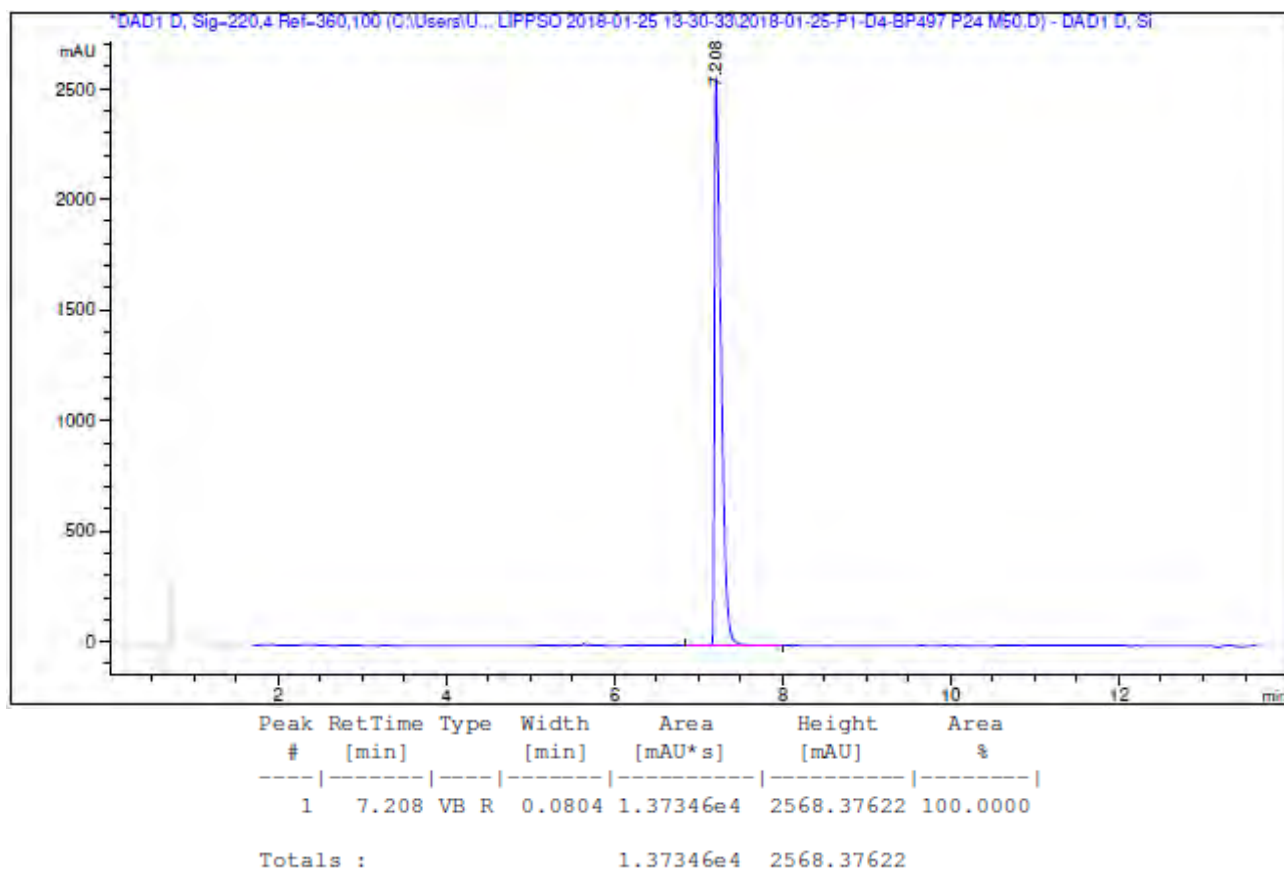
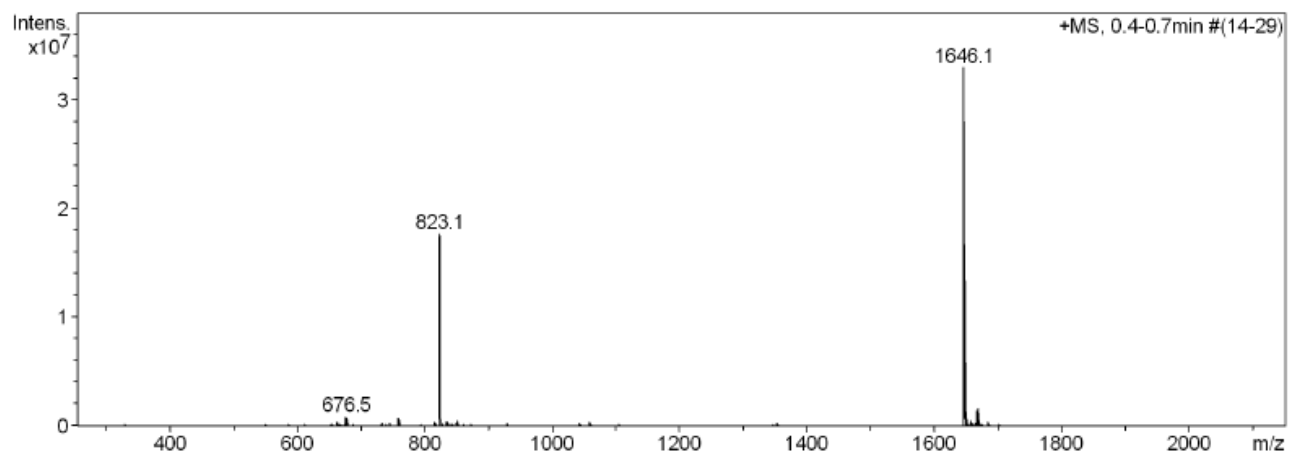
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₁₁H₂₃)-Tyr-Leu-NH₂ (BP497)



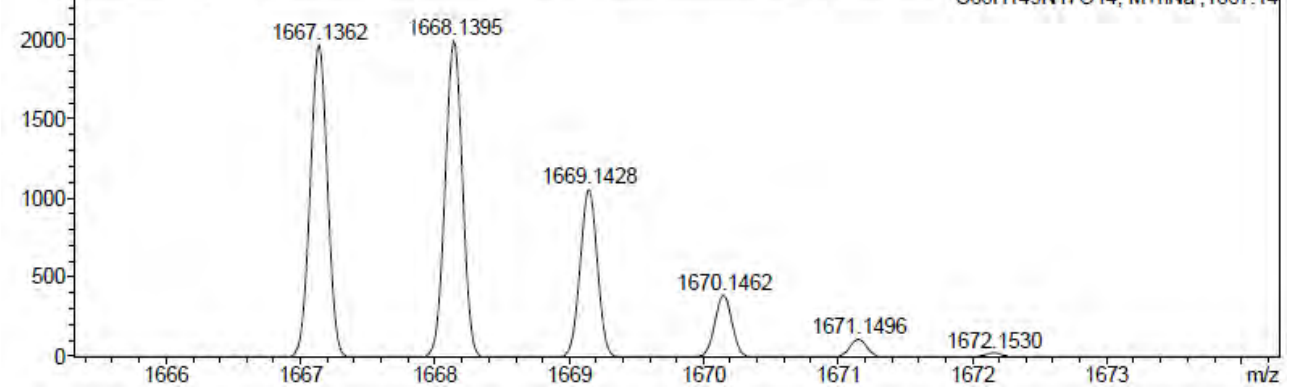
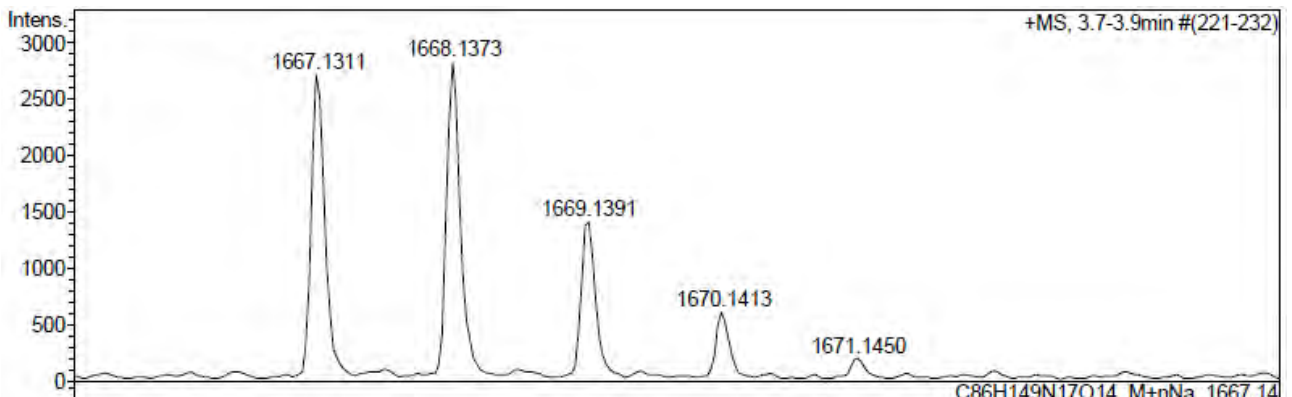
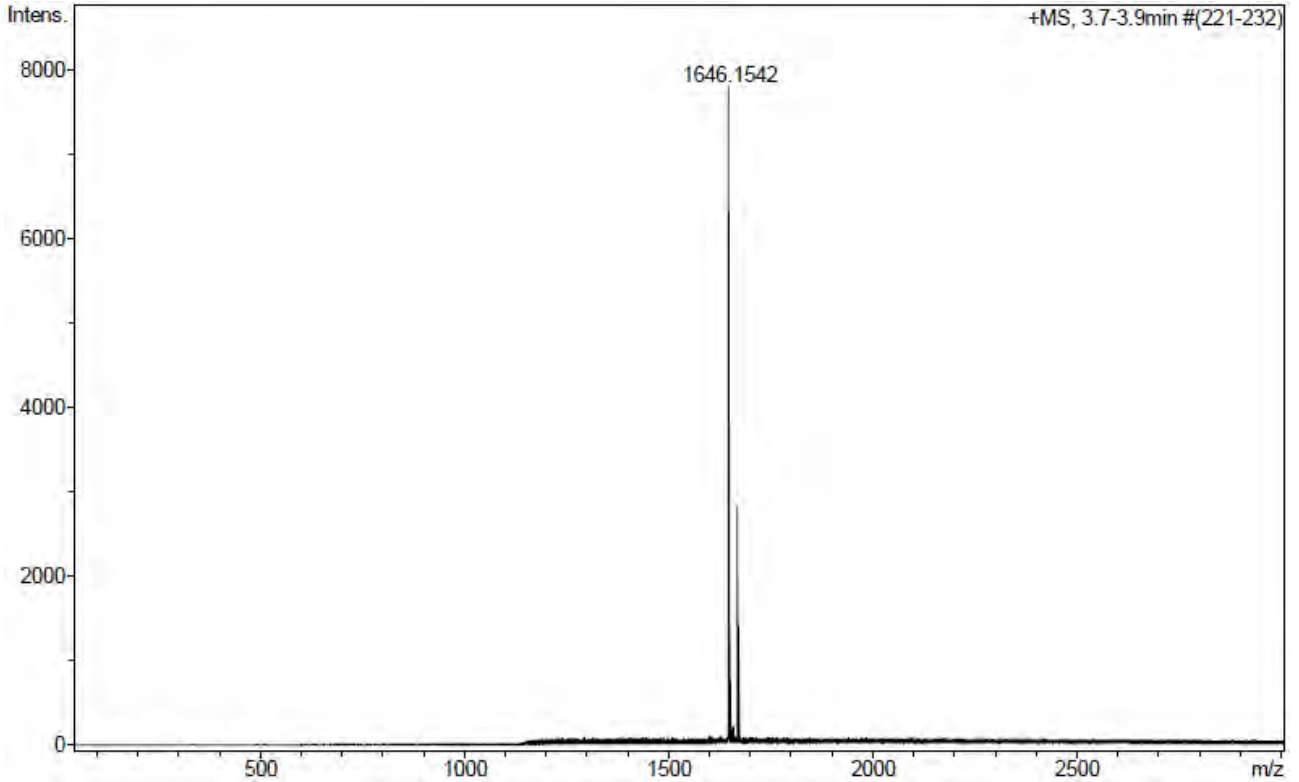
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

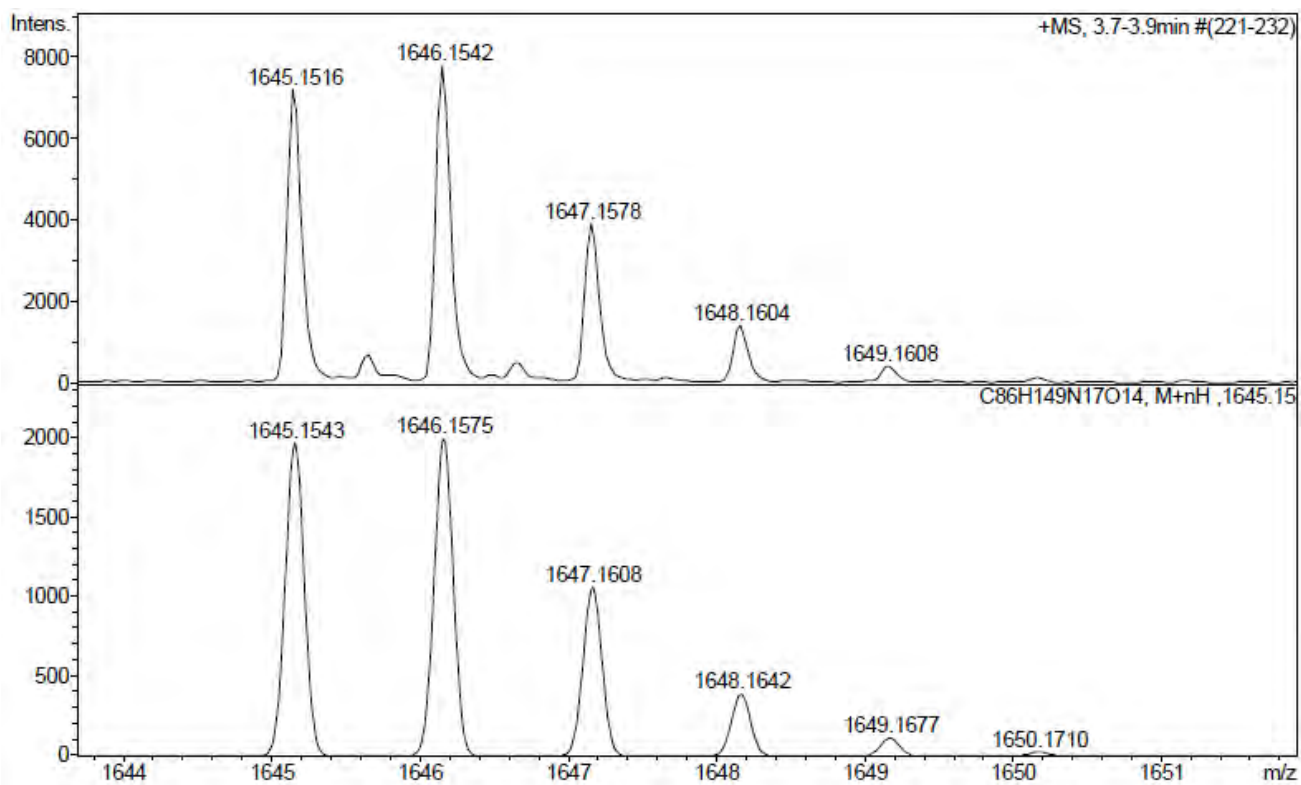


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.241	VB R	0.0399	431.05203	157.88124	12.7336
2	7.245	WR	0.0556	2954.10278	772.97687	87.2664
Totals :				3385.15482	930.85811	

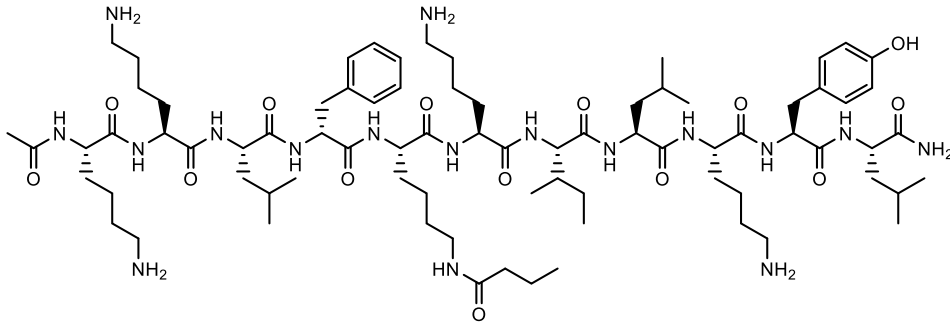
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

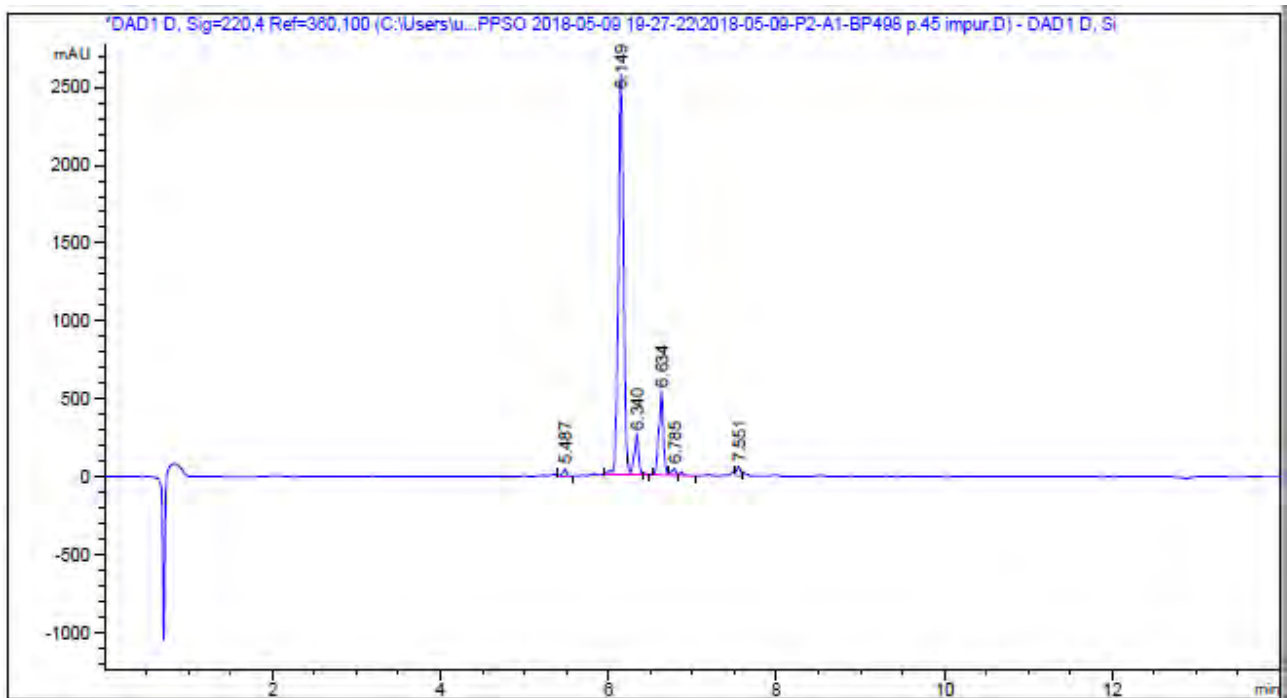




Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP498)

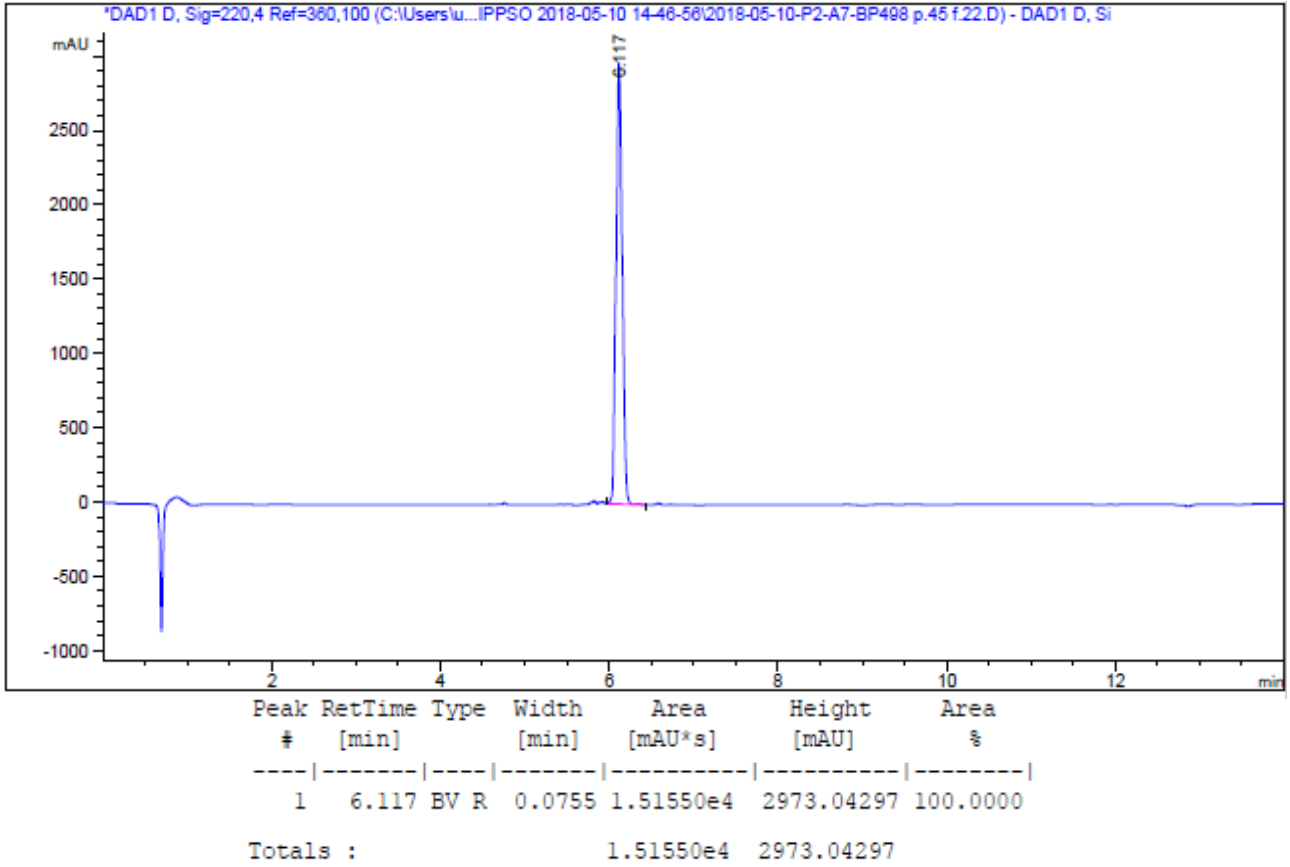
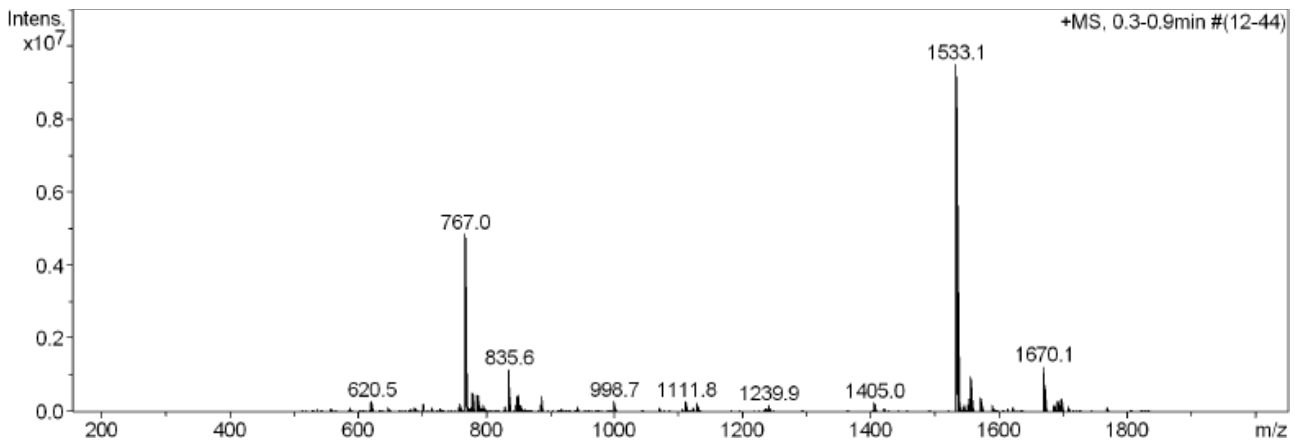


HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)

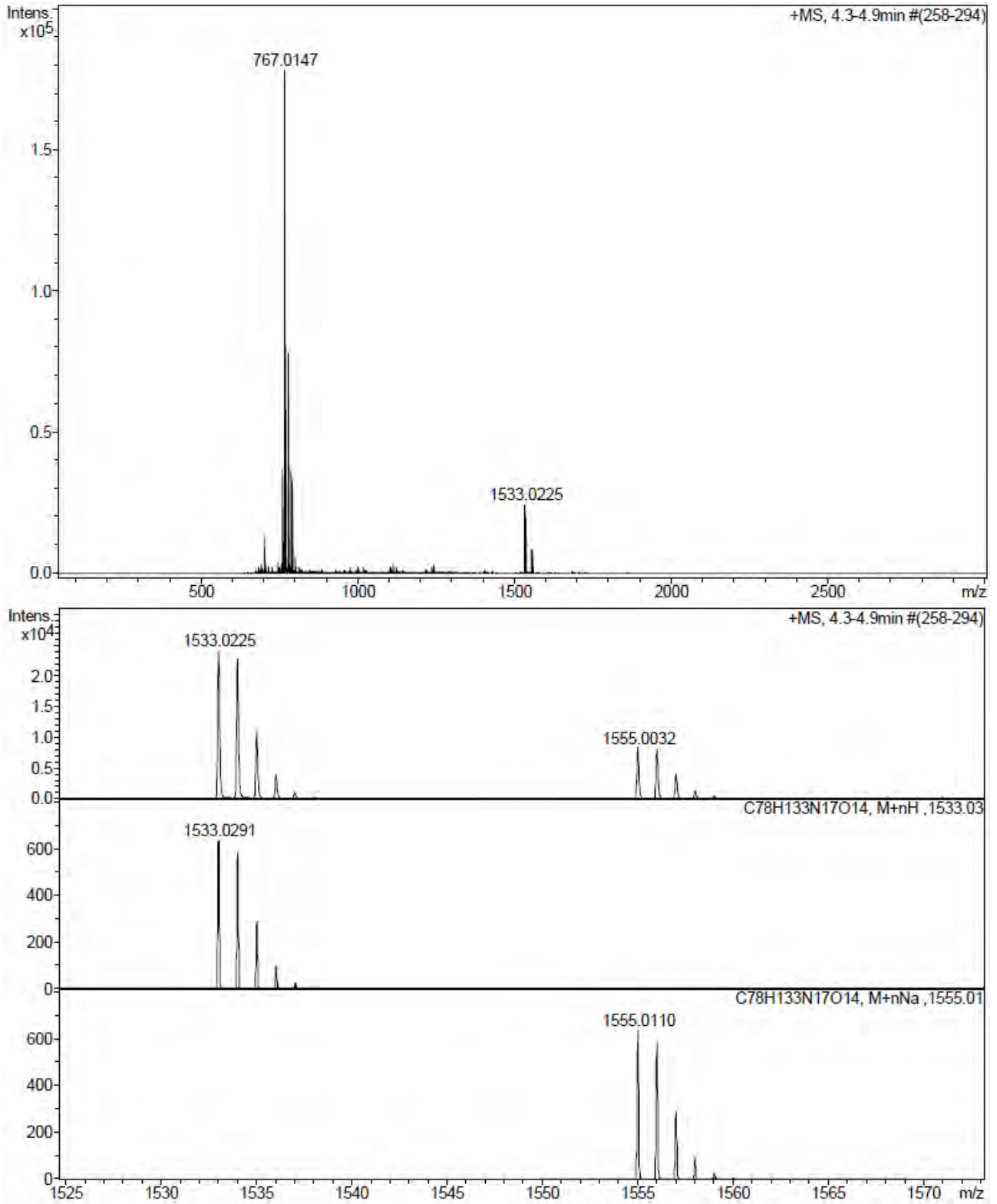


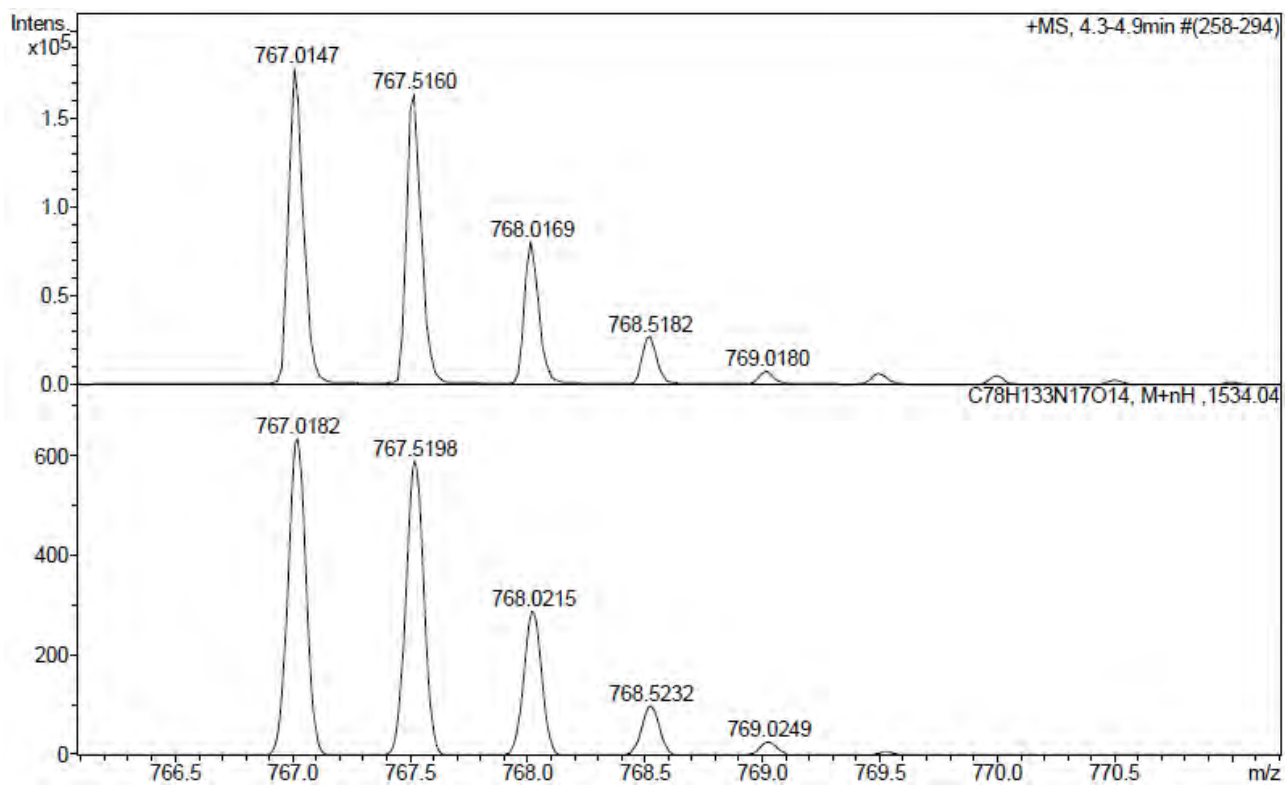
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.487	VB R	0.0464	148.45491	45.10777	1.0160
2	6.149	VV R	0.0632	1.10937e4	2578.84717	75.9247
3	6.340	VV E	0.0510	902.96692	250.56866	6.1799
4	6.634	BV R	0.0567	2112.34912	528.10651	14.4569
5	6.785	VV E	0.0489	152.63356	43.54723	1.0446
6	7.551	VV	0.0518	201.33051	57.53705	1.3779

Totals : 1.46114e4 3503.71439

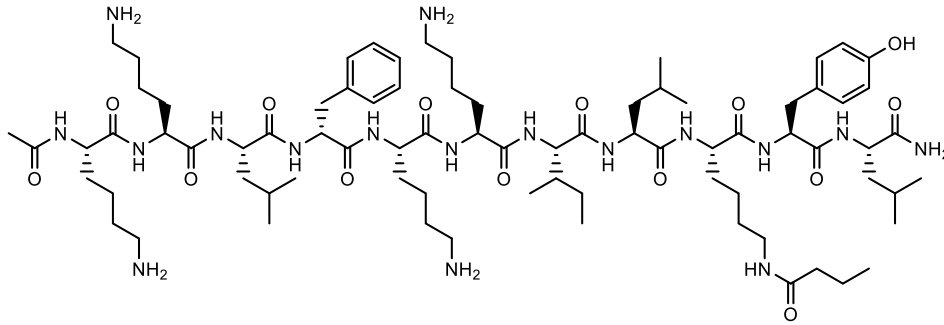
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

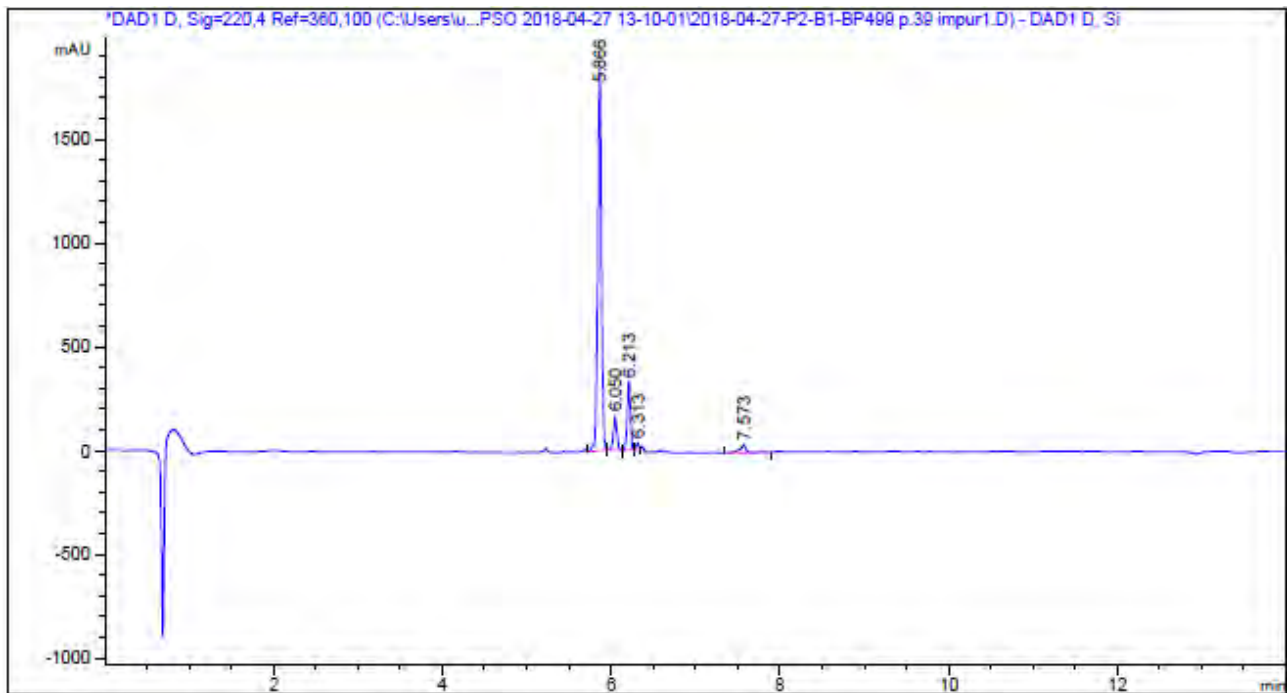




Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(COC₃H₇)-Tyr-Leu-NH₂ (BP499)

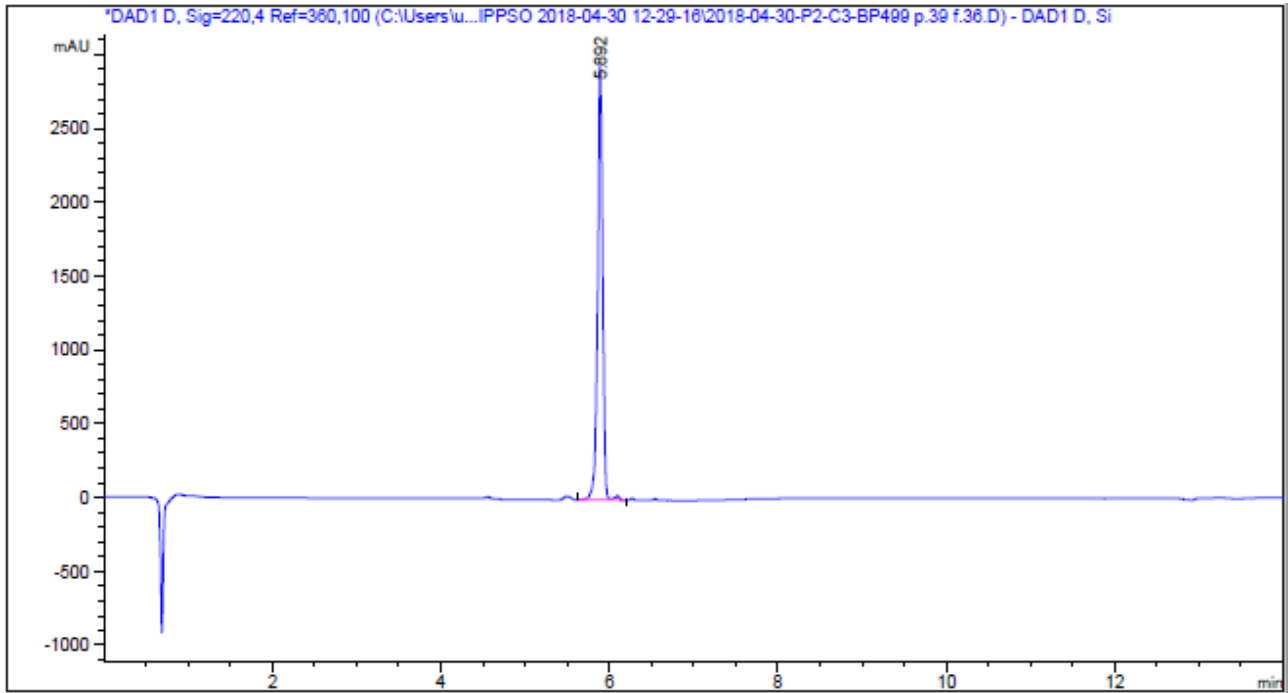


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

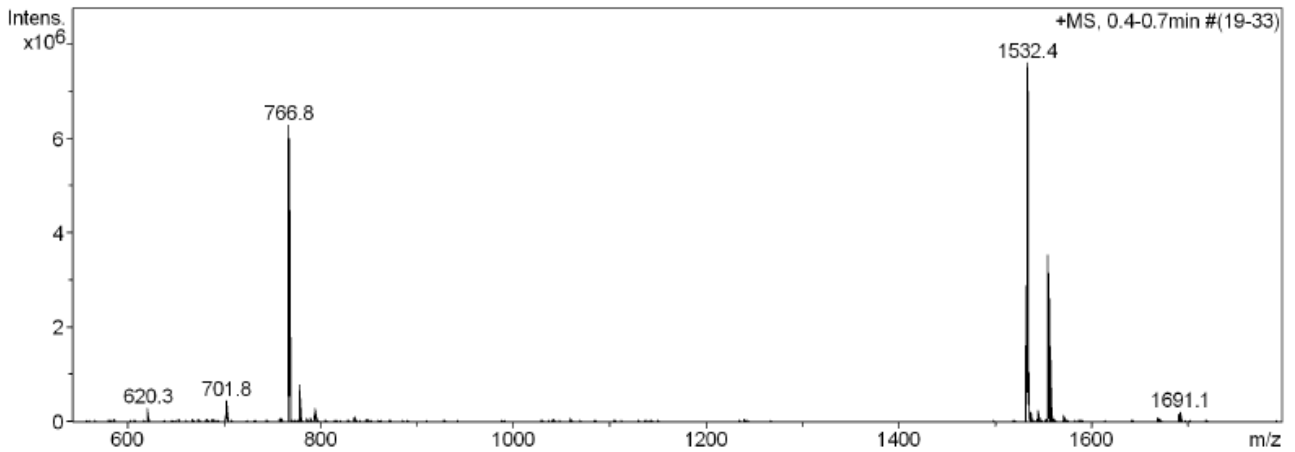


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.866	VB R	0.0443	5598.51953	1849.33667	77.5439
2	6.050	BB	0.0433	478.38898	162.94824	6.6261
3	6.213	BB	0.0390	849.00946	329.78500	11.7594
4	6.313	BV	0.0370	90.36411	37.69422	1.2516
5	7.573	BV R	0.0764	203.52594	36.29560	2.8190

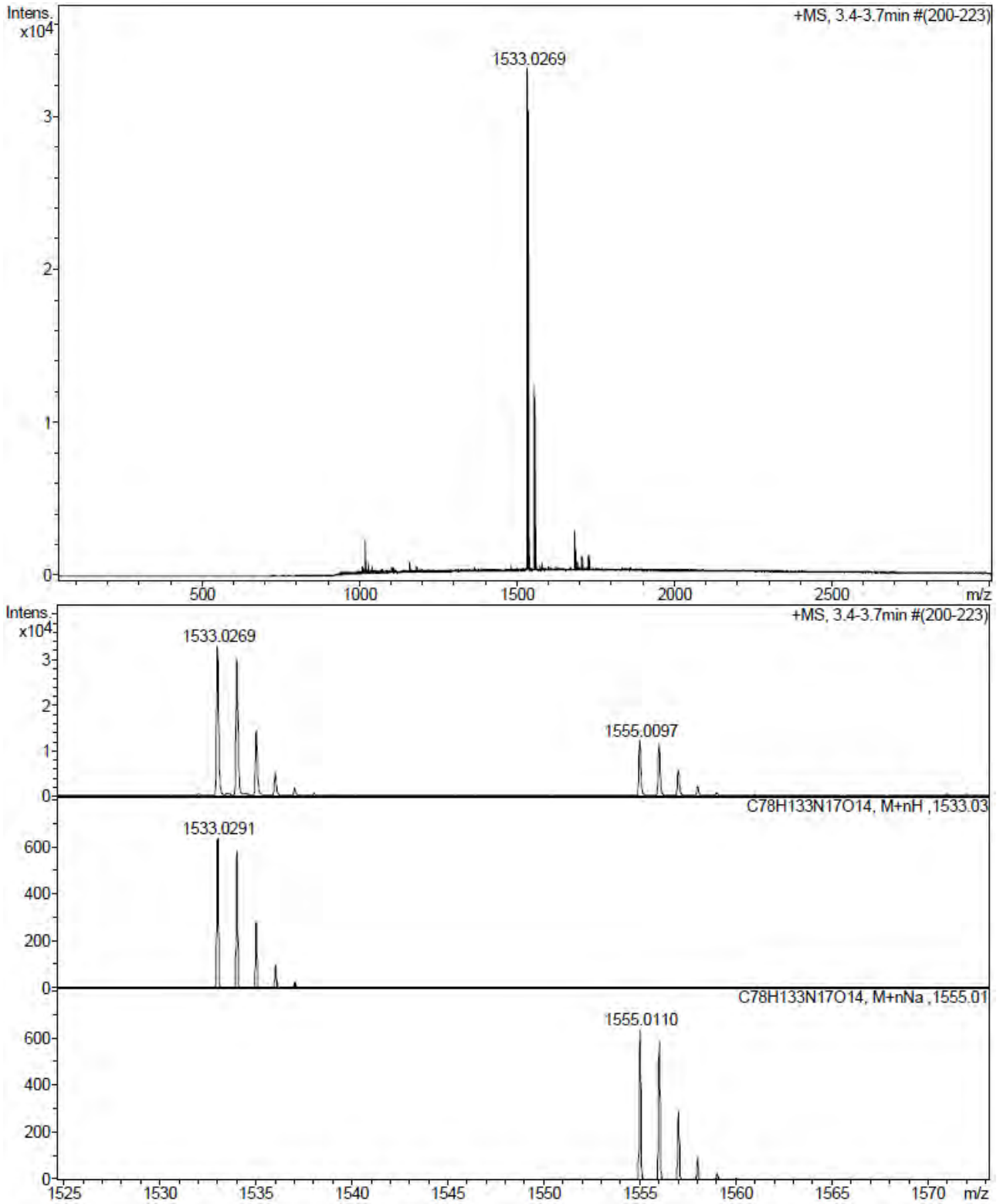
Totals : 7219.80802 2416.05974

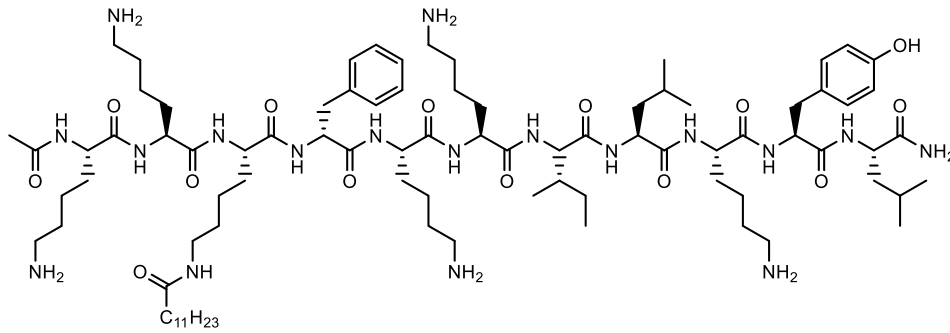
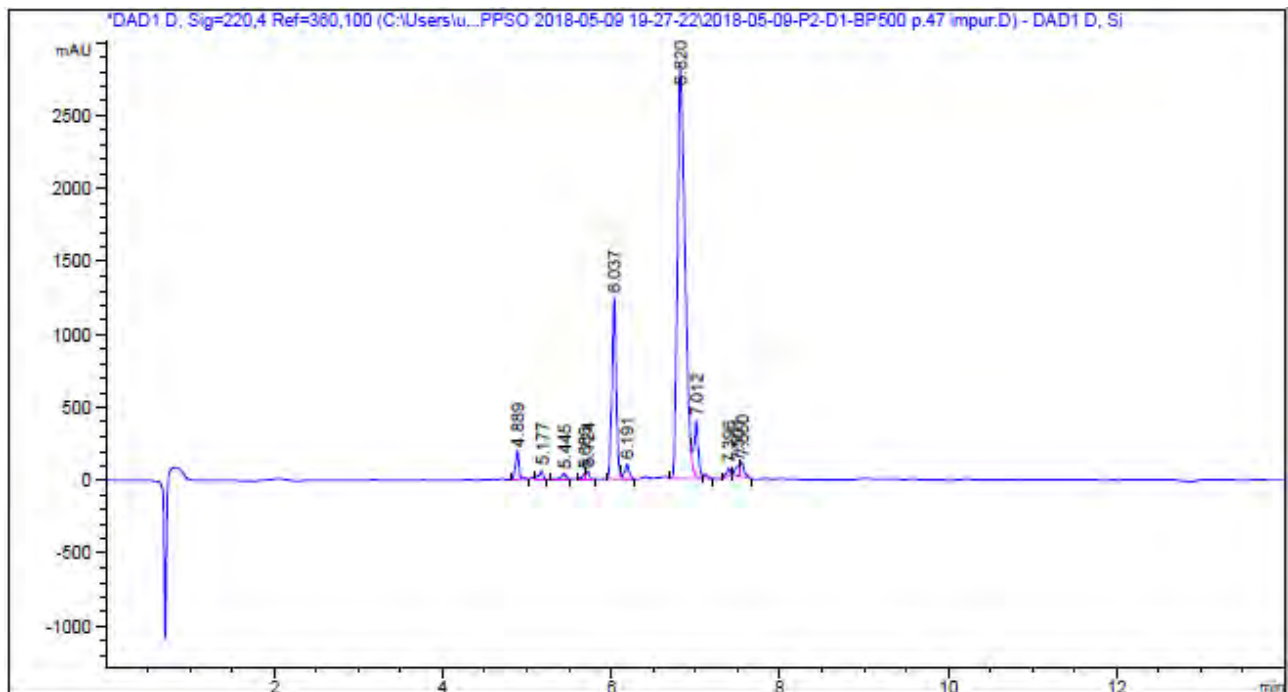
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.892	BV R	0.0617	1.23197e4	2951.55957	100.0000
Totals :				1.23197e4	2951.55957	

ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

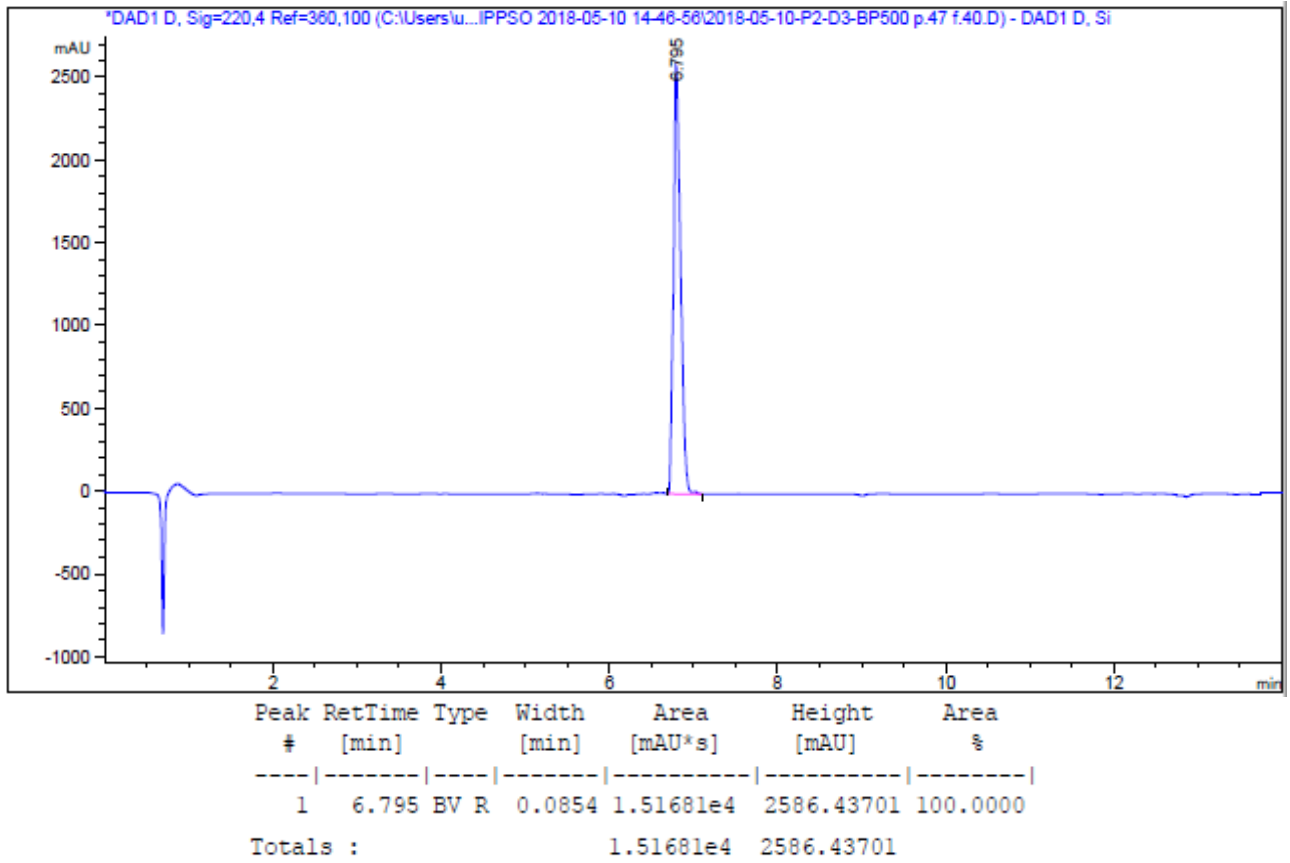


Ac-Lys-Lys-Lys(COC₁₁H₂₃)-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP500)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

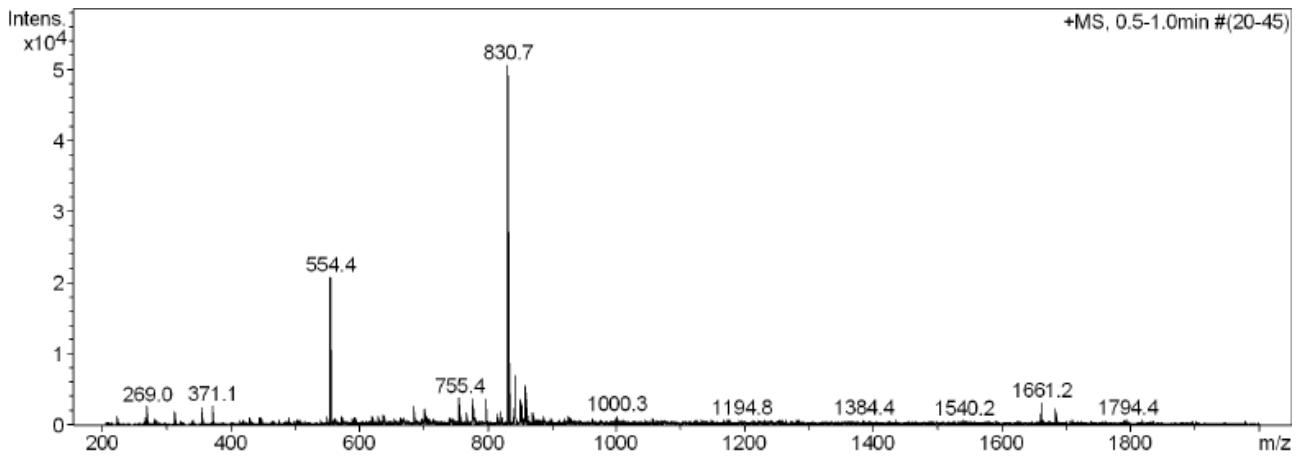
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.889	BV R	0.0428	573.98651	192.62531	2.2259
2	5.177	VB	0.0478	194.40025	56.93281	0.7539
3	5.445	VB R	0.0522	155.32494	41.03360	0.6023
4	5.683	BV	0.0402	88.94859	32.20647	0.3449
5	5.724	VB	0.0343	124.03711	52.92344	0.4810
6	6.037	BV R	0.0531	4459.11426	1236.56287	17.2920
7	6.191	VB E	0.0551	397.45981	102.88657	1.5413
8	6.820	BV R	0.0960	1.77881e4	2804.05859	68.9804
9	7.012	VV E	0.0503	1283.47070	371.63638	4.9772
10	7.396	BB	0.0442	159.22202	52.83167	0.6174
11	7.501	BV	0.0502	202.72284	65.27905	0.7861
12	7.550	VB	0.0532	360.41031	97.30477	1.3976

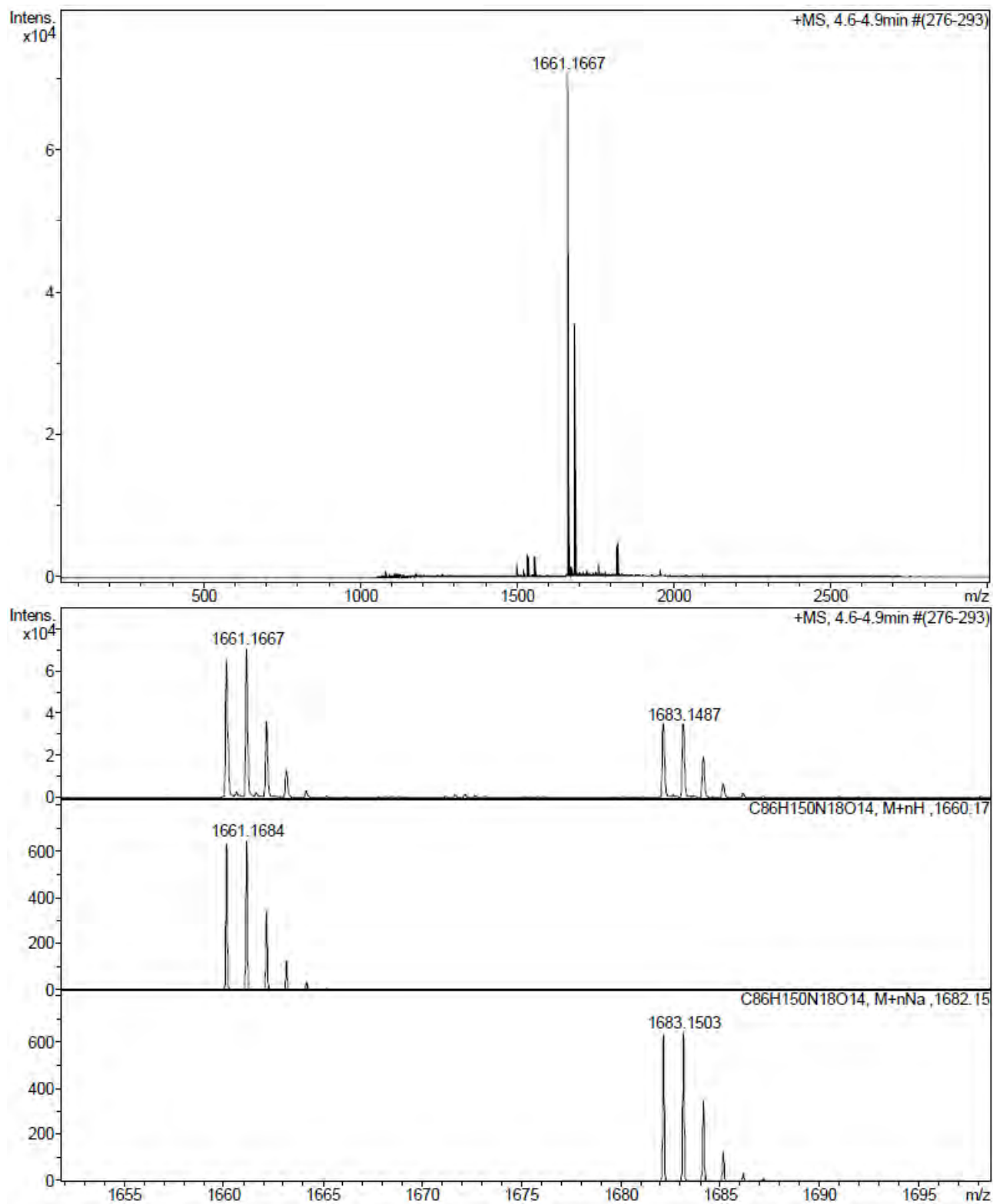
Totals : 2.57872e4 5106.28153

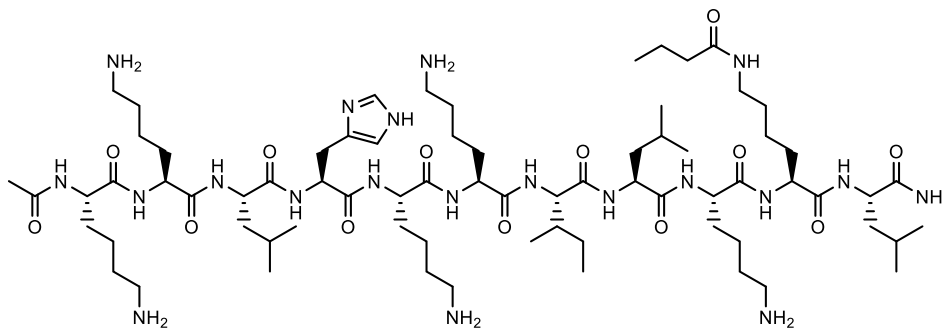
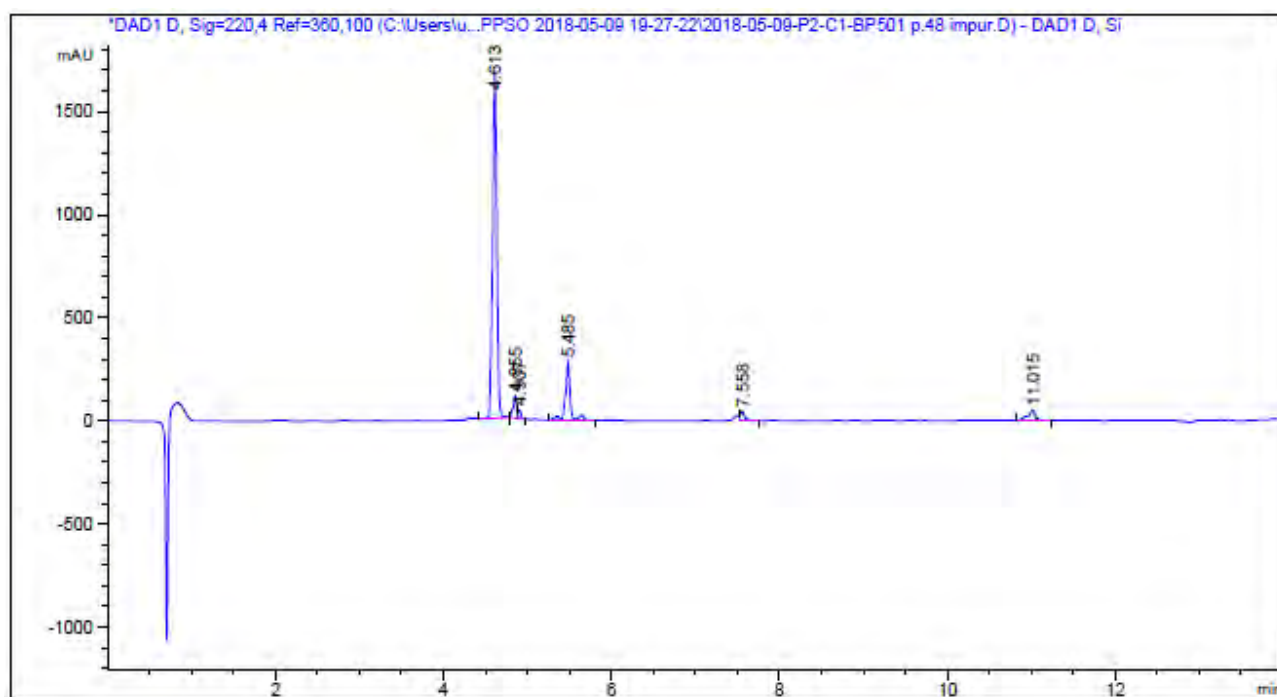
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



ESI-MS (m/z)

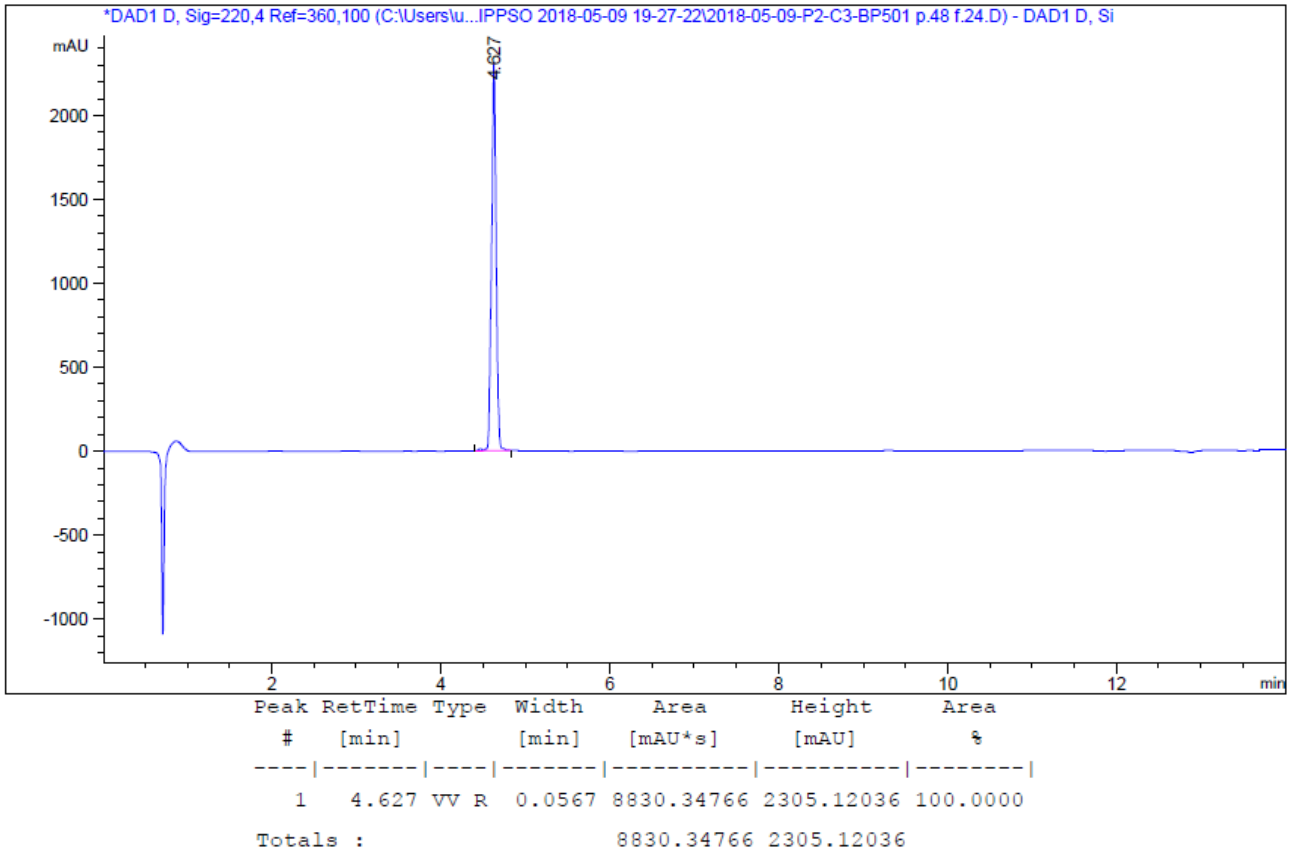
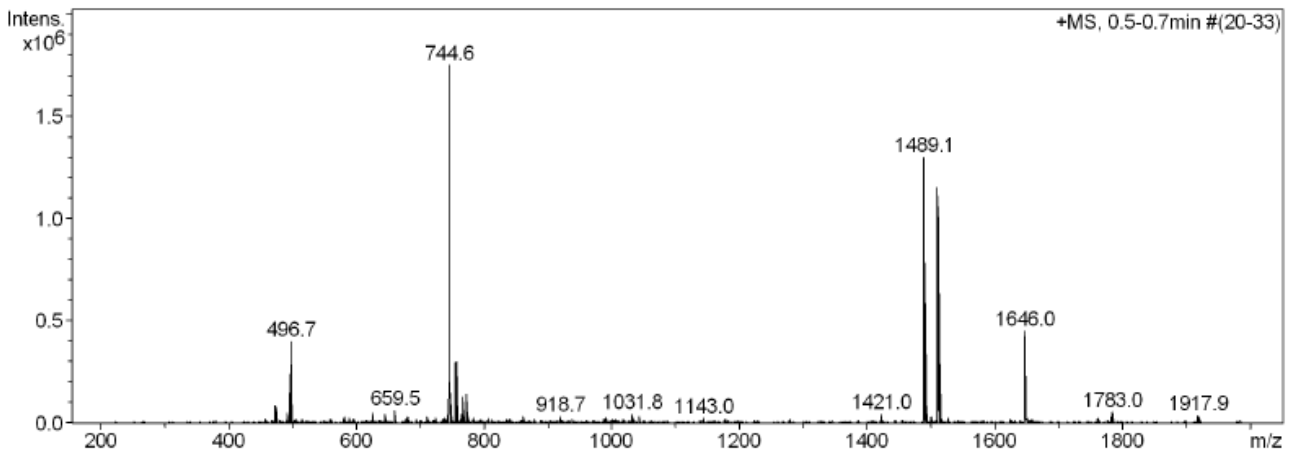


HRMS (m/z)

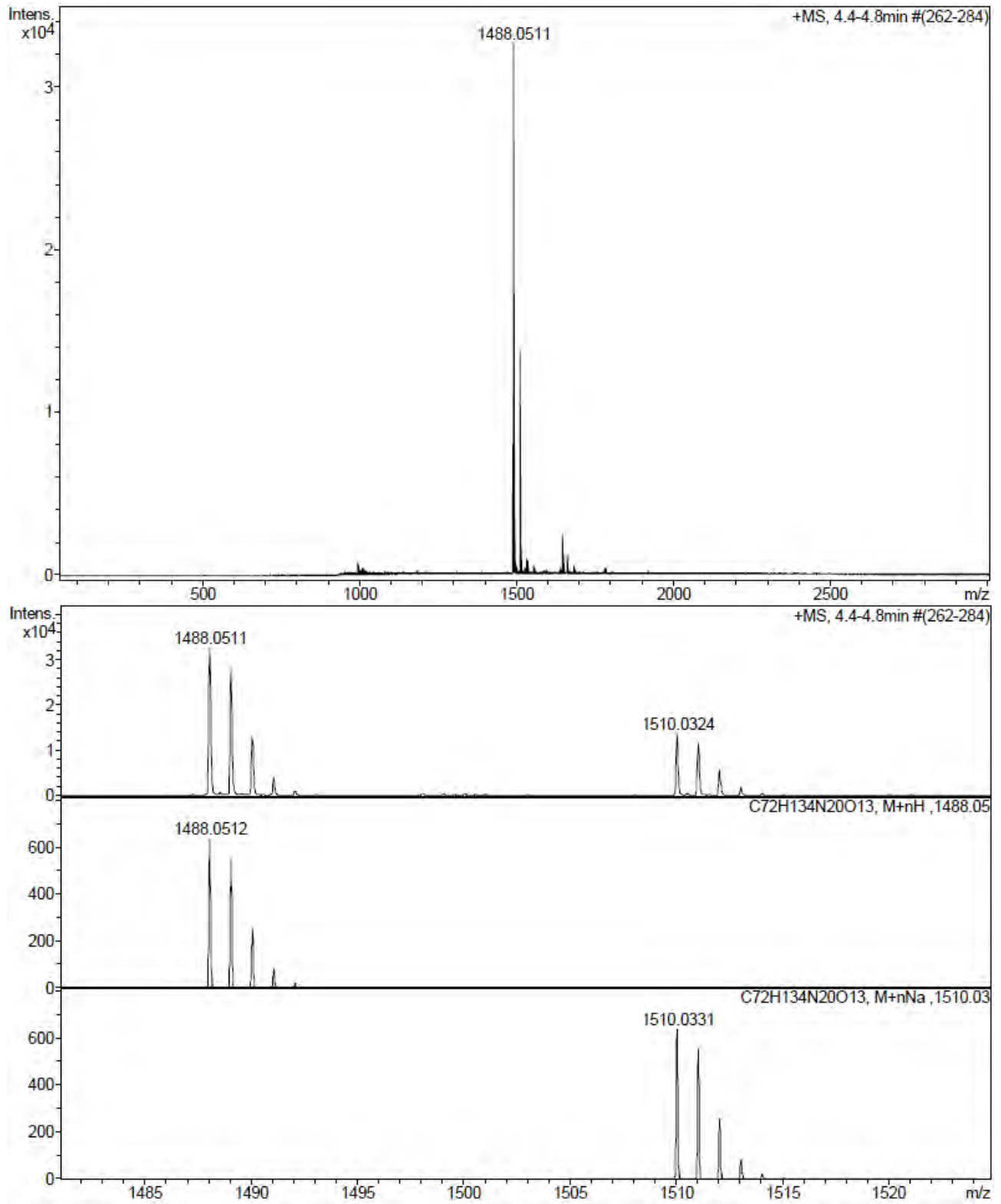
Ac-Lys-Lys-Leu-His-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (BP501)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

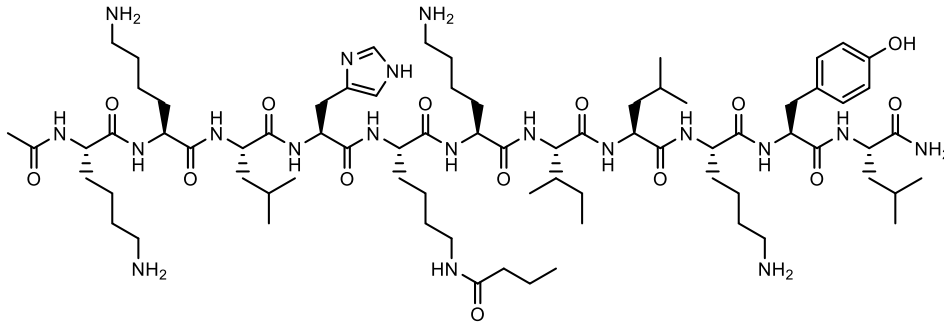
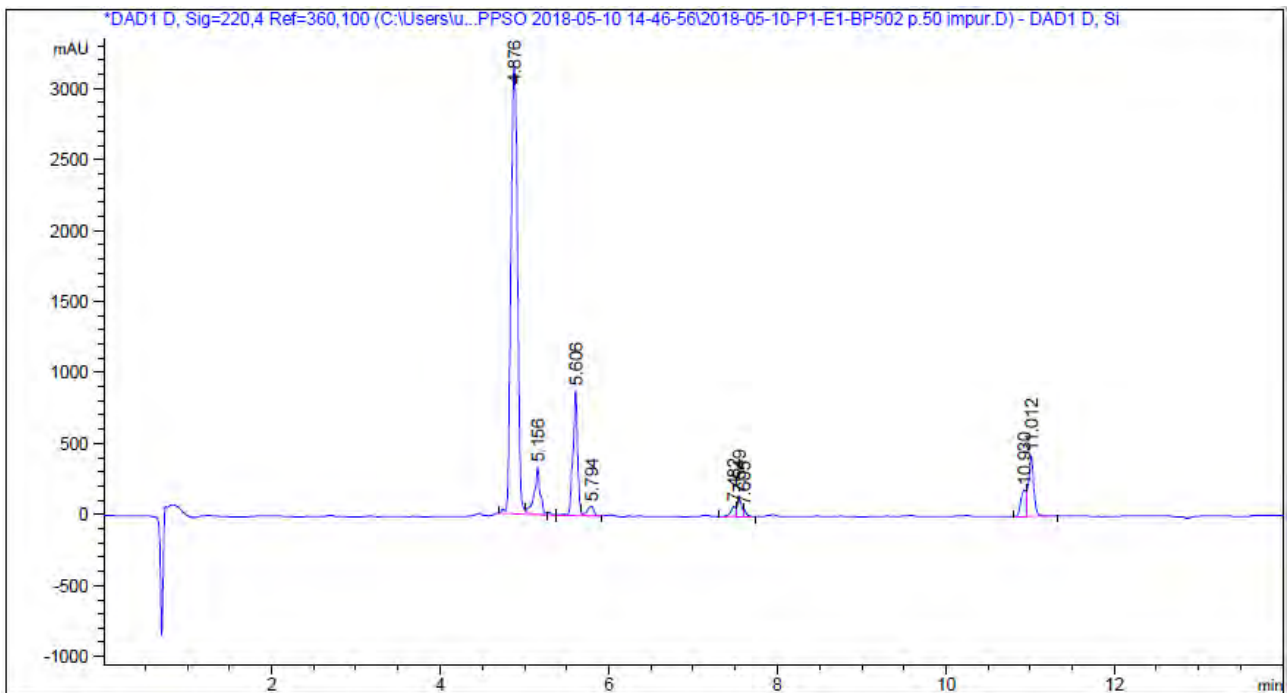
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.613	VV R	0.0505	5811.38135	1675.55383	74.5562
2	4.855	BV	0.0428	319.79245	107.12914	4.1027
3	4.907	VB	0.0311	86.19245	41.71175	1.1058
4	5.485	VV R	0.0561	1115.45459	282.46628	14.3106
5	7.558	VB	0.0567	172.16484	43.98072	2.2088
6	11.015	BB	0.0831	289.64175	48.19611	3.7159

Totals : 7794.62743 2199.03782

HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

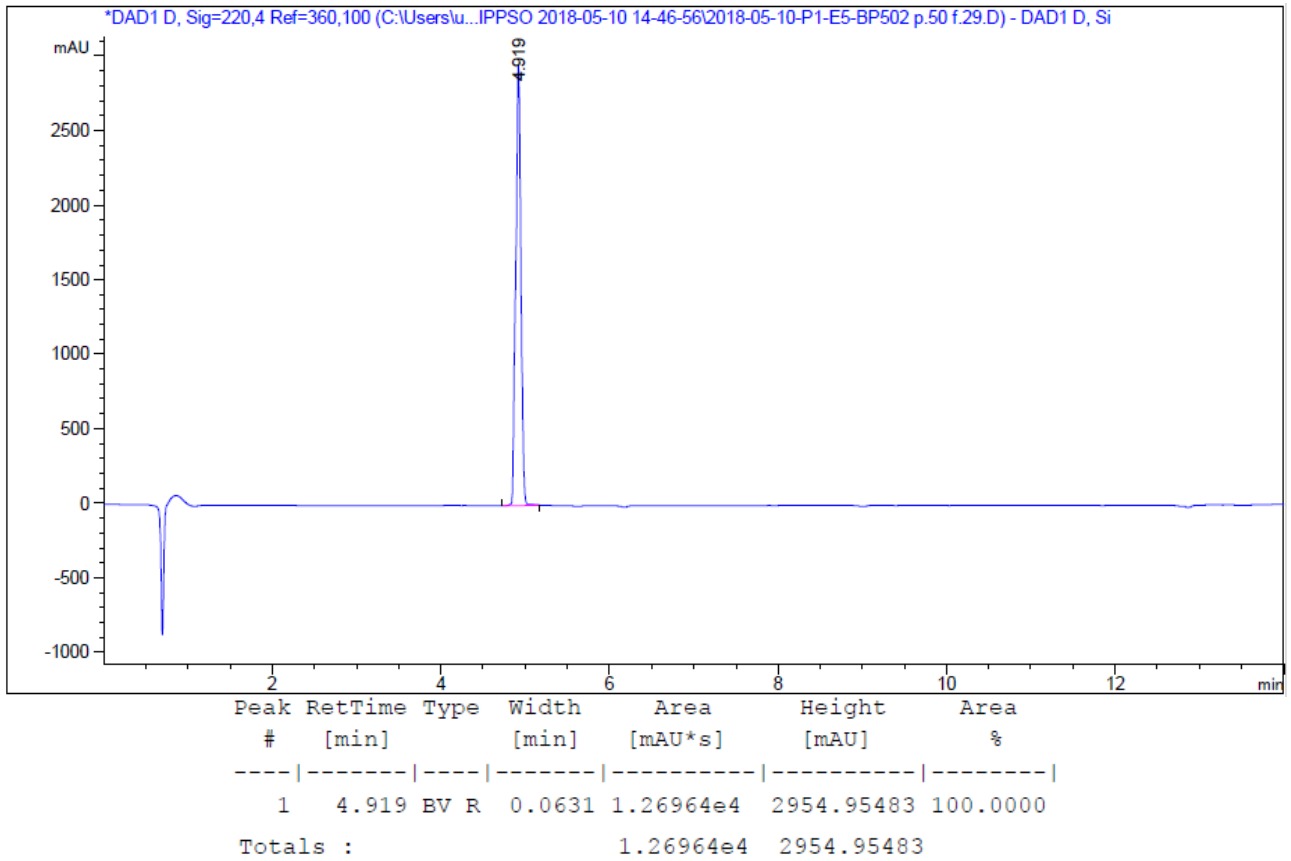
HRMS (m/z)



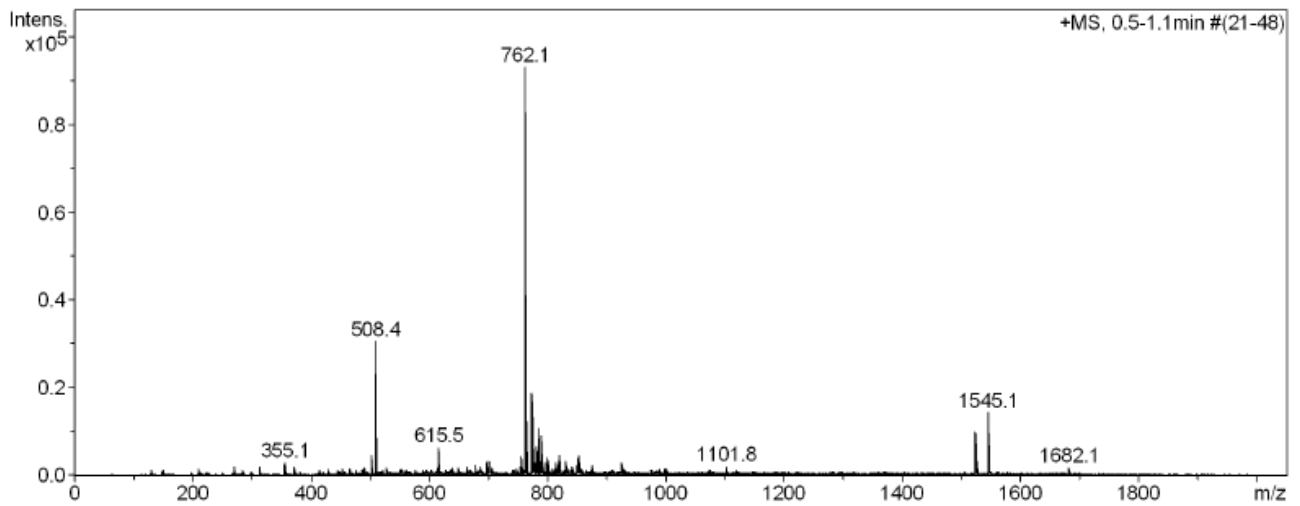
Ac-Lys-Lys-Leu-His(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP502)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

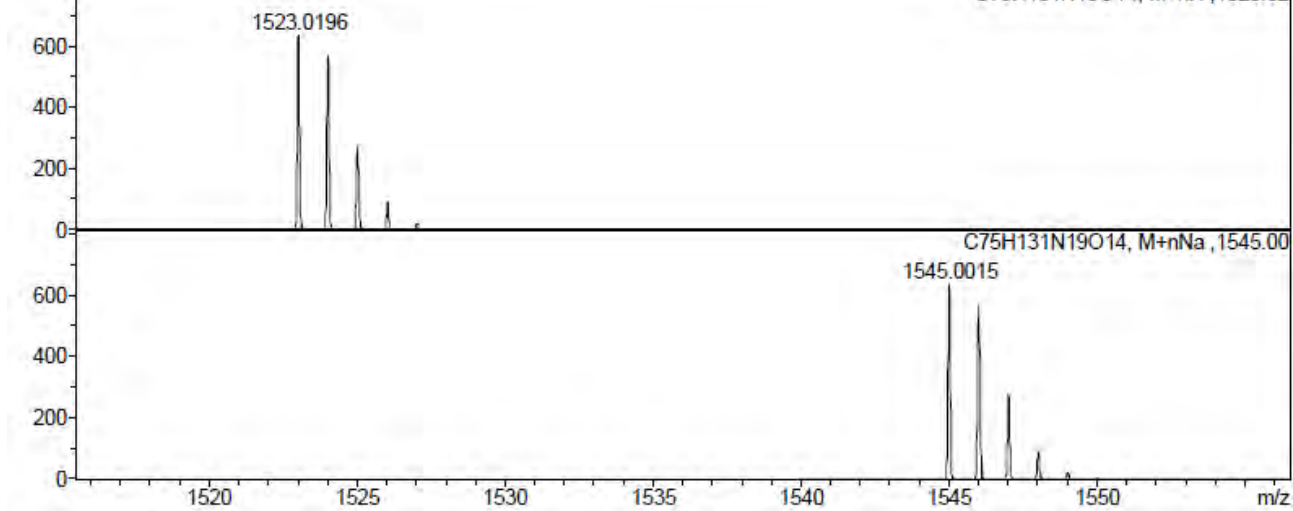
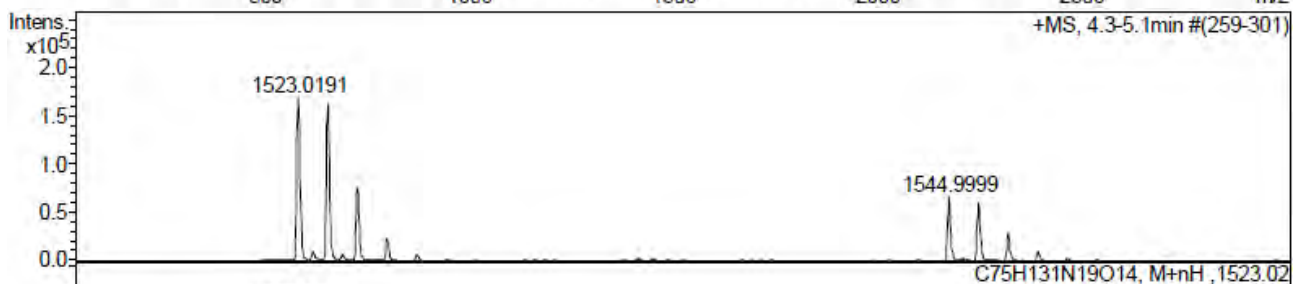
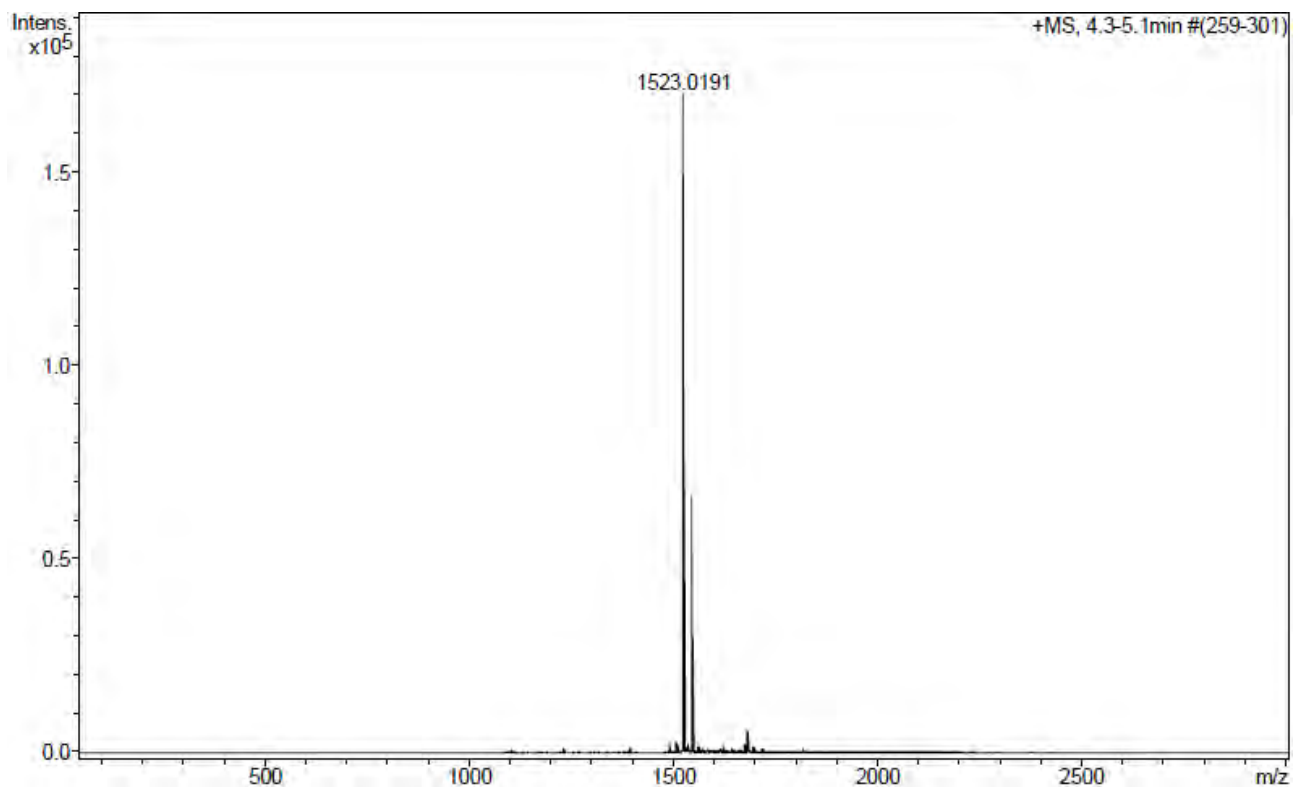
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.876	VV R	0.0819	1.71988e4	3142.53906	66.1217
2	5.156	VV E	0.0640	1604.14746	334.49460	6.1672
3	5.606	VV R	0.0534	3361.93530	883.10394	12.9251
4	5.794	VB E	0.0697	357.15604	68.64326	1.3731
5	7.482	BV	0.0603	283.18814	69.80135	1.0887
6	7.549	VV	0.0528	459.09119	128.23923	1.7650
7	7.605	VB	0.0365	114.81831	46.93065	0.4414
8	10.930	BV	0.0661	771.86859	183.41315	2.9675
9	11.012	VB	0.0660	1859.85132	417.45279	7.1503

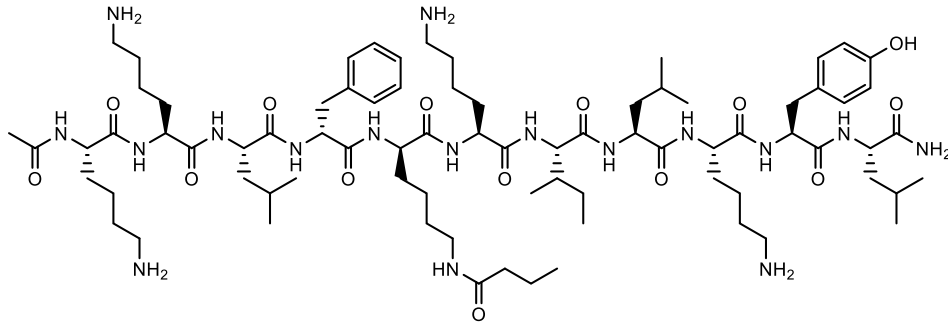
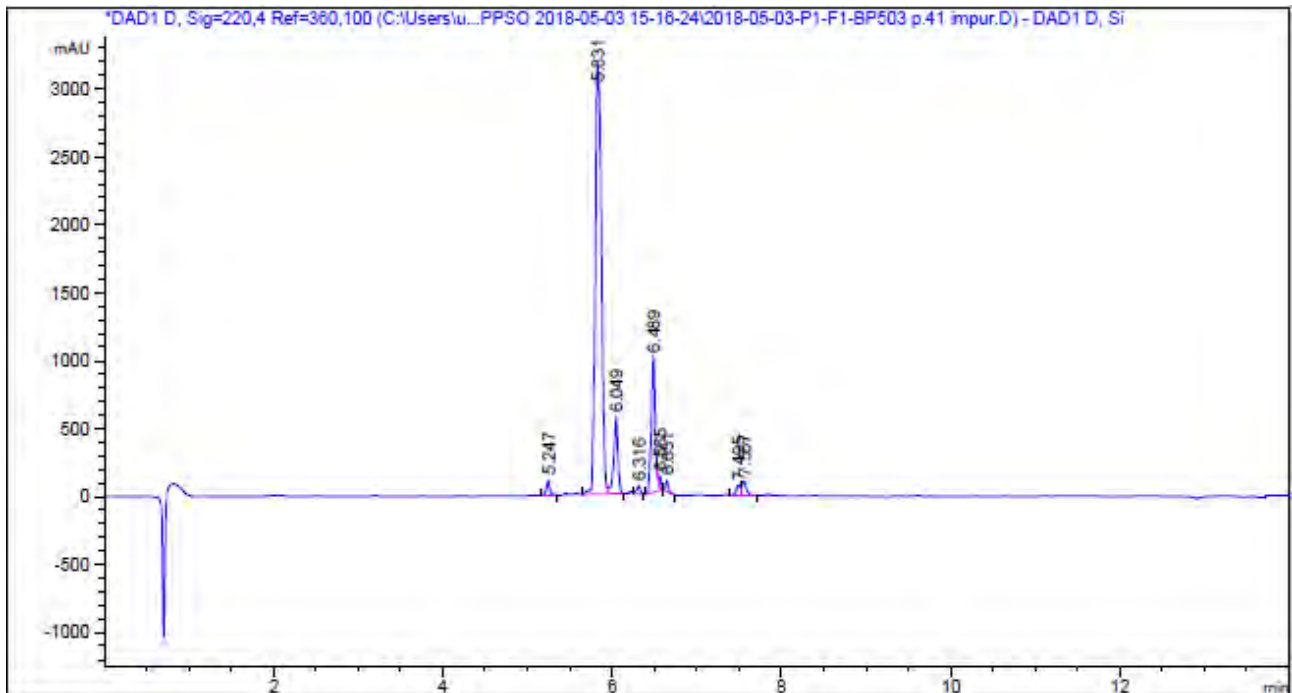
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



ESI-MS (m/z)

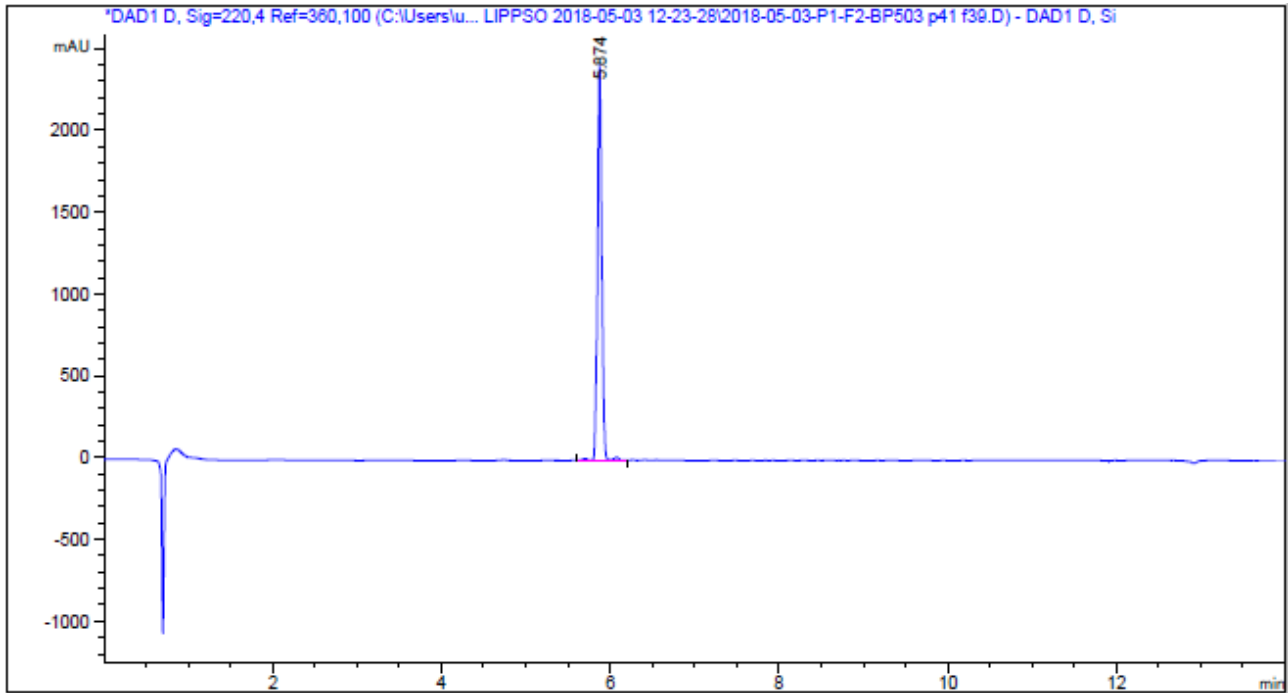


HRMS (m/z)

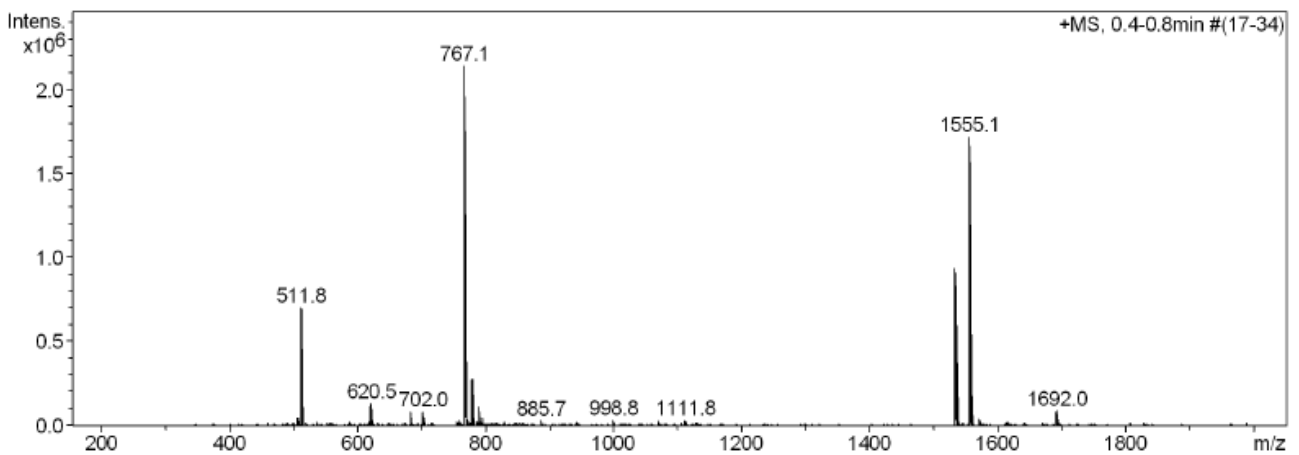
Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-D-Lys(COC₃H₇)-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP503)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.247	BB	0.0424	324.39719	110.01169	1.4202
2	5.831	VV R	0.0785	1.60395e4	3147.60254	70.2225
3	6.049	VB E	0.0508	1952.62183	557.87189	8.5488
4	6.316	VB	0.0423	177.34346	60.24075	0.7764
5	6.489	BV R	0.0493	3337.57983	991.46075	14.6122
6	6.565	VB E	0.0292	161.58295	84.85044	0.7074
7	6.651	BB	0.0375	193.79315	79.21914	0.8484
8	7.495	BV	0.0480	257.41467	77.04169	1.1270
9	7.557	VV R	0.0538	396.73975	105.63332	1.7370

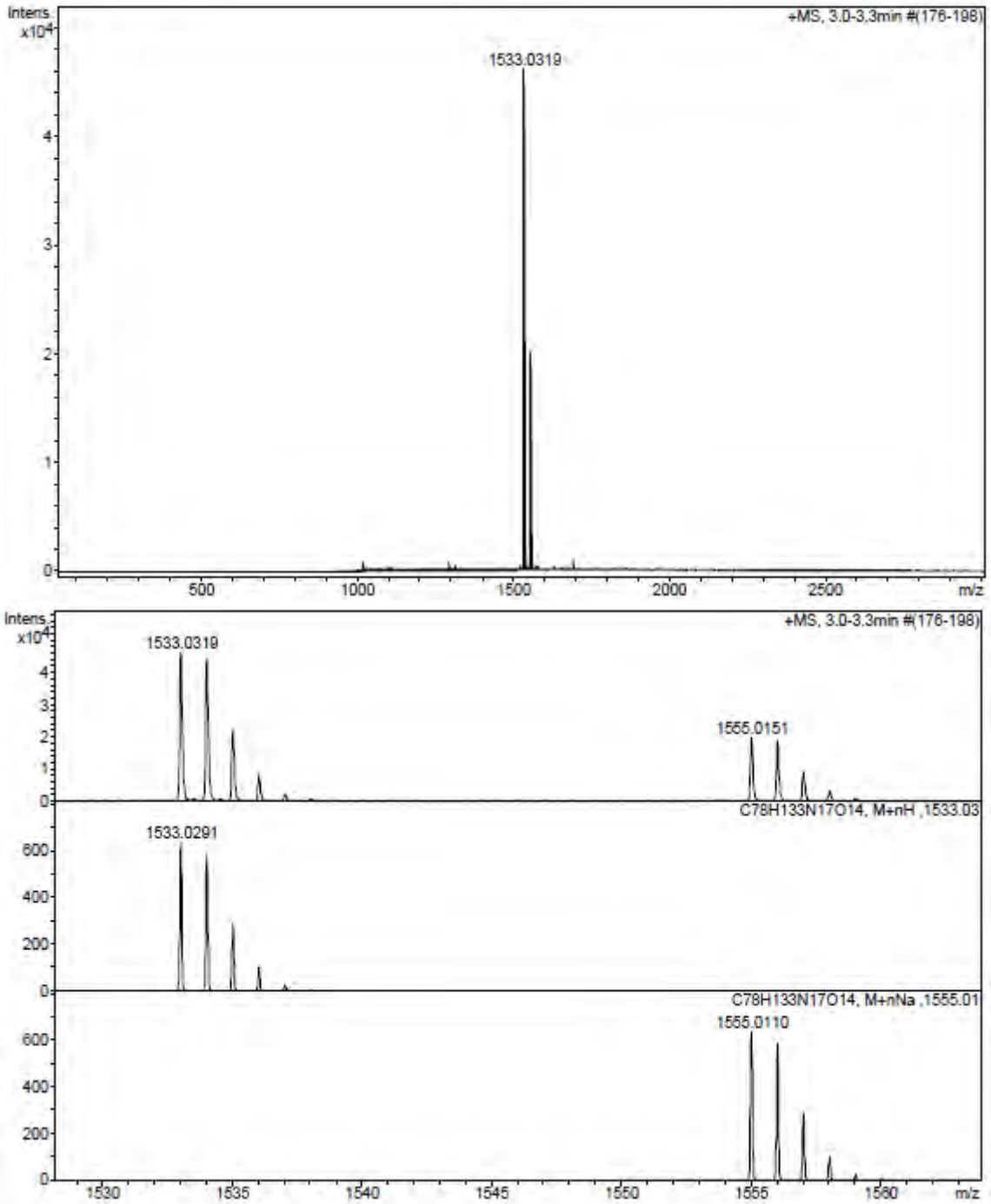
Totals : 2.28410e4 5213.93221

HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.874	VV R	0.0520	8544.11035	2429.77344	100.0000
Totals :				8544.11035	2429.77344	

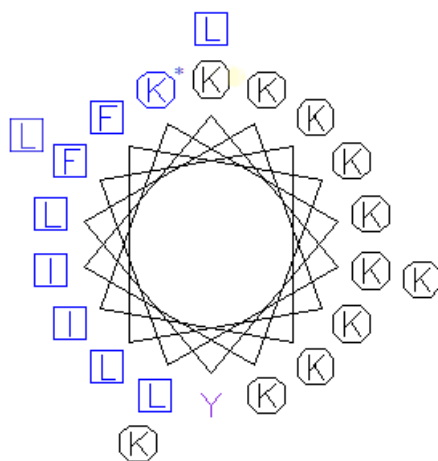
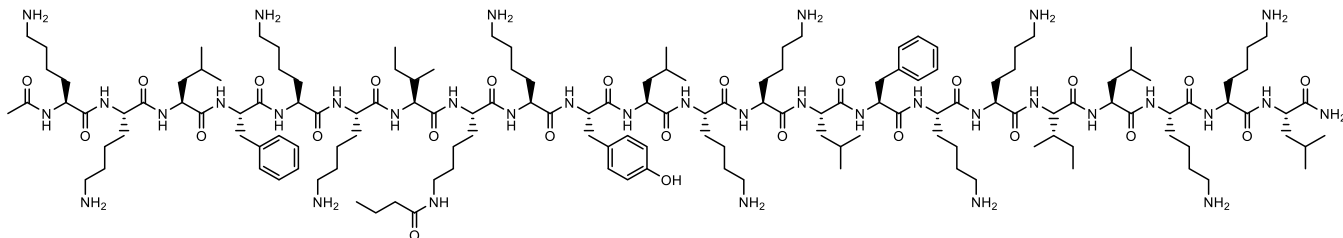
ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

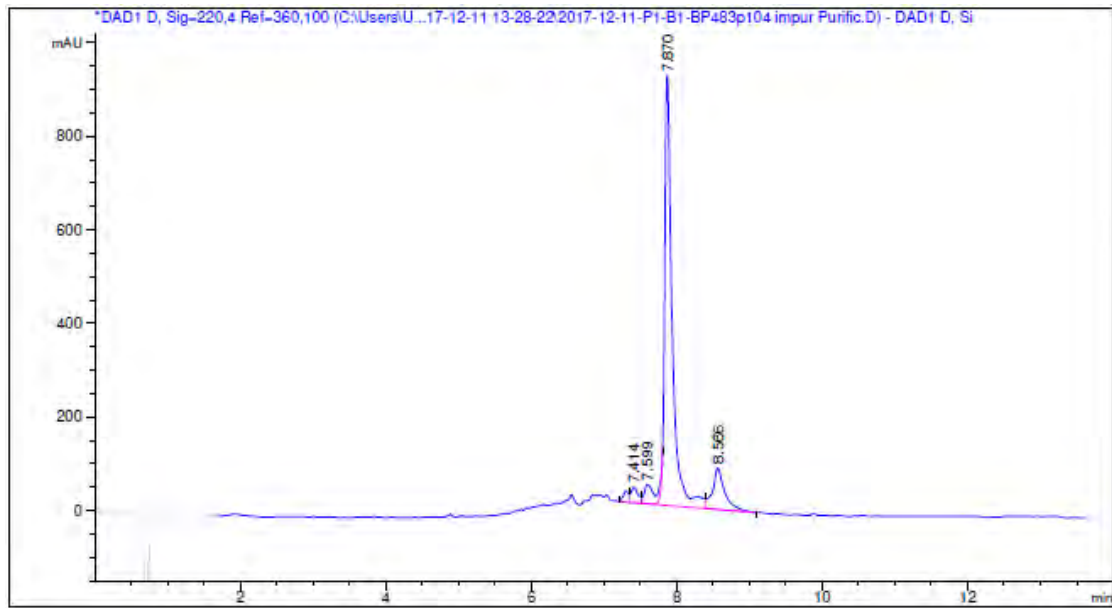


2 Lipopèptids conjugats derivats de BP100

Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂ (BP387-BP16)



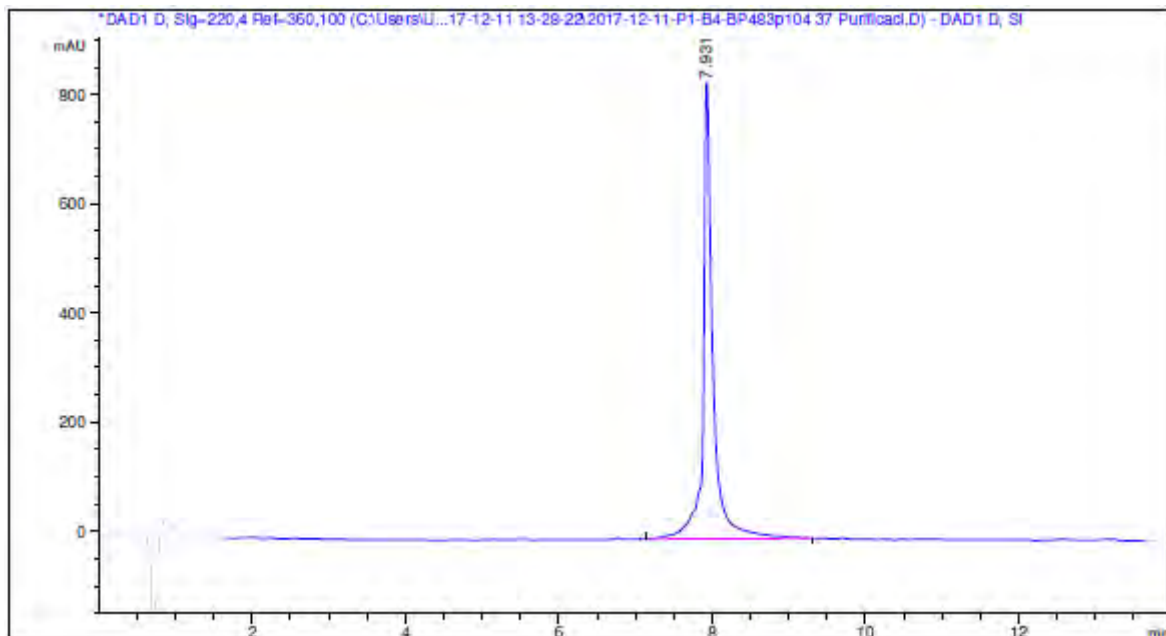
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.414	VV E	0.0986	234.82819	34.00100	2.7636
2	7.599	VV E	0.1476	432.53186	41.50467	5.0903
3	7.870	VV R	0.1060	6790.62891	920.89063	79.9160
4	8.566	VB E	0.1614	1039.22131	88.90380	12.2301

Totals : 8497.21027 1085.30010

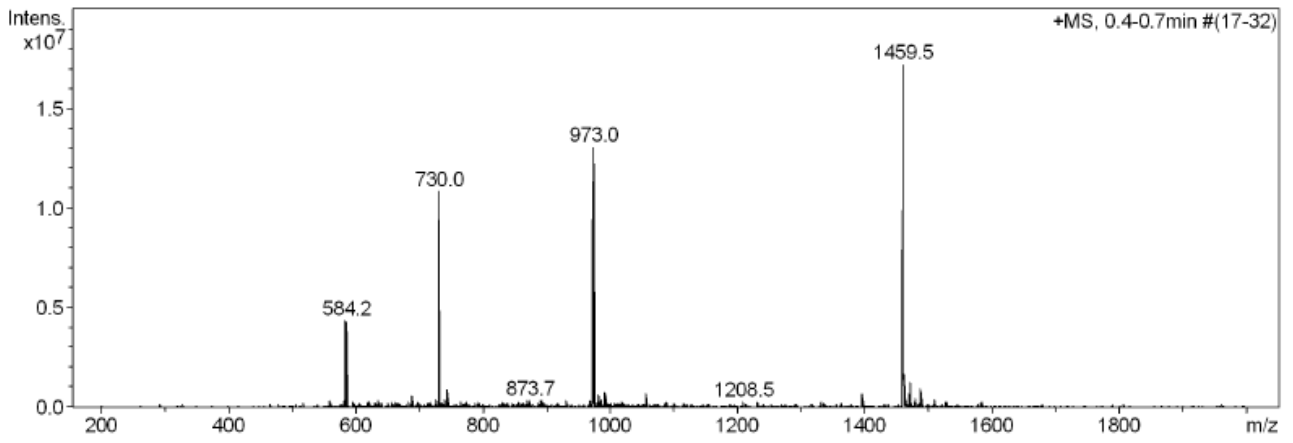
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



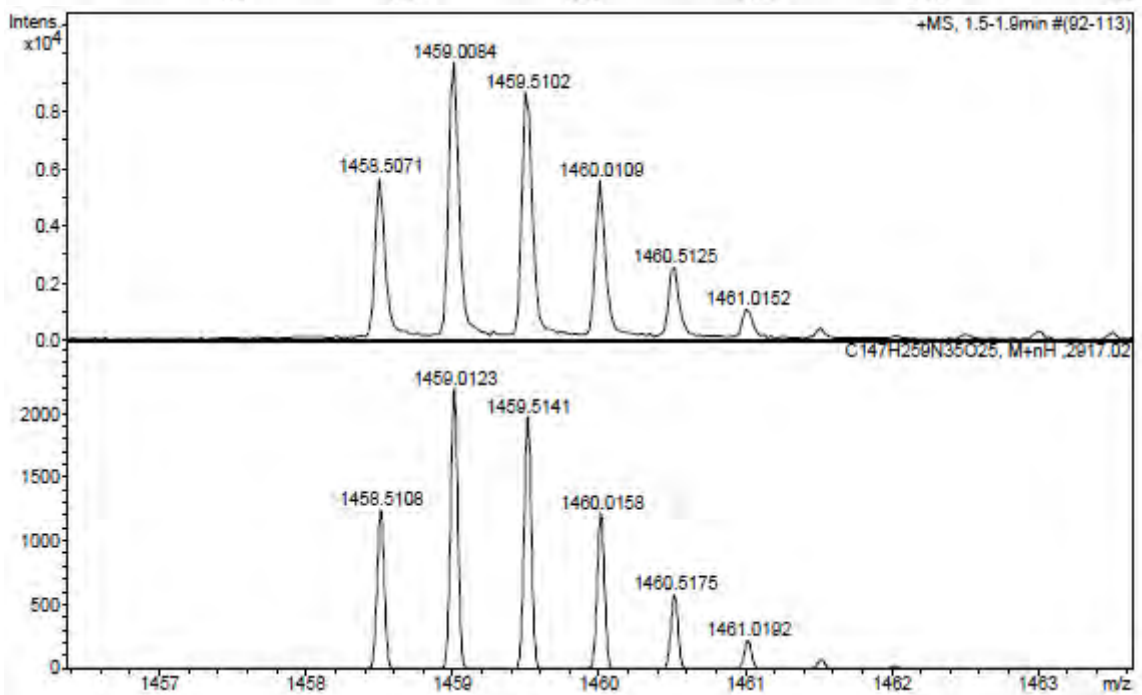
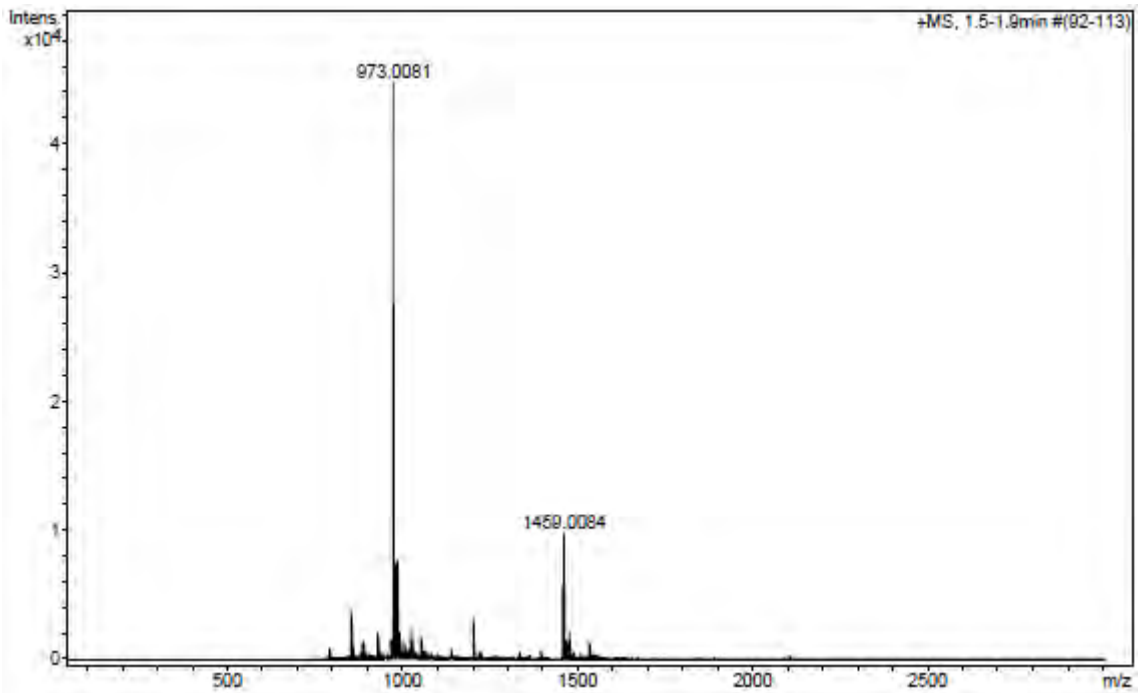
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.931	VV R	0.1229	7451.10596	836.64624	100.0000

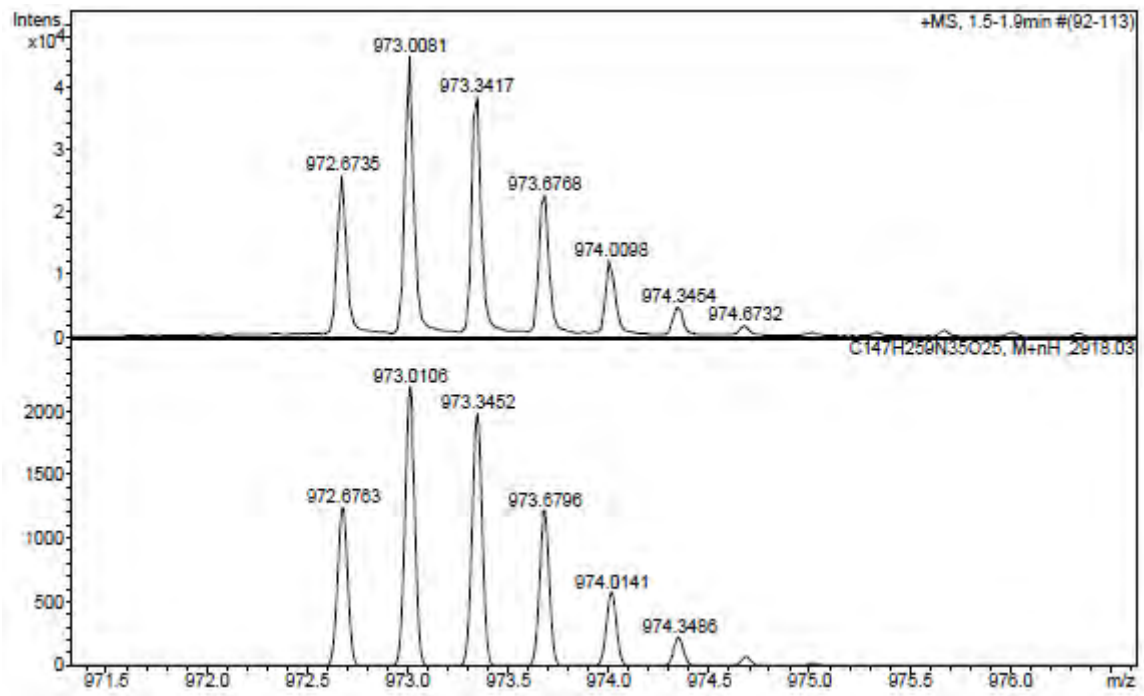
Totals : 7451.10596 836.64624

ESI-MS (m/z)

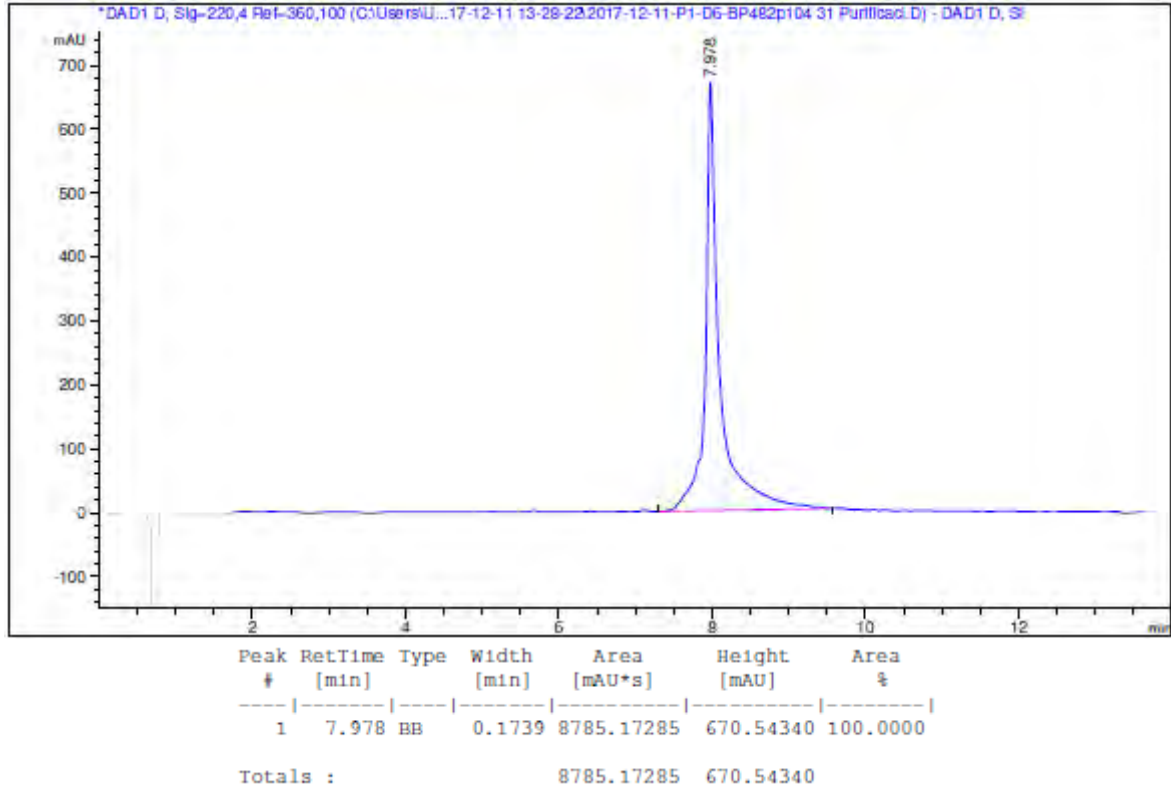


HRMS (m/z)

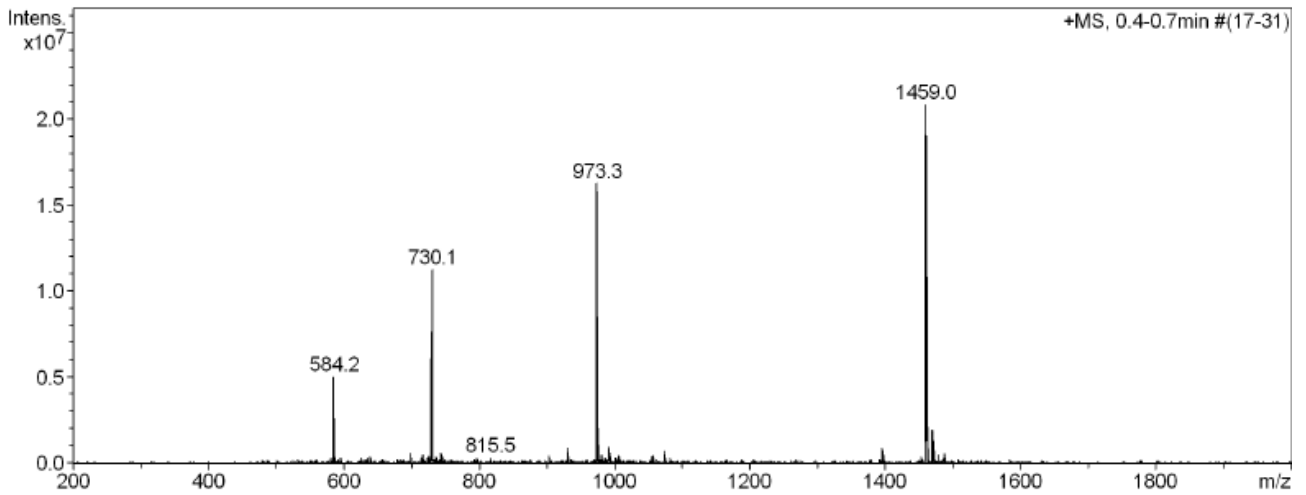


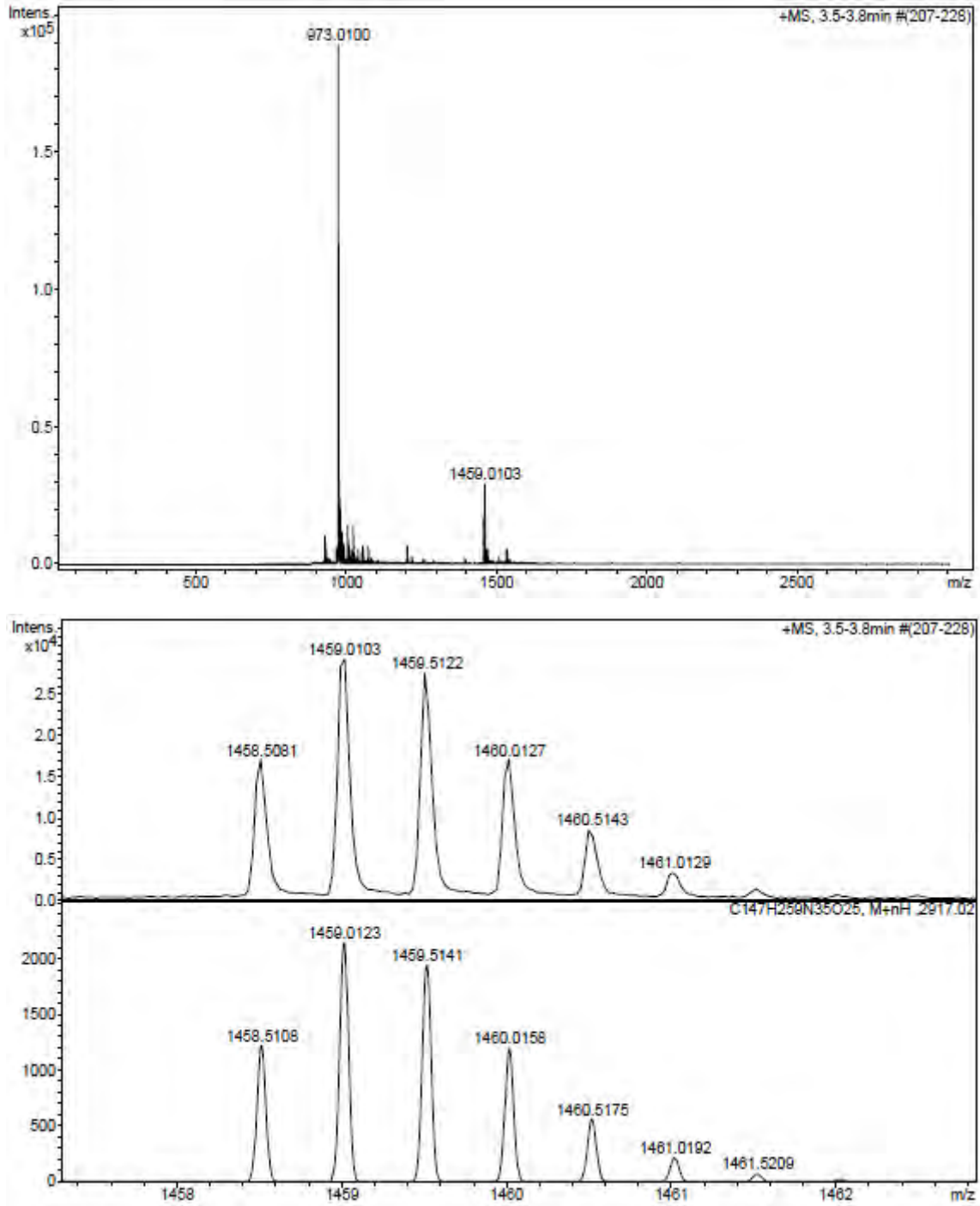


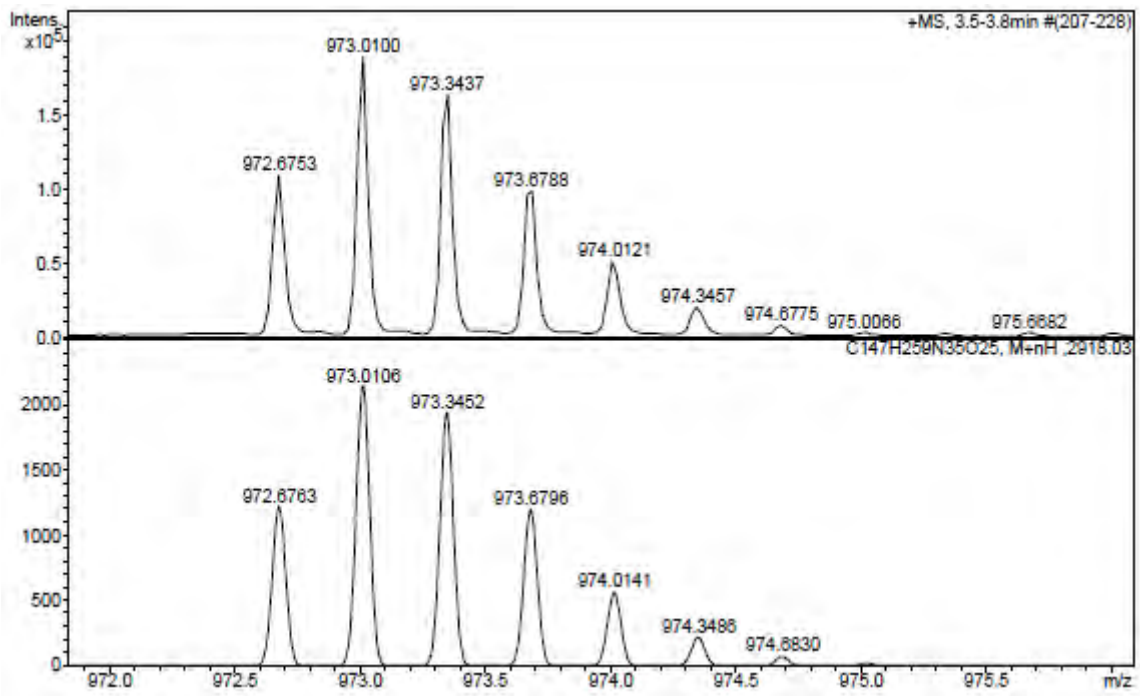
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



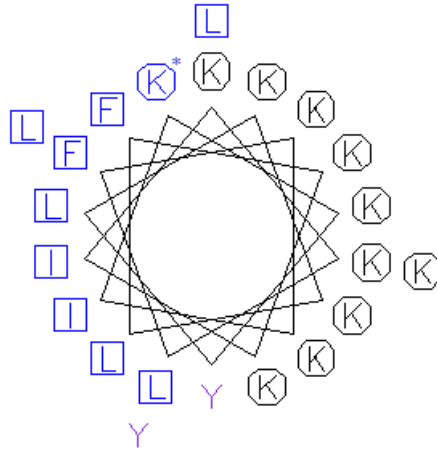
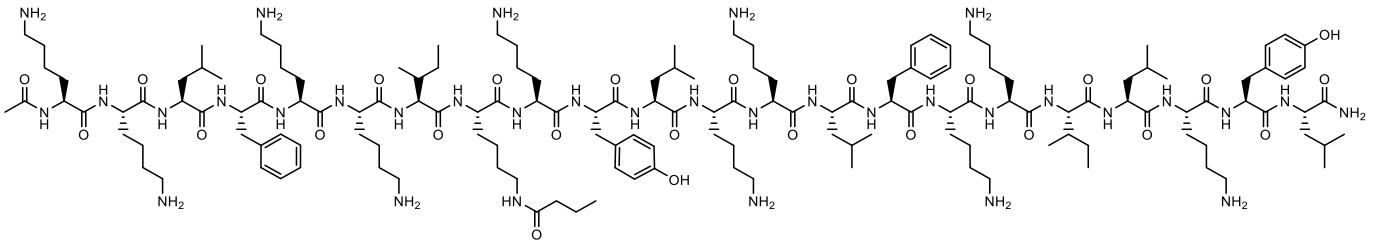
ESI-MS (m/z)



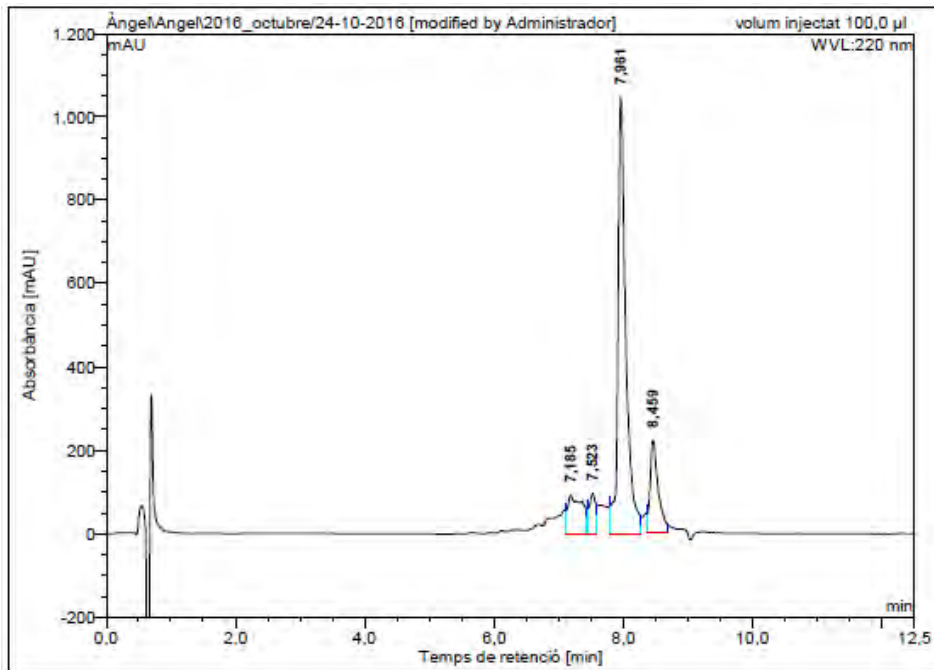
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP387-BP100)

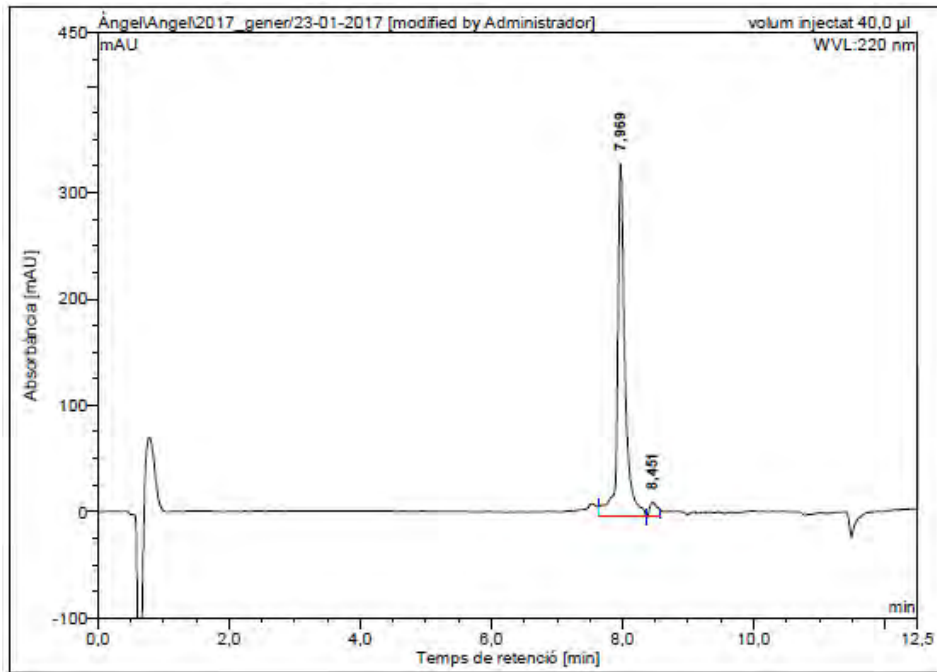


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



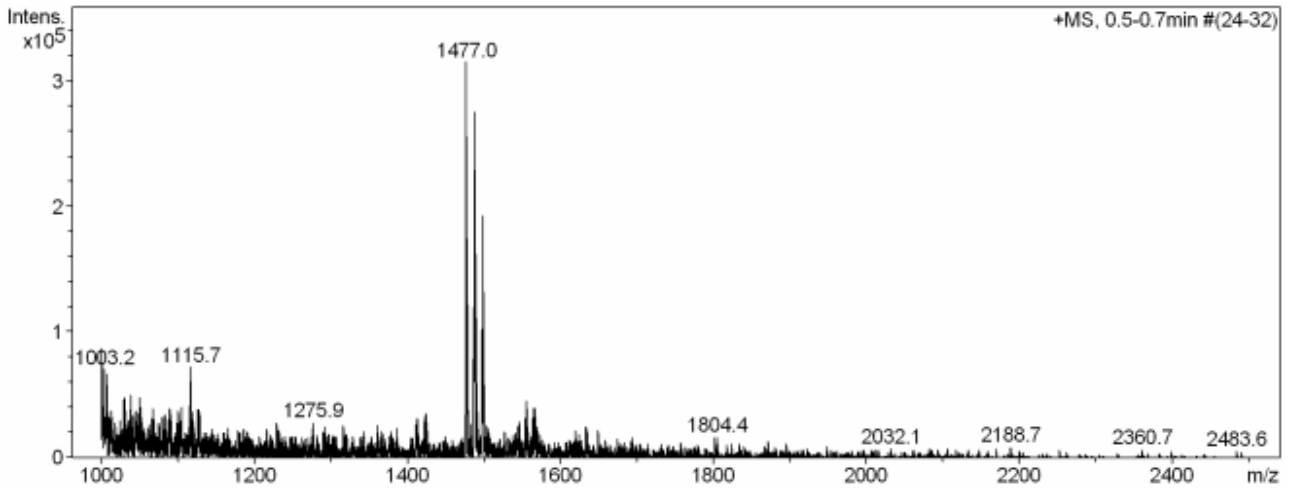
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,18	92,964	23,022	10,85
2	7,52	97,651	10,857	5,12
3	7,96	1045,078	146,461	69,01
4	8,46	222,241	31,885	15,02
Total:		1457,933	212,224	100,00

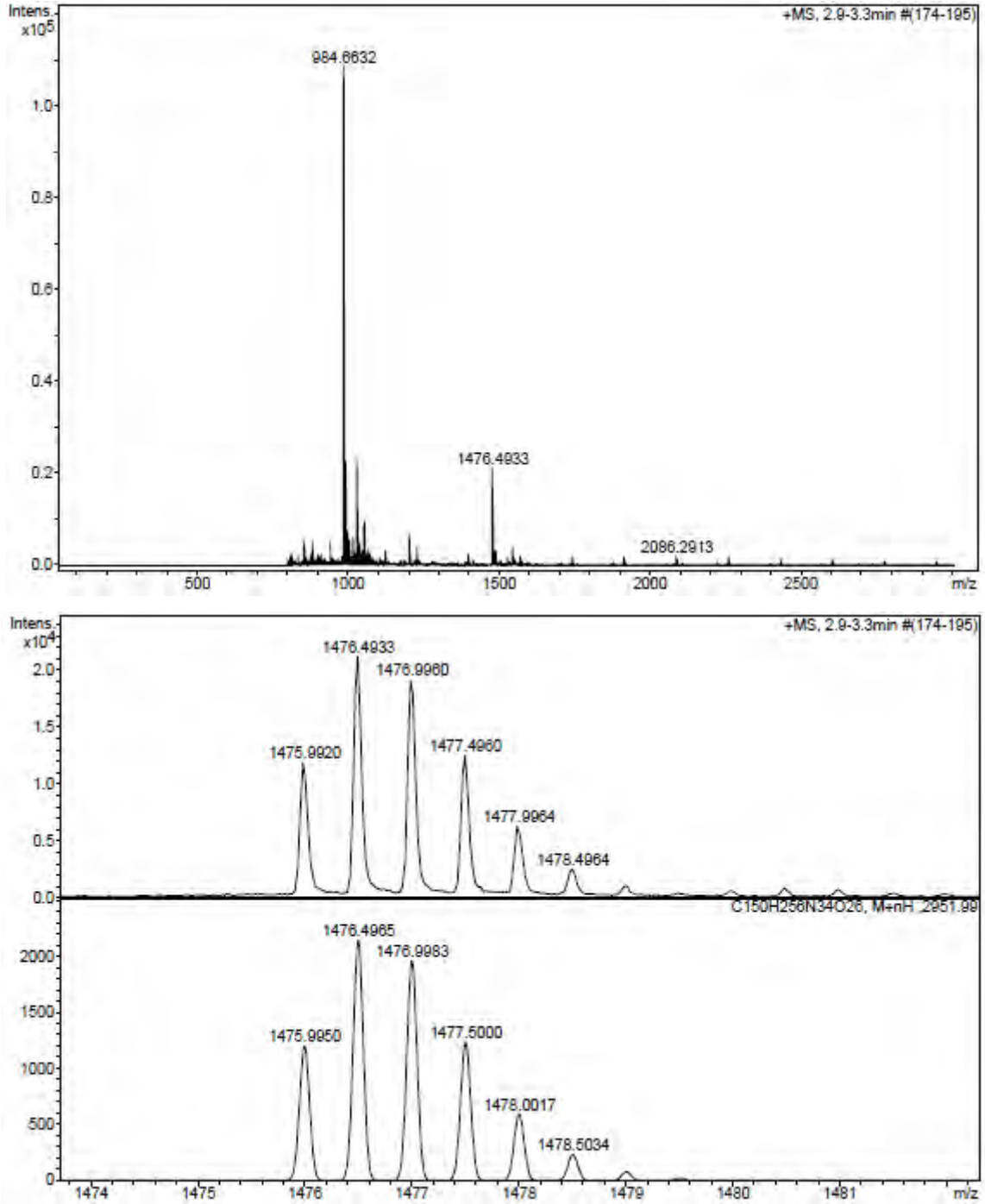
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

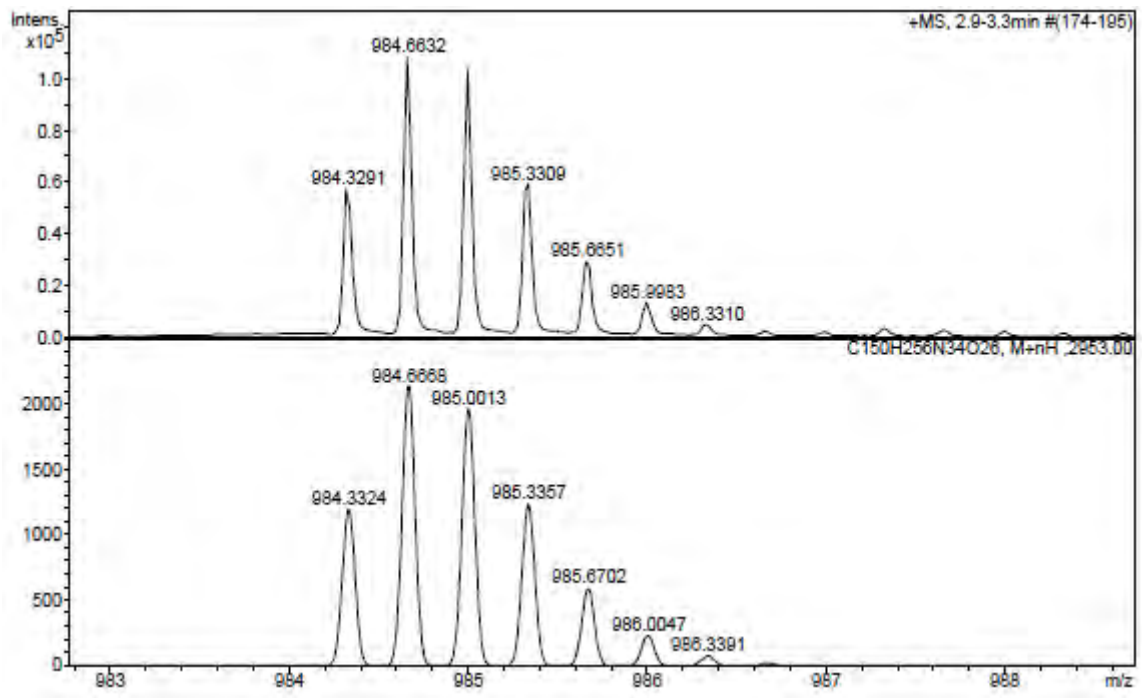


No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7.97	332,500	44,015	95,85
2	8,45	13,843	1,904	4,15
Total:		346,344	45,918	100,00

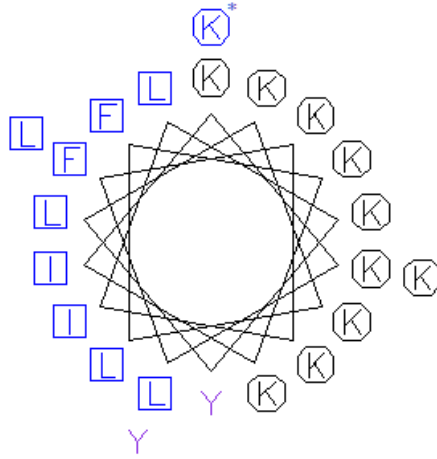
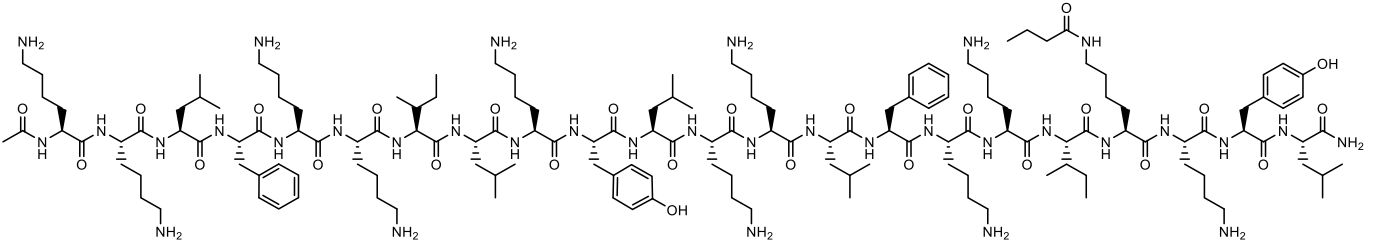
ESI-MS (m/z)



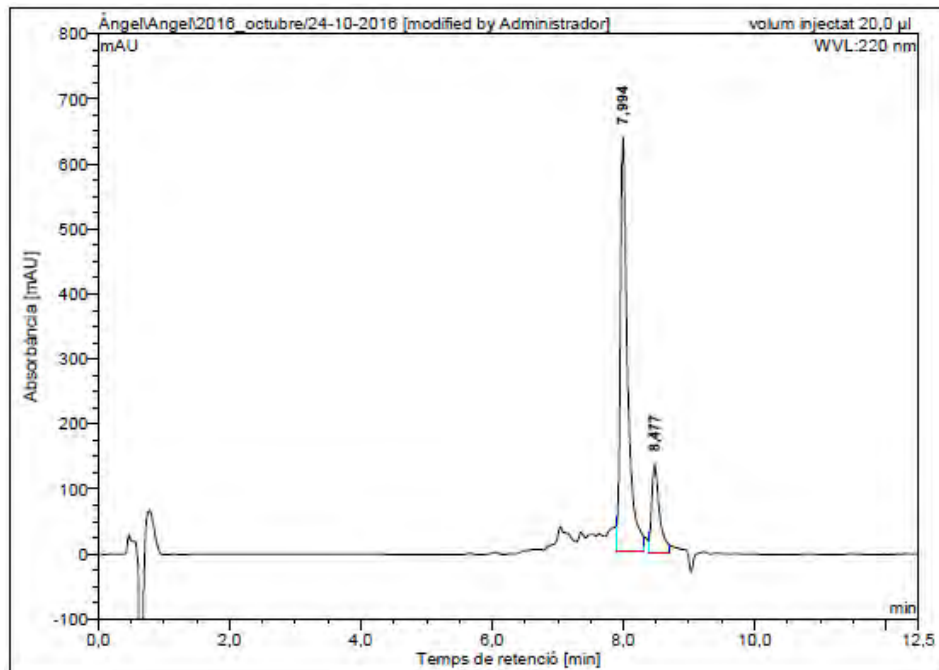
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP100-BP387)

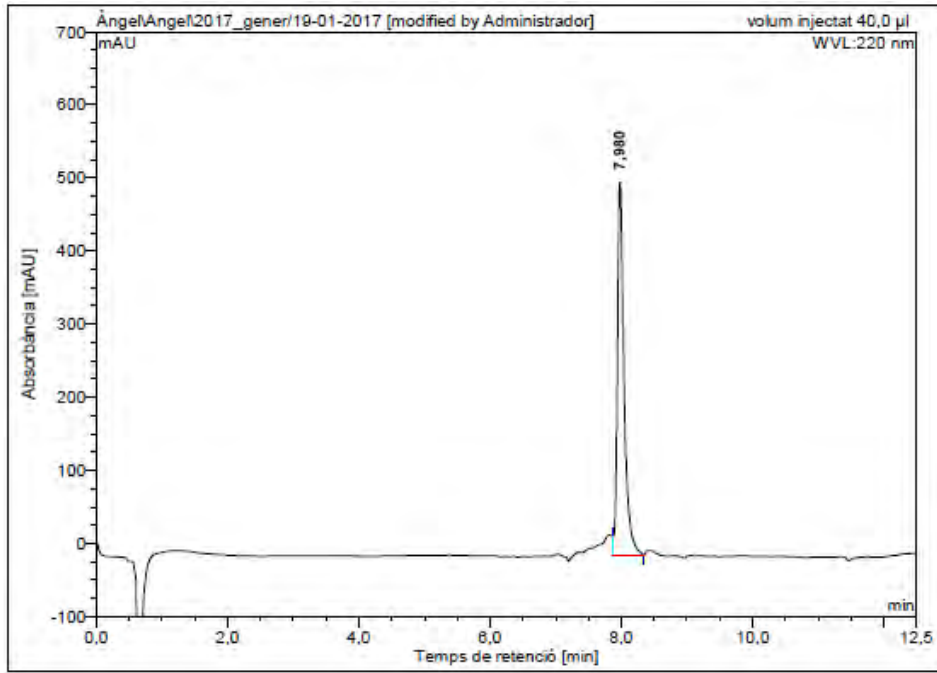


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



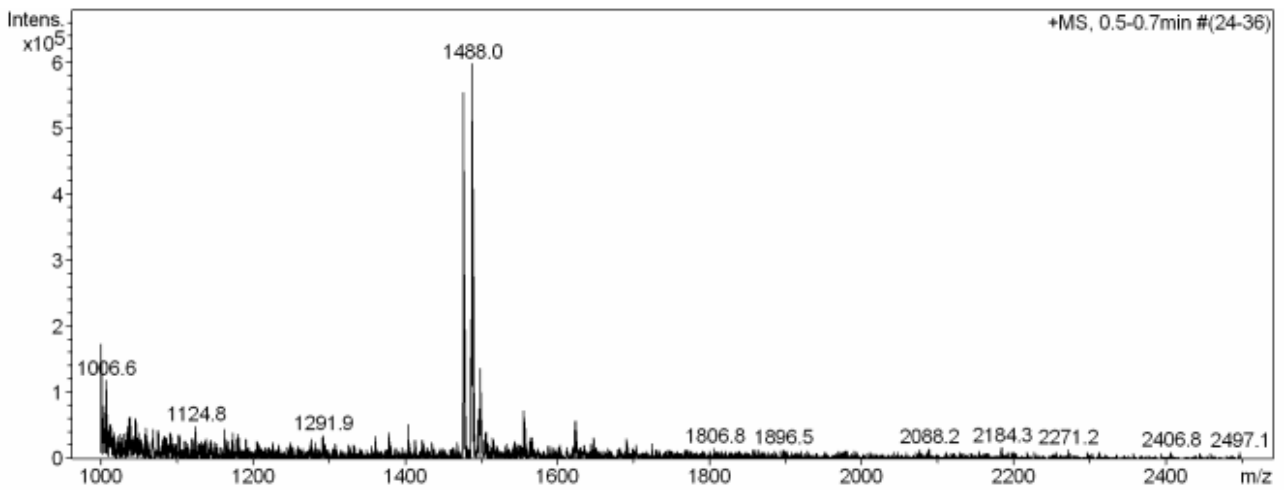
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,99	637,424	83,278	81,71
2	8,48	134,552	18,637	18,29
Total:		771,976	101,915	100,00

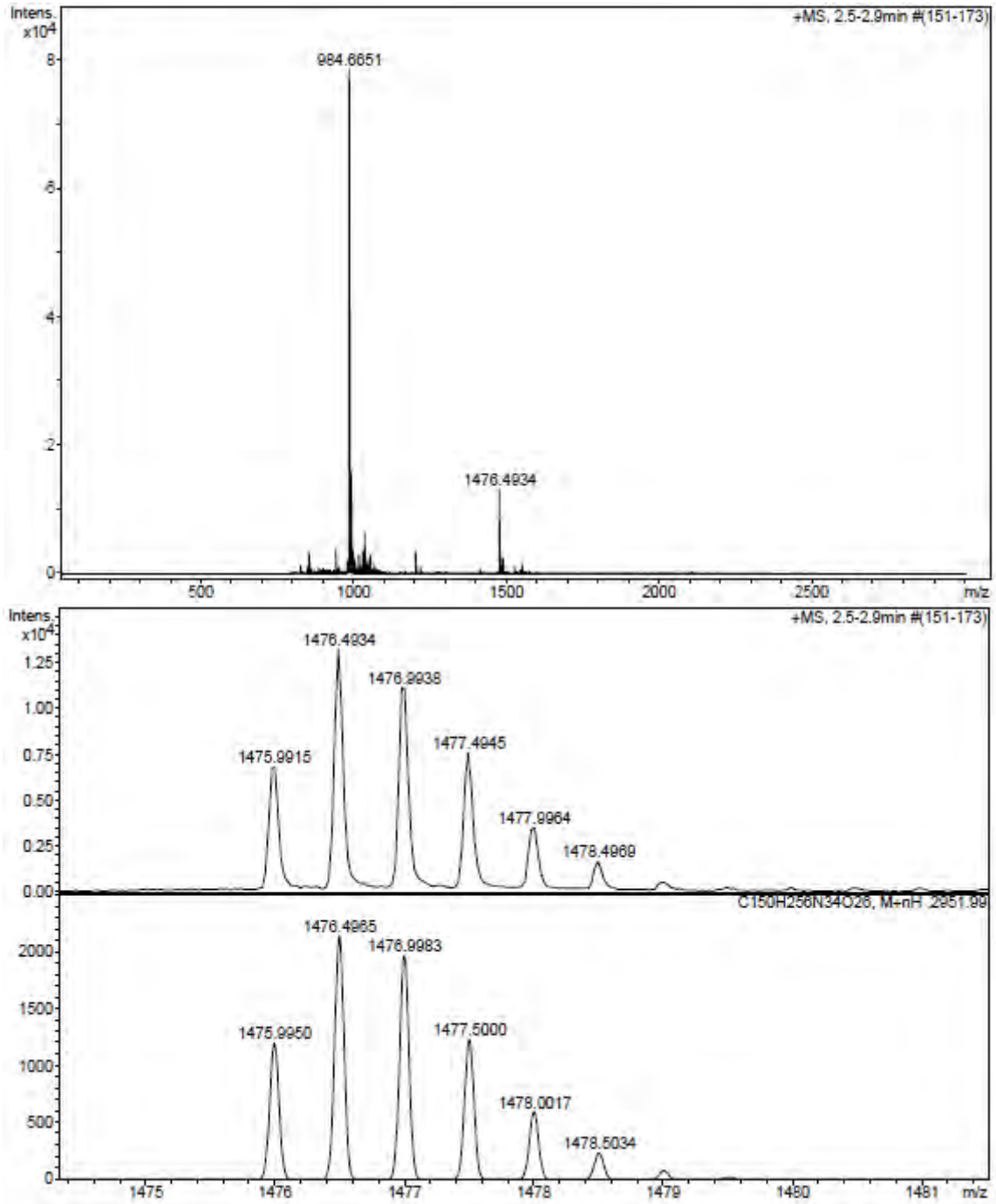
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

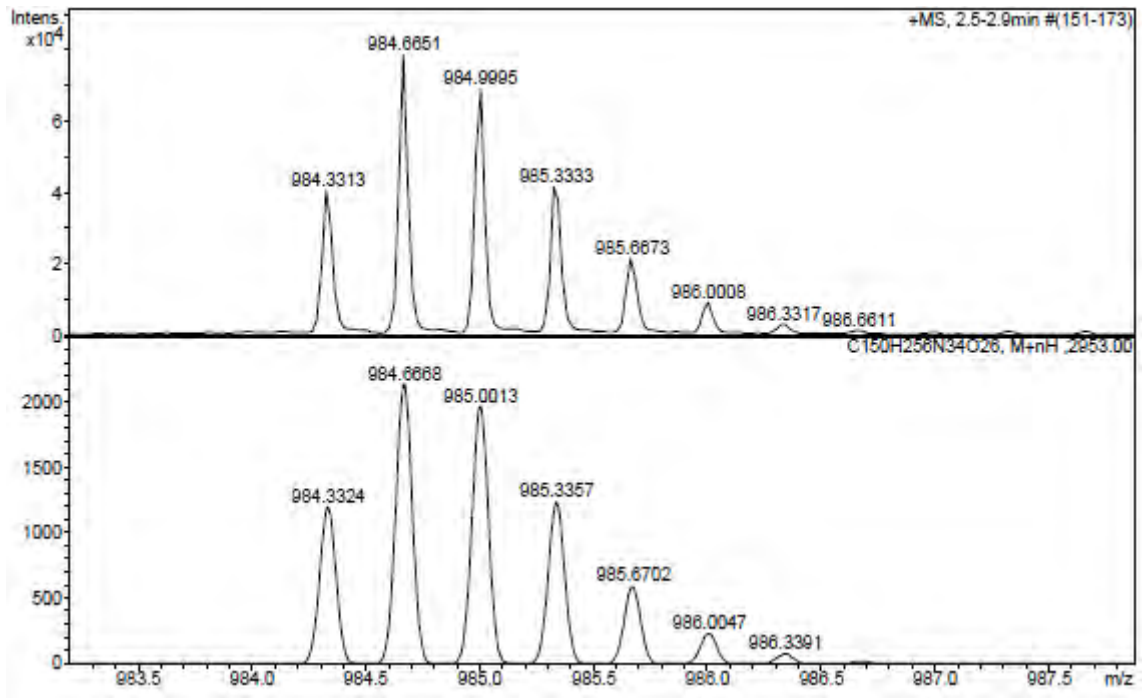


No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	7,98	510,089	59,863	100,00
Total:		510,089	59,863	100,00

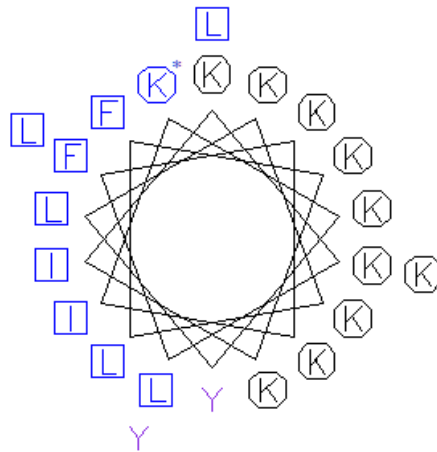
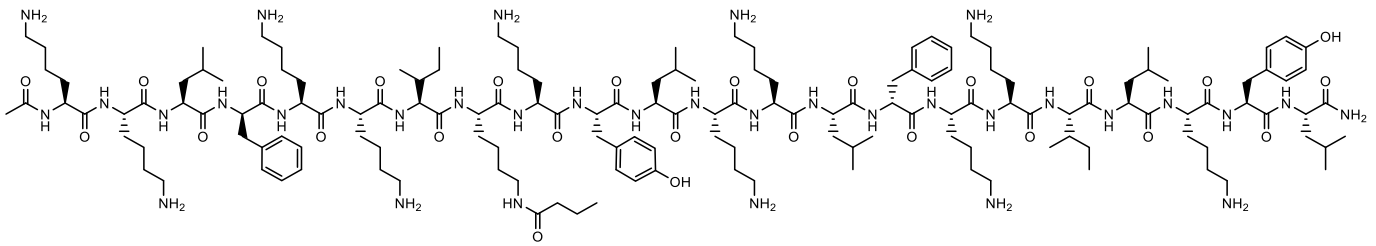
ESI-MS (m/z)



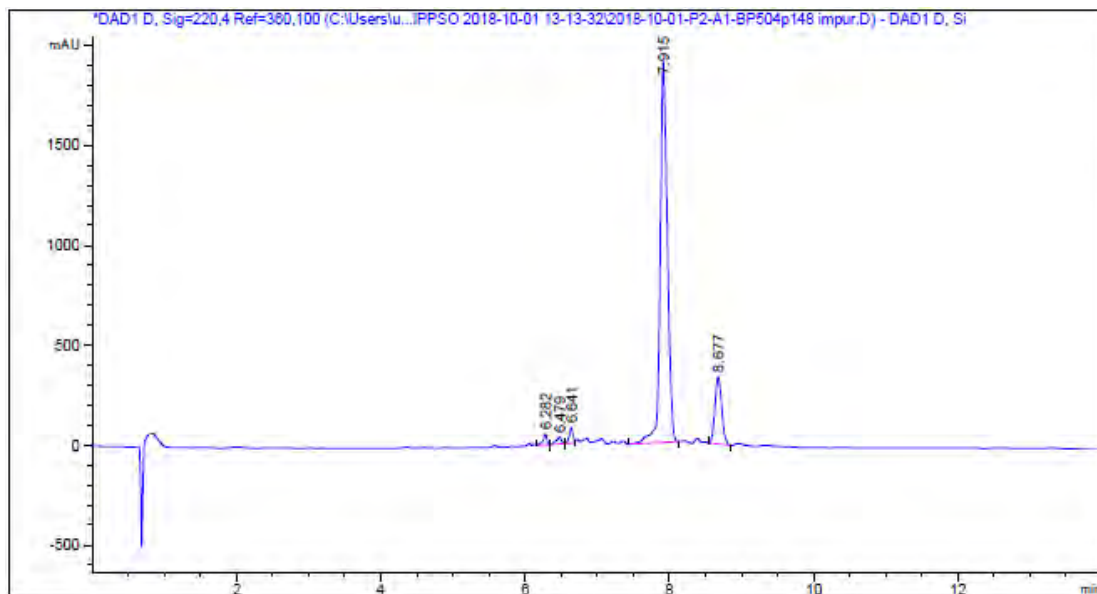
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP474-BP143)



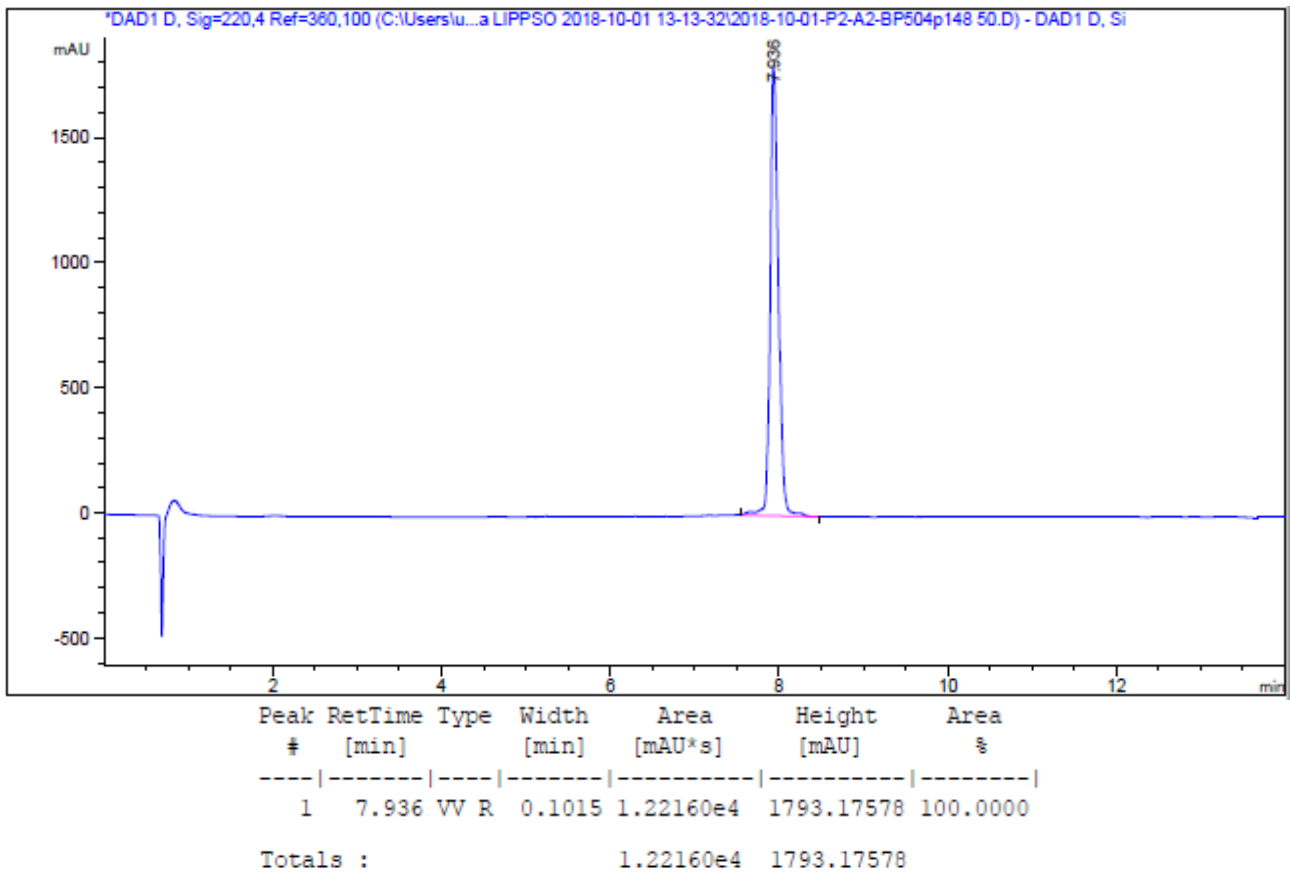
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



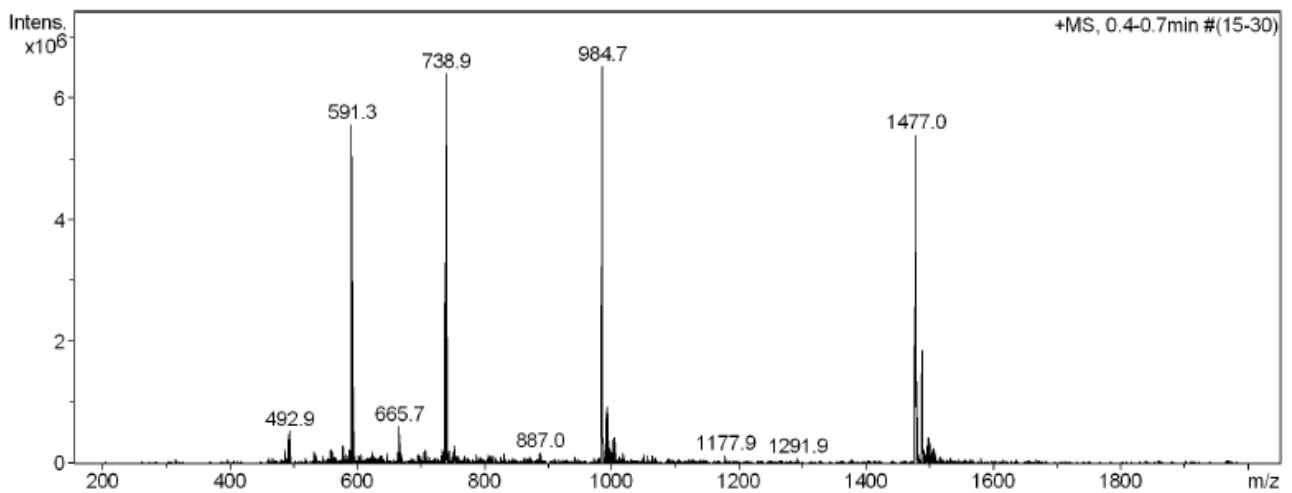
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.282	BB	0.0544	200.26265	53.83027	1.2485
2	6.479	BB	0.0665	176.25700	35.78355	1.0988
3	6.641	BV	0.0555	278.69397	76.44629	1.7374
4	7.915	BB	0.1026	1.32033e4	1910.04736	82.3102
5	8.677	BB	0.0969	2182.39551	339.84186	13.6052

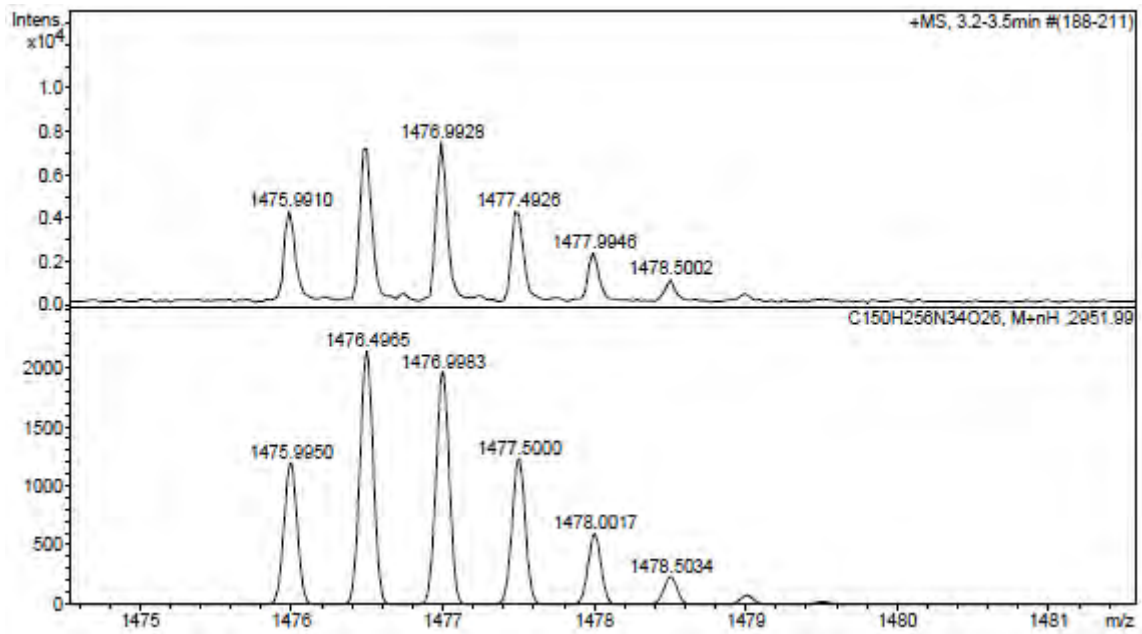
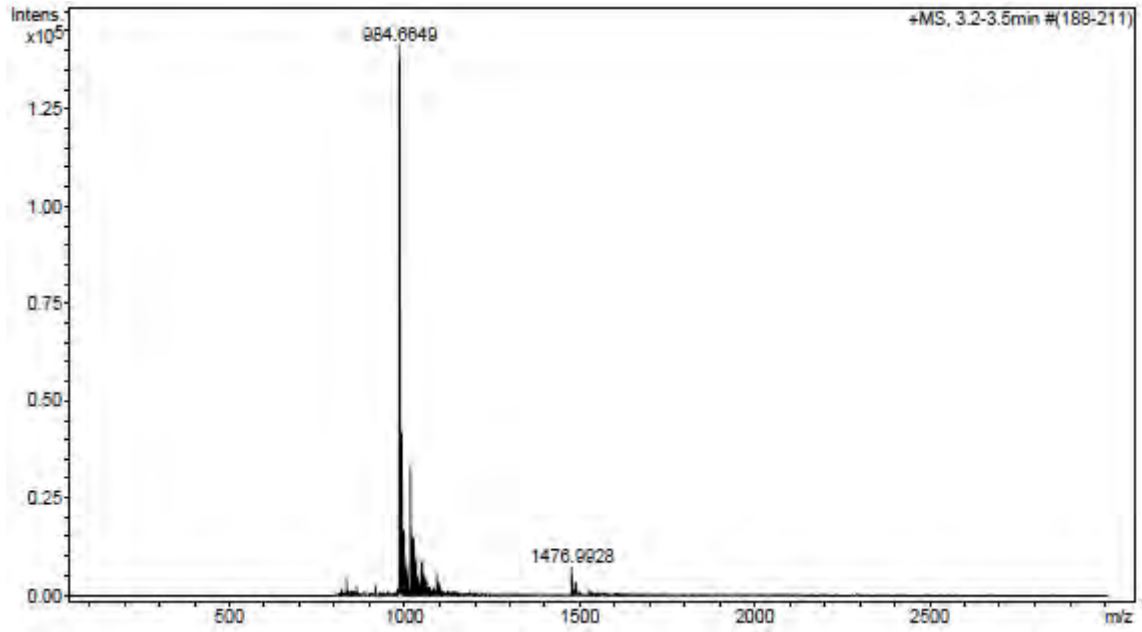
Totals : 1.60409e4 2415.94934

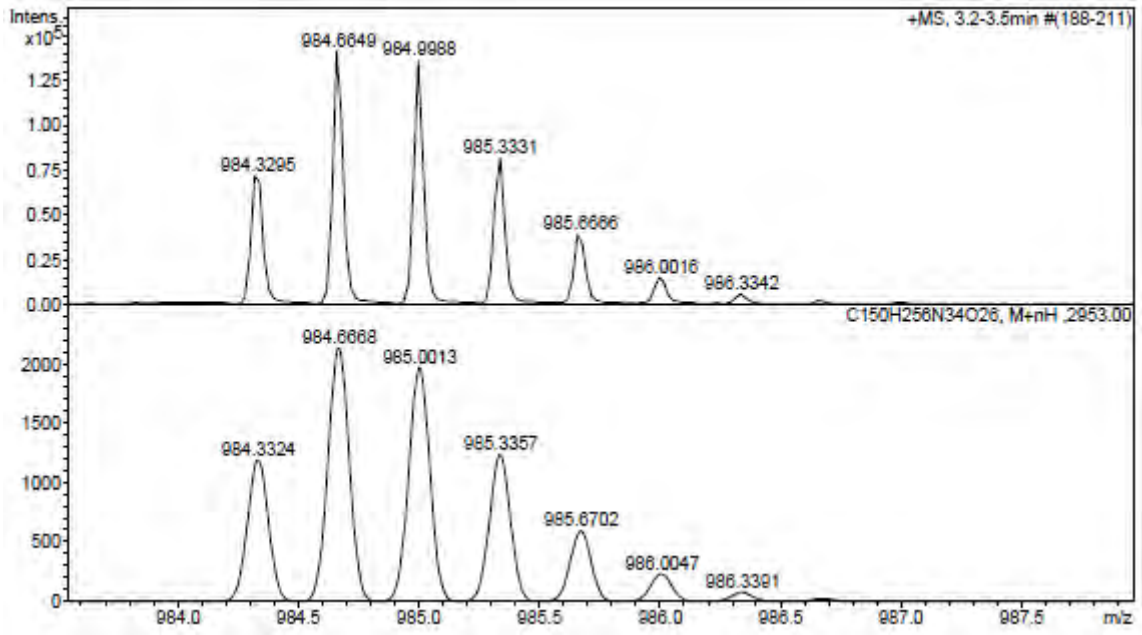
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



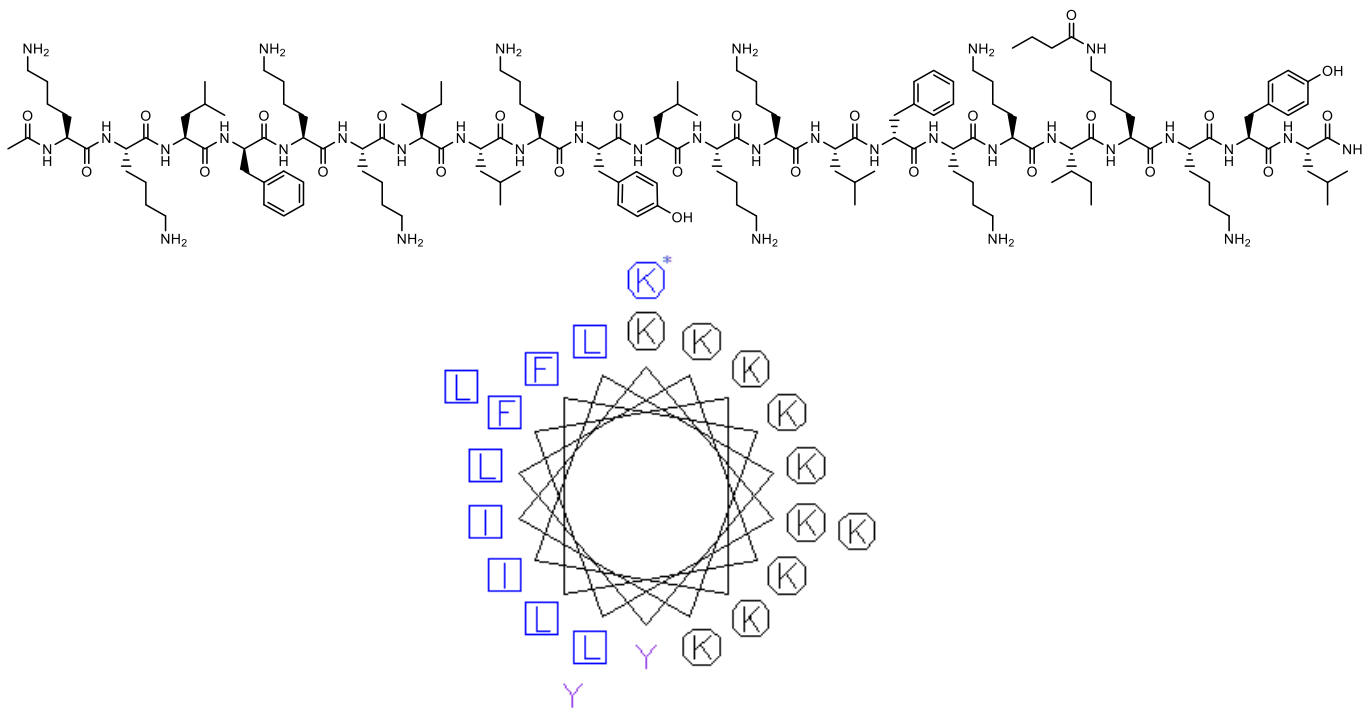
ESI-MS (m/z)



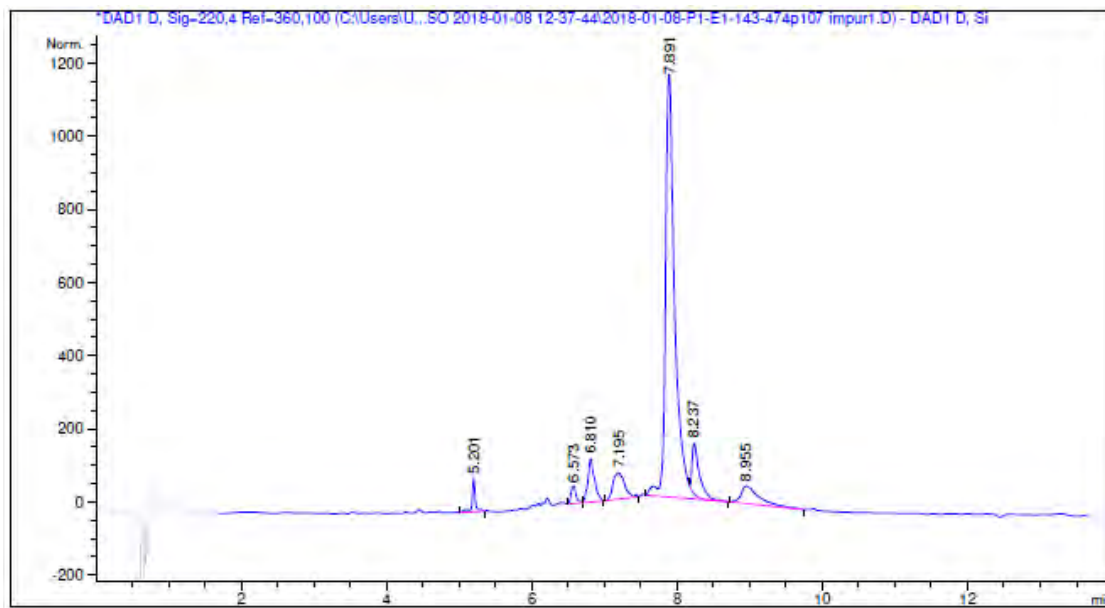
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP143-BP474)



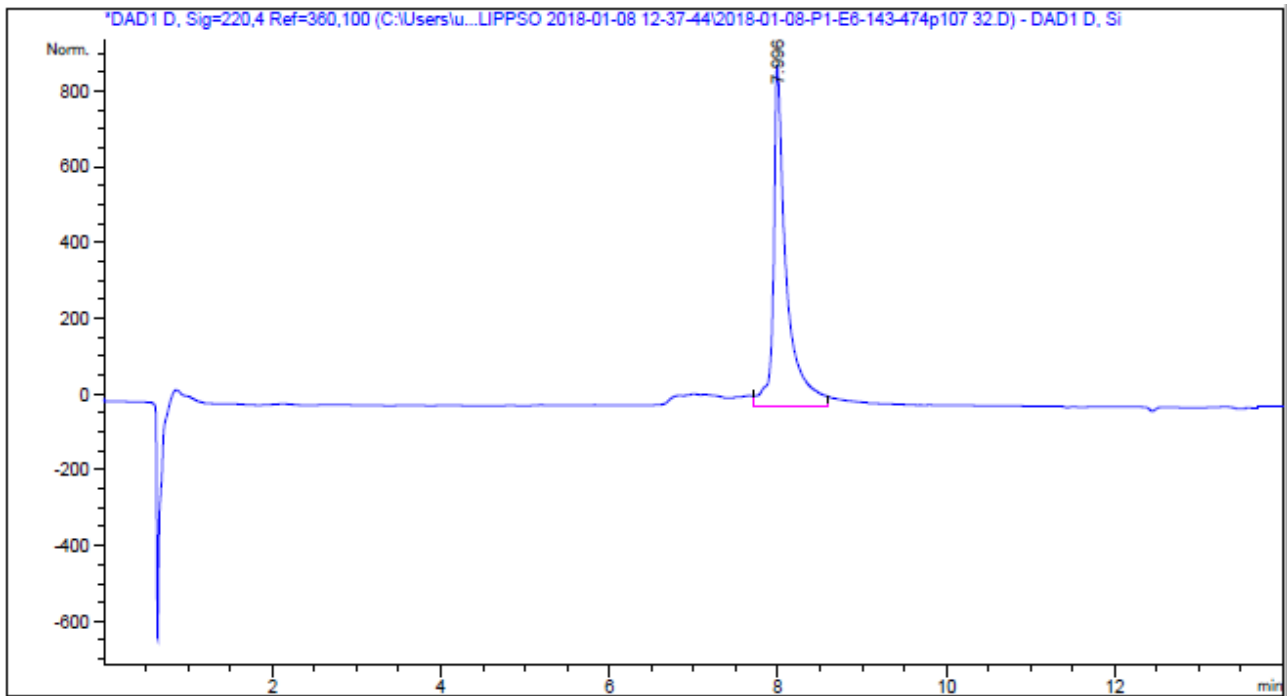
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.201	WV R	0.0462	284.82236	87.07029	2.1150
2	6.573	BV	0.0765	220.08604	45.41225	1.6343
3	6.810	VB	0.0887	718.65118	112.18520	5.3366
4	7.195	BV R	0.1425	768.39307	69.24796	5.7059
5	7.891	WV R	0.1294	9713.23535	1095.75525	72.1287
6	8.237	VB E	0.1020	951.14130	132.14522	7.0630
7	8.955	BV R	0.2520	810.20856	45.21909	6.0165

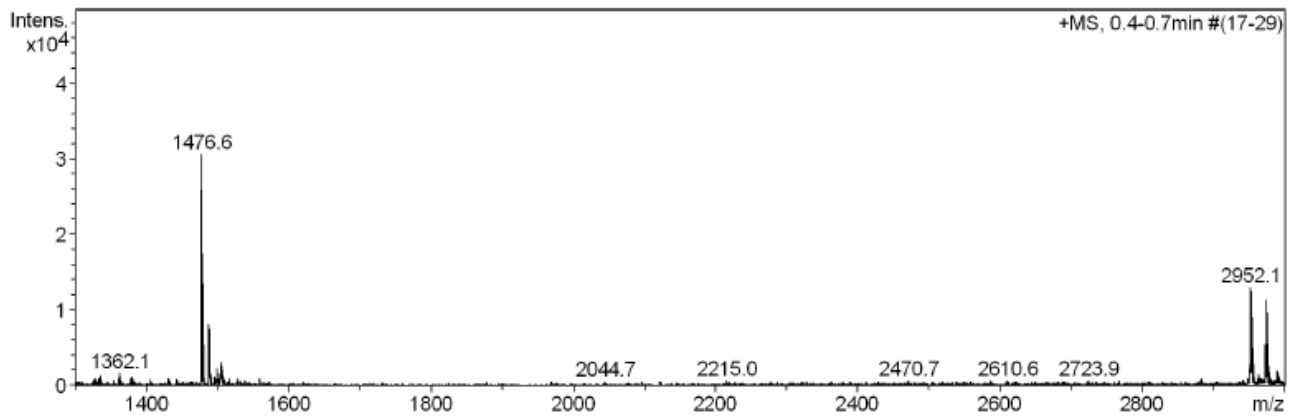
Totals : 1.34665e4 1587.03525

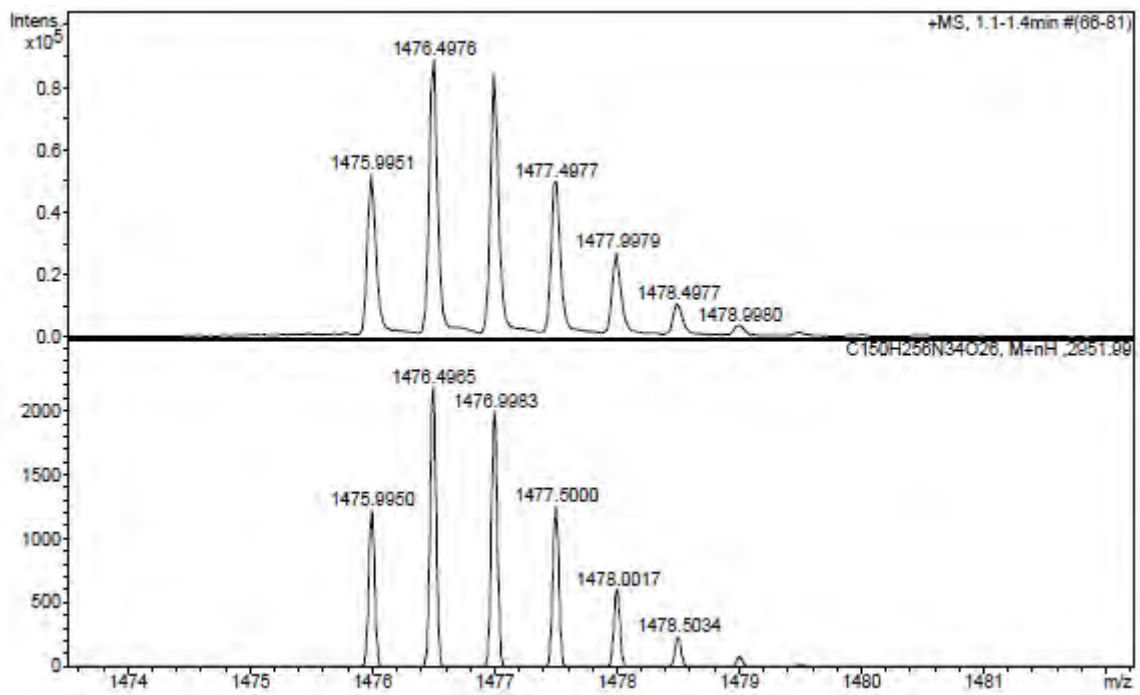
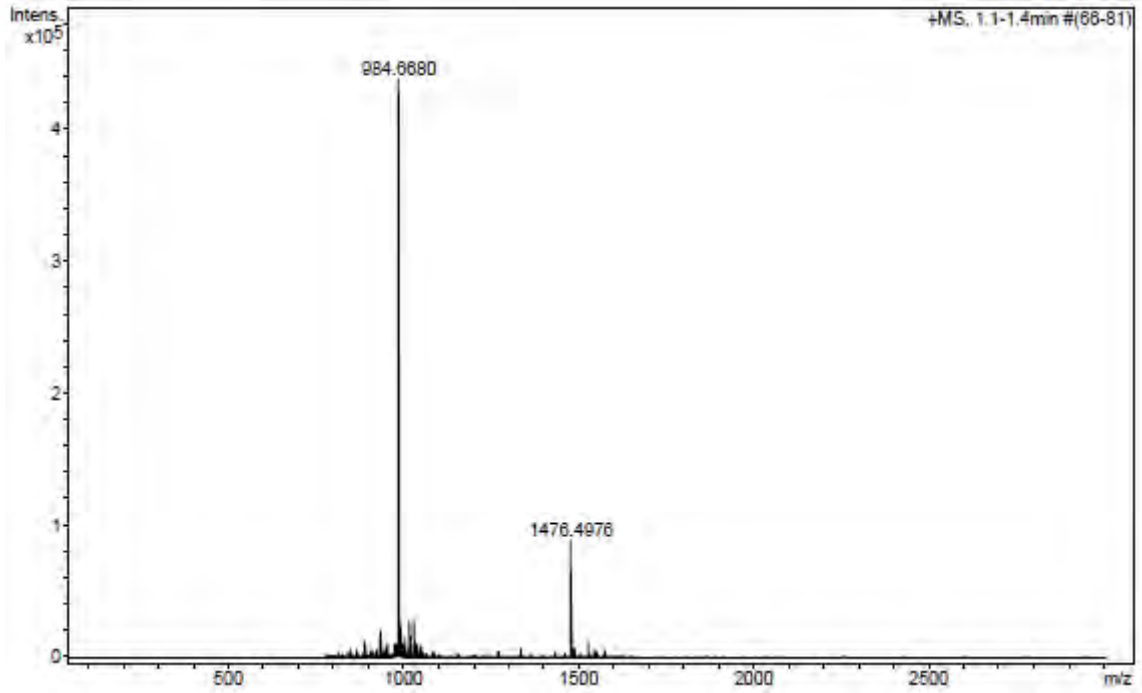
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

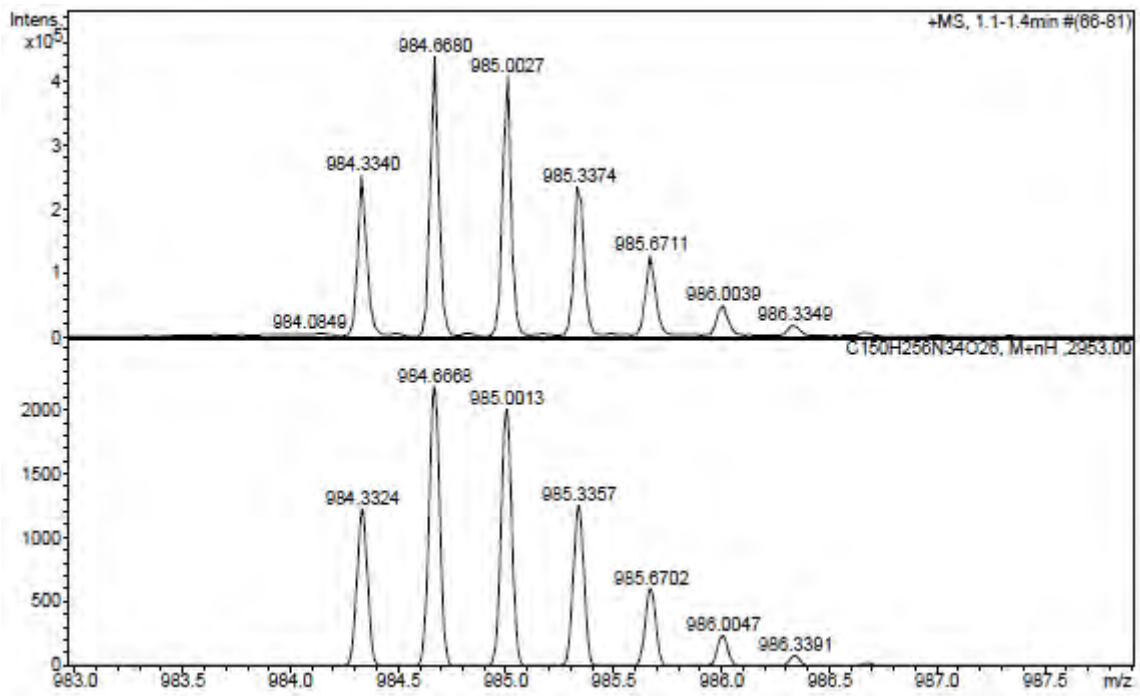


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.996	HHA	0.1438	8605.06152	810.70532	100.0000
Totals :				8605.06152	810.70532	

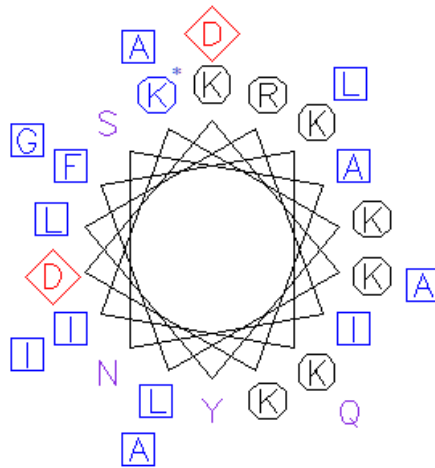
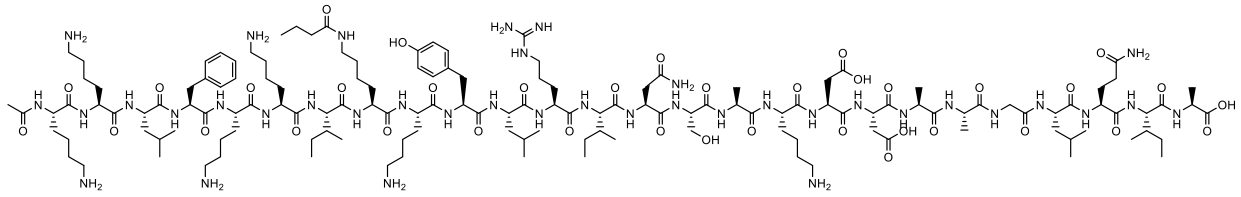
ESI-MS (m/z)



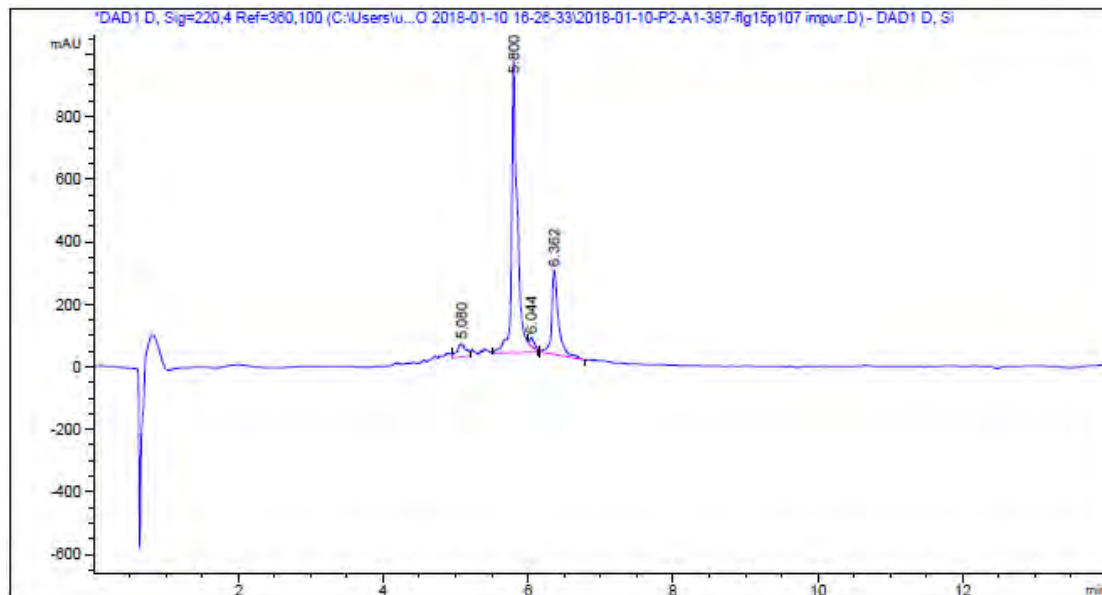
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP387-flg15)



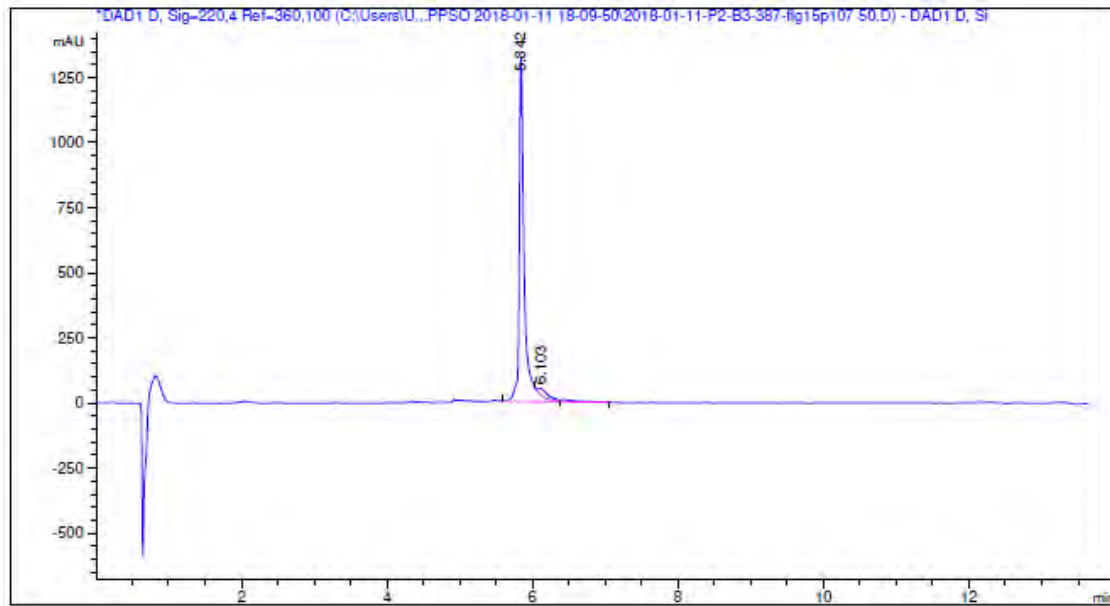
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.080	VV	0.1247	355.84882	40.41603	4.7876
2	5.800	VV R	0.0752	5232.85791	936.02850	70.4024
3	6.044	VB E	0.0629	119.06960	27.30922	1.6020
4	6.362	BV R	0.0922	1725.00476	267.63770	23.2081

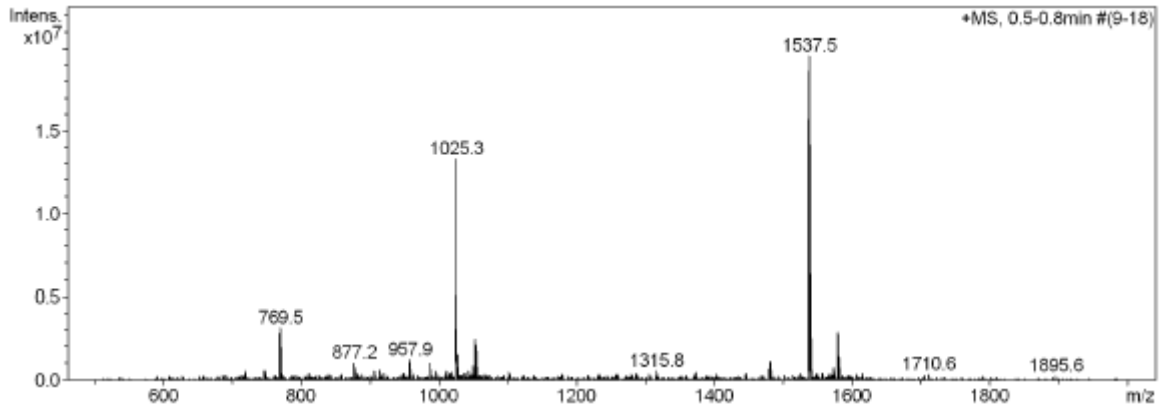
Totals : 7432.78108 1271.39145

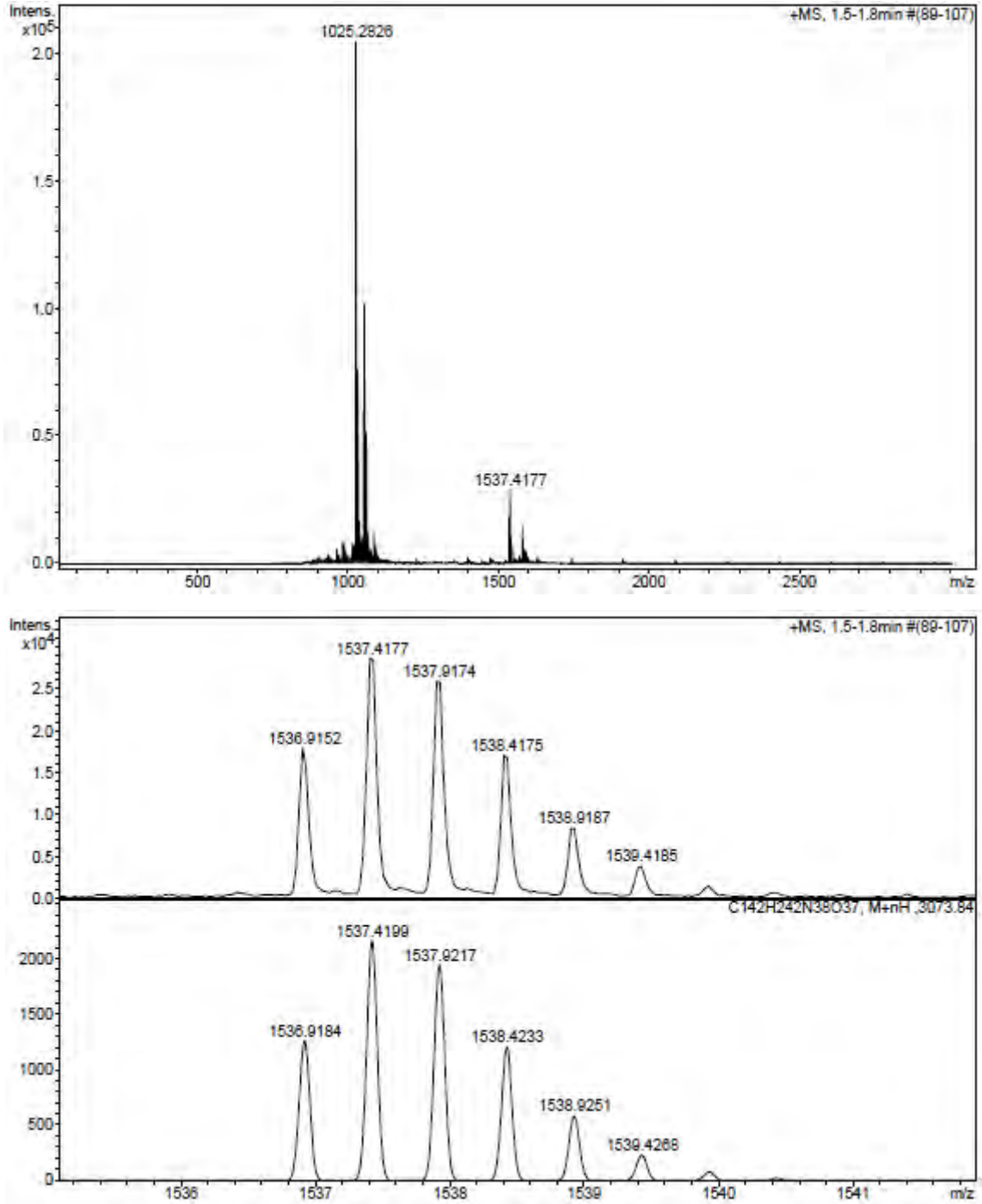
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

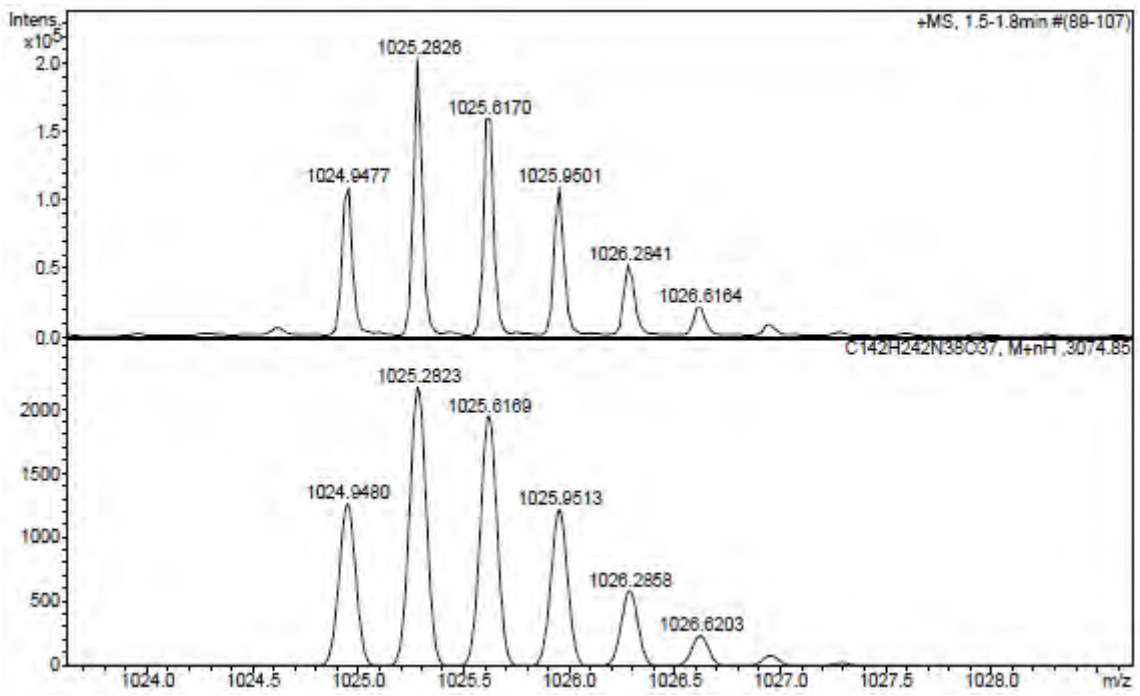


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.842	BV R	0.0681	6357.41650	1321.30750	95.8923
2	6.103	VV E	0.1565	272.32904	23.98207	4.1077
Totals :				6629.74554	1345.28957	

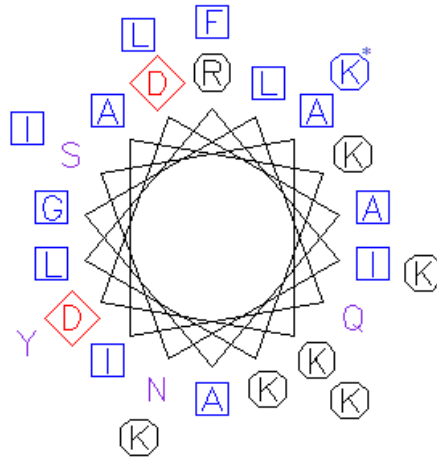
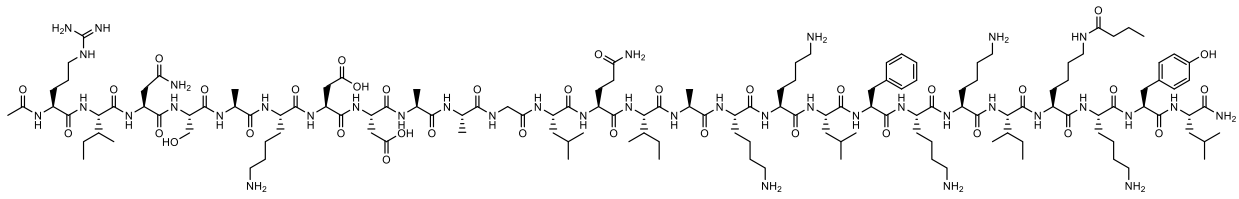
ESI-MS (m/z)



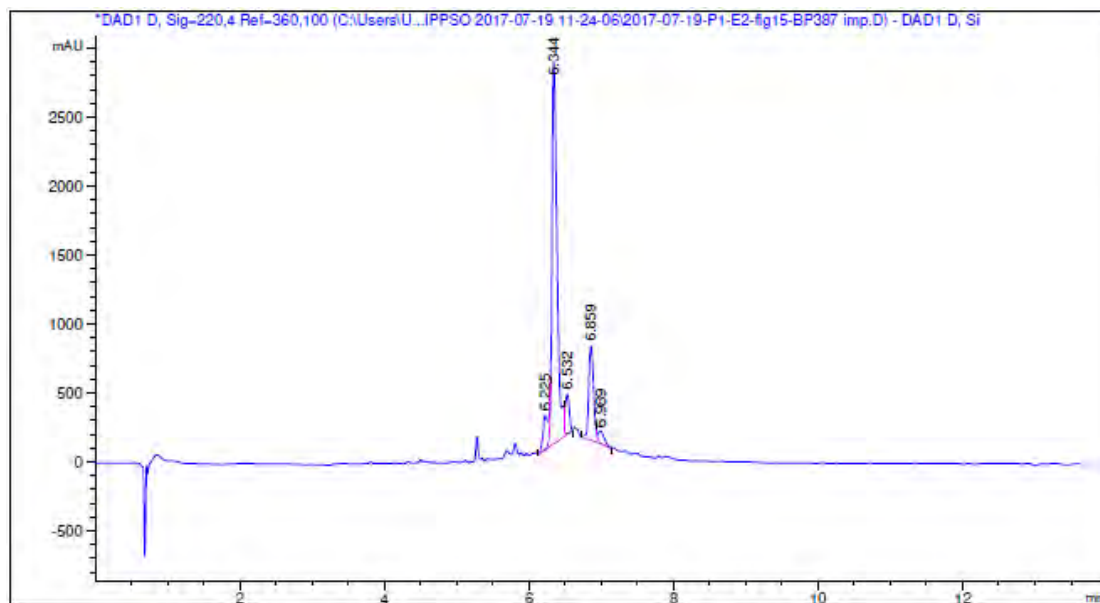
HRMS (m/z)



Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Lys(COC₃H₇)-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (flg15-BP387)



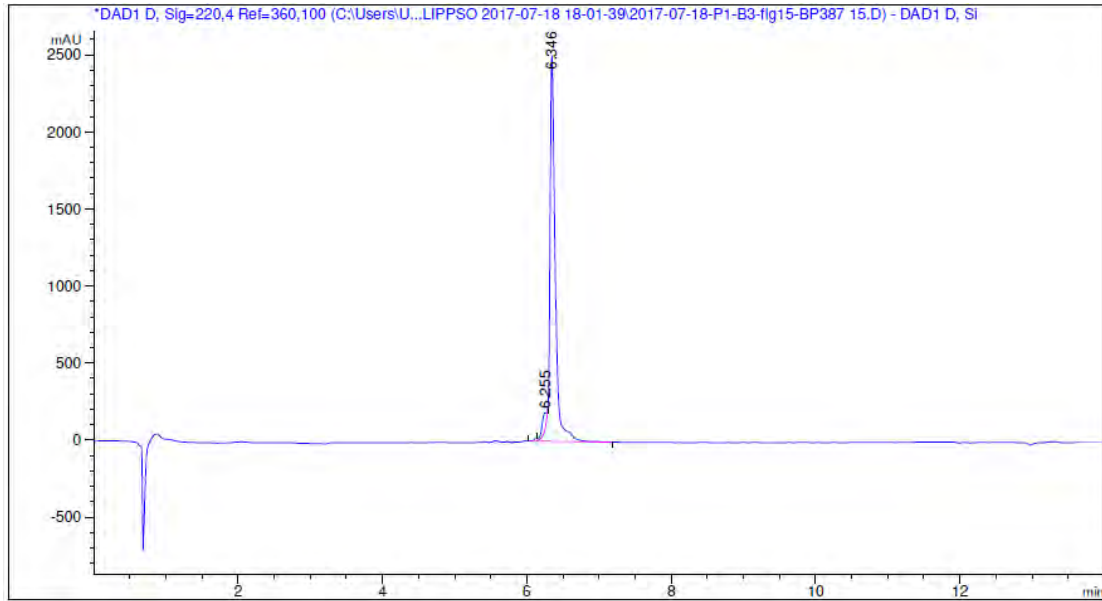
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.225	BV E	0.0670	1236.57361	248.65964	6.2236
2	6.344	VV R	0.0752	1.37758e4	2773.43433	69.3333
3	6.532	VB E	0.0582	1106.06189	285.68558	5.5668
4	6.859	BV R	0.0750	3268.27661	681.10583	16.4492
5	6.989	VB E	0.0847	482.24747	86.90884	2.4271

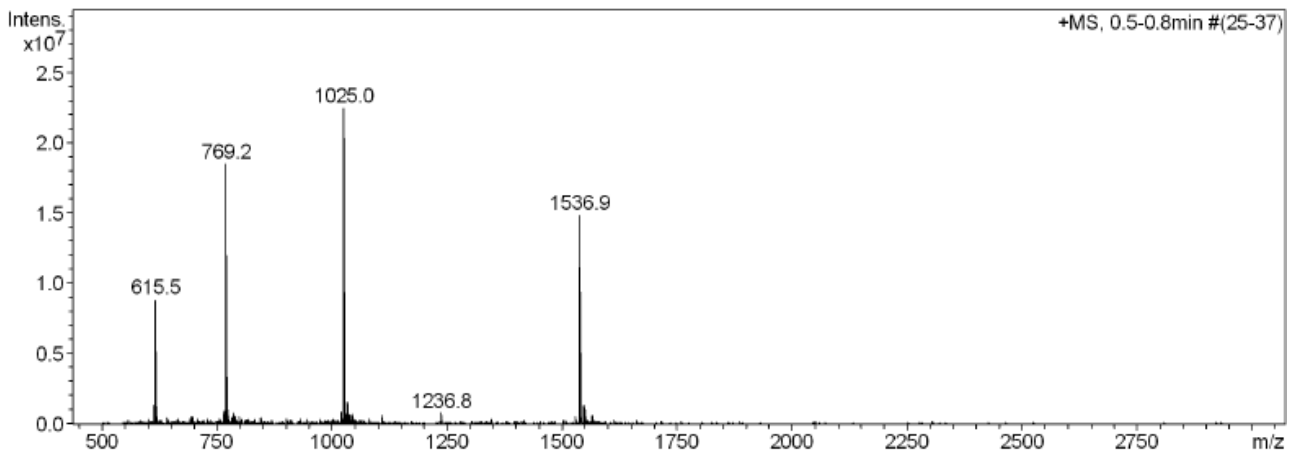
Totals : 1.98689e4 4075.79422

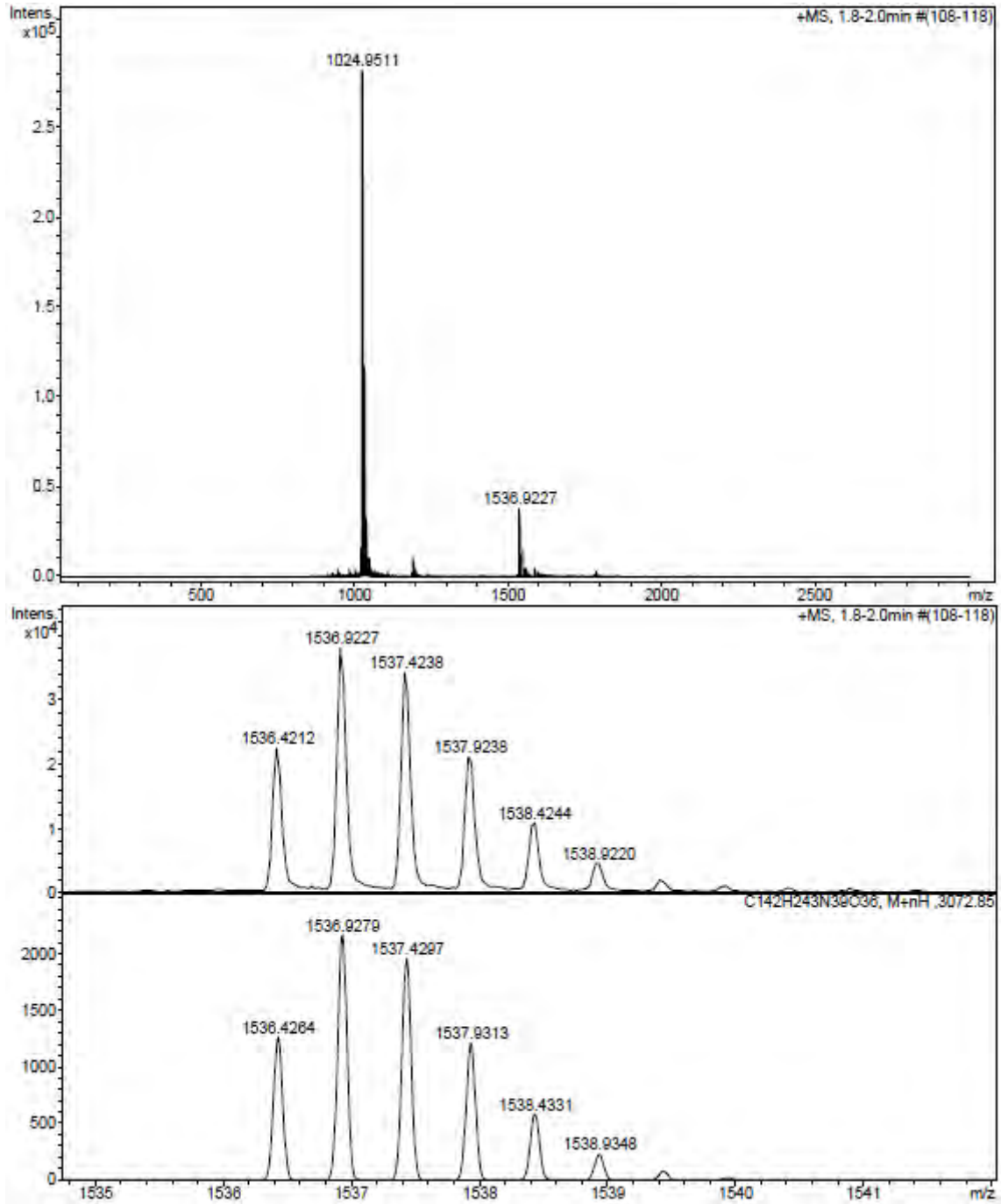
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

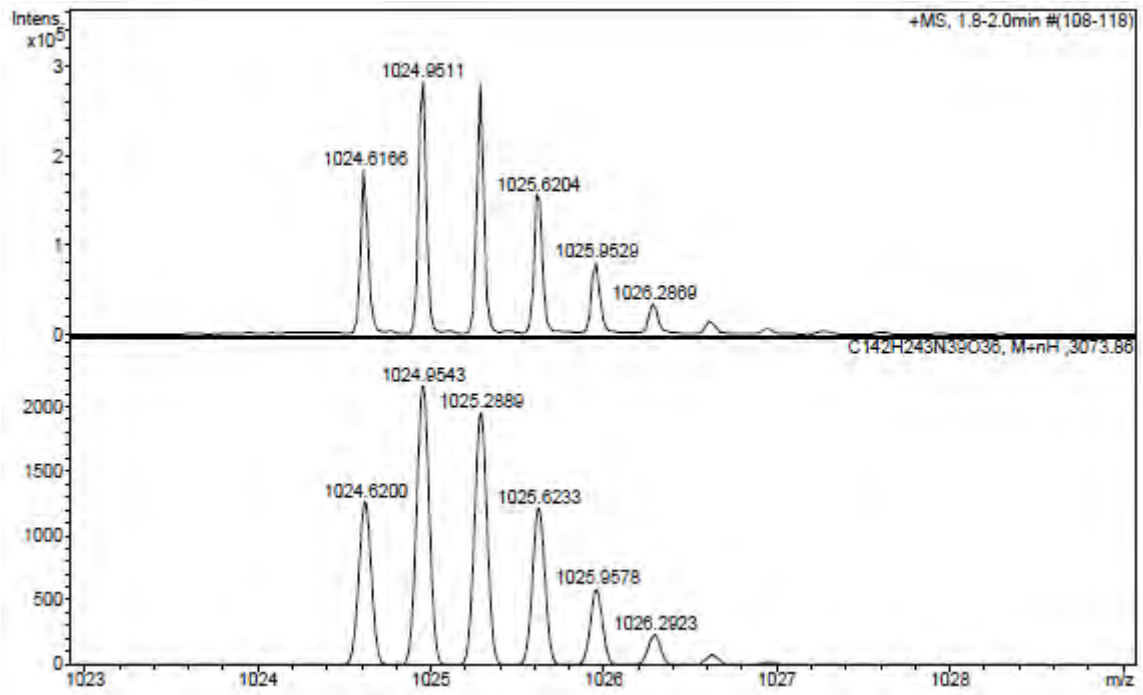


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.255	VV E	0.0724	496.30545	100.95900	3.6633
2	6.346	VB R	0.0768	1.30517e4	2504.88135	96.3367

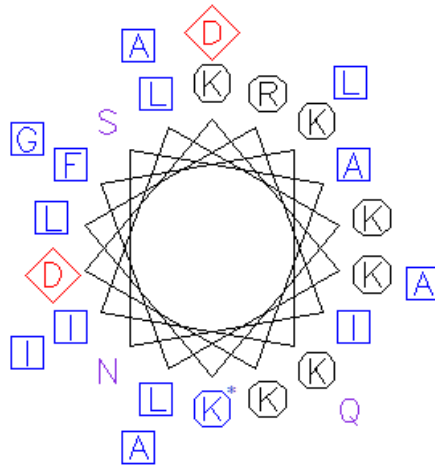
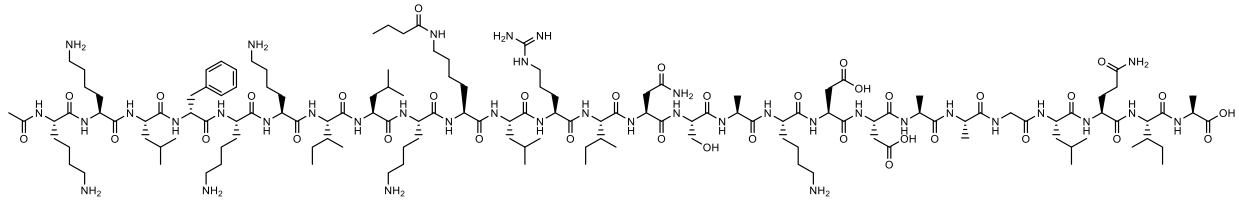
ESI-MS (m/z)



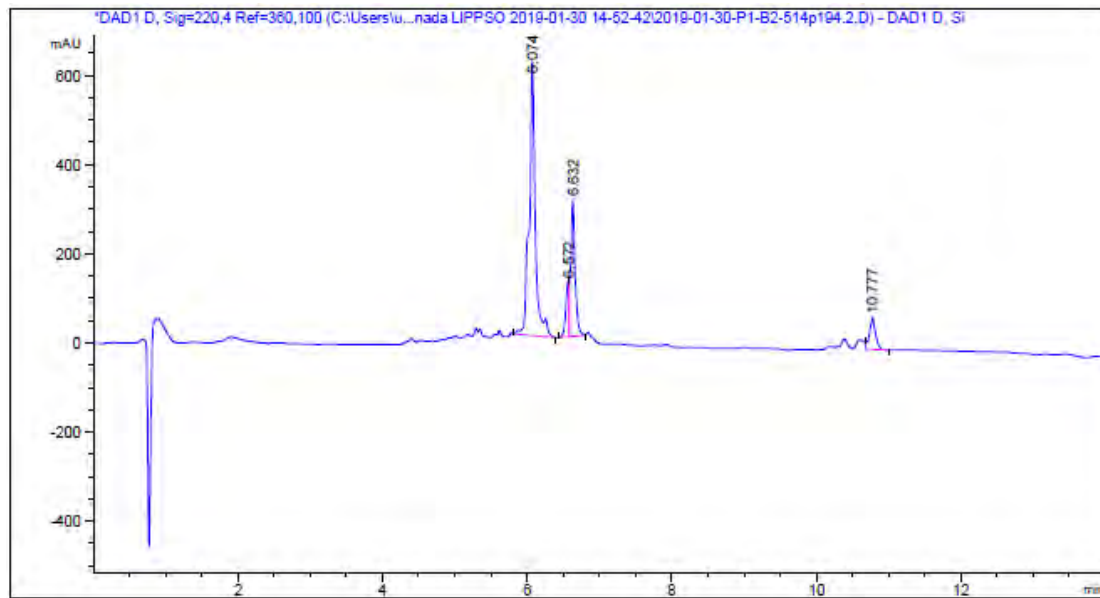
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-OH (BP475-flg15)



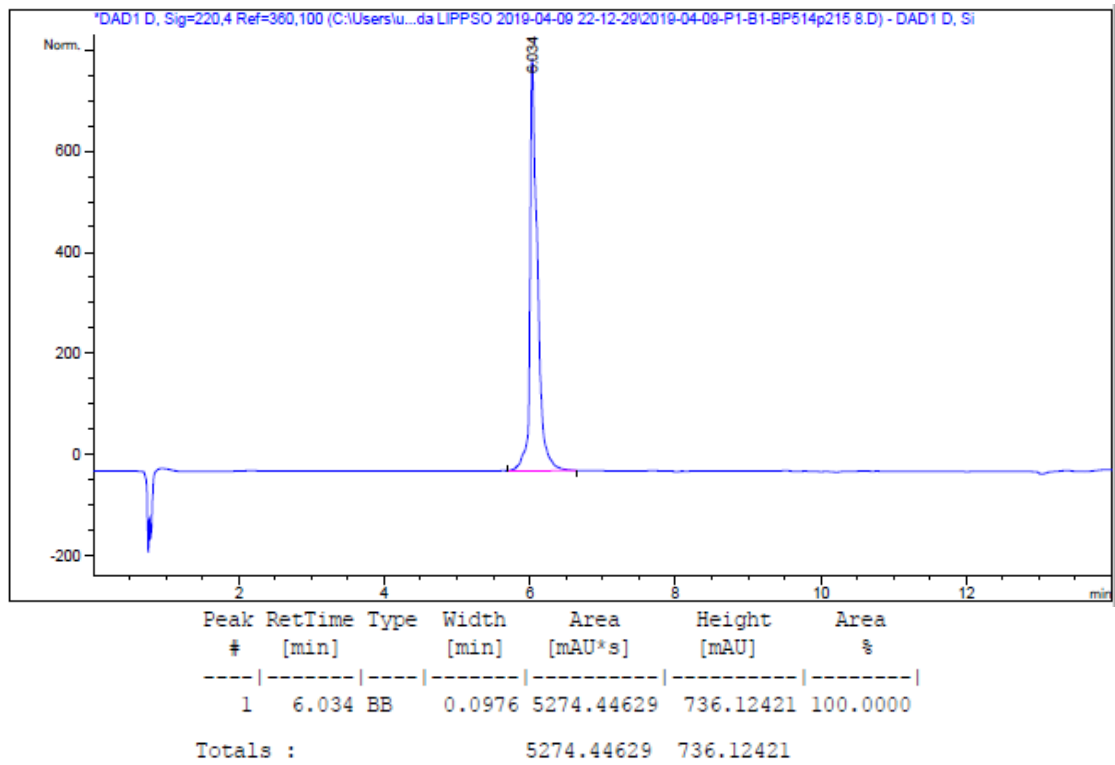
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



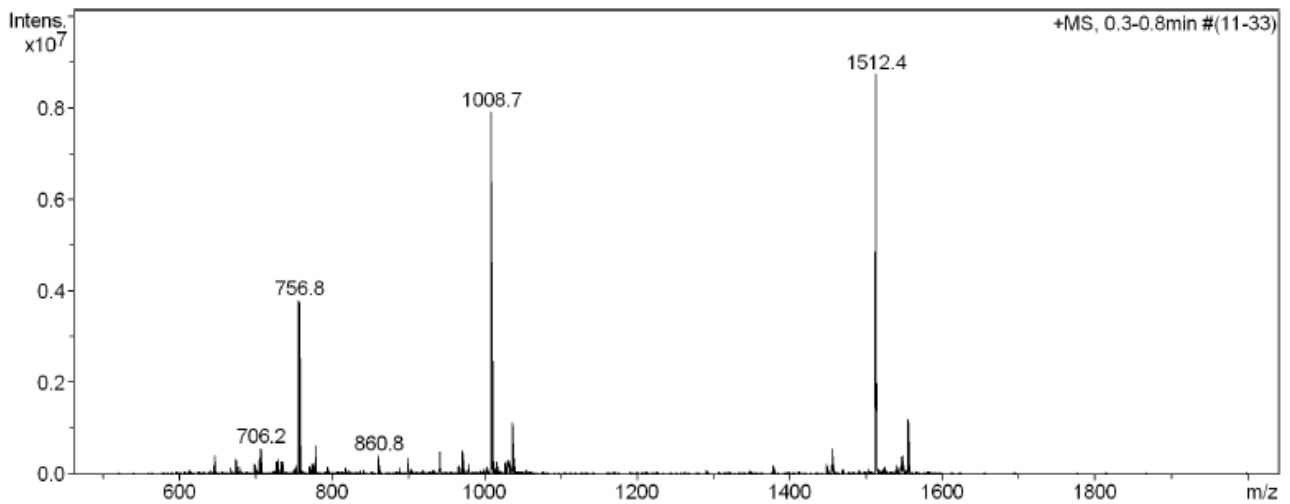
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.074	VV R	0.0784	3585.60352	620.24286	63.1007
2	6.572	BV	0.0468	366.07712	122.82347	6.4424
3	6.632	VB	0.0625	1316.80054	304.14810	23.1735
4	10.777	VB	0.0843	413.86948	70.68221	7.2834

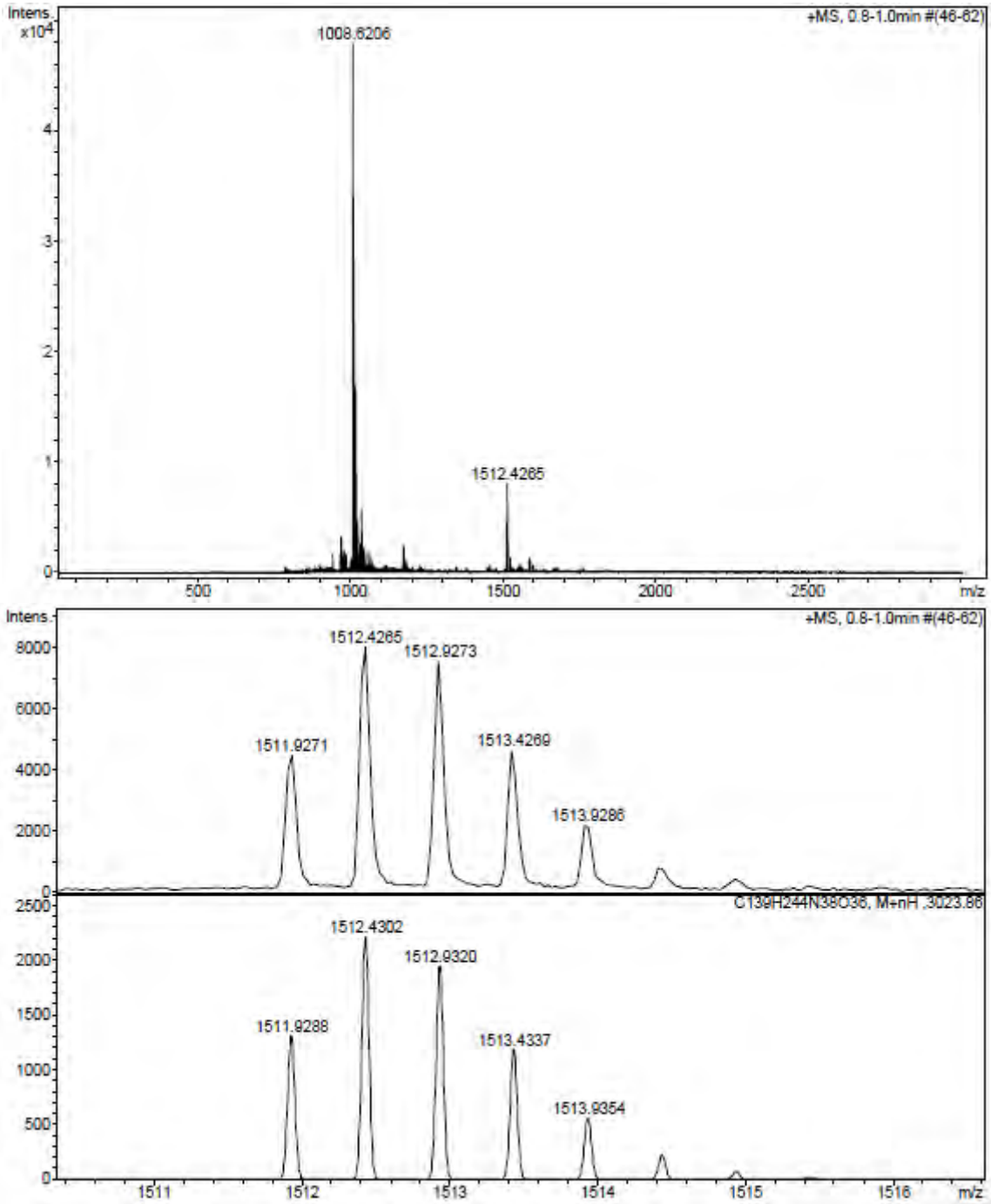
Totals : 5682.35065 1117.89664

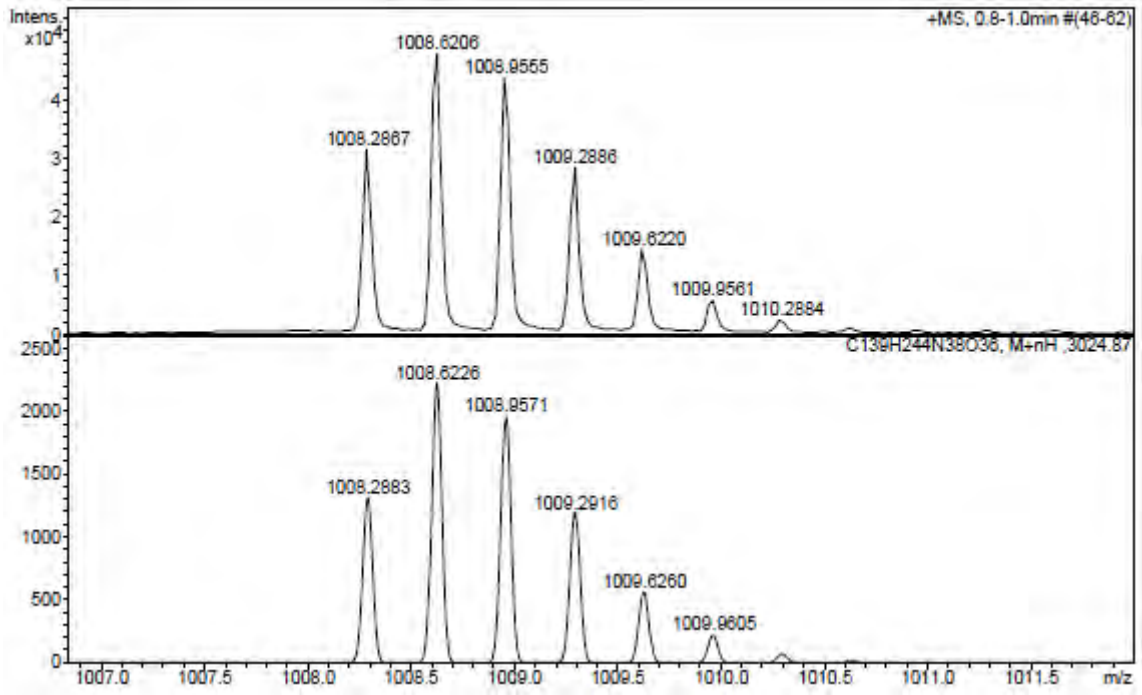
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



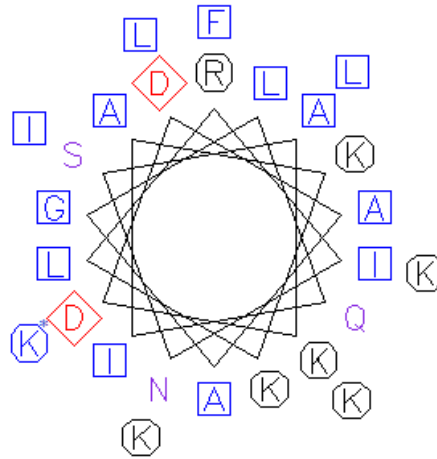
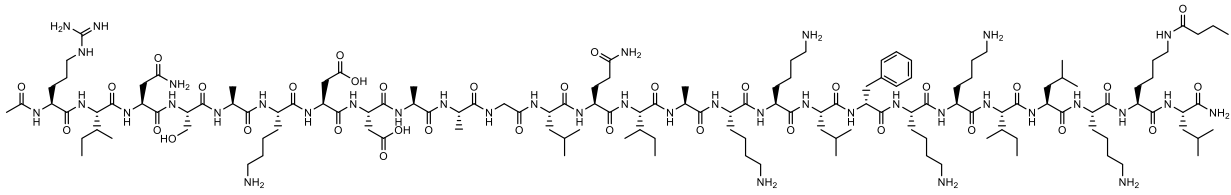
ESI-MS (m/z)



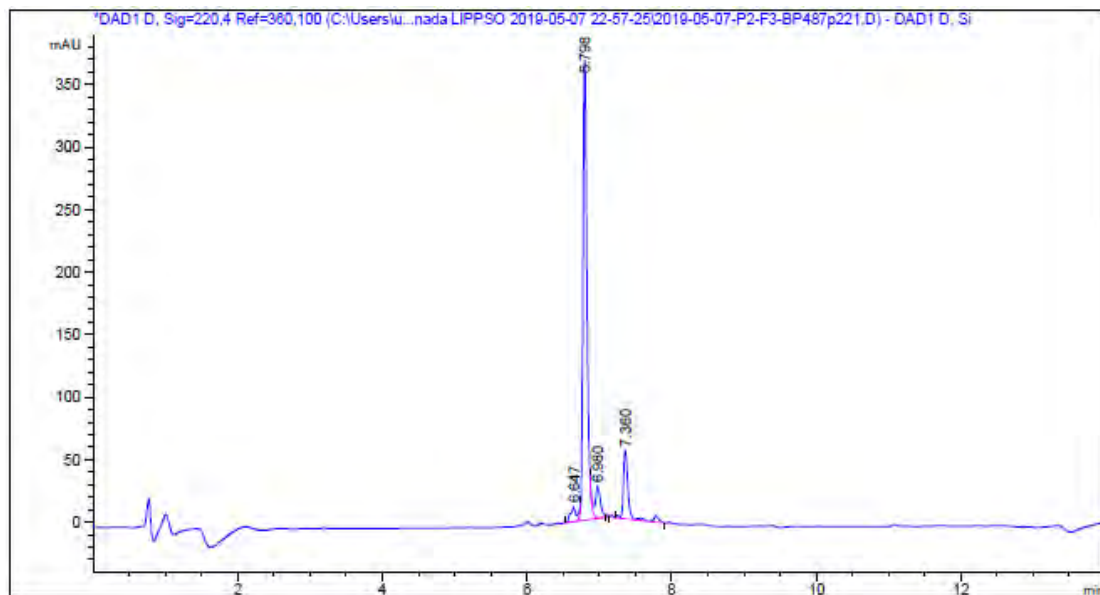
HRMS (m/z)



Ac-Arg-Ile-Asn-Ser-Ala-Lys-Asp-Asp-Ala-Ala-Gly-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (flg15-BP475)



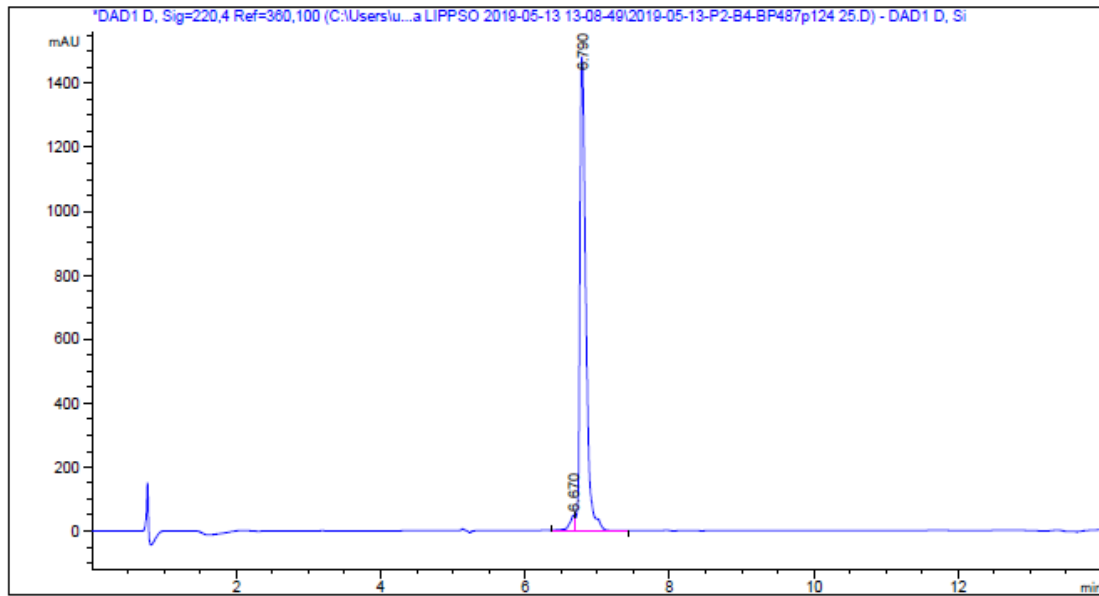
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.647	BV E	0.0833	67.14684	10.98732	3.5175
2	6.798	VV R	0.0601	1452.93237	367.75342	76.1111
3	6.980	VV E	0.0722	125.38196	24.70408	6.5681
4	7.360	VV R	0.0705	263.50095	54.45255	13.8034

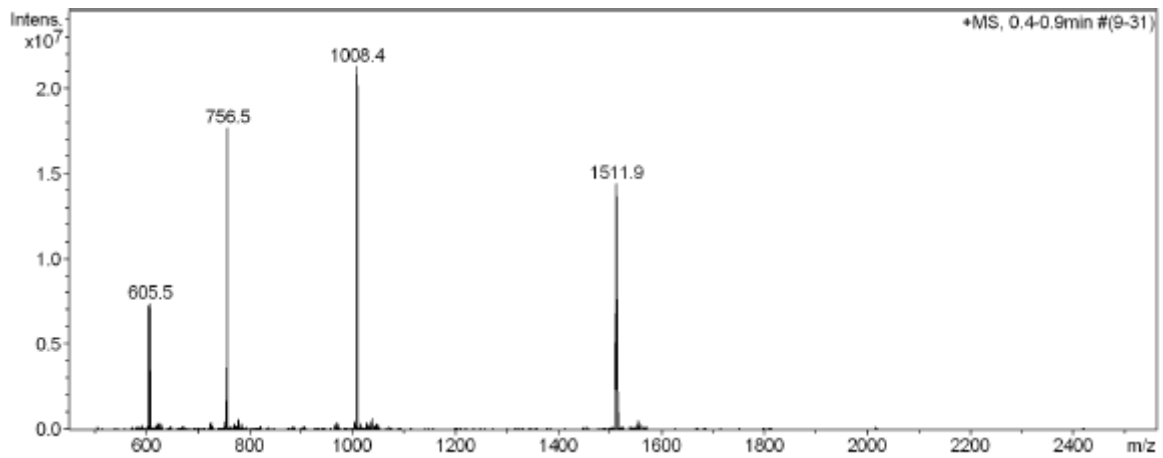
Totals : 1908.96211 457.89738

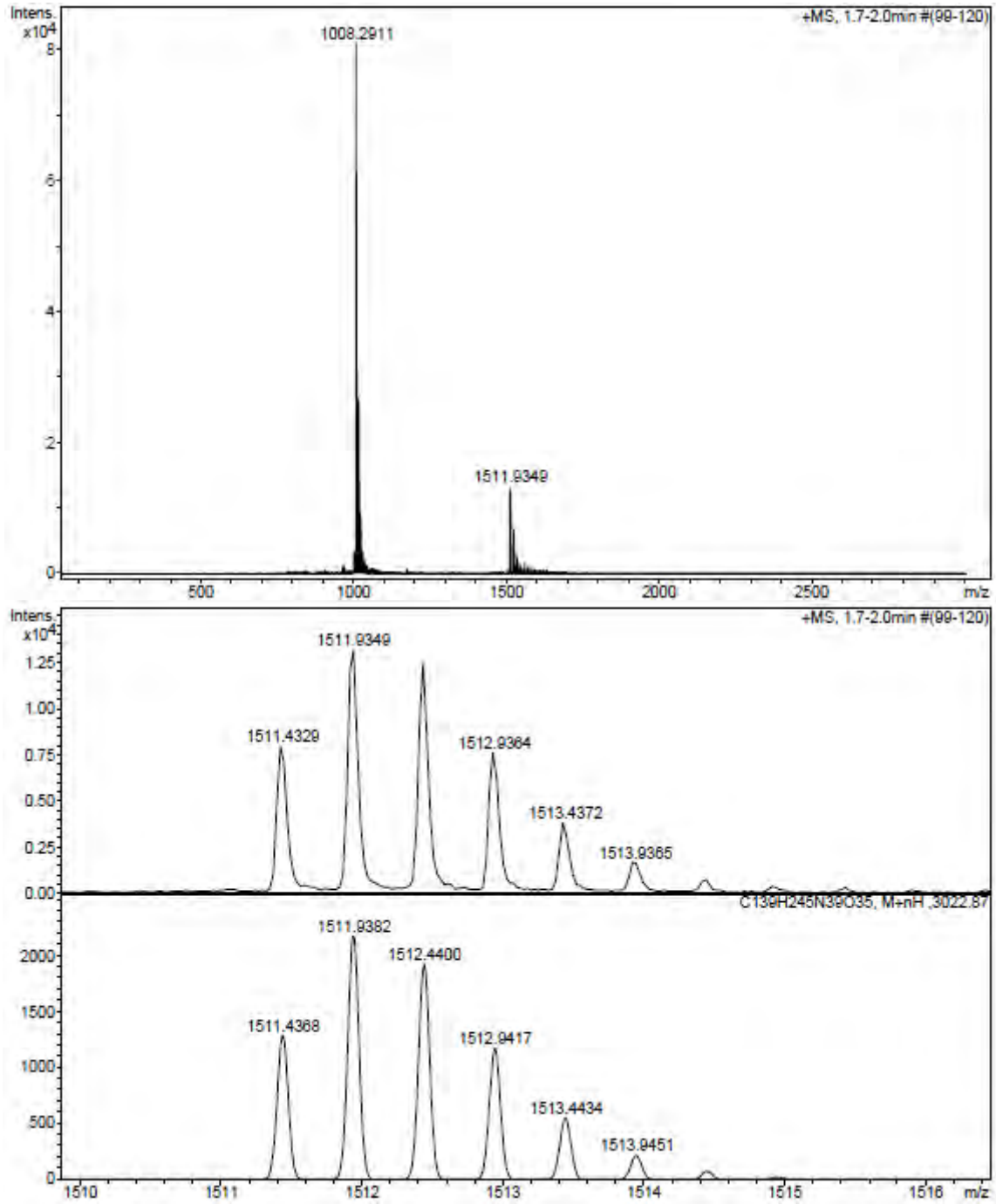
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

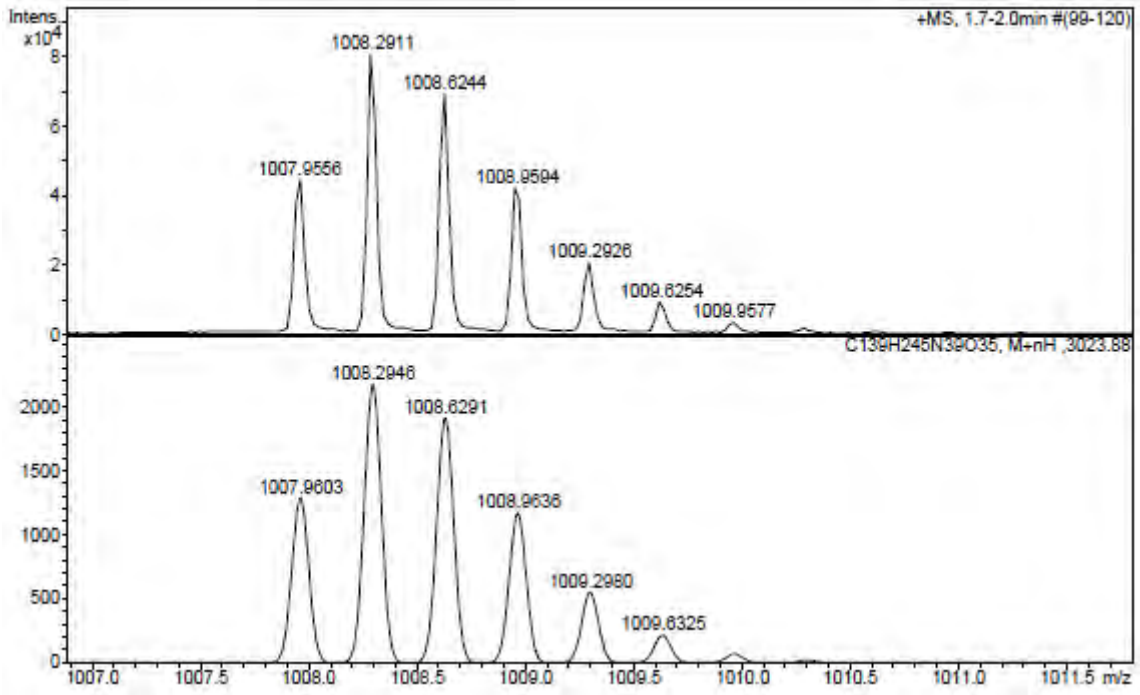


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.670	HH	0.0798	288.50366	49.63588	3.2581
2	6.790	HH	0.0894	8566.53027	1482.00330	96.7419
Totals :				8855.03394	1531.63918	

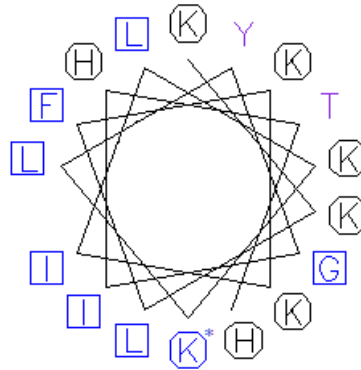
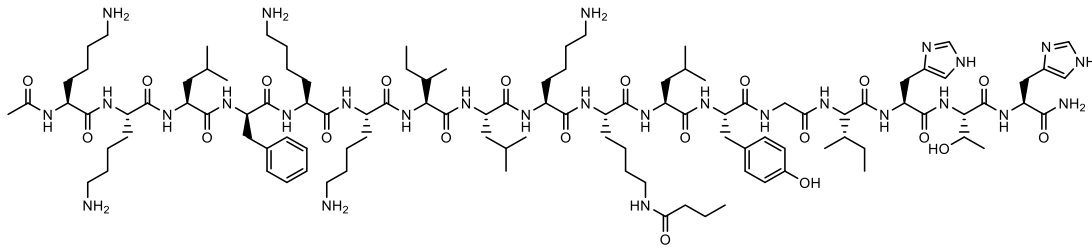
ESI-MS (m/z)



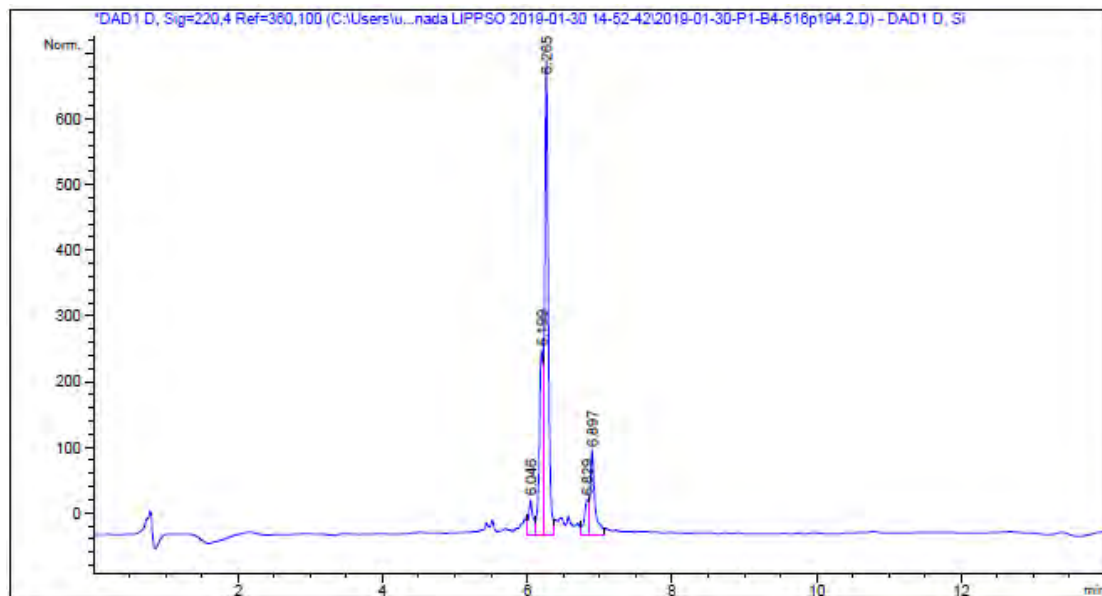
HRMS (m/z)



Ac-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-NH₂ (BP475-Pip1)



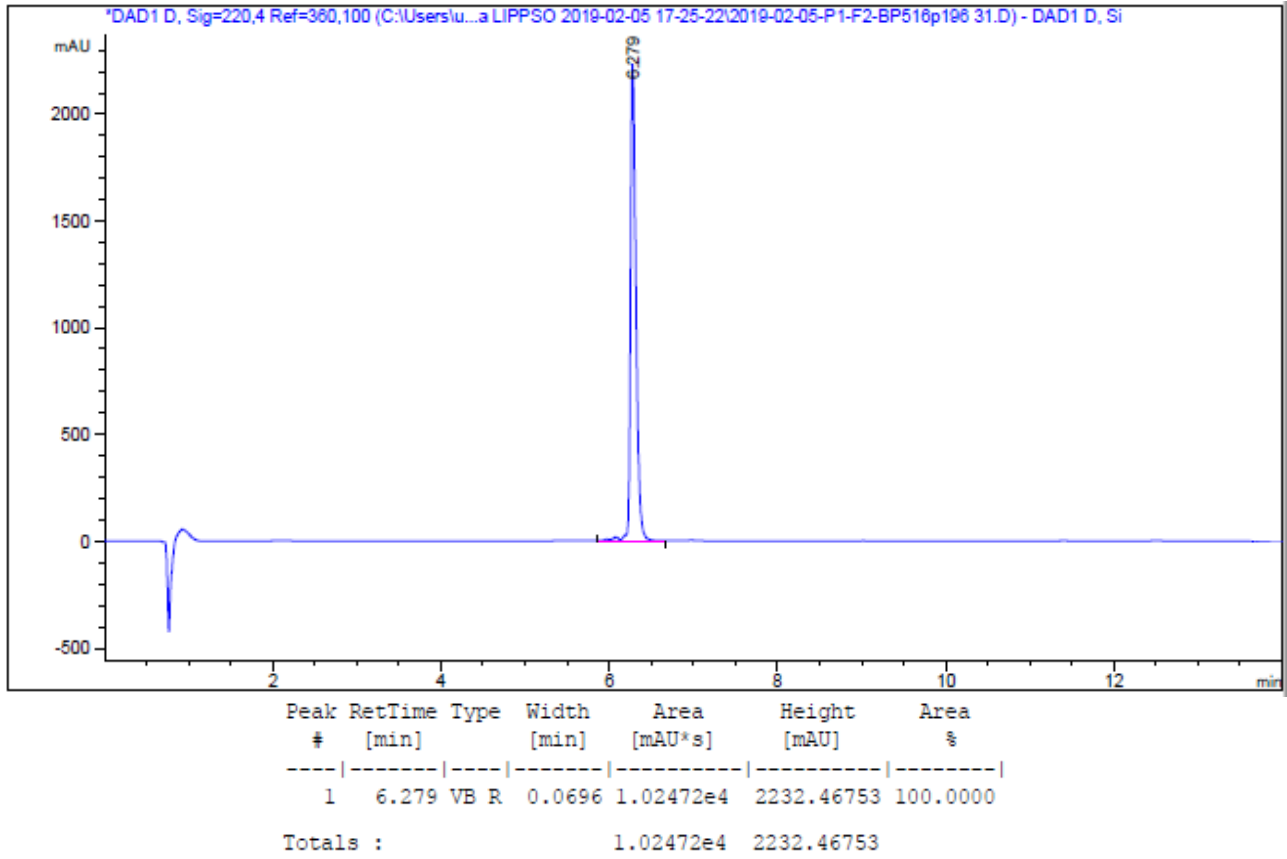
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



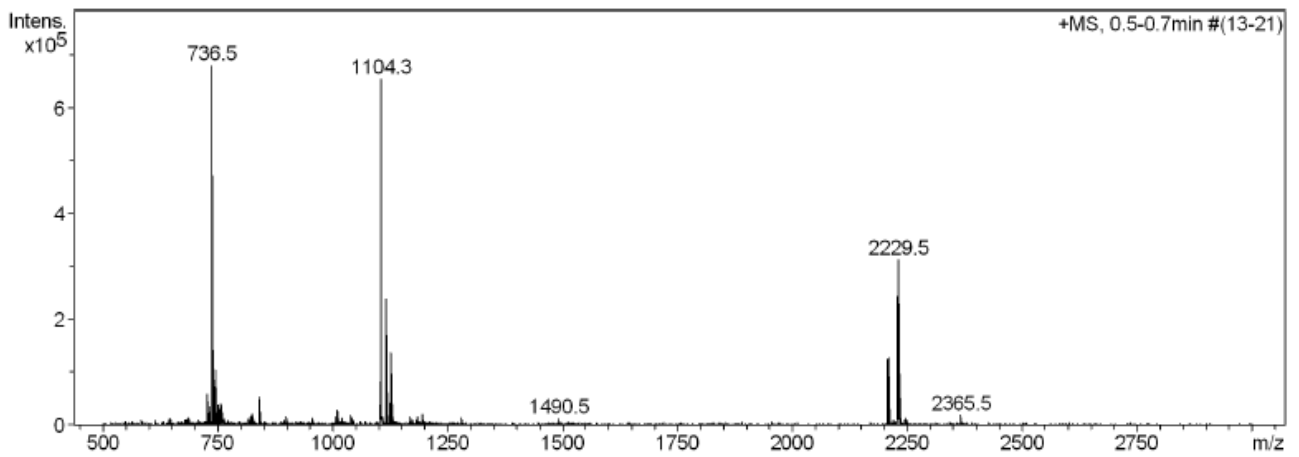
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.046	HH	0.0558	187.42612	46.71981	4.4862
2	6.199	HH	0.0524	877.78589	253.76959	21.0107
3	6.265	HH	0.0536	2392.32471	655.62097	57.2626
4	6.829	HH	0.0578	185.41014	47.26570	4.4380
5	6.897	HH	0.0662	534.86603	115.04214	12.8025

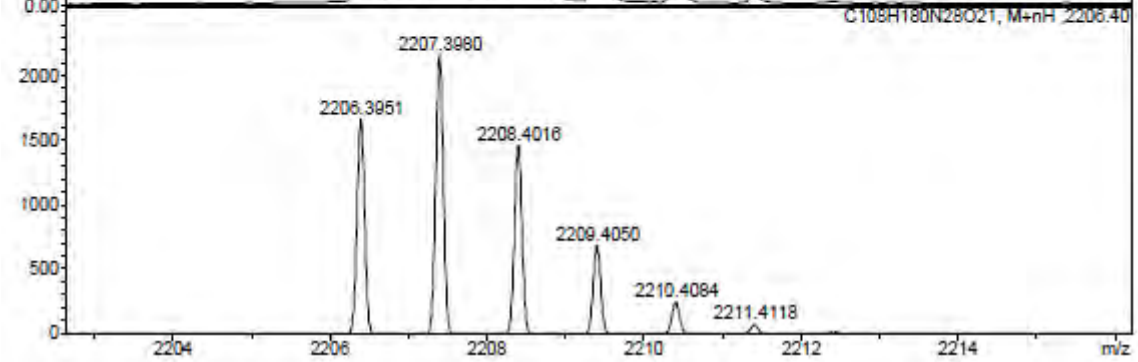
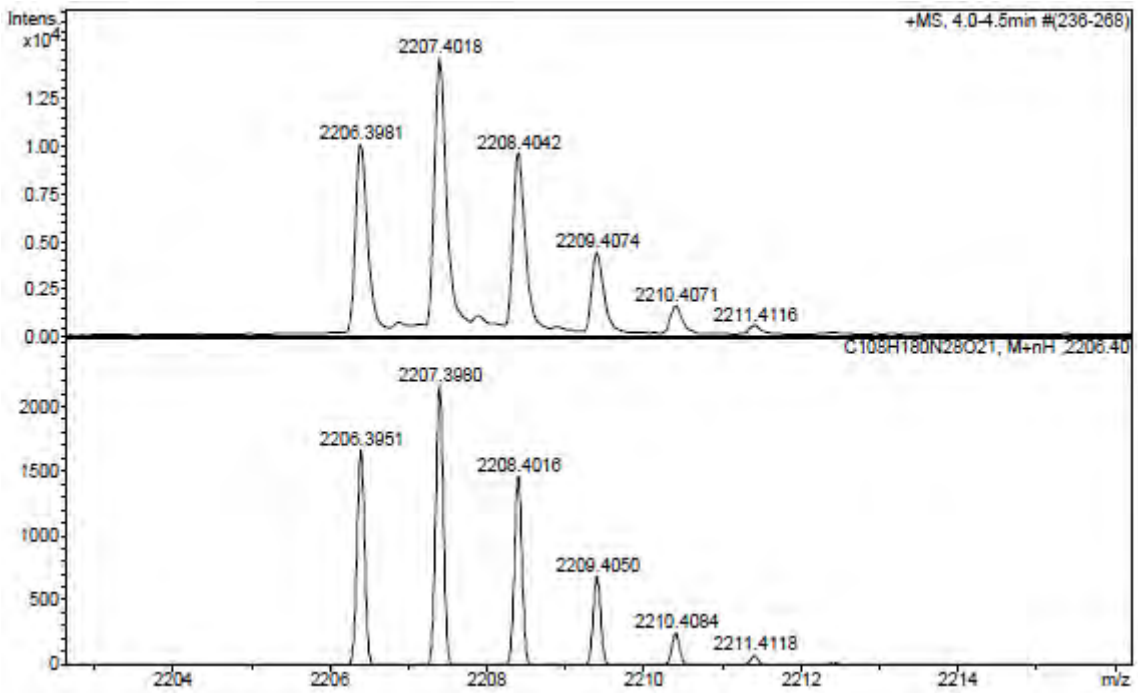
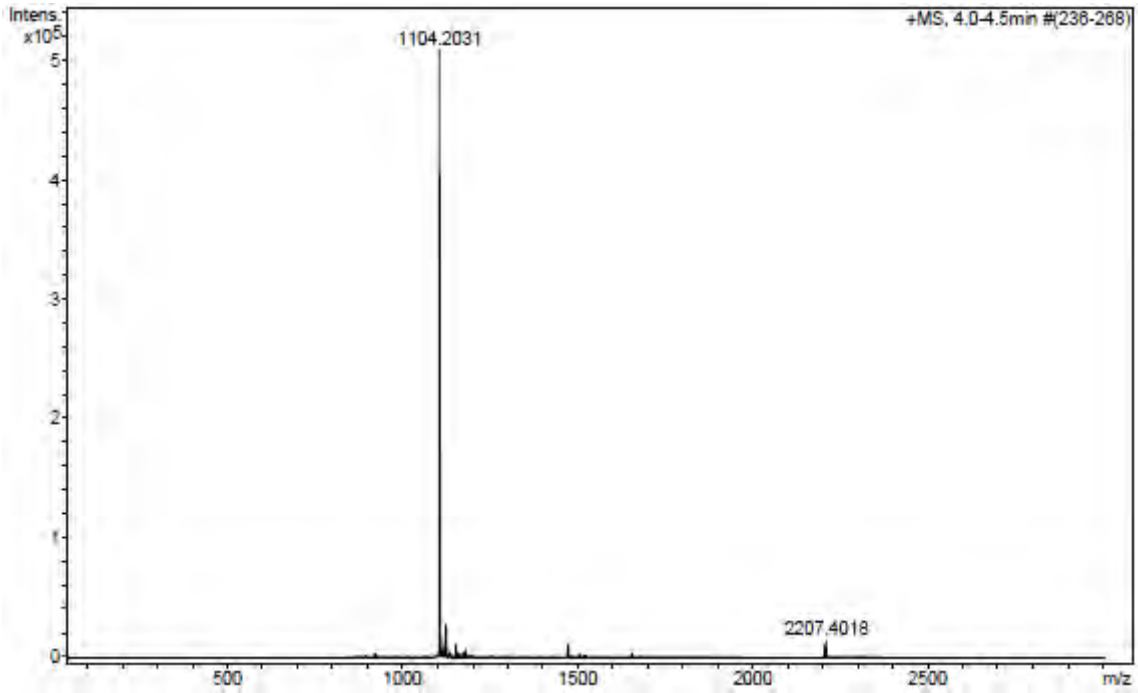
Totals : 4177.81288 1118.41822

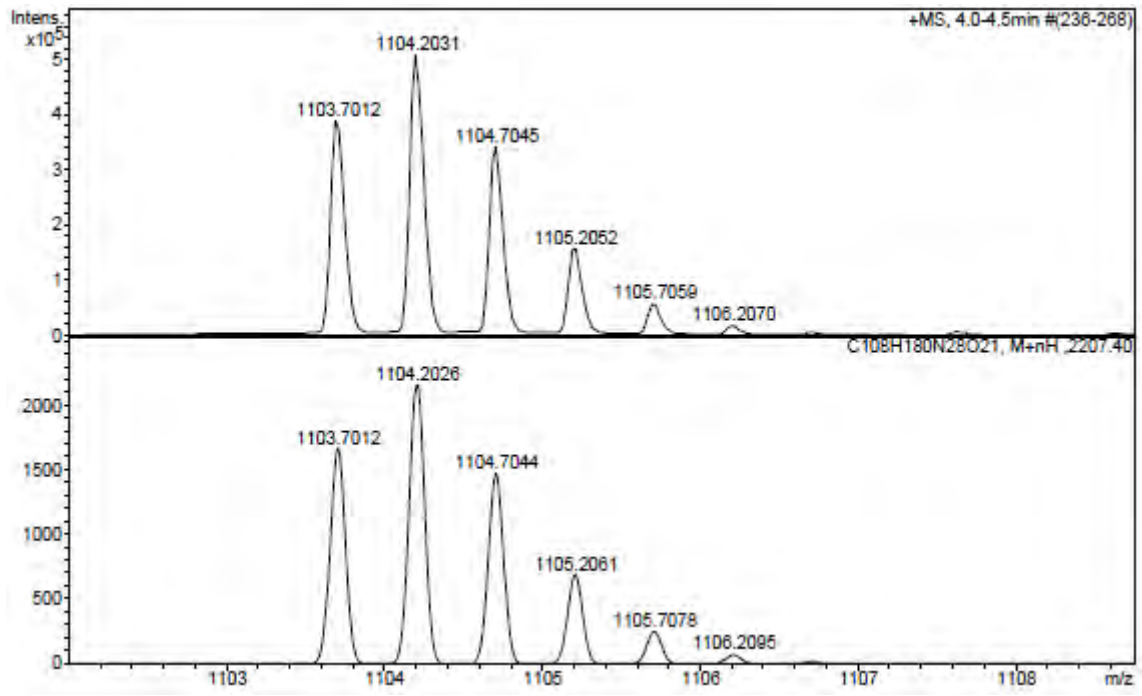
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



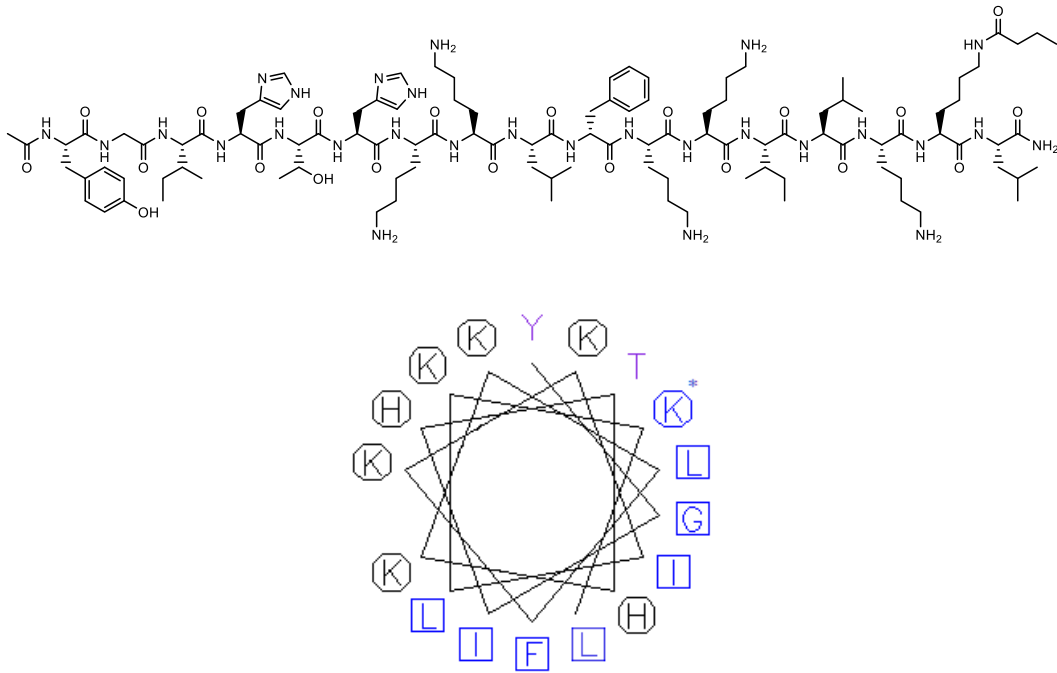
ESI-MS (m/z)



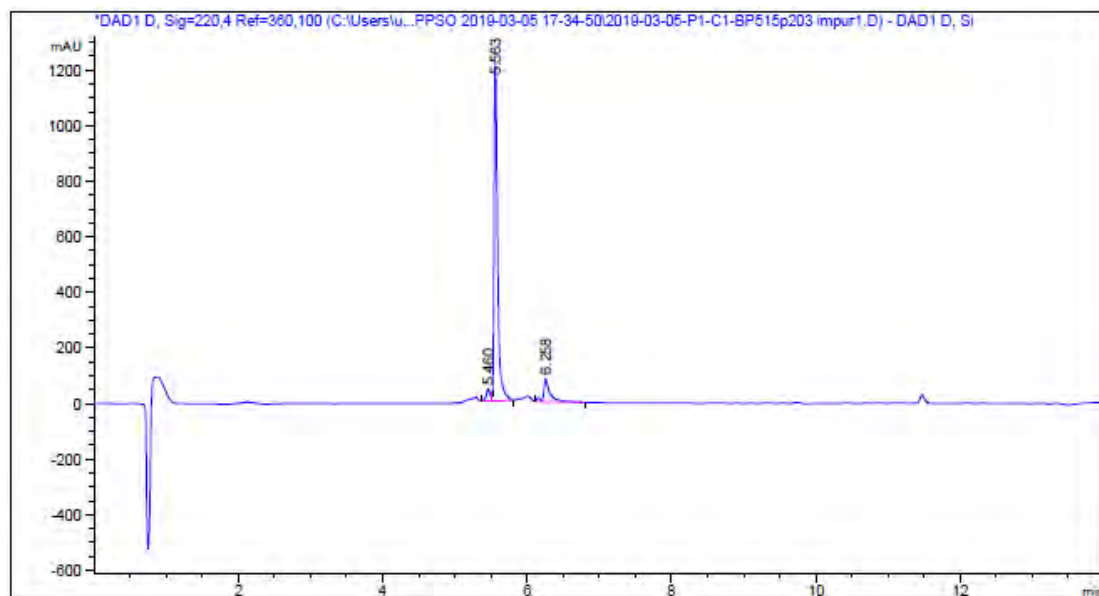
HRMS (m/z)



Ac-Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys(COC₃H₇)-Leu-NH₂ (Pip1-BP475)



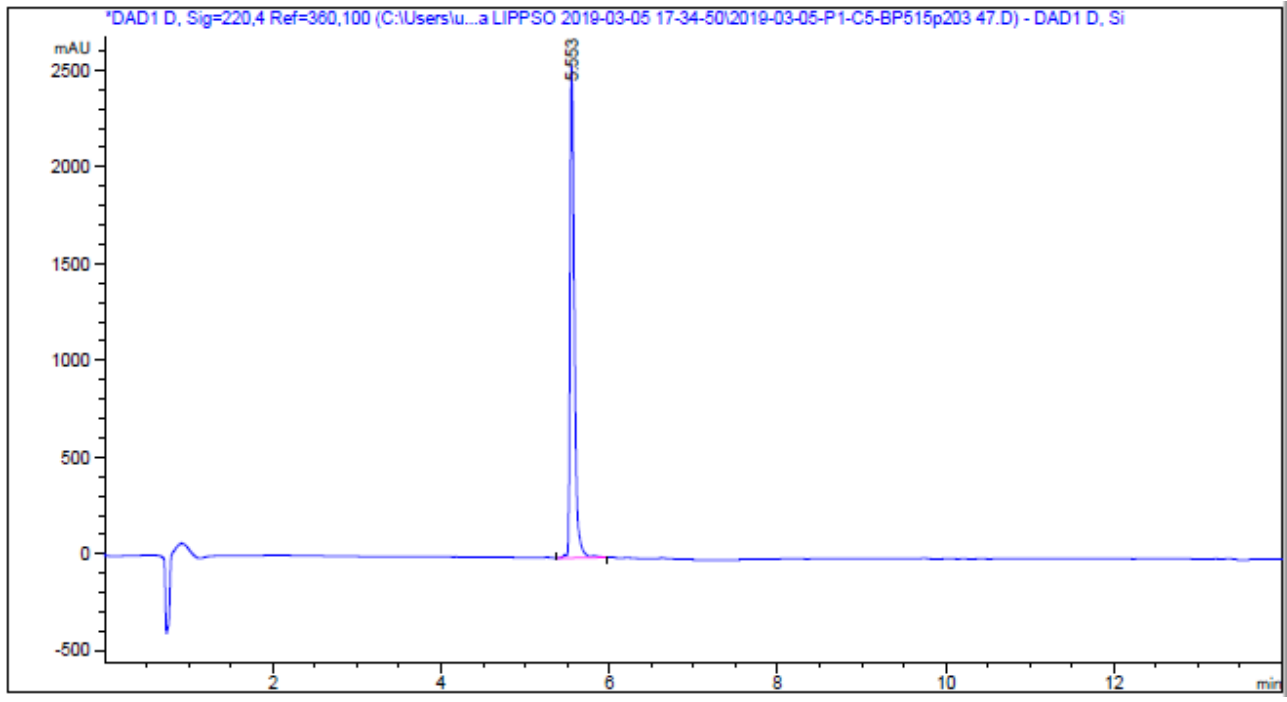
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.460	BV E	0.0543	155.50912	42.90910	3.2800
2	5.563	VB R	0.0500	4079.53809	1221.27478	86.0449
3	6.258	VB R	0.0834	506.12424	82.64986	10.6751

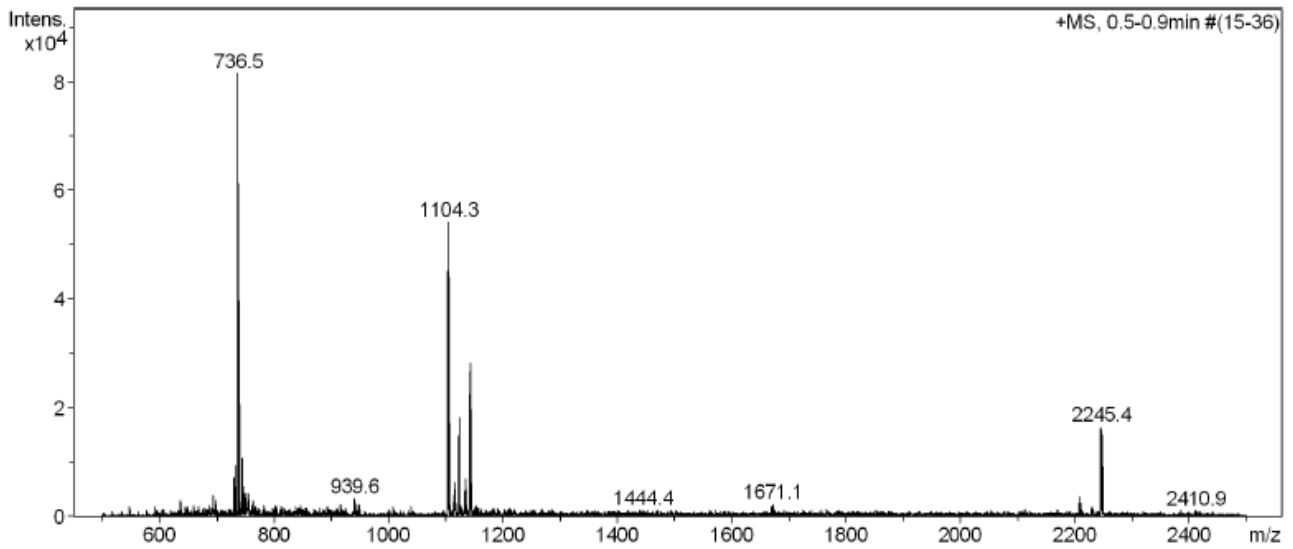
Totals : 4741.17145 1346.83375

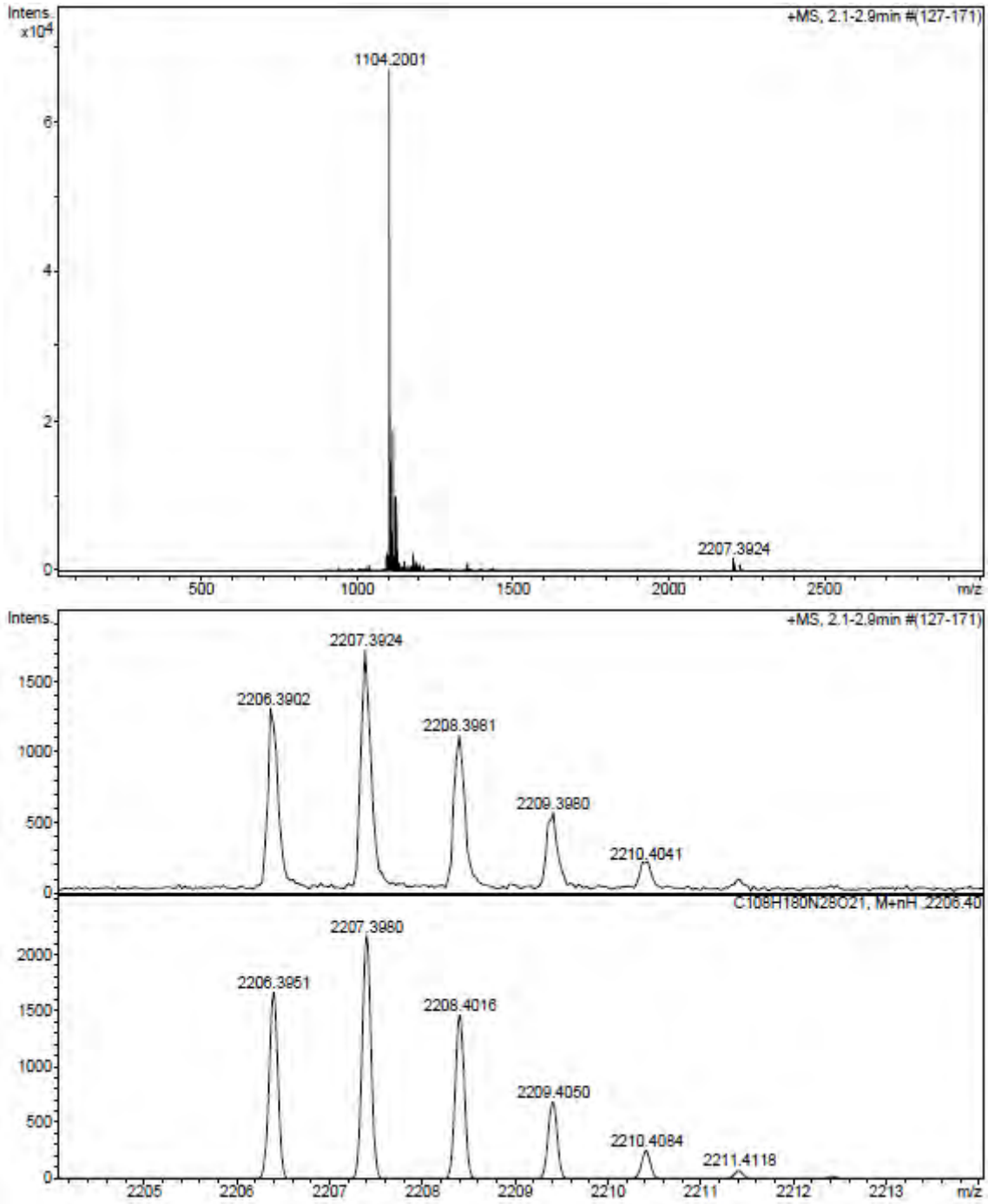
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

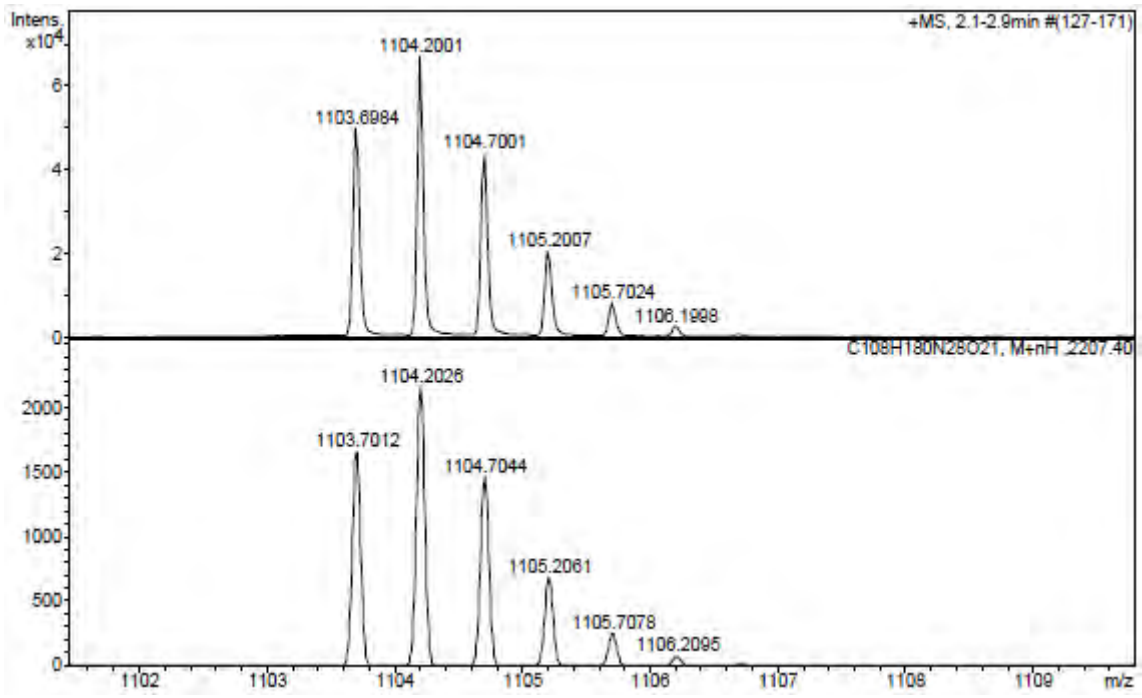


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.553	VV R	0.0551	9212.02441	2550.51538	100.0000
Totals :				9212.02441	2550.51538	

ESI-MS (m/z)

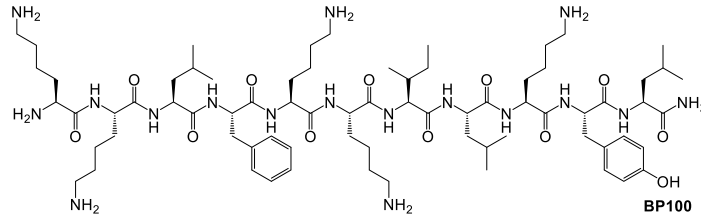


HRMS (m/z)

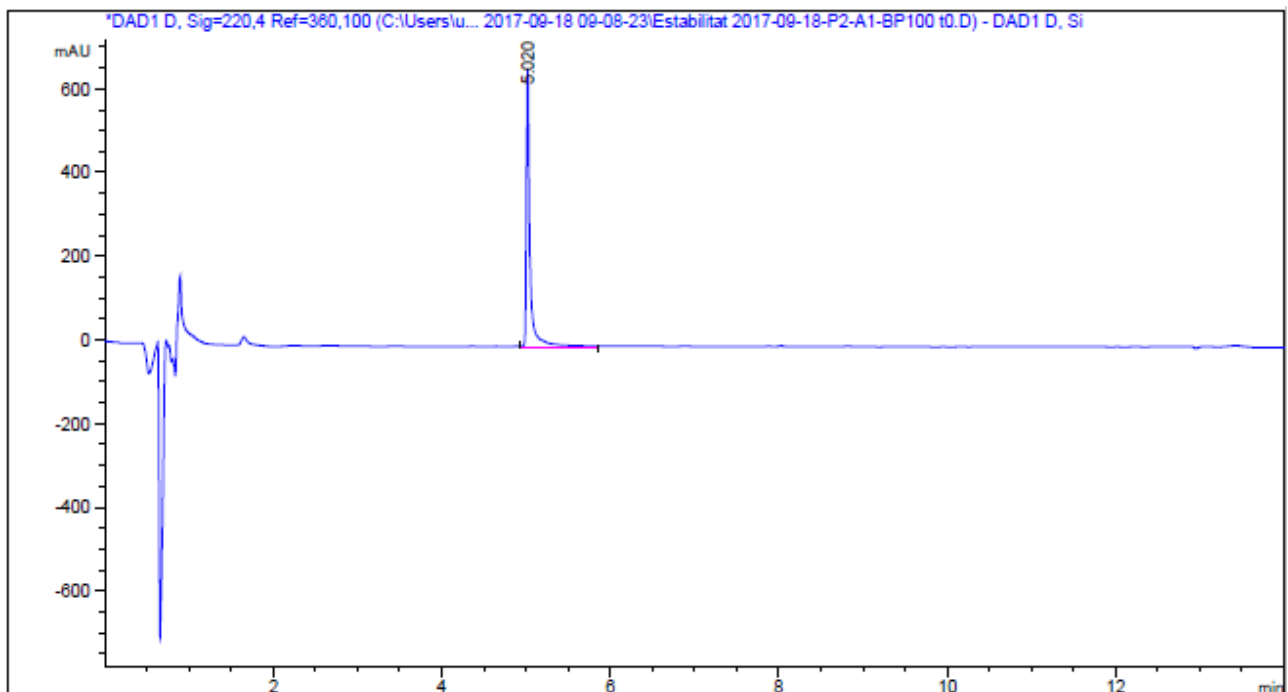


3 Pèptids conjugats de BP100 amb pesticides convencionals

Peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-MBHA (6a)

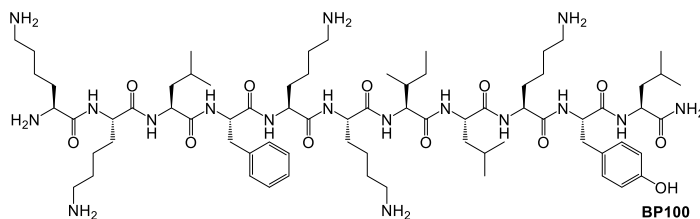


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

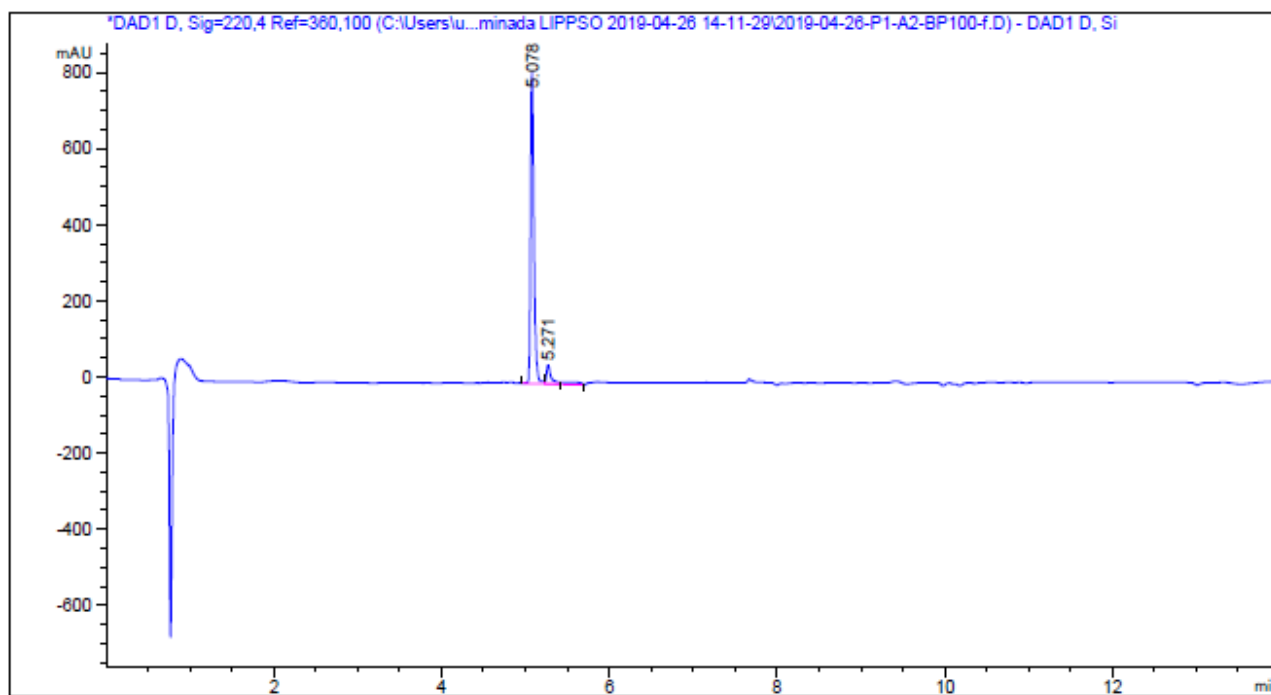


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.020	HH	0.0430	1997.97229	665.58813	100.0000
Totals :				1997.97229	665.58813	

Peptidil resina H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (6b)



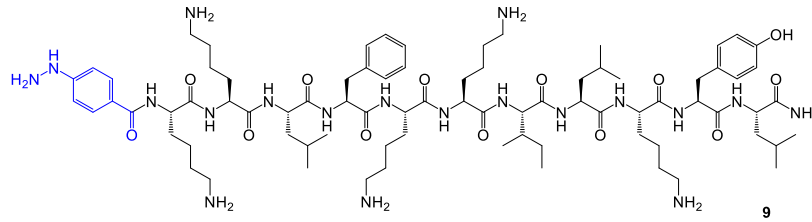
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



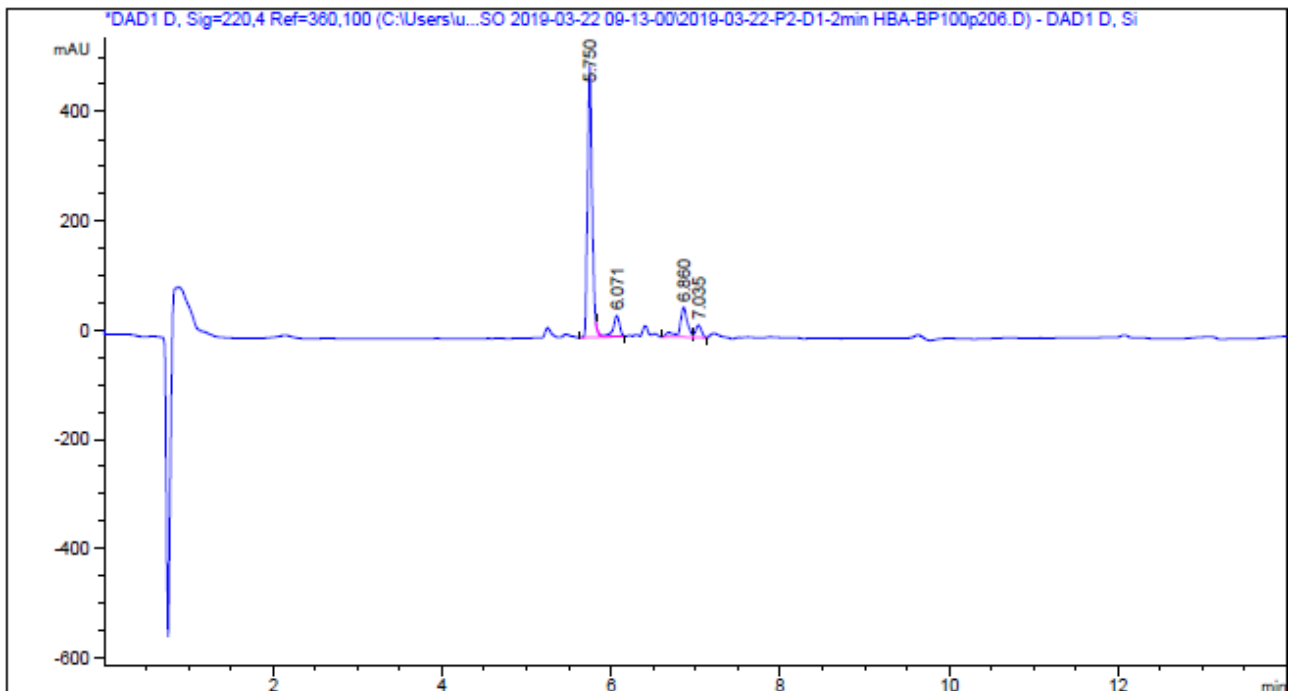
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.078	BV R	0.0441	2389.73267	818.68323	92.8044
2	5.271	VV E	0.0527	185.28758	49.44049	7.1956
Totals :				2575.02025	868.12372	

Síntesi del pèptid conjugat BP524a/b

4-Hidrazino-benzoat-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(^tBu)-Leu-NH-Rink-ChemMatrix (10)

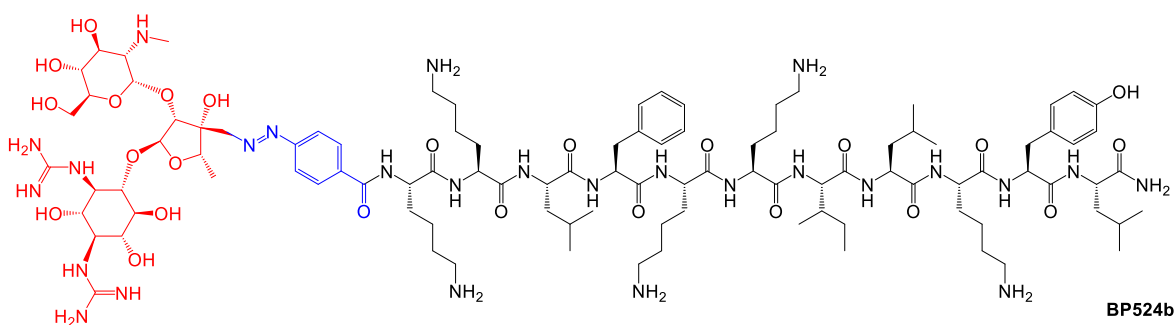
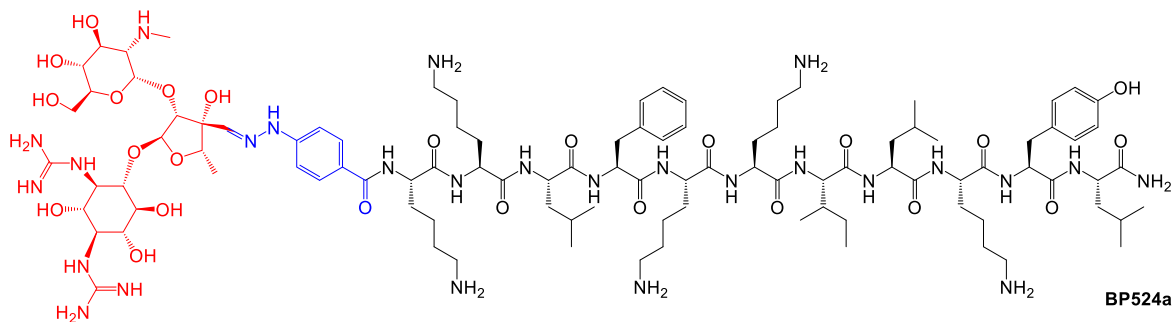


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

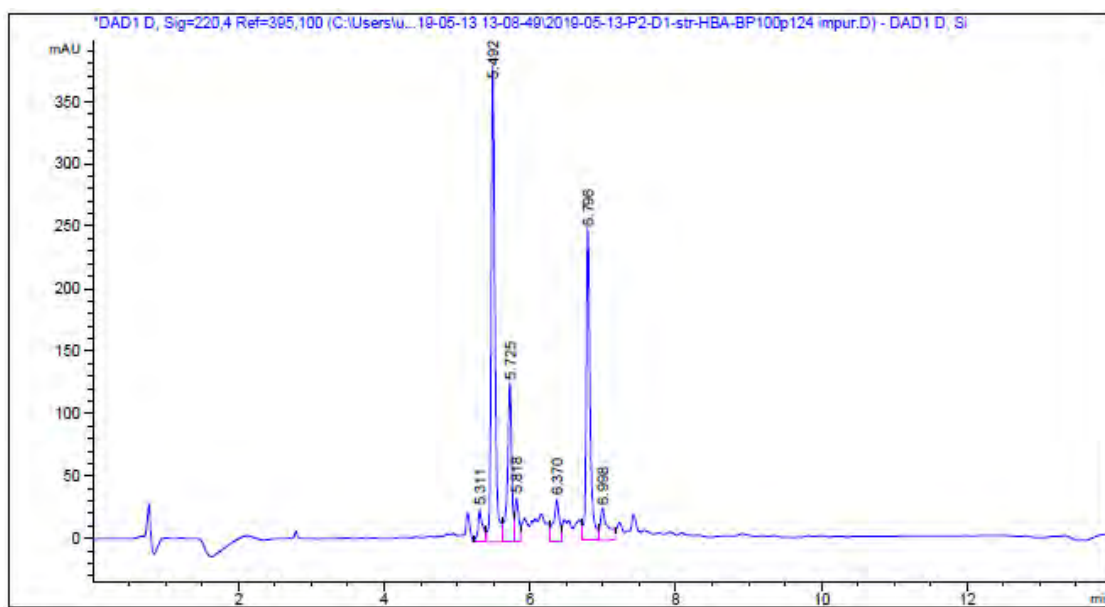


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.750	BV R	0.0600	1869.08472	495.18484	73.9470
2	6.071	VB E	0.0803	204.42514	38.25659	8.0877
3	6.860	VV R	0.0951	348.61417	54.17215	13.7923
4	7.035	VB	0.0747	105.47694	21.69952	4.1730
Totals :				2527.60096	609.31310	

Pèptid conjugat BP524a/b

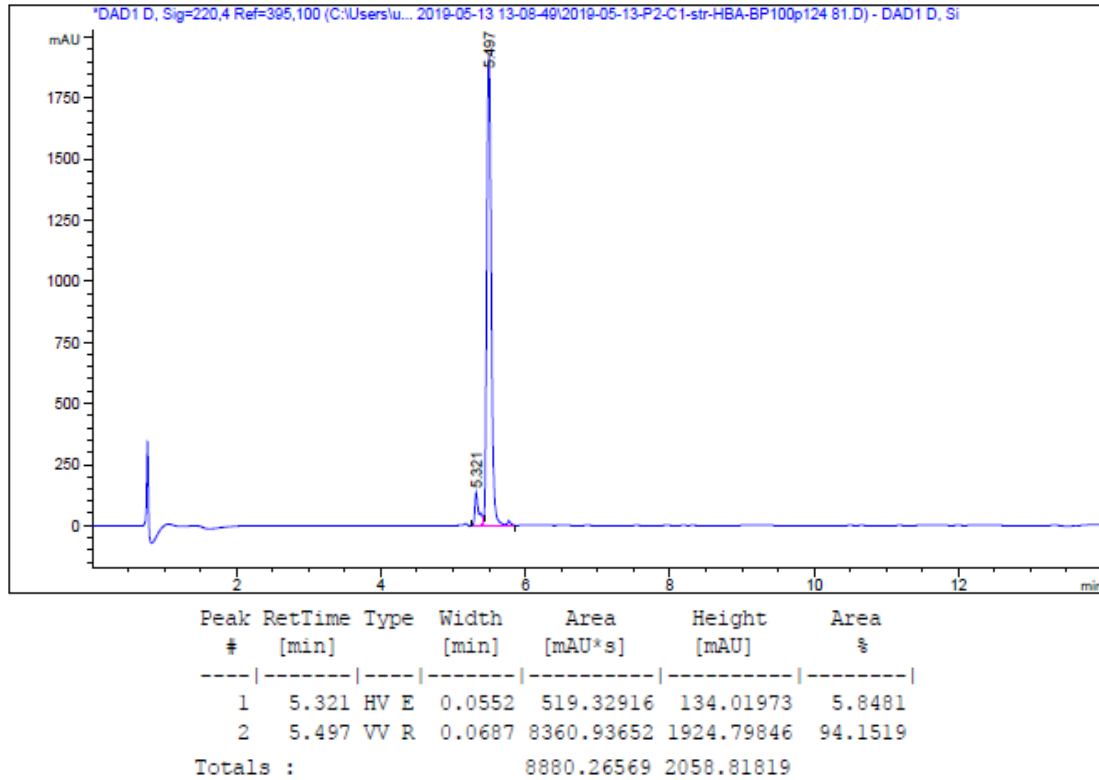
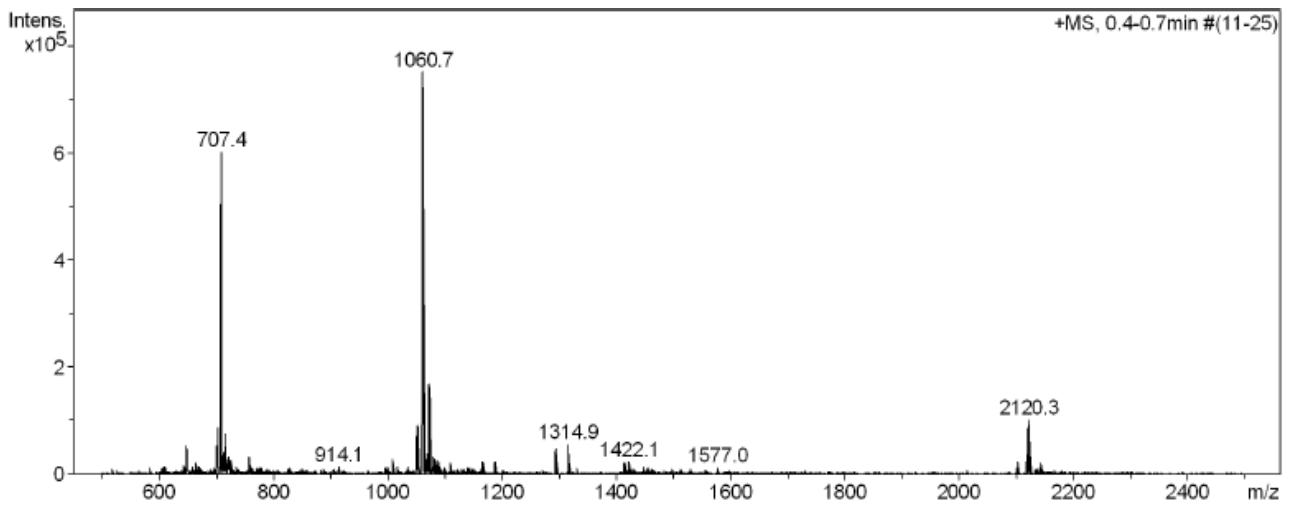


HPLC del cru de reacció ($\lambda=220$ nm)

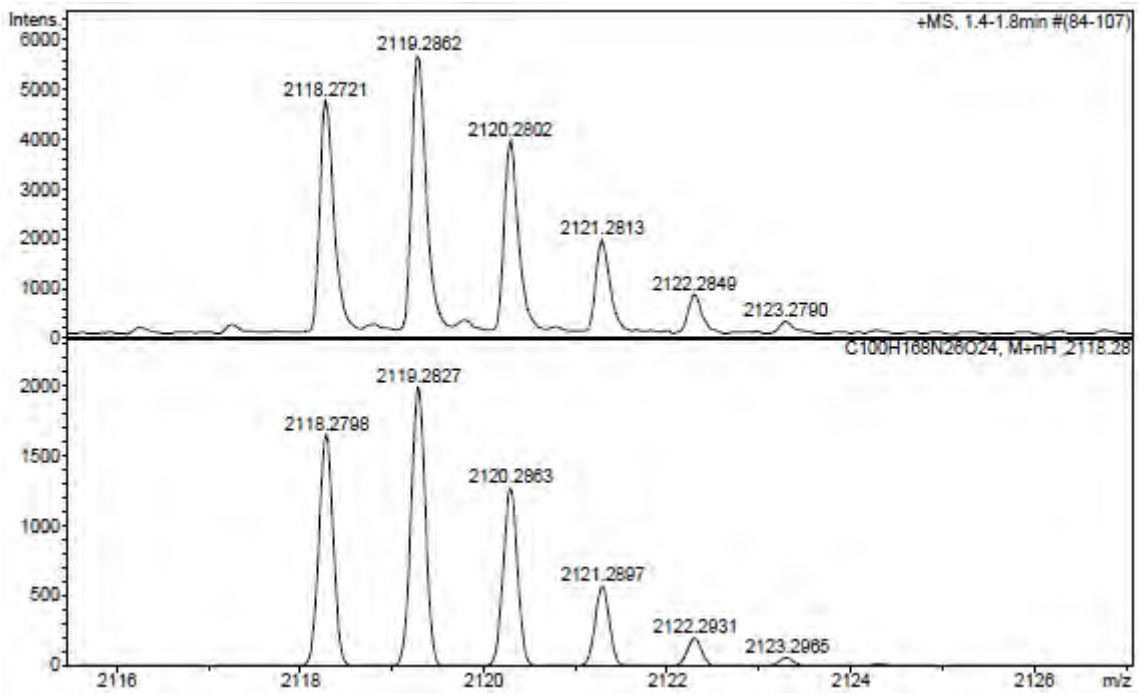
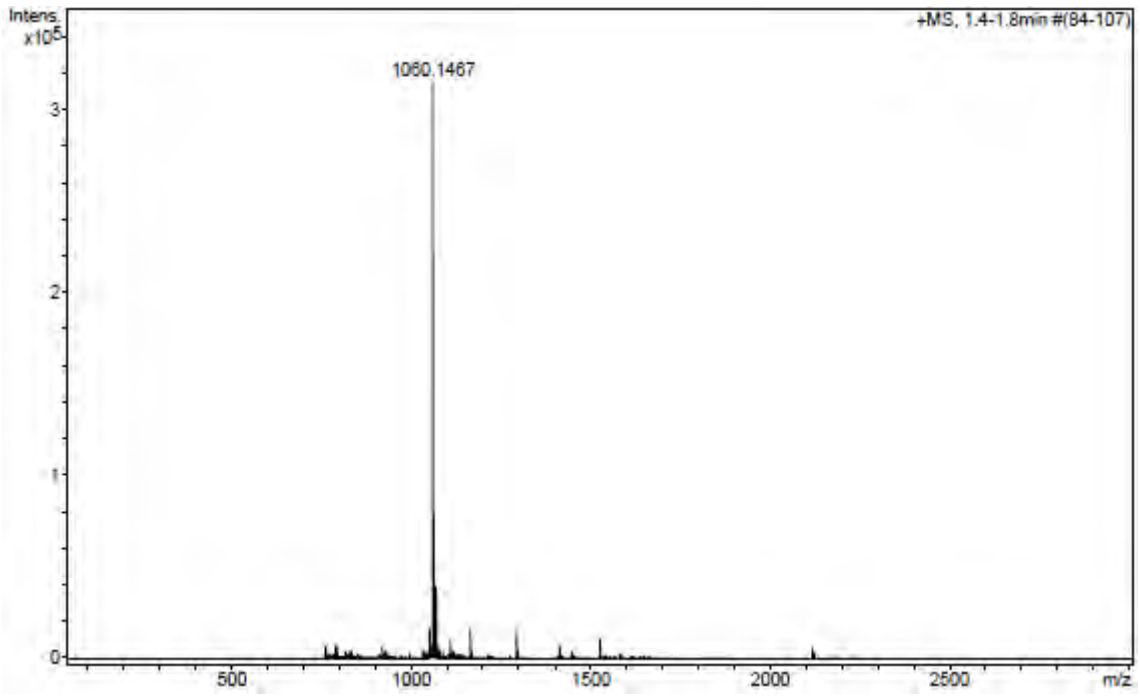


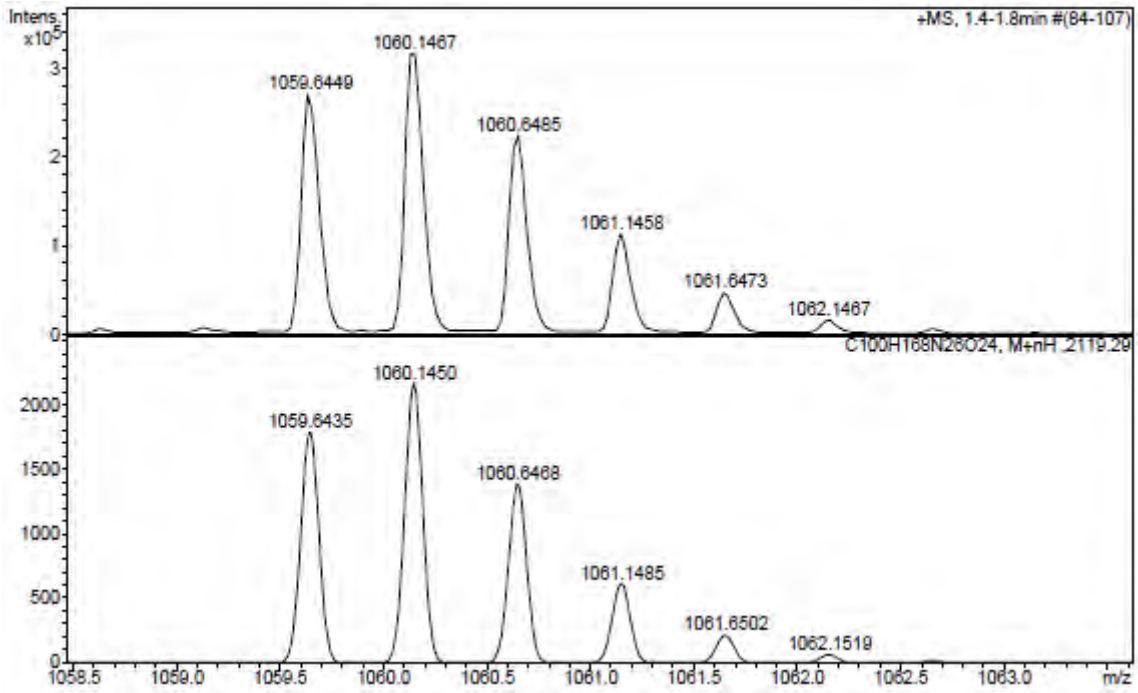
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.311	BH	0.0645	118.94523	25.46117	3.4840
2	5.492	HH	0.0547	1394.14307	380.81433	40.8352
3	5.725	HH	0.0578	497.05630	126.50564	14.5591
4	5.818	HH	0.0543	126.68131	34.90557	3.7106
5	6.370	HH	0.0752	177.07419	32.69902	5.1866
6	6.796	HH	0.0572	919.40588	248.13550	26.9299
7	6.998	HH	0.0960	180.76402	25.09466	5.2947

Totals : 3414.07001 873.61589

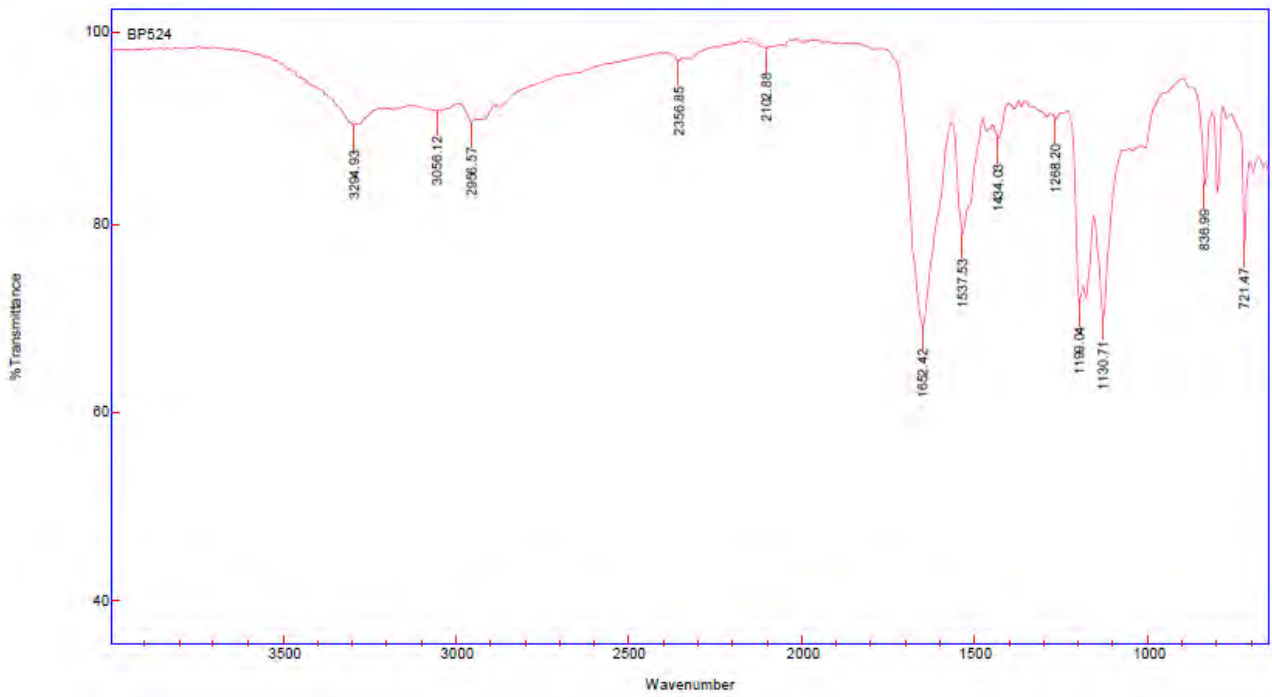
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

HRMS (m/z)

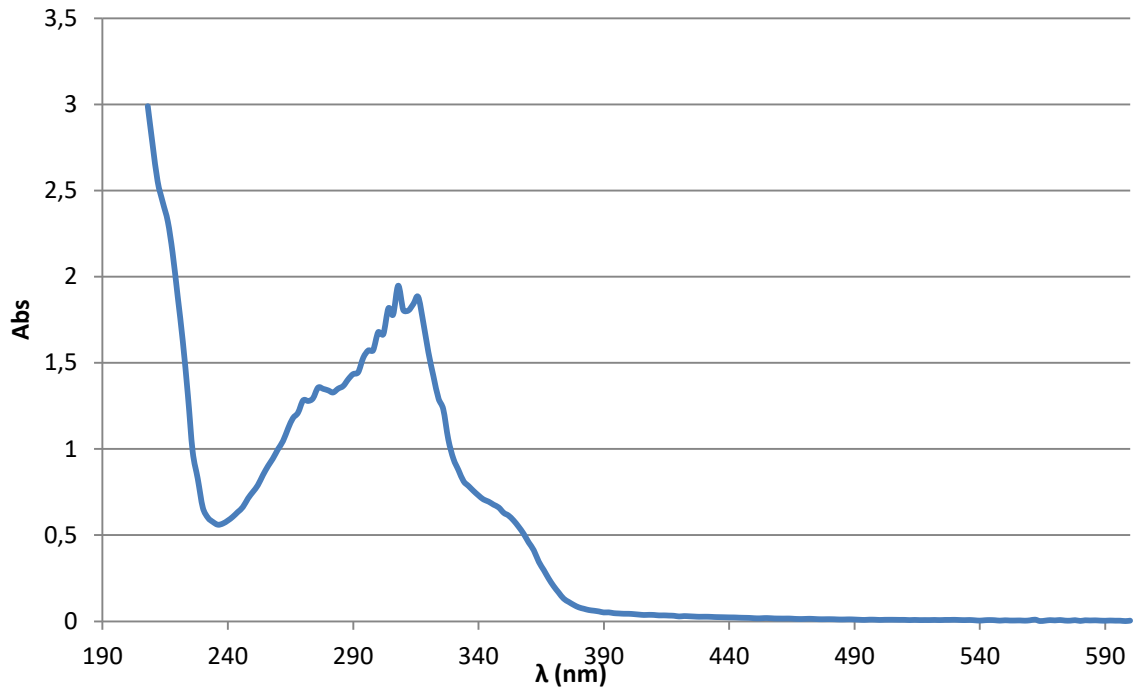




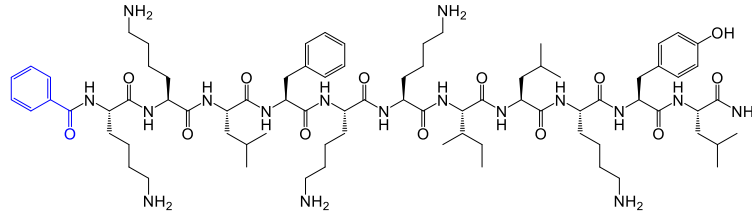
FT-IR (neat) ν (cm⁻¹)



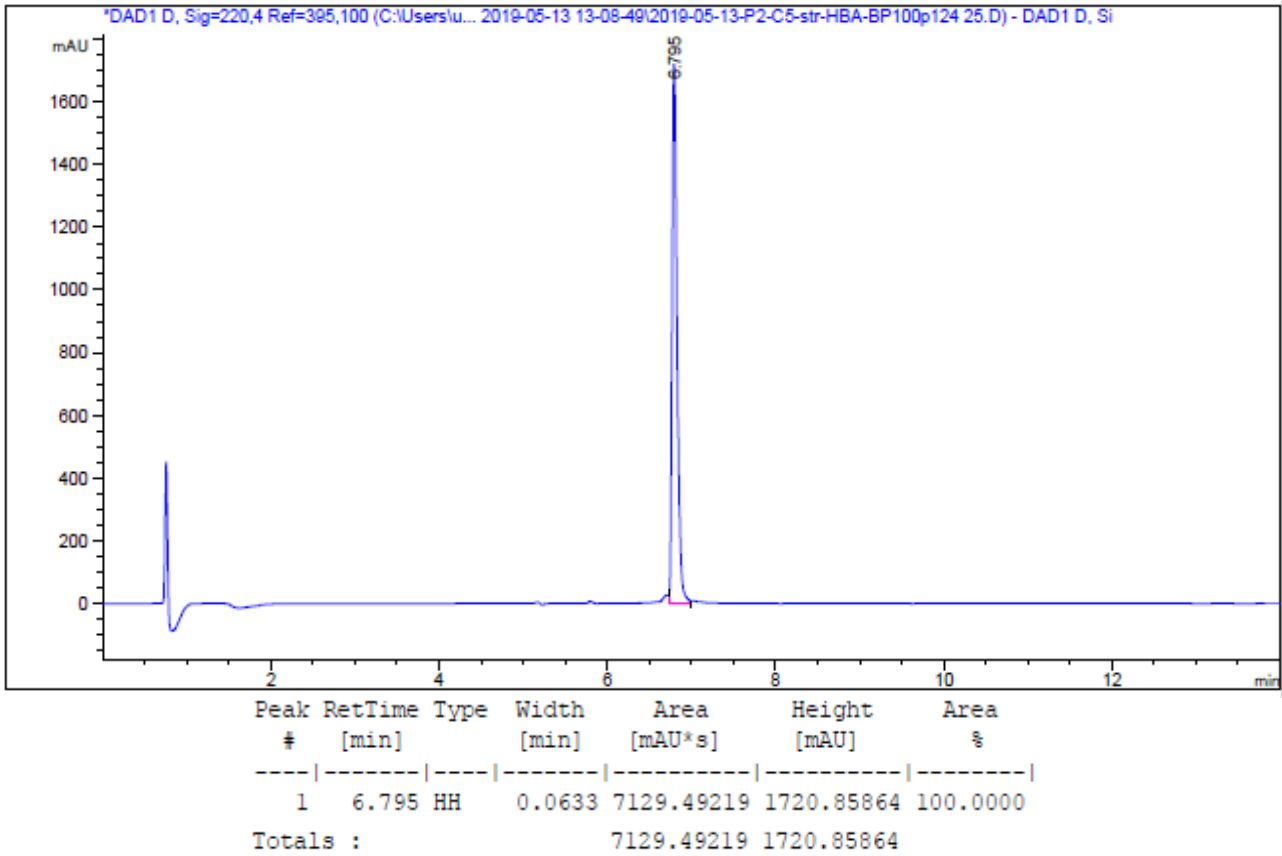
UV/VIS



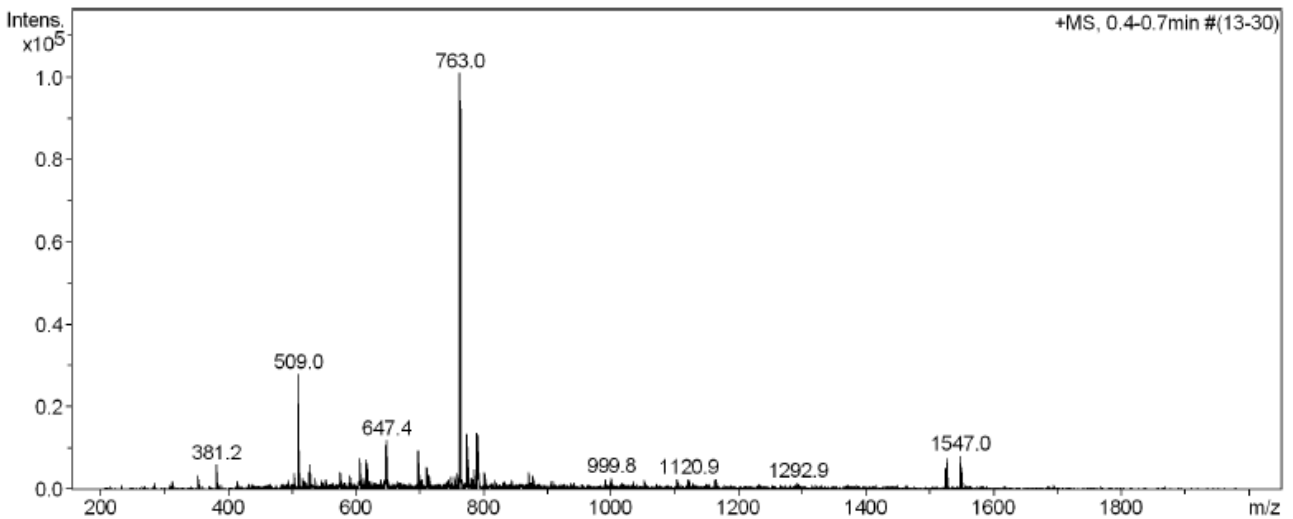
Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (BP103)

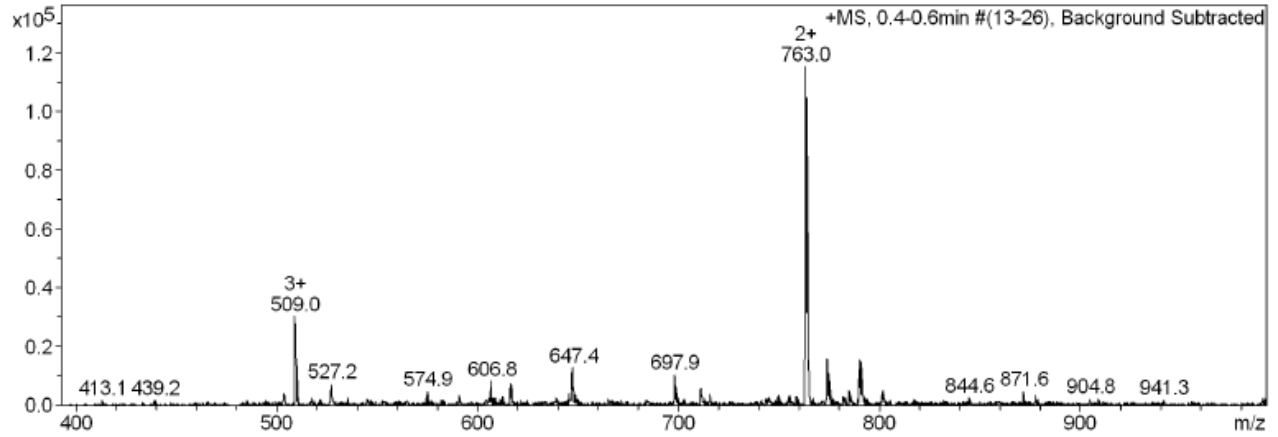
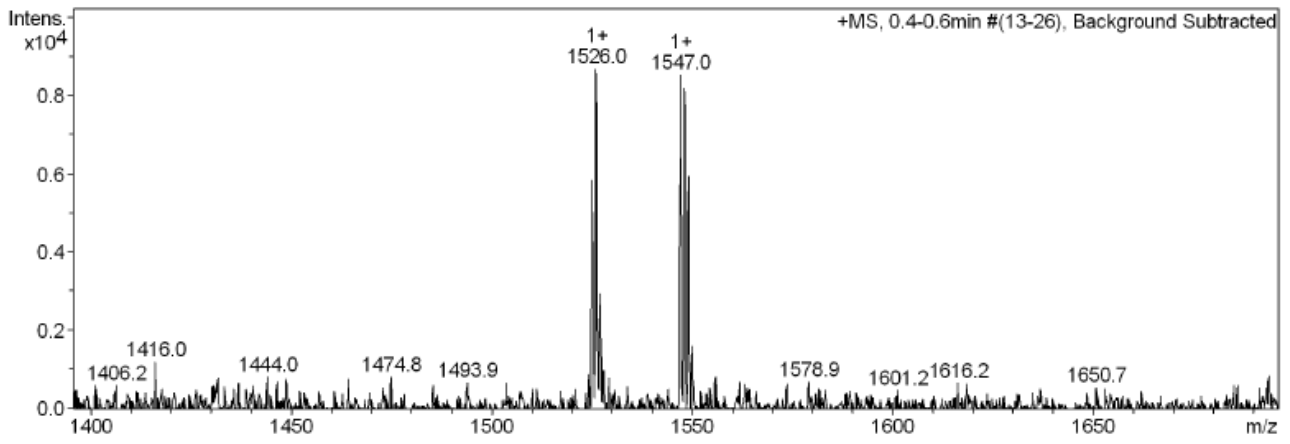


HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

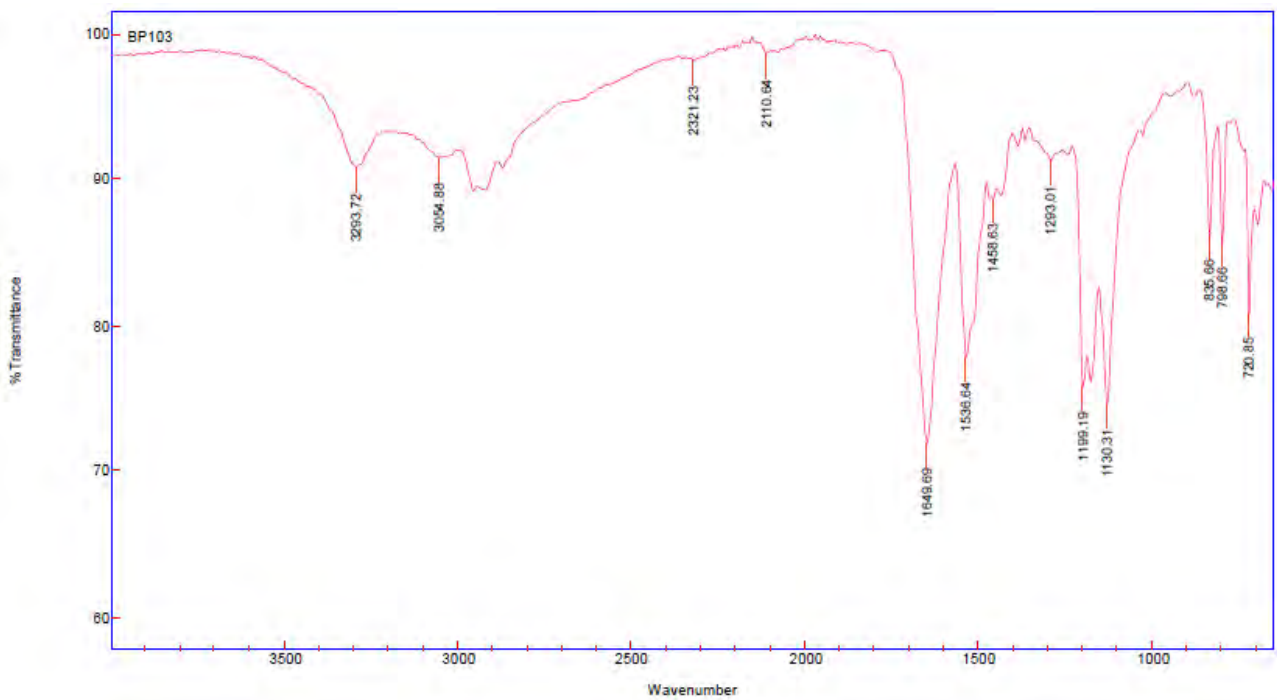


ESI-MS (m/z)

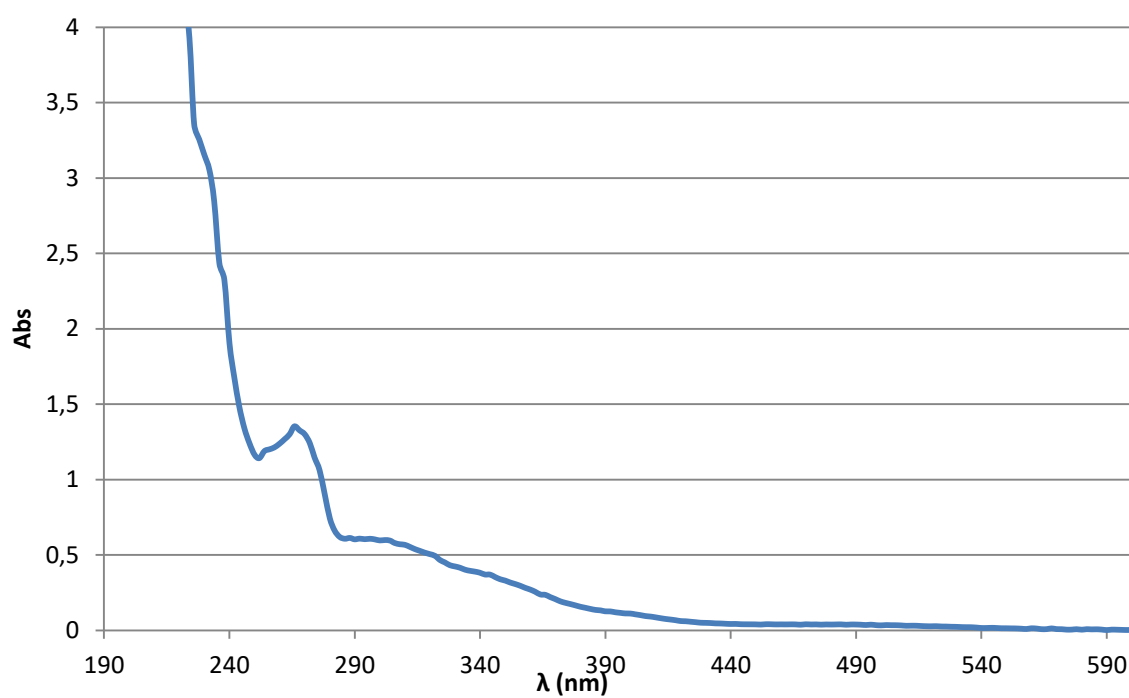




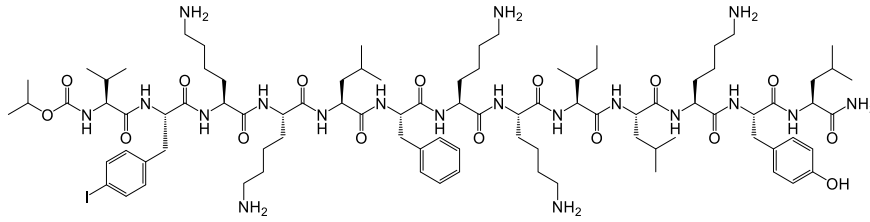
FT-IR (neat) ν (cm^{-1})



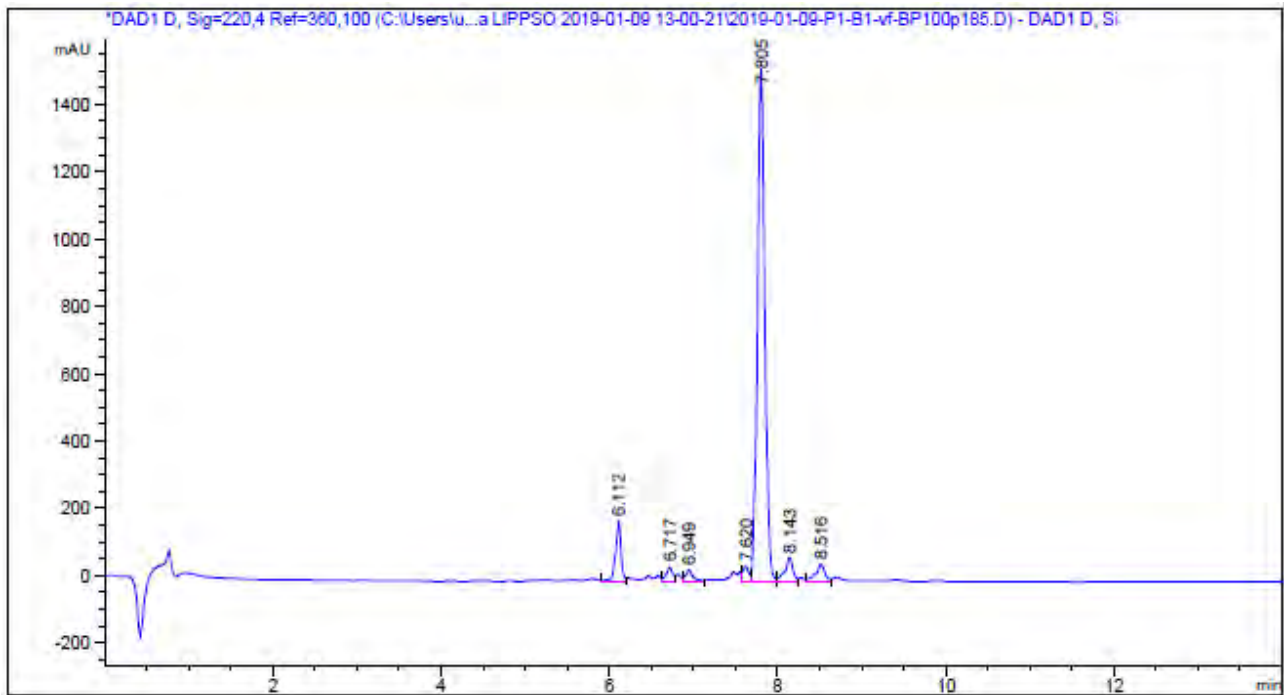
UV/VIS



Pèptid conjugat contenint BP100 i un derivat de valifenalat

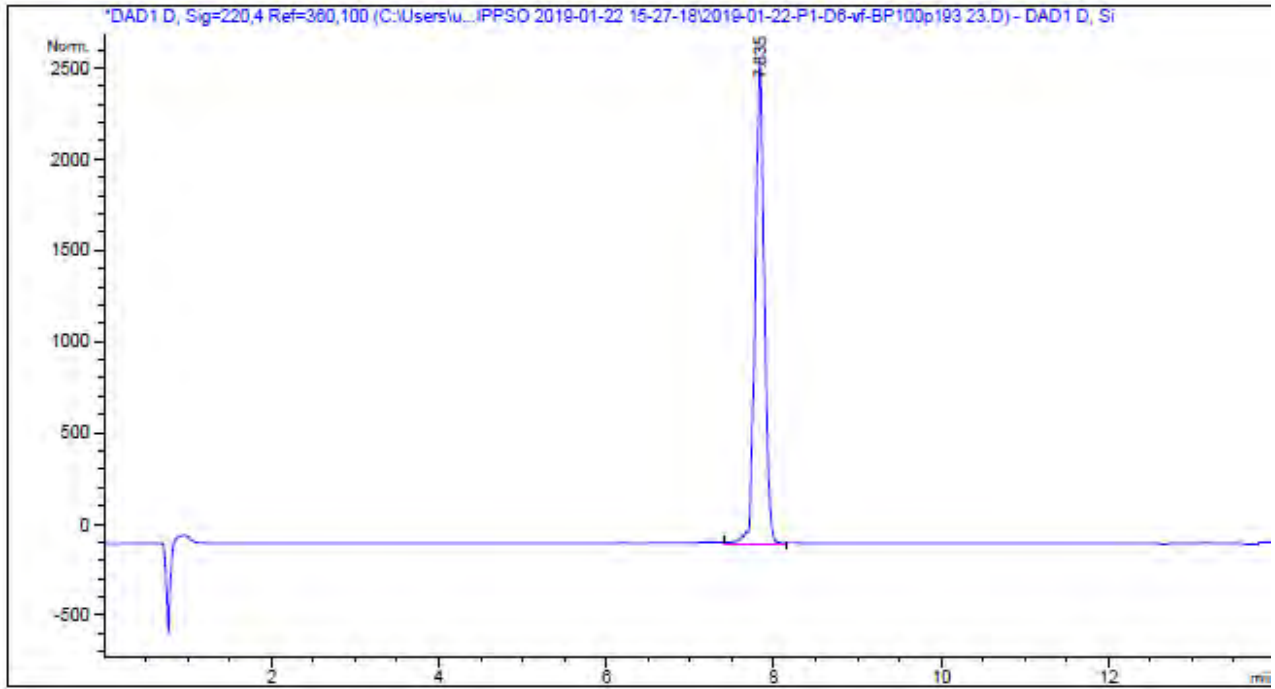


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

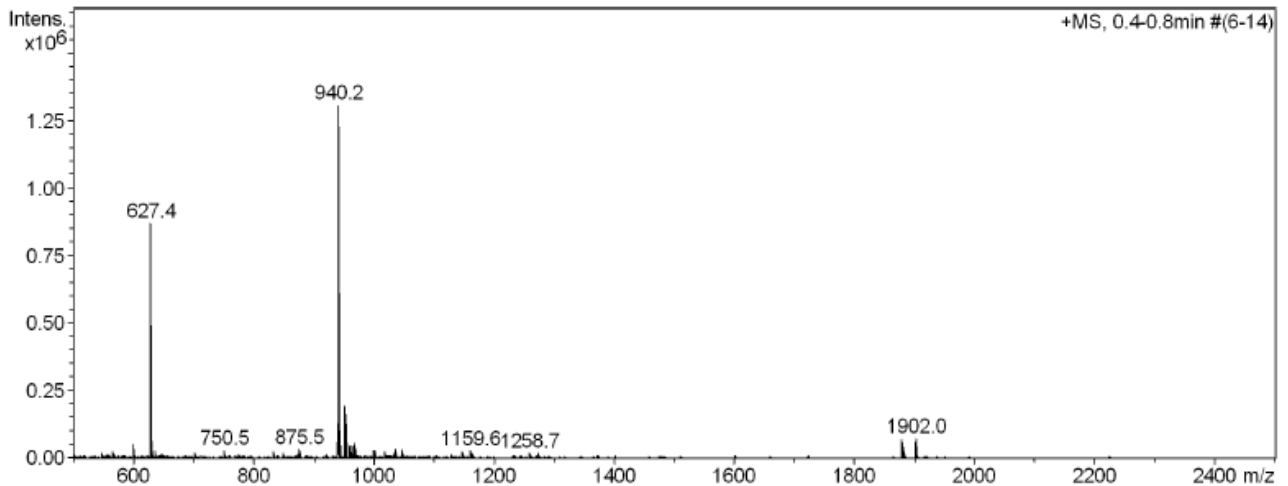


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.112	HH	0.0669	807.21027	177.99796	6.9877
2	6.717	HH	0.0754	215.48122	41.62869	1.8653
3	6.949	HH	0.0853	201.55014	32.97571	1.7448
4	7.620	HH	0.0728	212.46762	44.41597	1.8393
5	7.805	HH	0.0919	9272.07227	1525.09839	80.2652
6	8.143	HH	0.0947	459.01080	69.85867	3.9735
7	8.516	HH	0.1108	384.00699	49.91442	3.3242

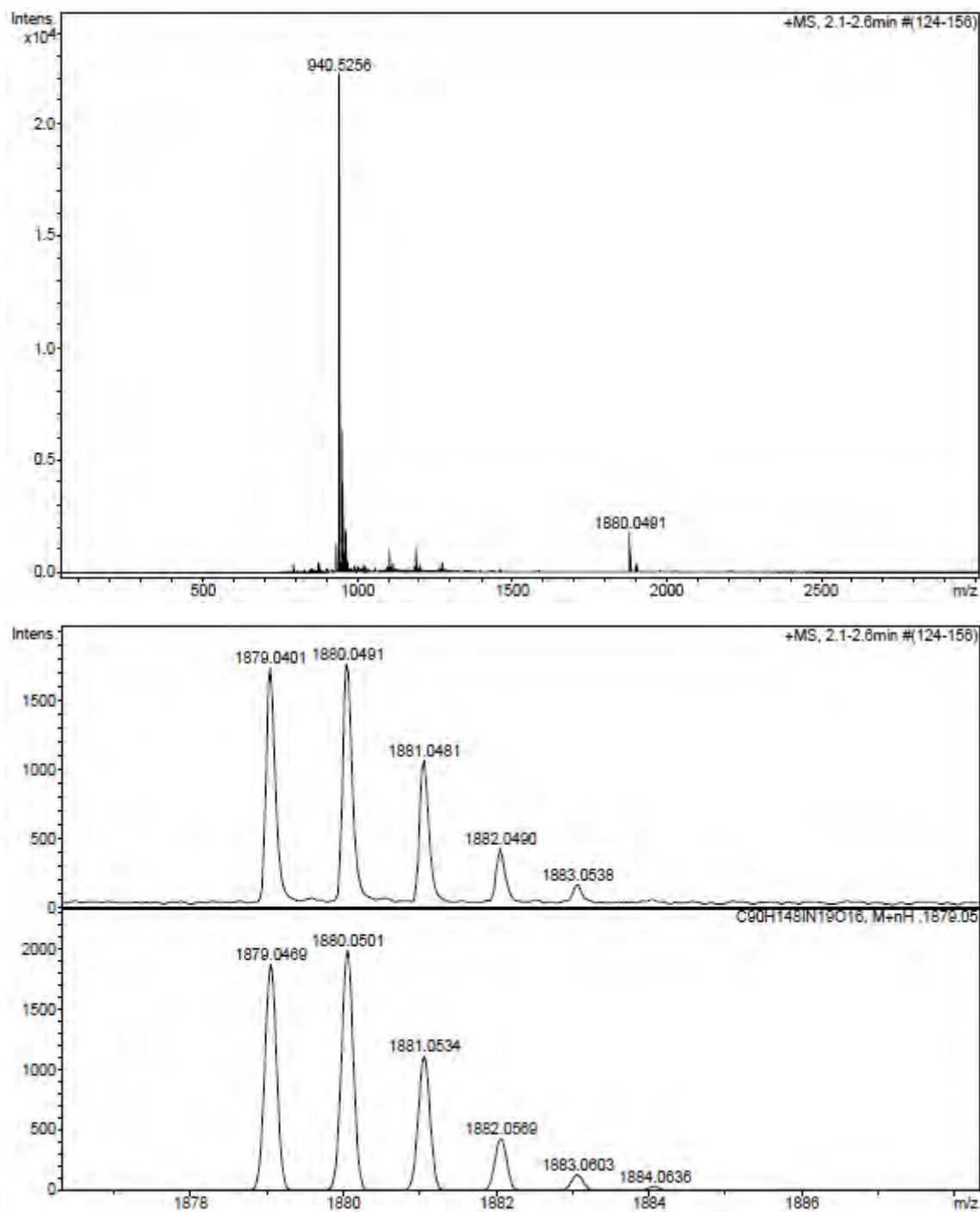
Totals : 1.15518e4 1941.88981

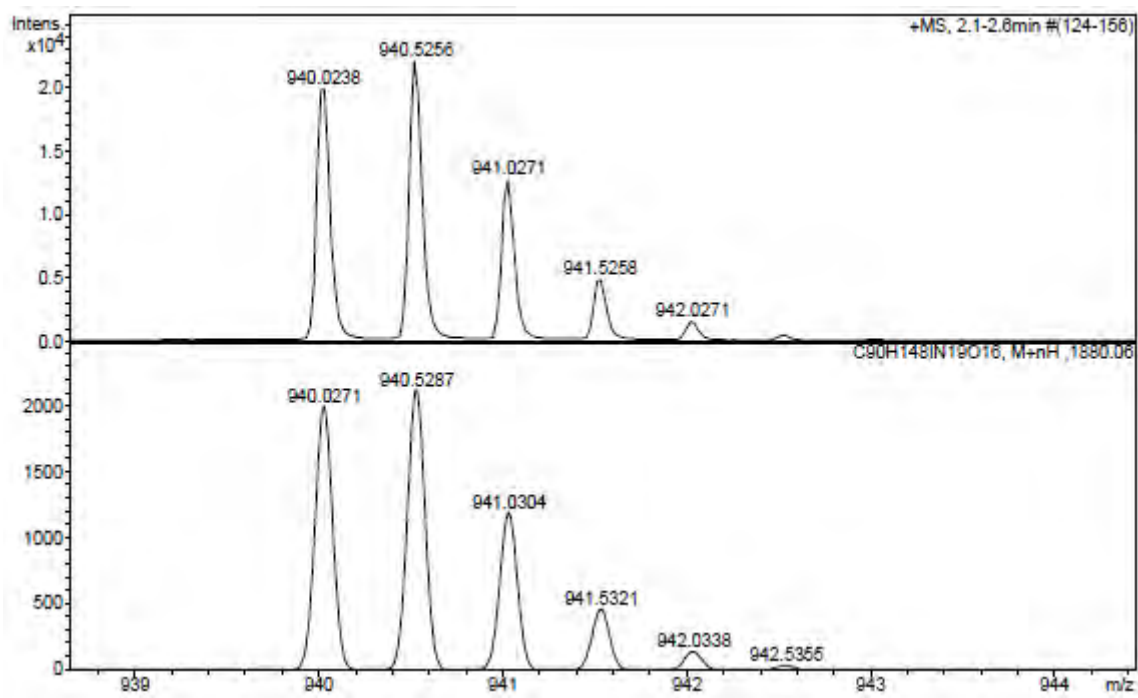
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.835	HH	0.1051	1.82064e4	2383.31348	100.0000
Totals :				1.82064e4	2383.31348	

ESI-MS (m/z)

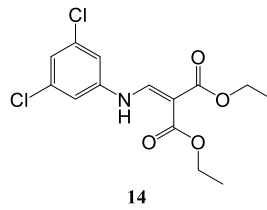
HRMS (m/z)



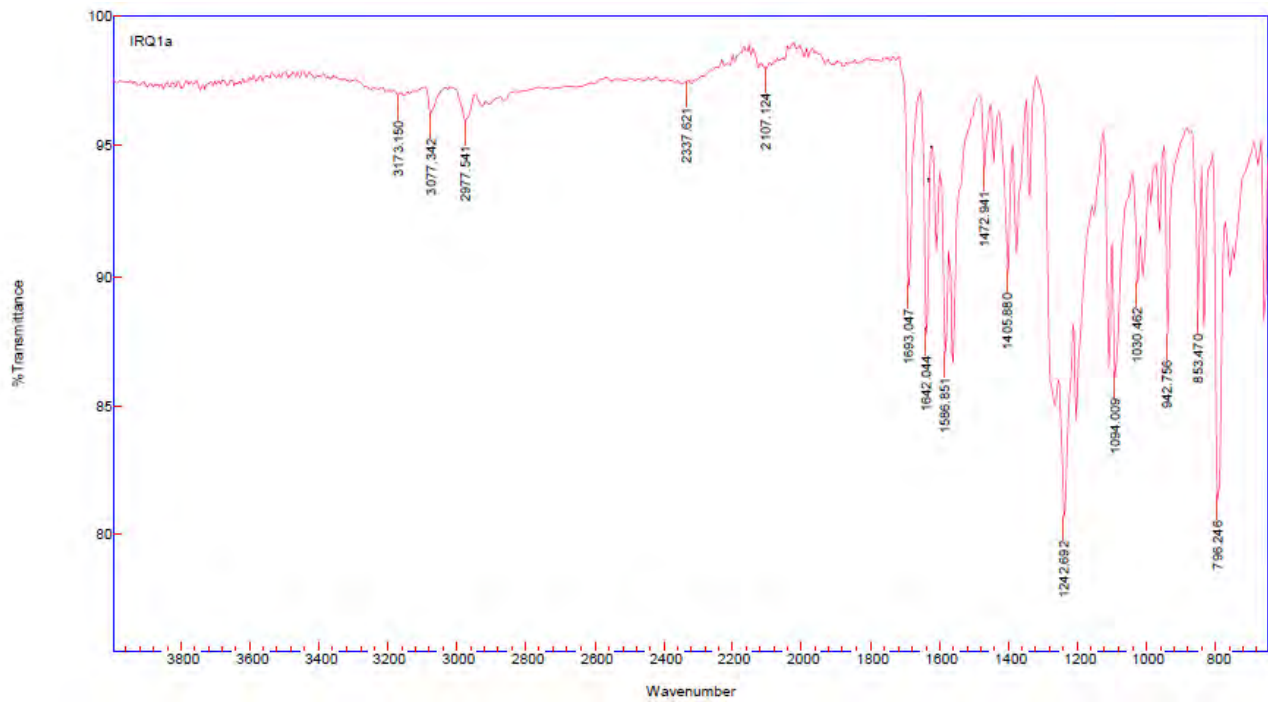


Síntesi del pèptid conjugat BP493 contenint BP100 i un derivat de quinoxifèn

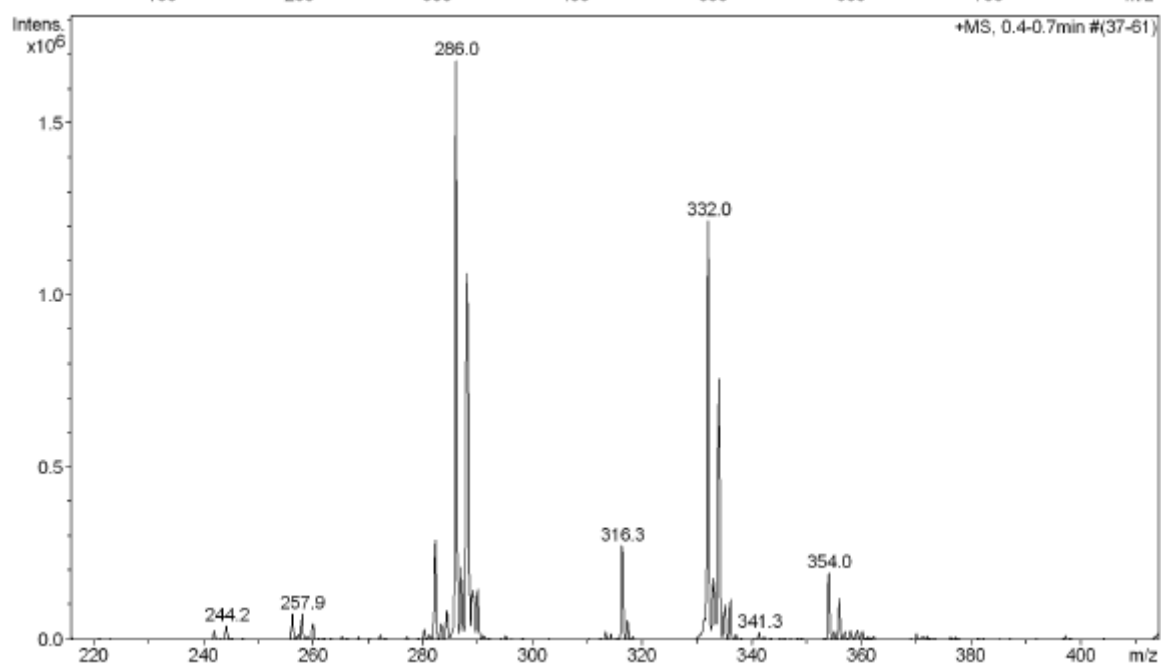
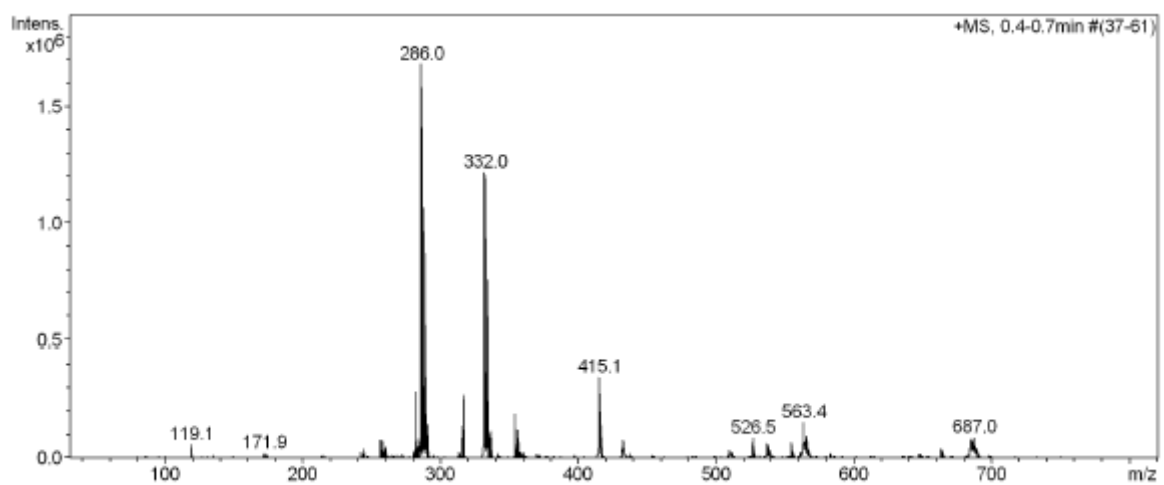
2-(3,5-Dicloroanilinometilen)malonat de dietil (14)



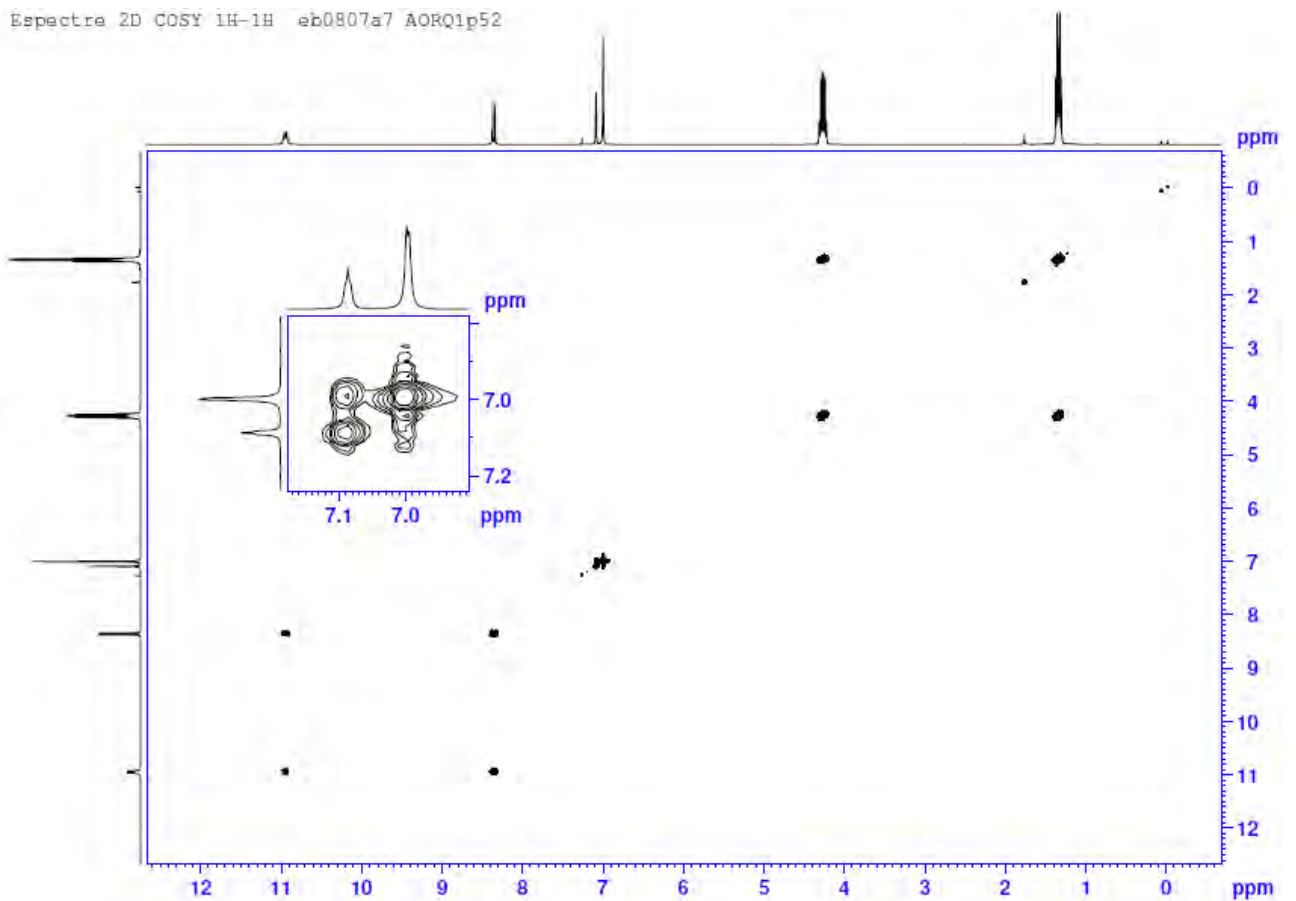
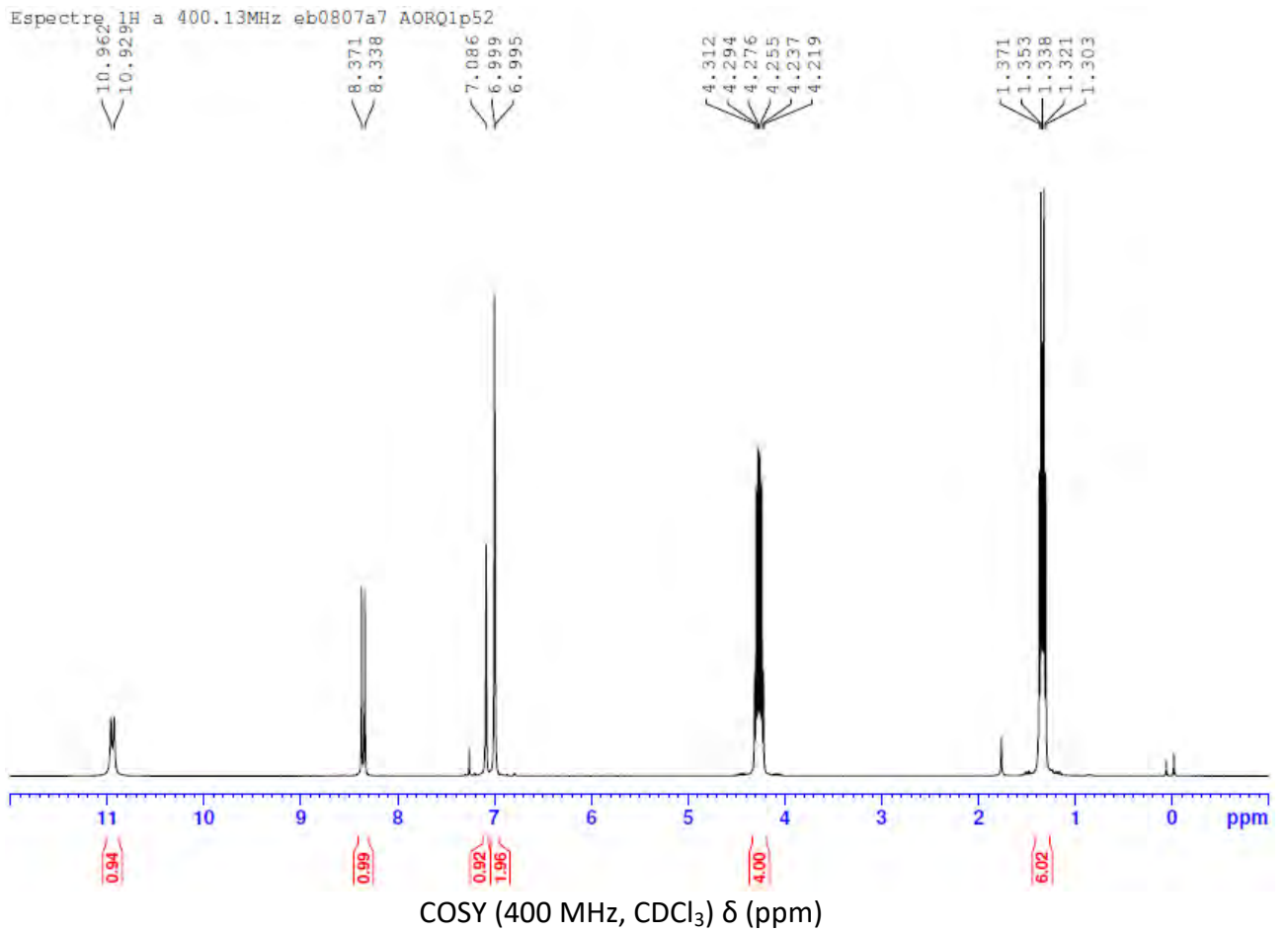
FT-IR (neat) ν (cm^{-1})



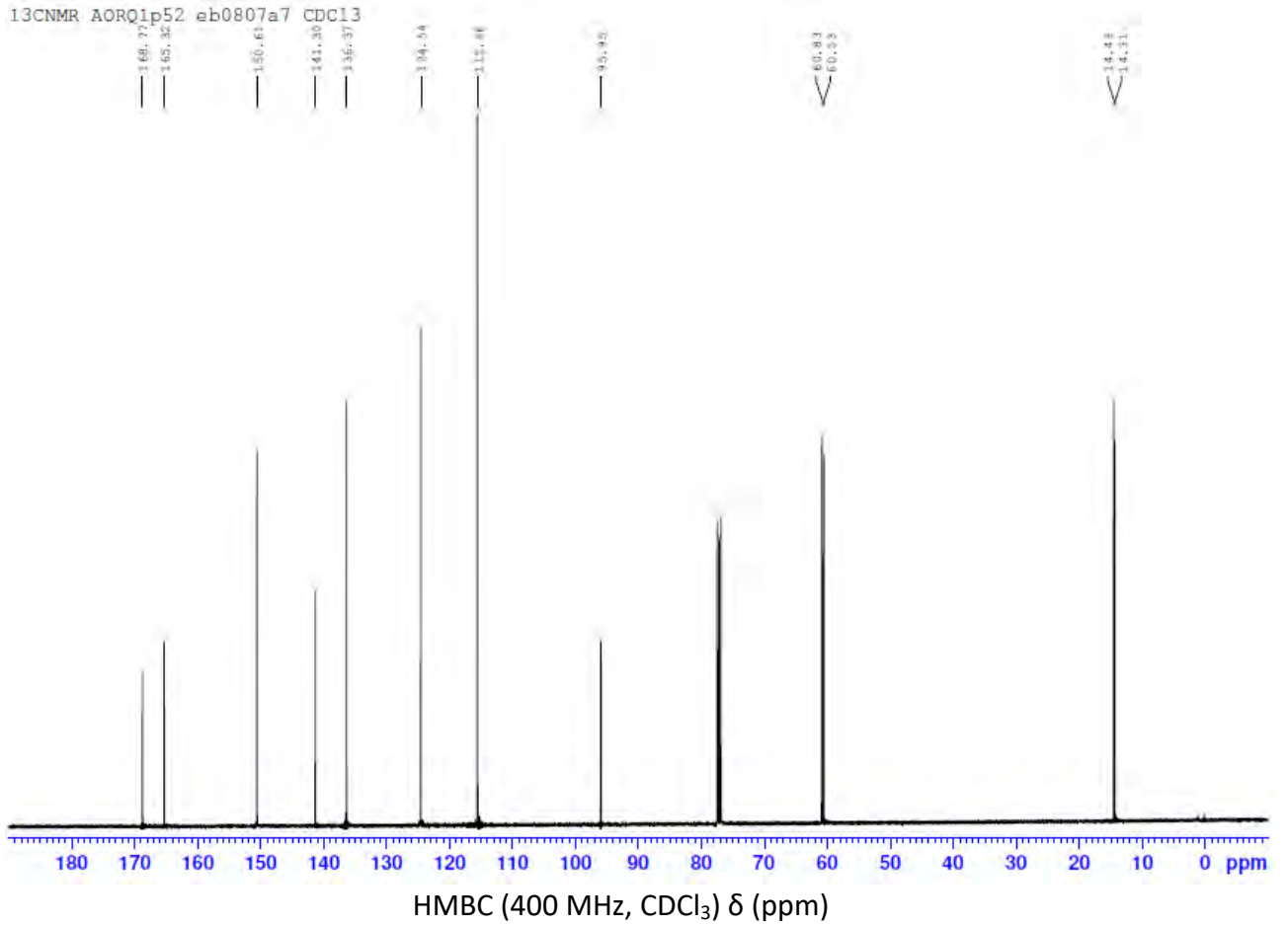
ESI (m/z)



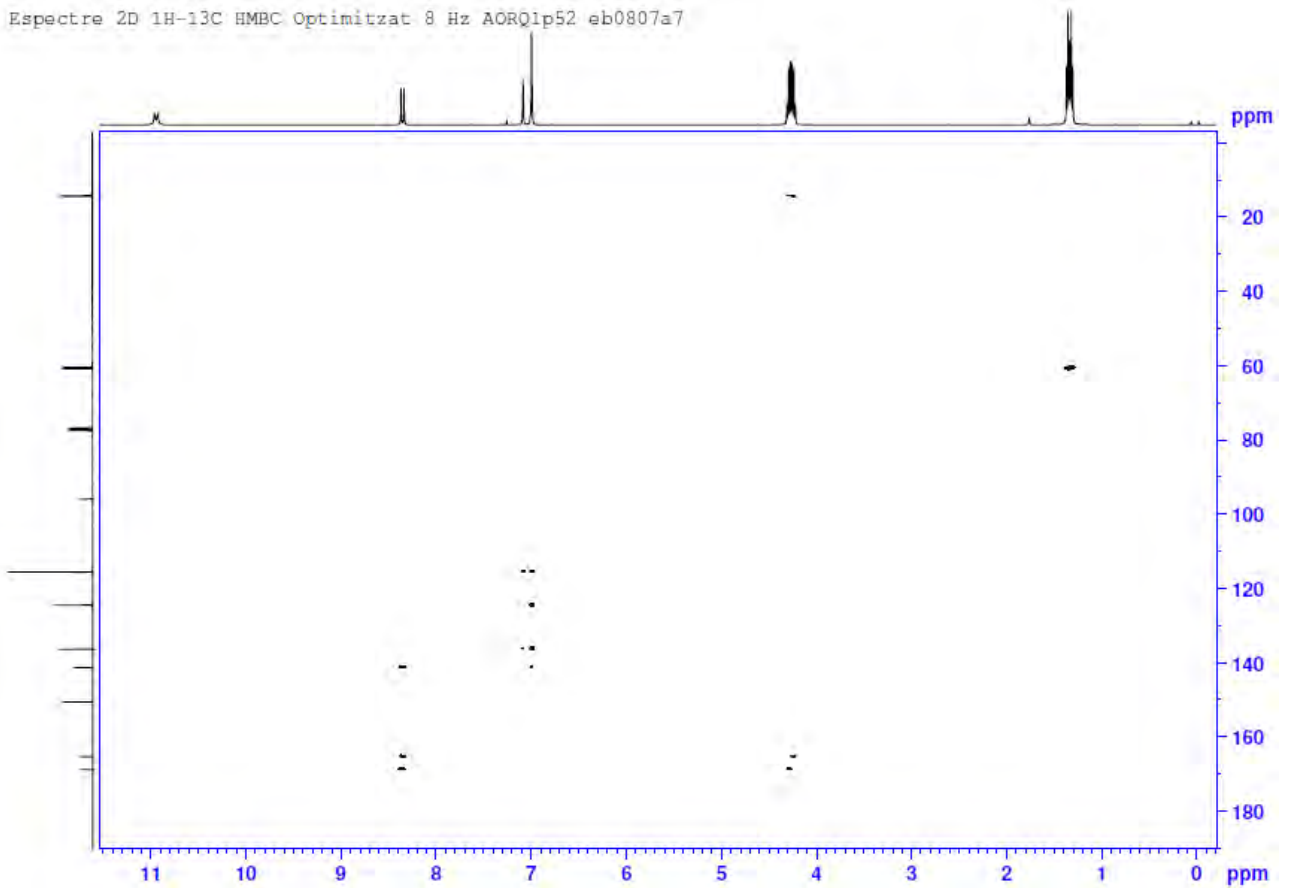
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)



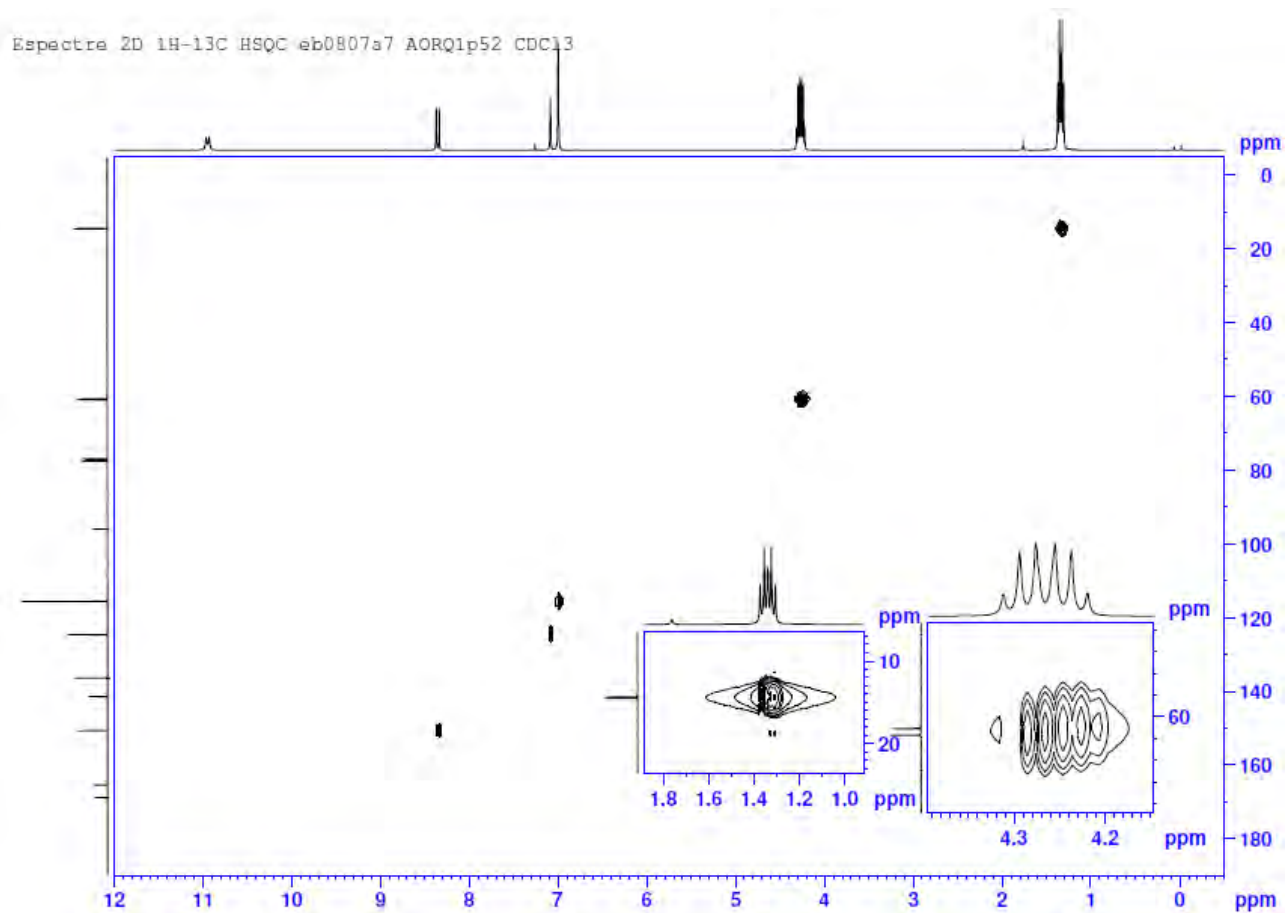
^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)



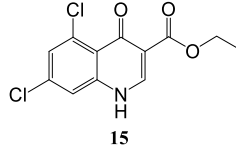
Espectre 2D 1H- ^{13}C HMBC Optimitzat 8 Hz AORQ1p52 eb0807a7



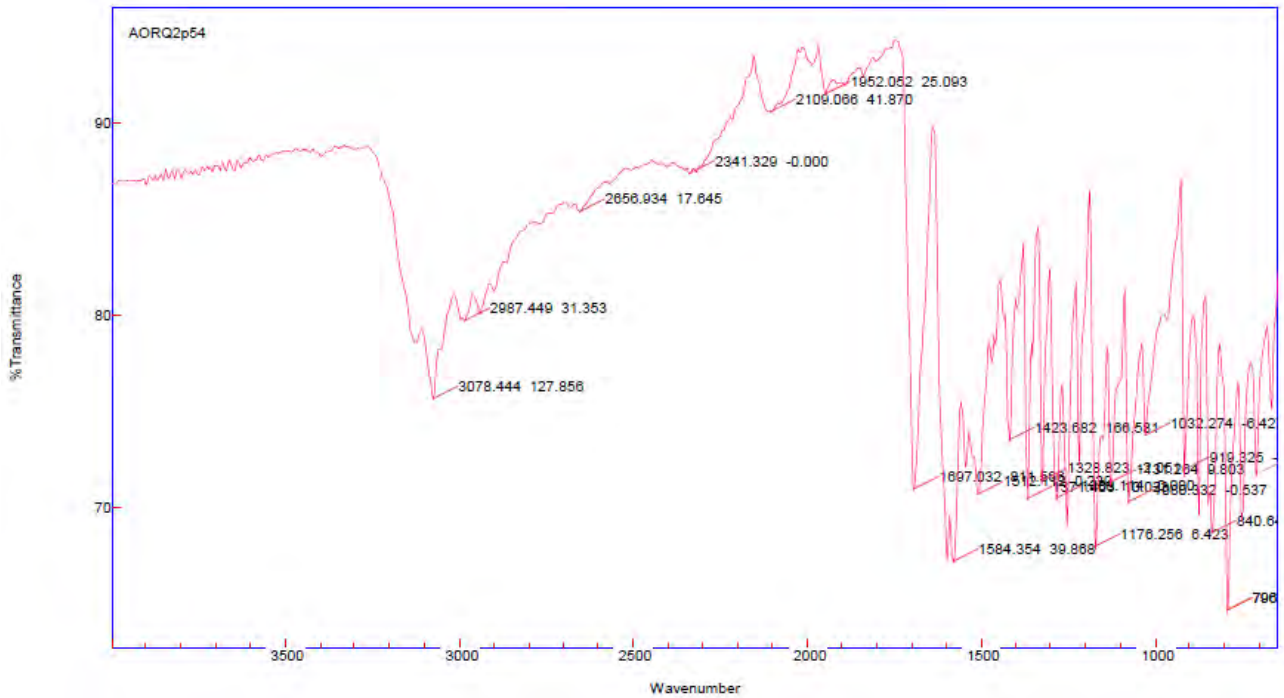
HSQC (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)



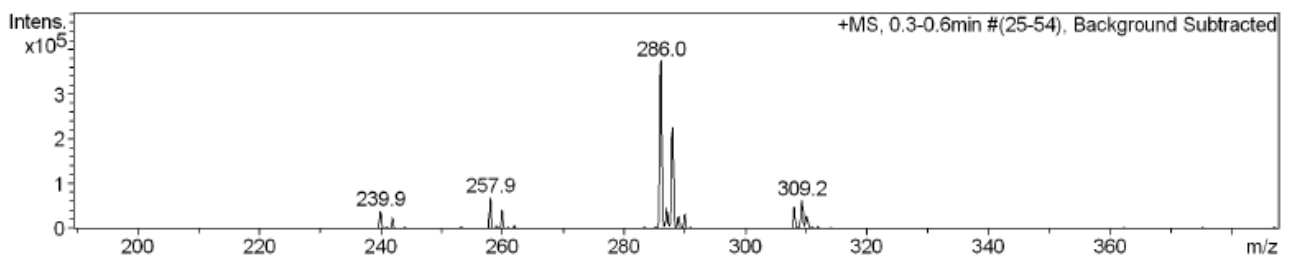
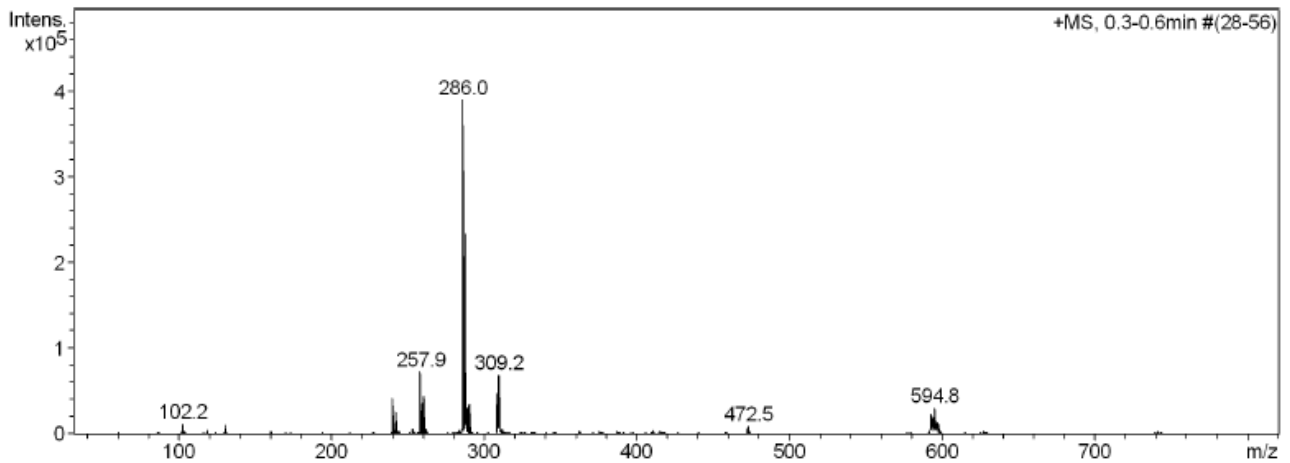
5,7-Dicloro-4-oxo-quinolina-3-carboxilat d'etil (15)



FT-IR ν (cm^{-1})

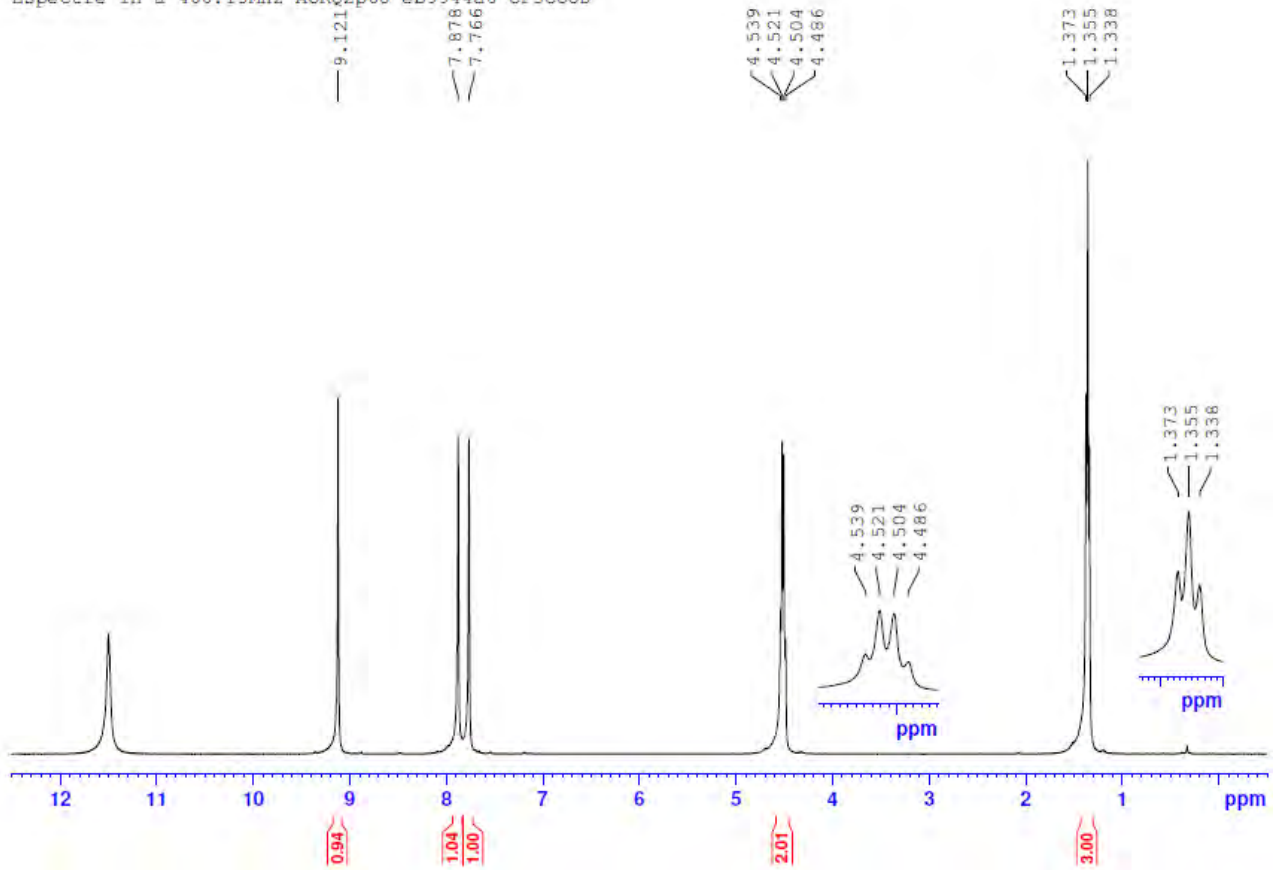


ESI (m/z)



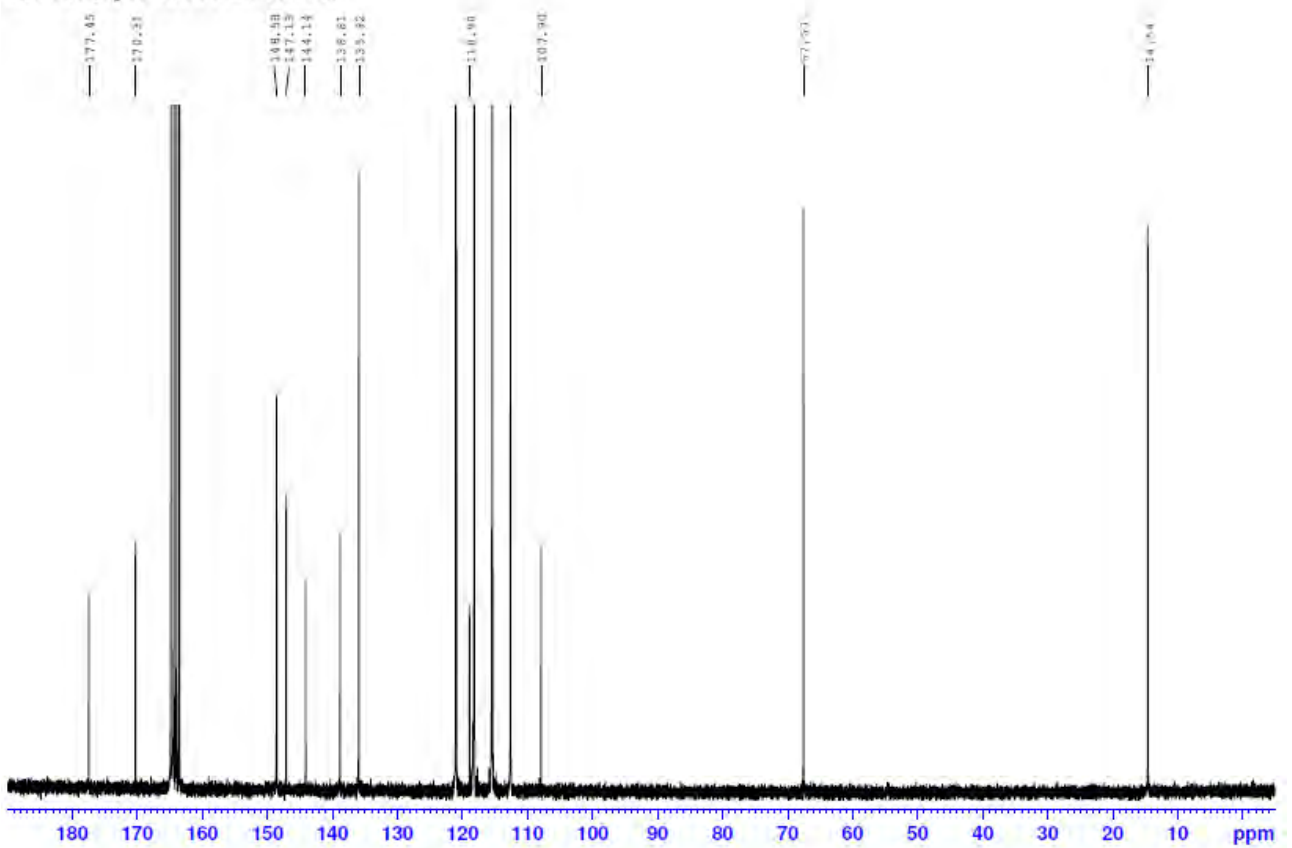
^1H -RMN (400 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ (ppm)

Espectre 1H a 400.13MHz AORQ2p68 eb9944a6 CF3COOD



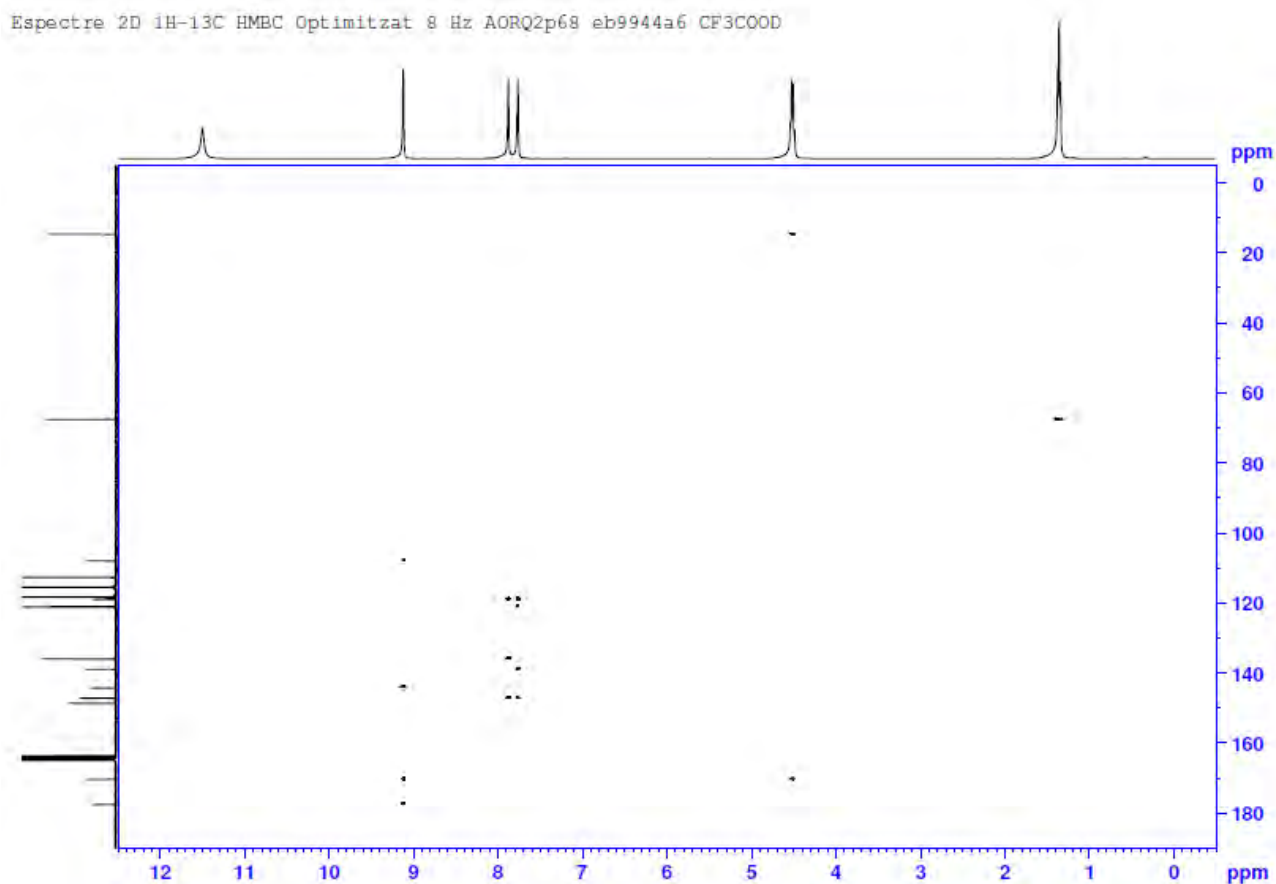
^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ (ppm)

^{13}C AORQ2p68 eb9944a6 CF3COOD



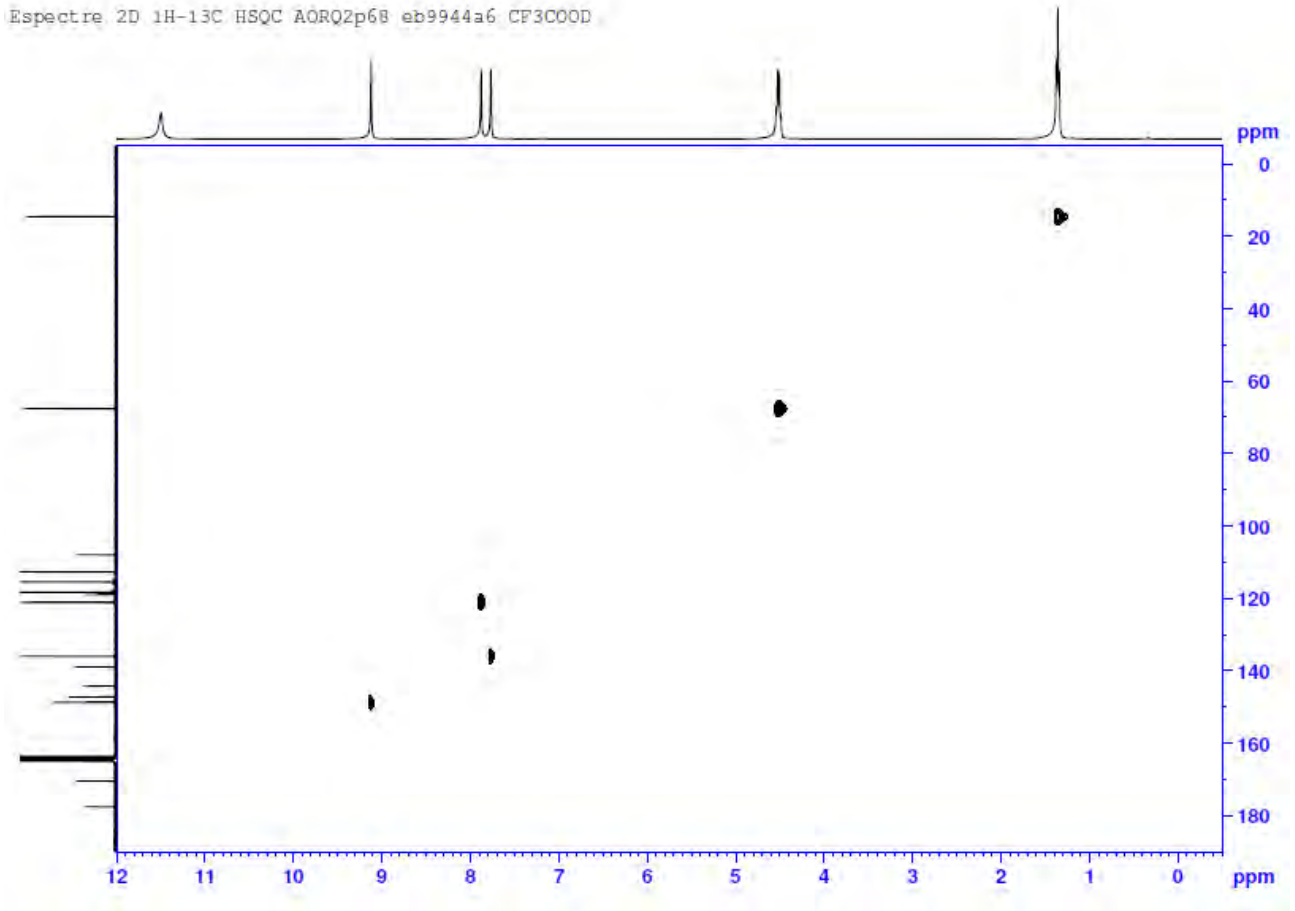
HMBC (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm)

Espectre 2D 1H-13C HMBC Optimitzat 8 Hz AORQ2p68 eb9944a6 CF3COOD

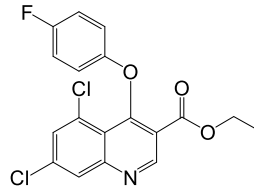


HSQC (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm)

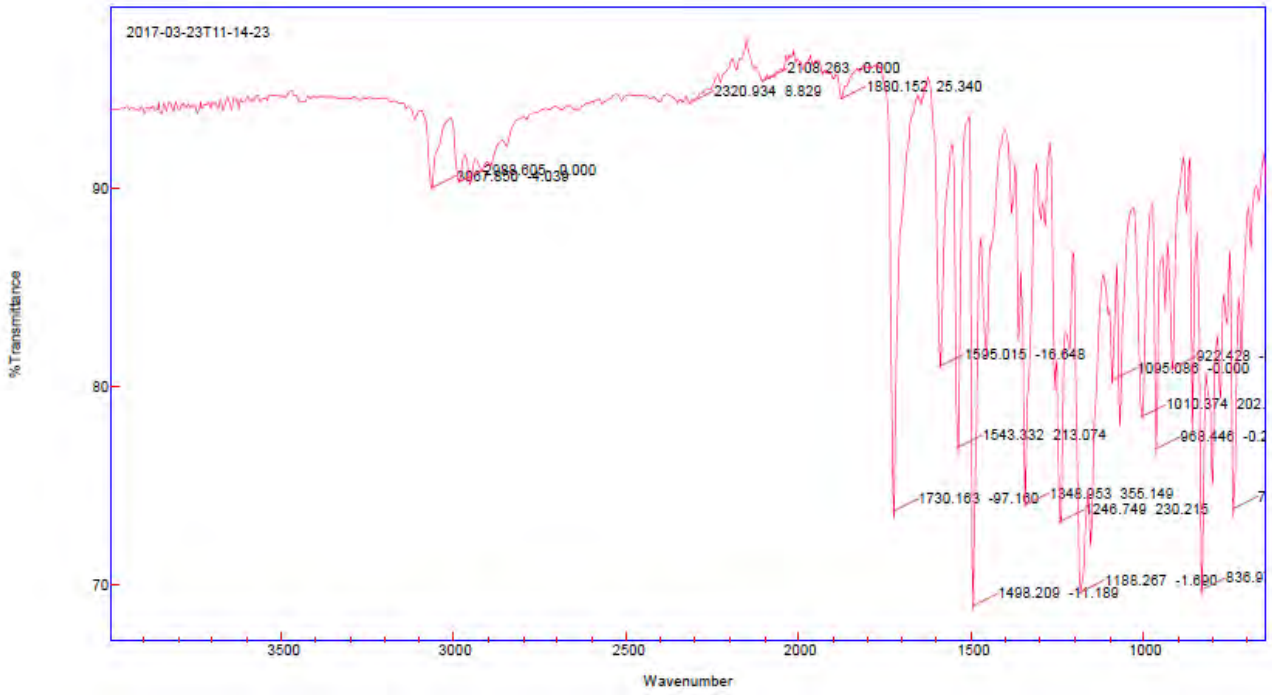
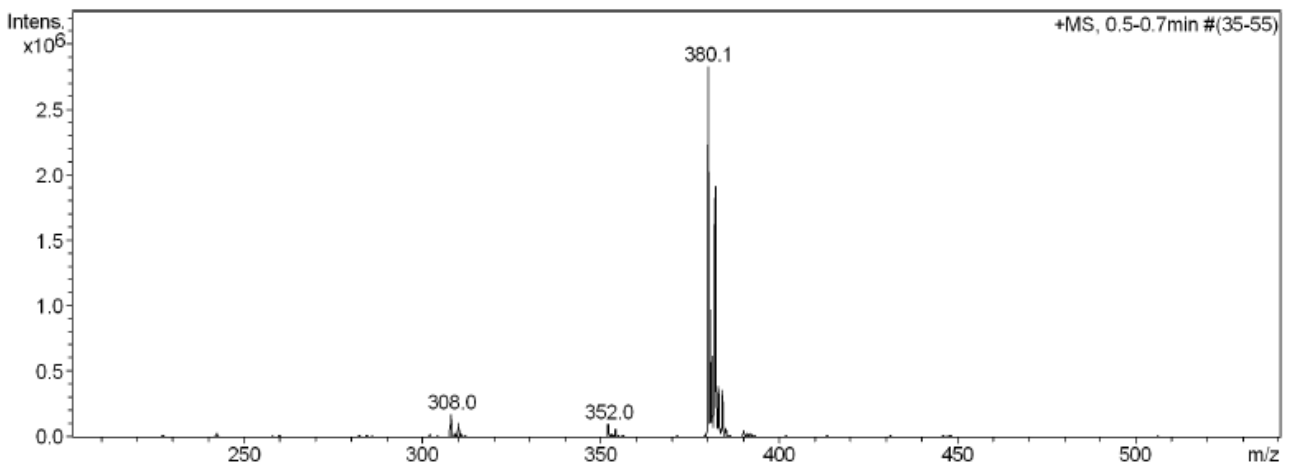
Espectre 2D 1H-13C HSQC A0RQ2p68 eb9944a6 CF3COOD



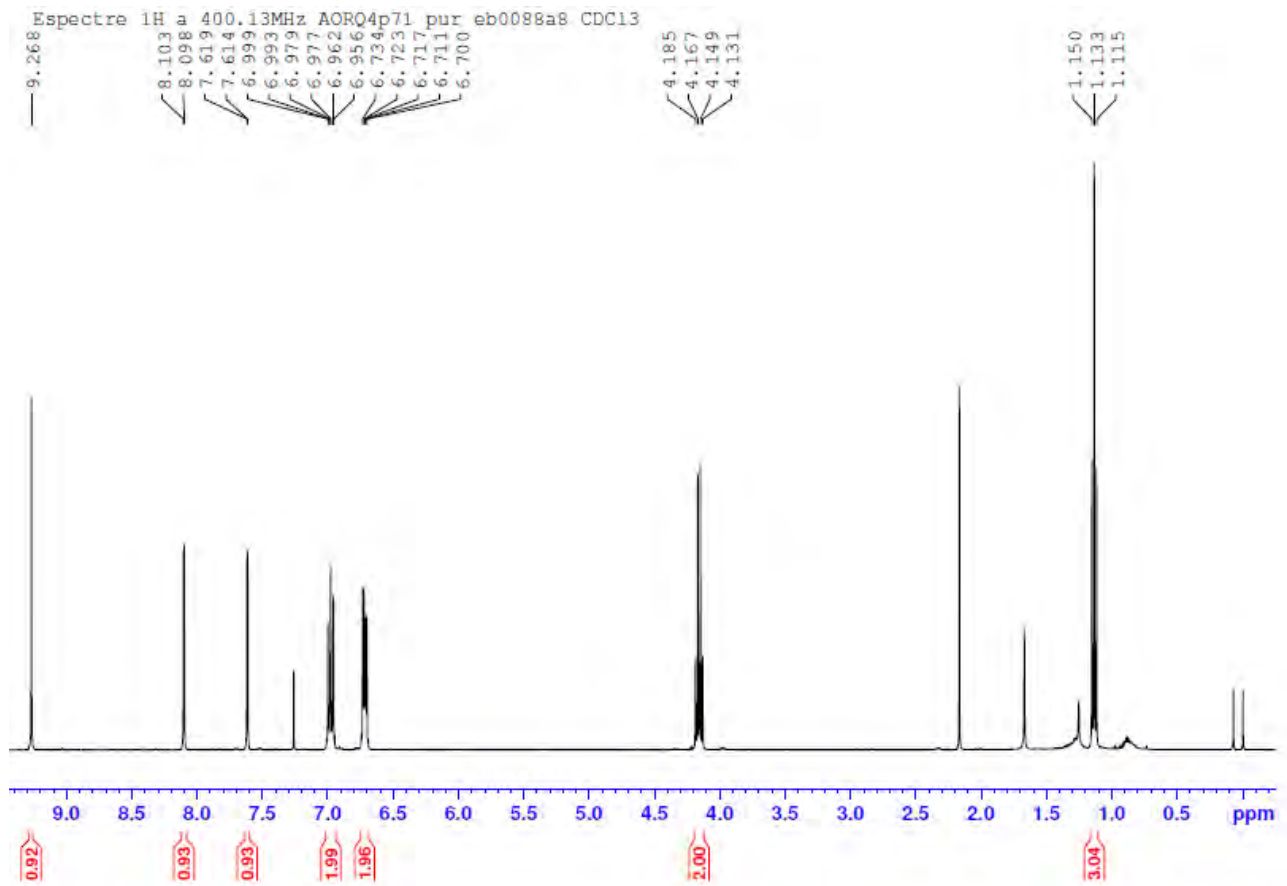
5,7-Dicloro-4-(4-fluorofenoxi)quinolina-3-carboxilat d'etil (17)



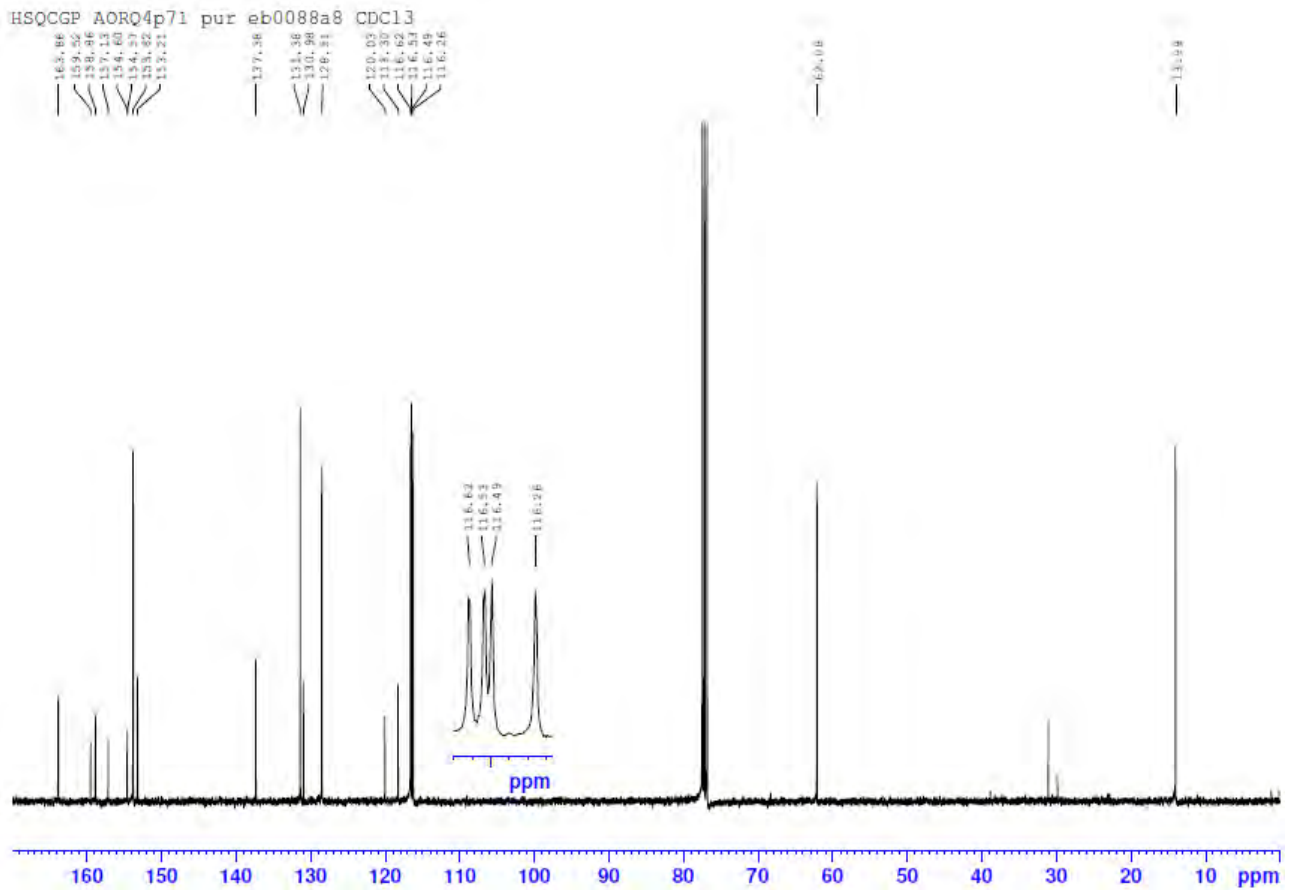
17

FT-IR ν (cm^{-1})ESI (m/z)

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

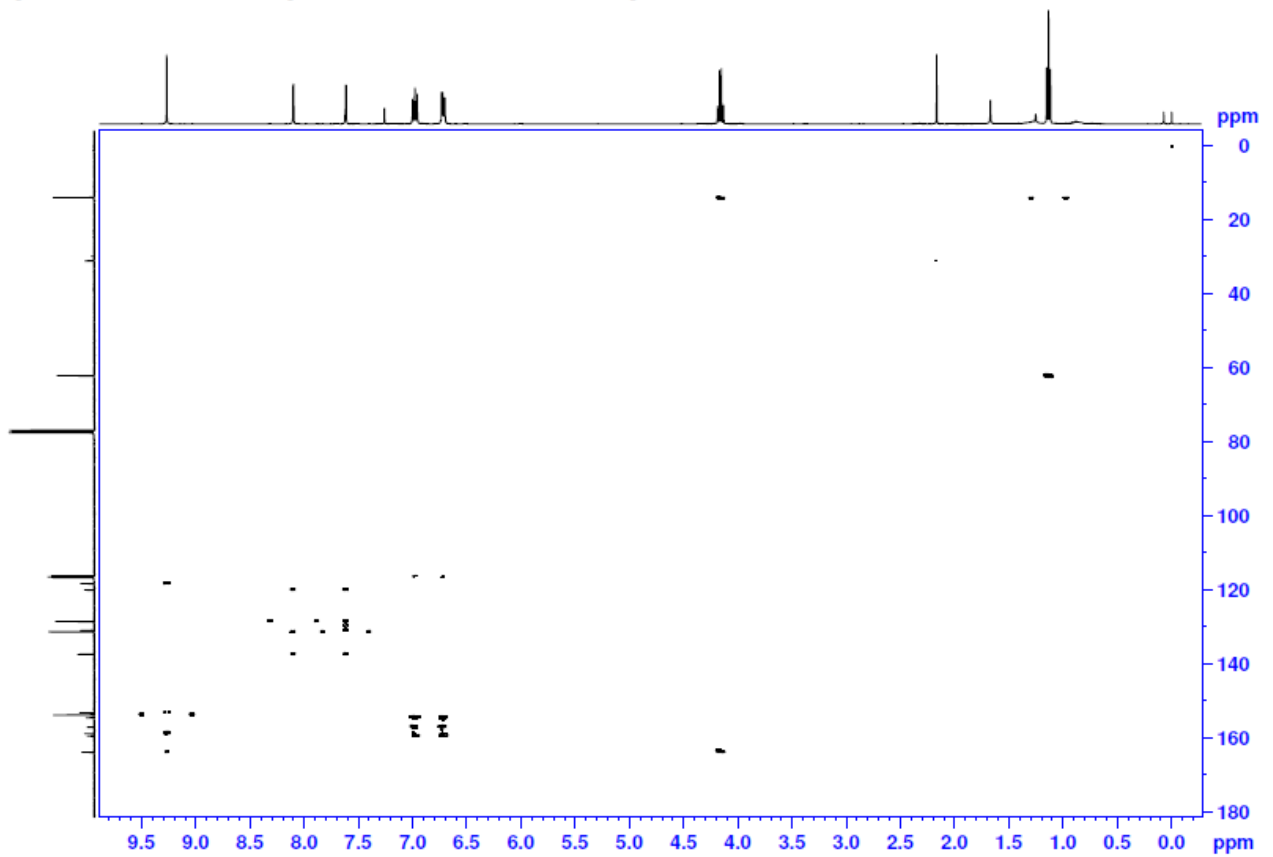


$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)



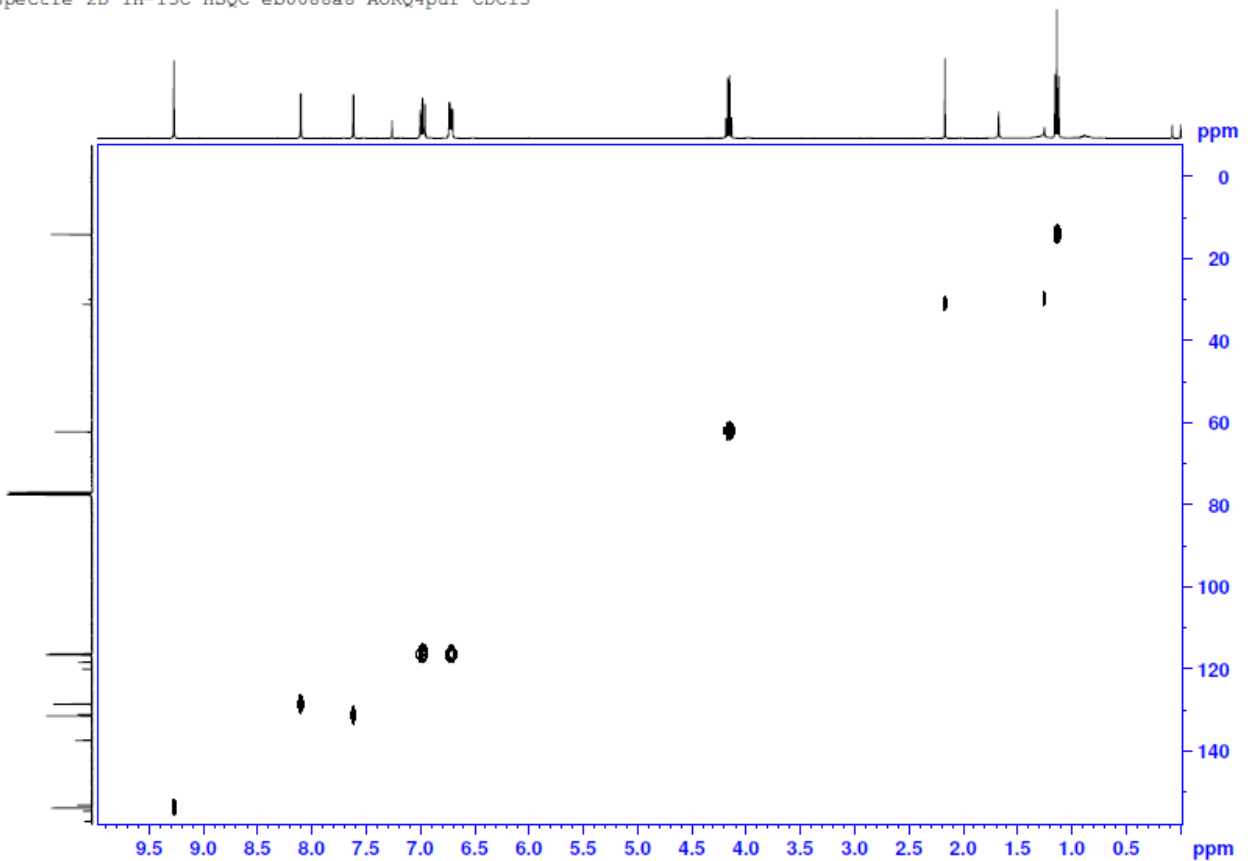
HMBC (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

Espectre 2D 1H-13C HMBC Optimitzat 8 Hz eb0088a8 AORQ4p71 CDC13

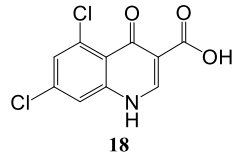


HSQC (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

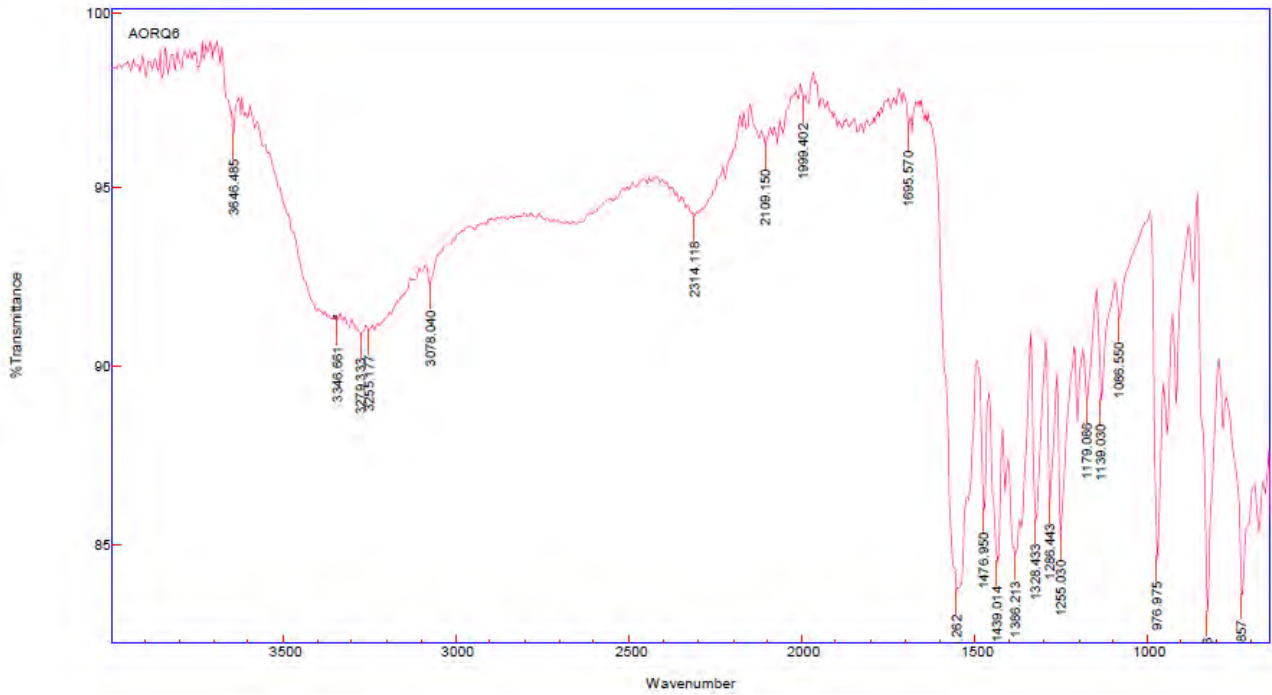
Espectre 2D 1H-13C HSQC eb0088a8 AORQ4pur CDC13



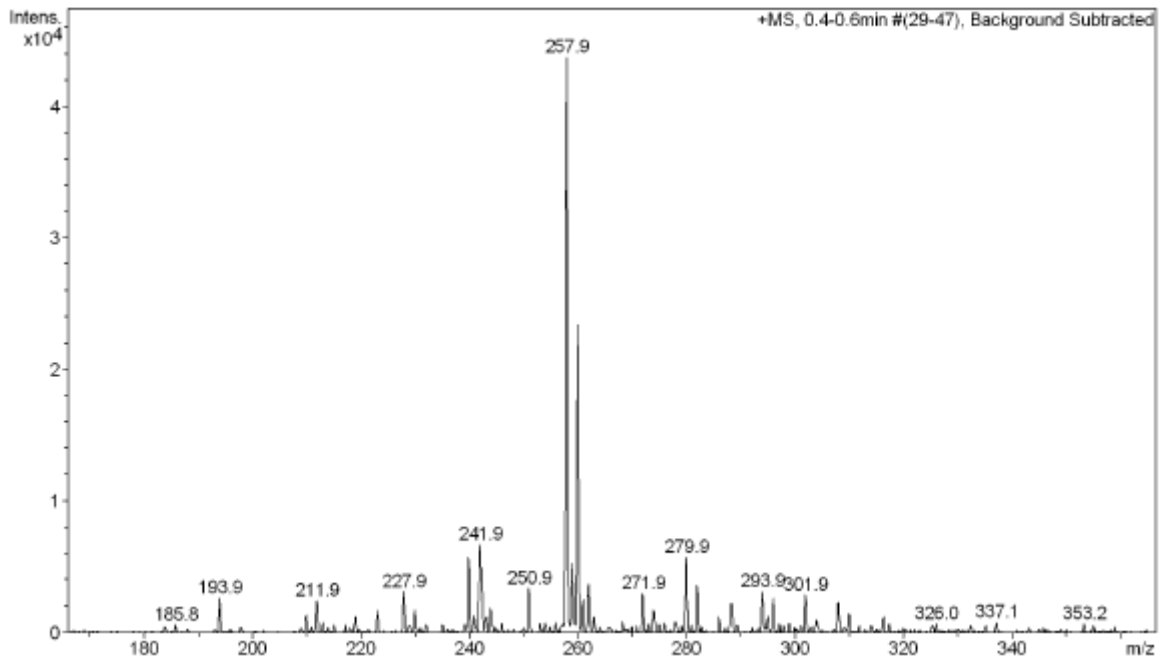
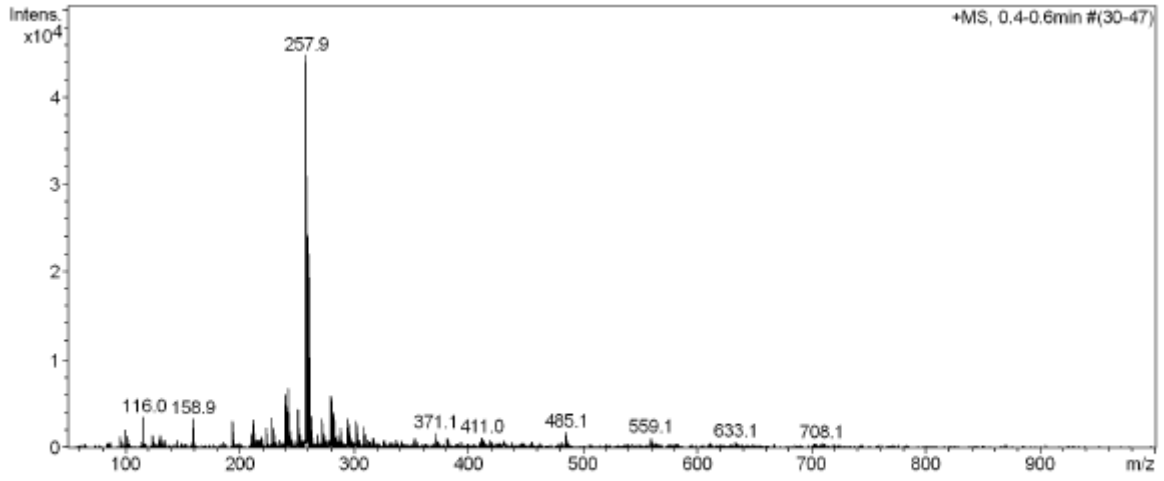
Àcid 5,7-dicloro-4-oxoquinolina-3-carboxilic (18)



FT-IR v (cm⁻¹)

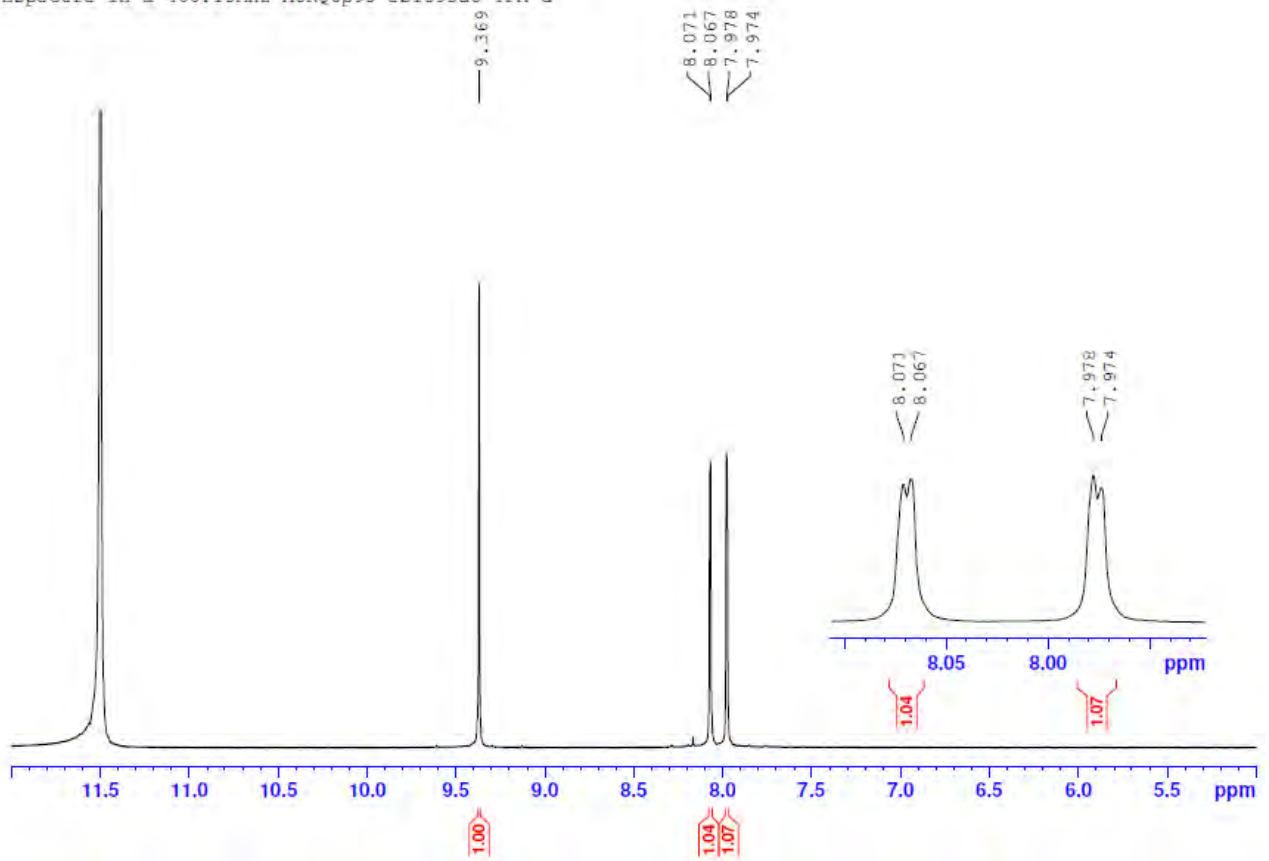


ESI (m/z)



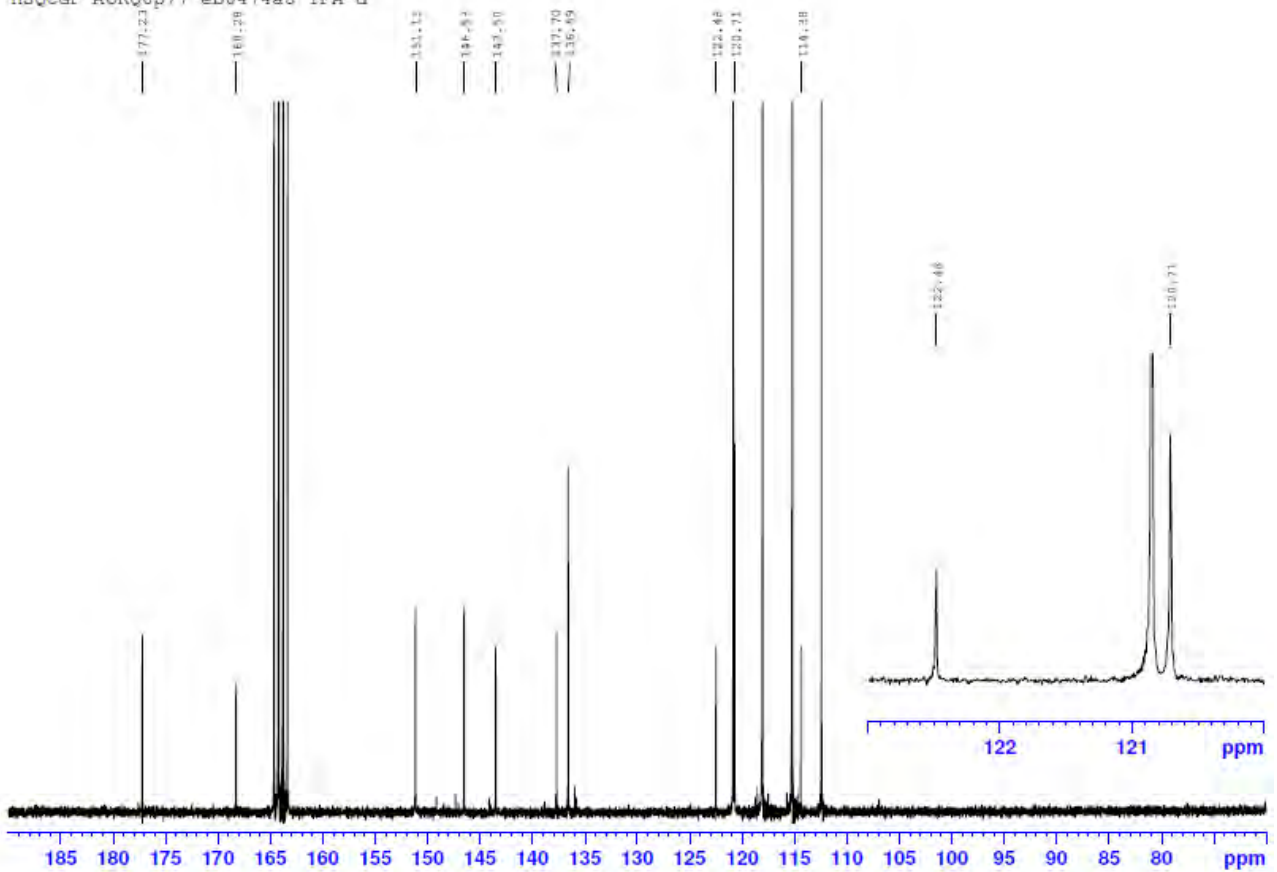
^1H -RMN (400 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ (ppm)

Espectre 1H a 400.13MHz AORQ6p93 eb1393a8 TFA-d



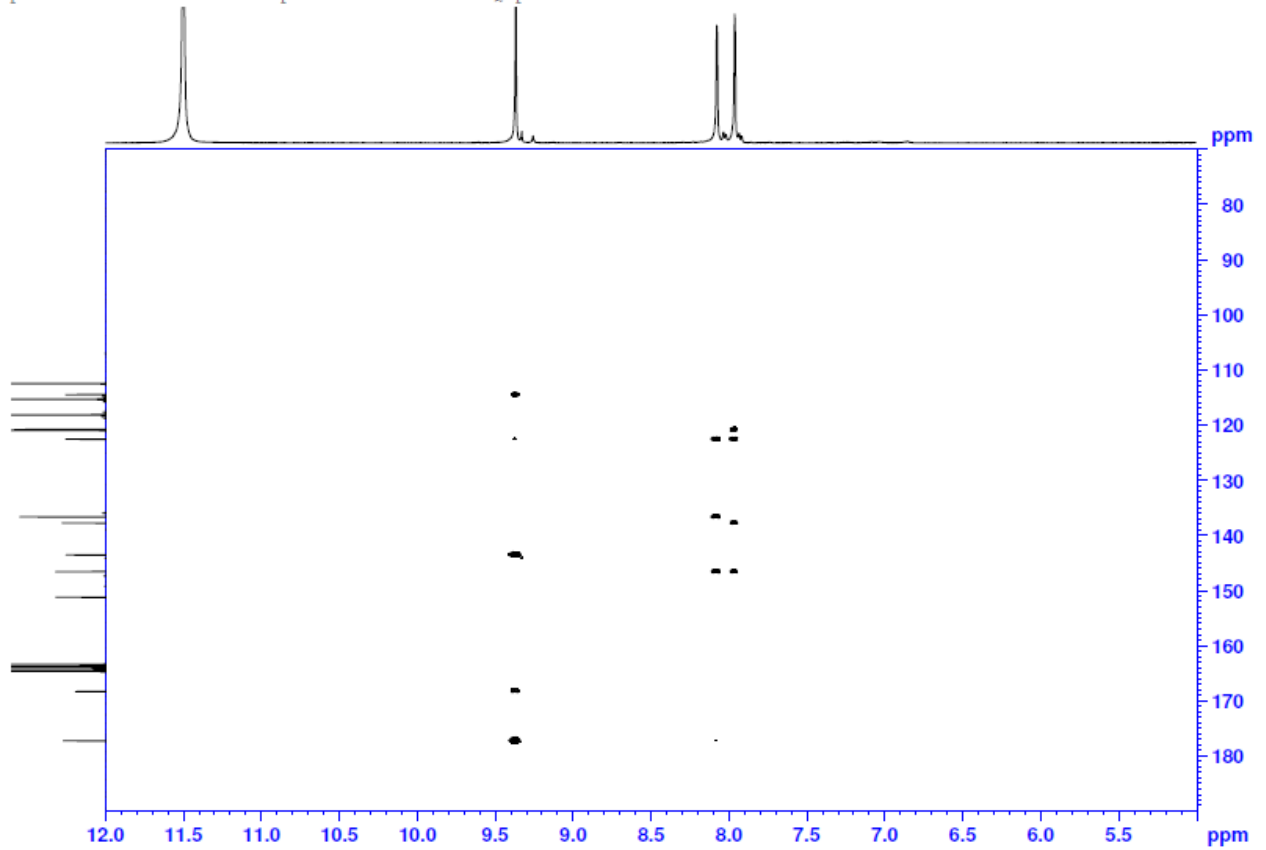
^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ (ppm)

HSQC6P AORQ6p77 eb0474a8 TFA-d



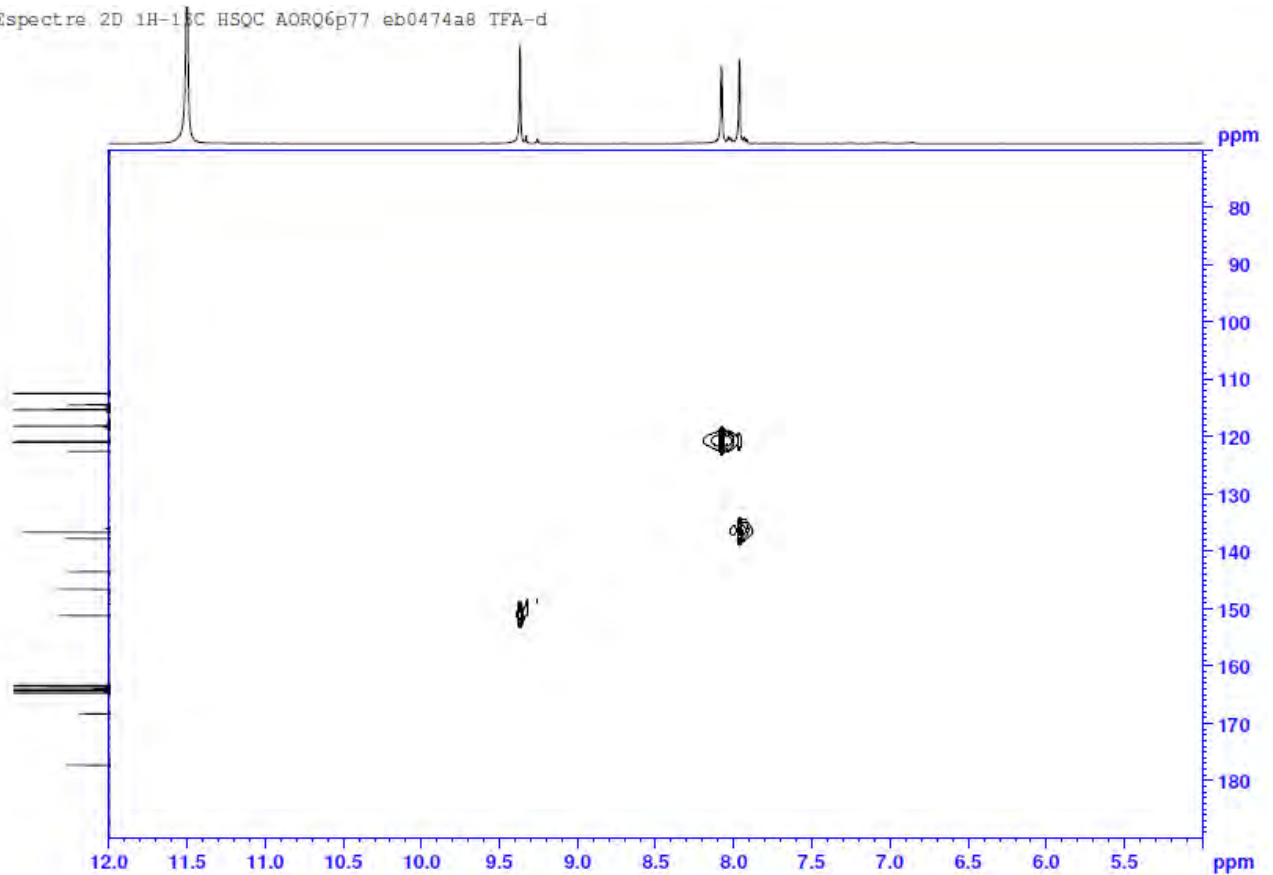
HMBC (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm)

Espectre 2D 1H-13C HMBC Optimitzat 8 Hz AORQ6p77 eb0474a8 TFA-d

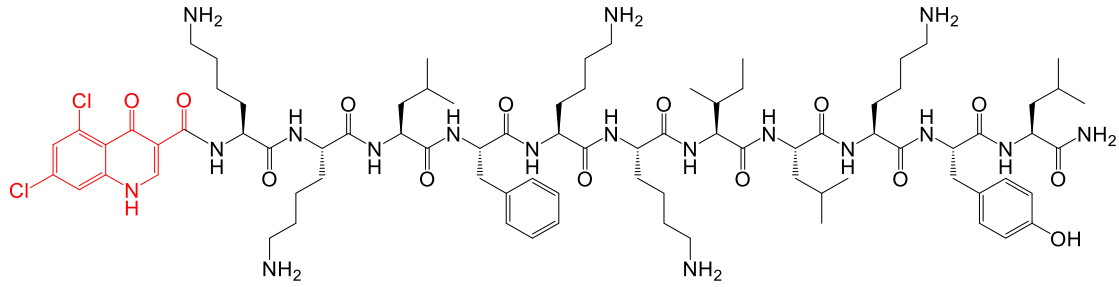


HSQC (400 MHz, CF₃CO₂D) δ (ppm)

Espectre 2D 1H-13C HSQC AORQ6p77 eb0474a8 TFA-d

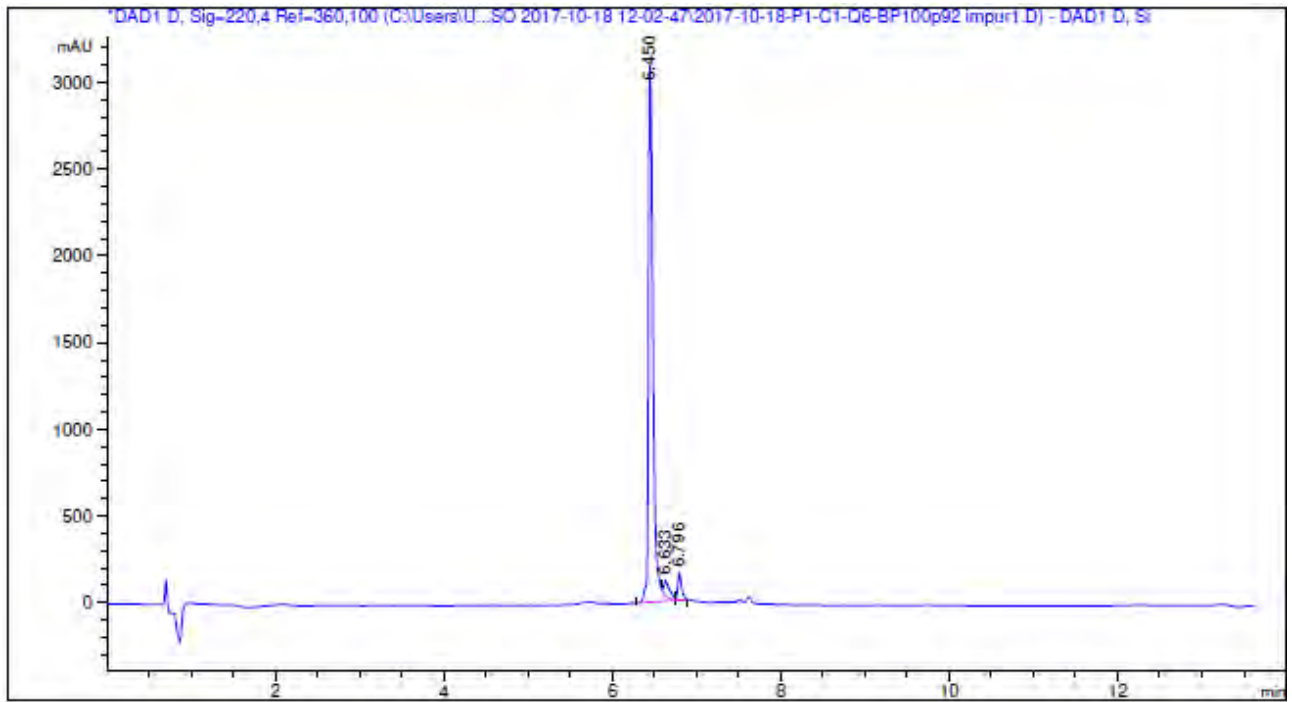


Pèptid conjugat BP493



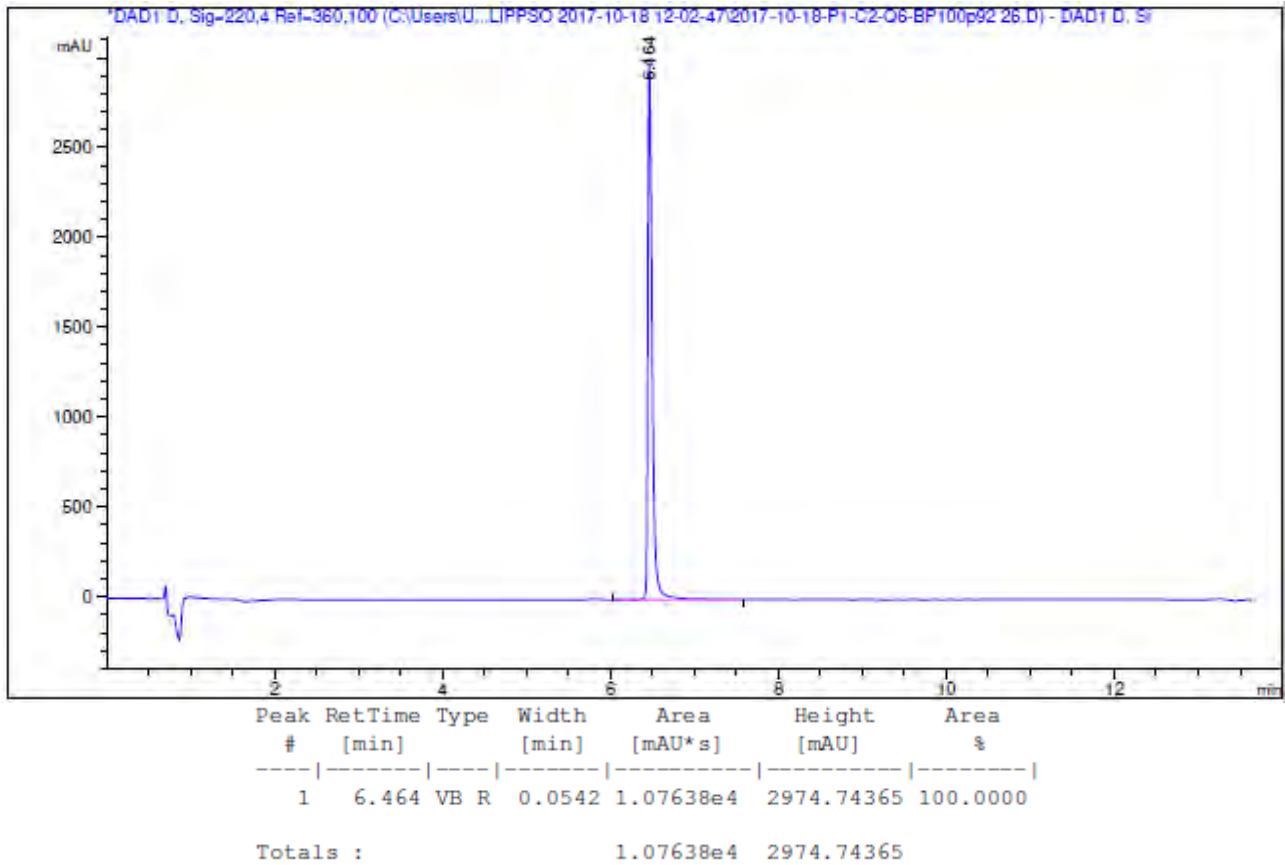
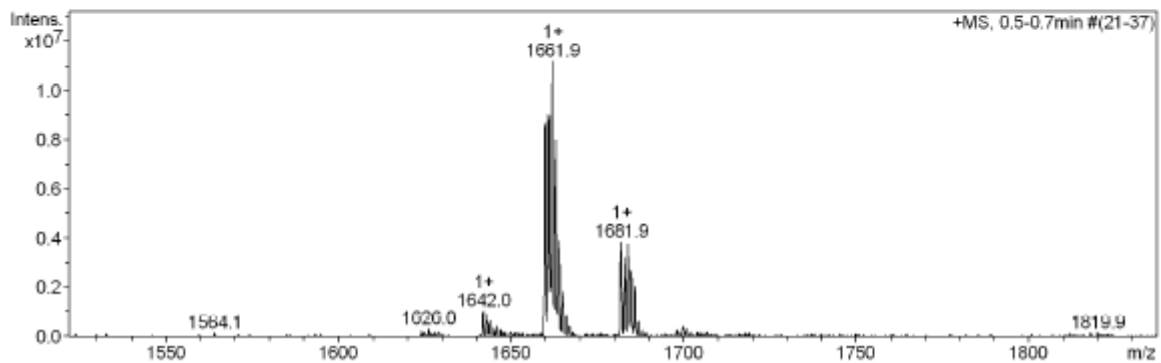
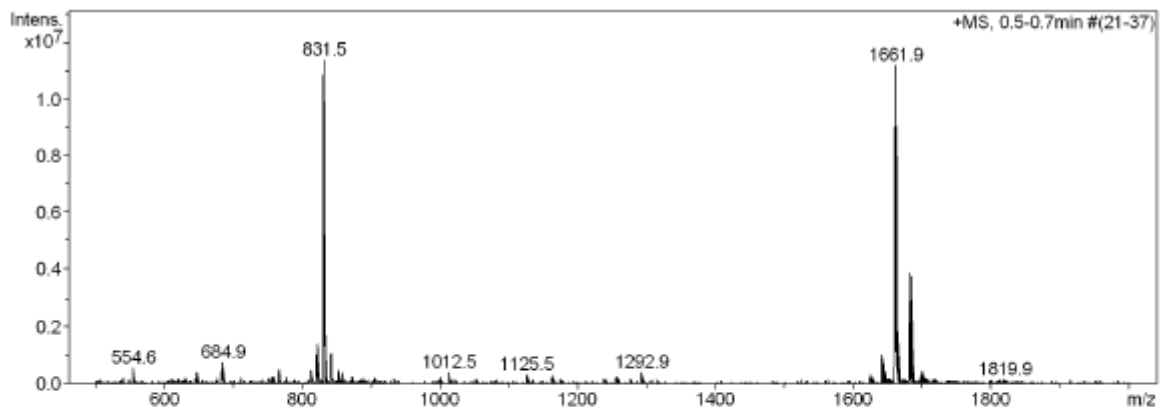
BP493

HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

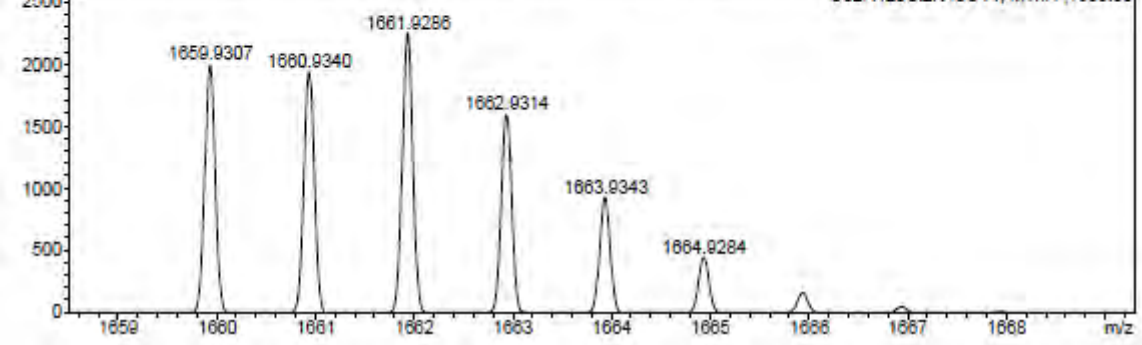
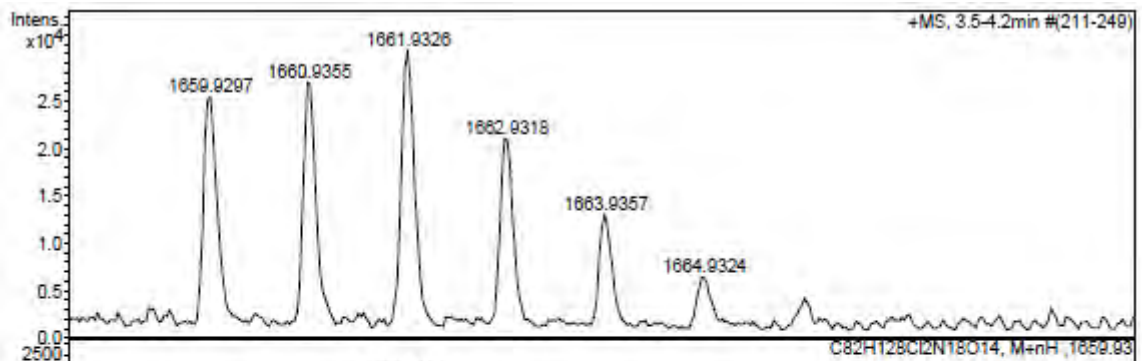
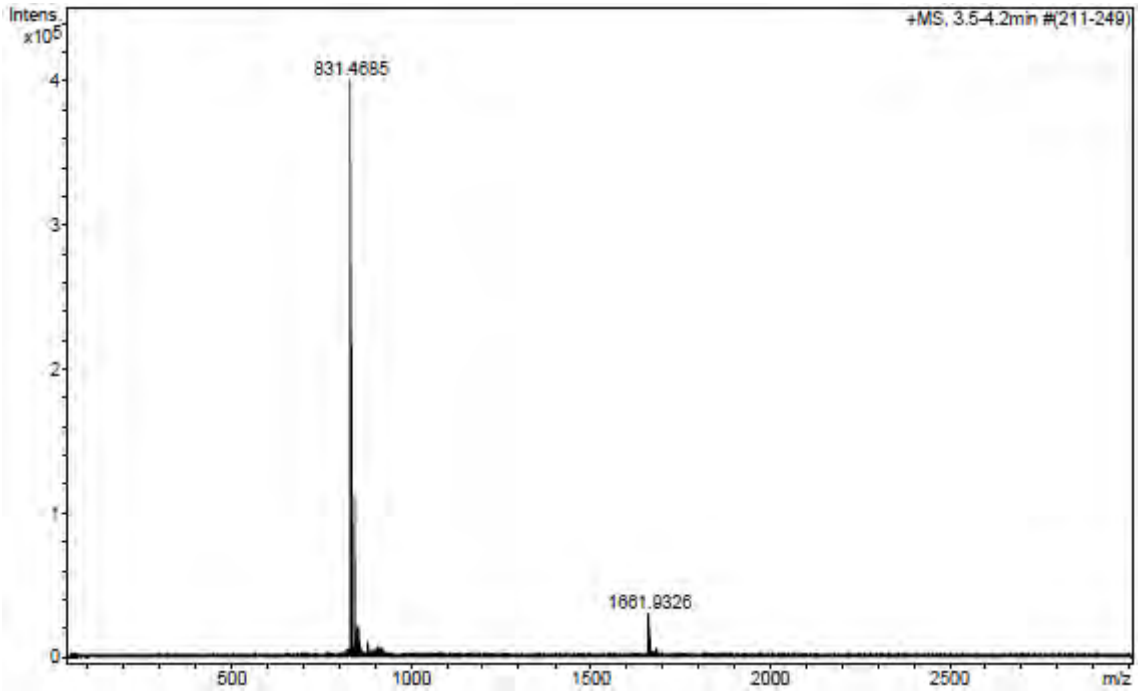


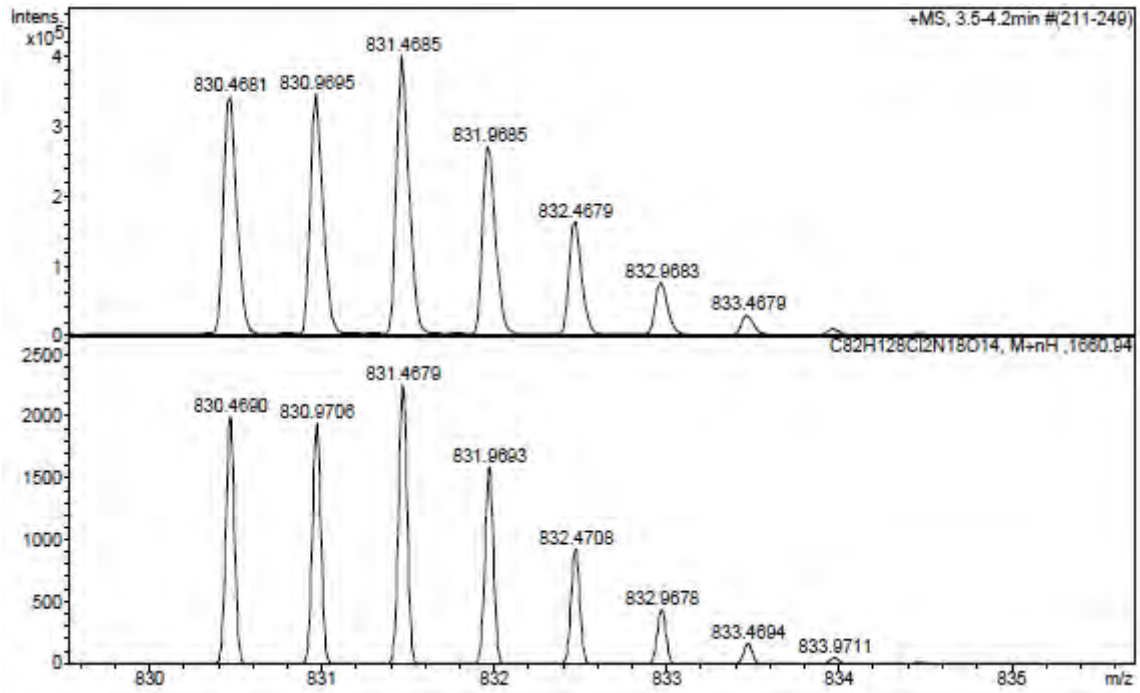
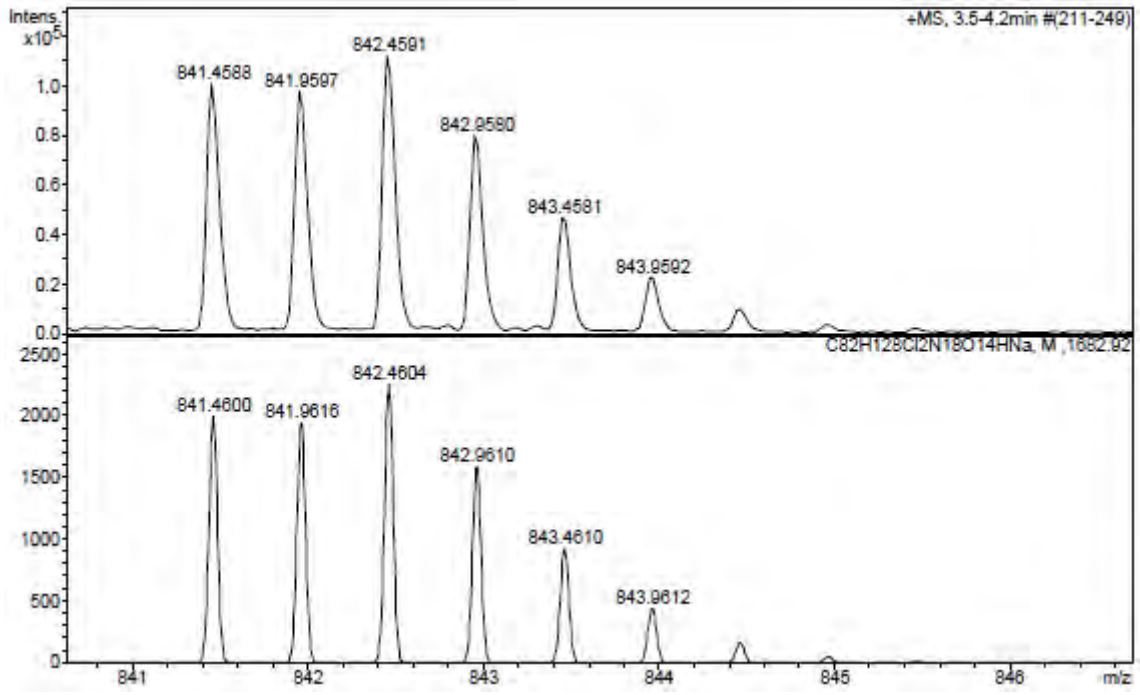
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.450	BV R	0.0572	1.17239e4	3096.43921	92.7031
2	6.633	VV E	0.0695	437.64508	87.30658	3.4606
3	6.796	VB E	0.0462	485.17157	156.54268	3.8364

Totals : 1.26467e4 3340.28847

HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)ESI-MS (m/z)

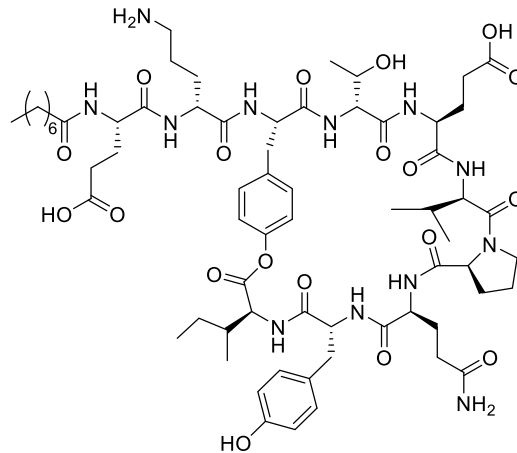
HRMS (m/z)



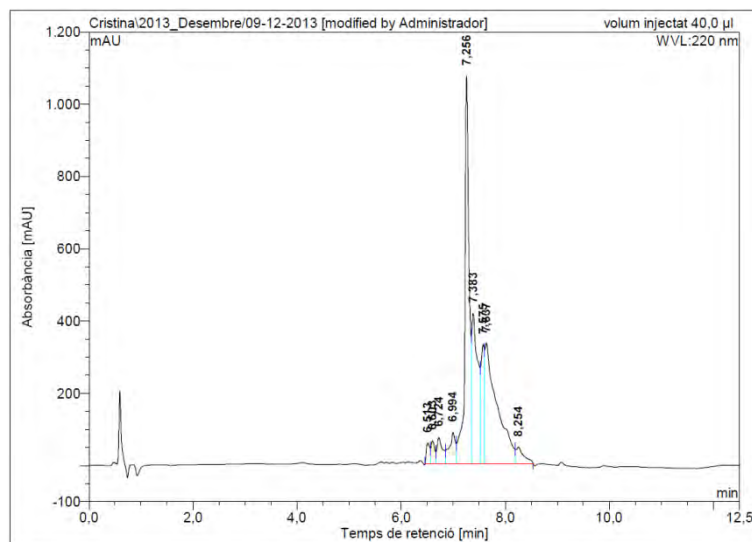


4 Dehidroderivats de fengicines

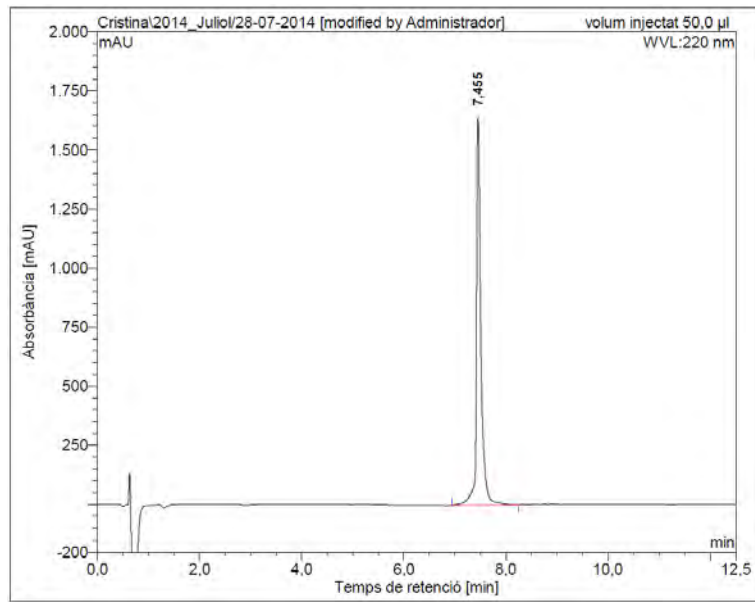
C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC838)



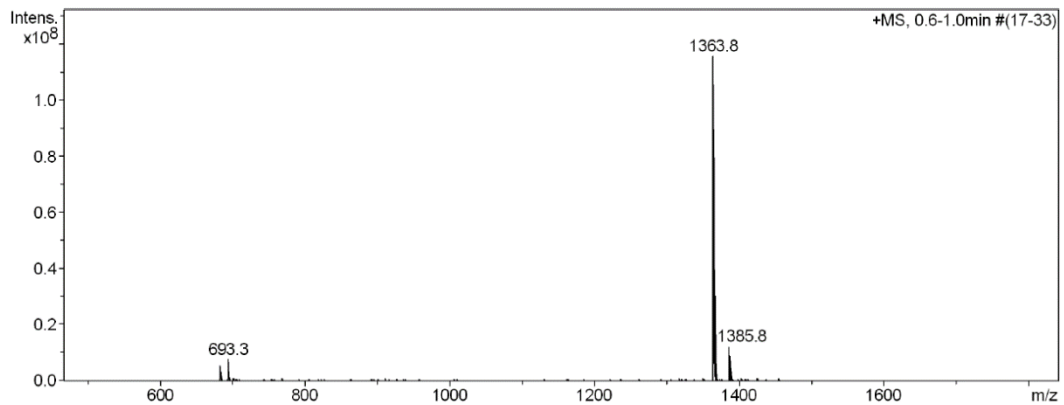
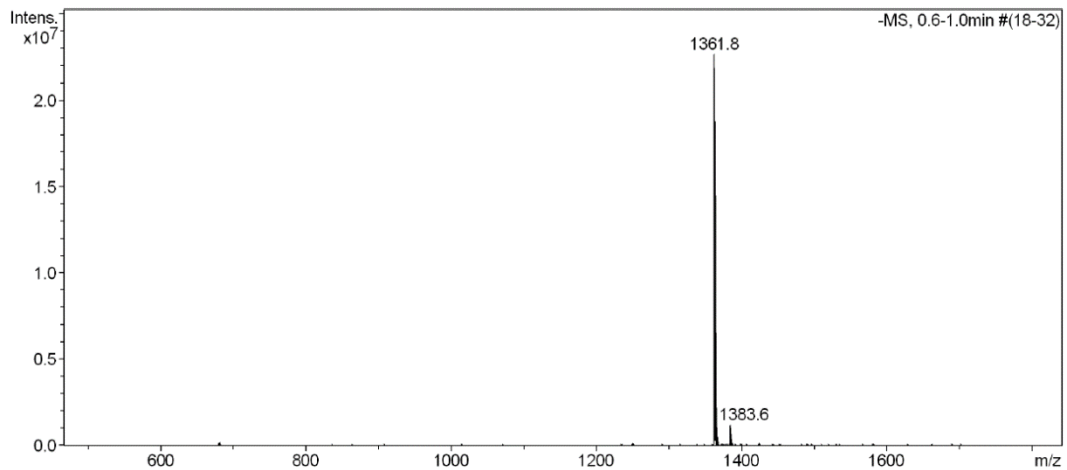
HPLC del cru del peptid ($\lambda=220$ nm)



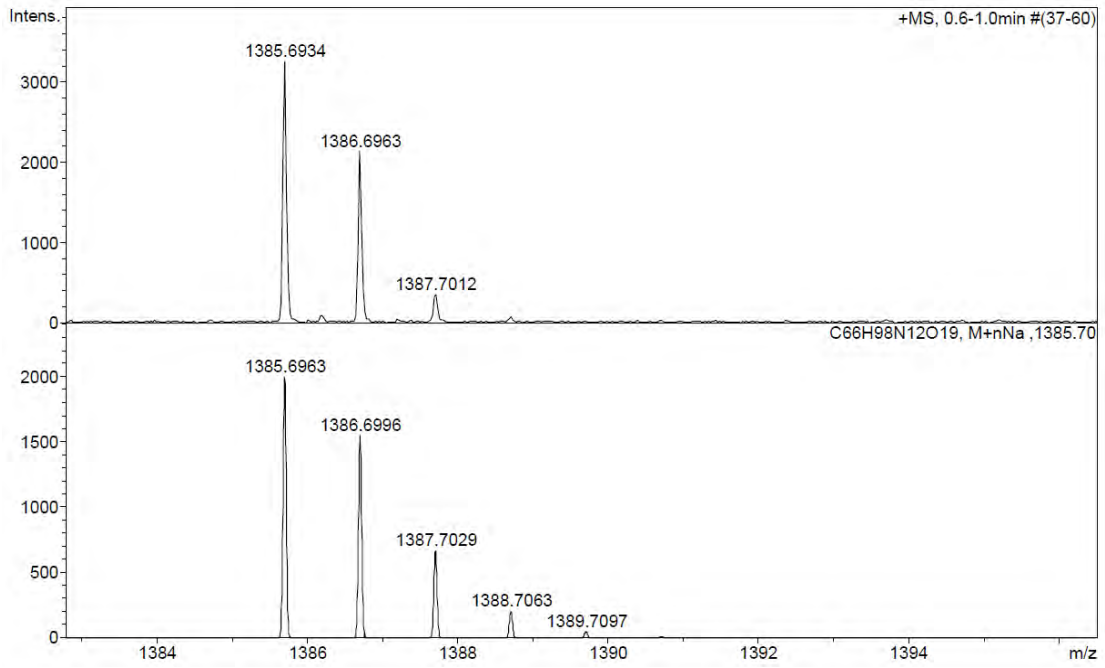
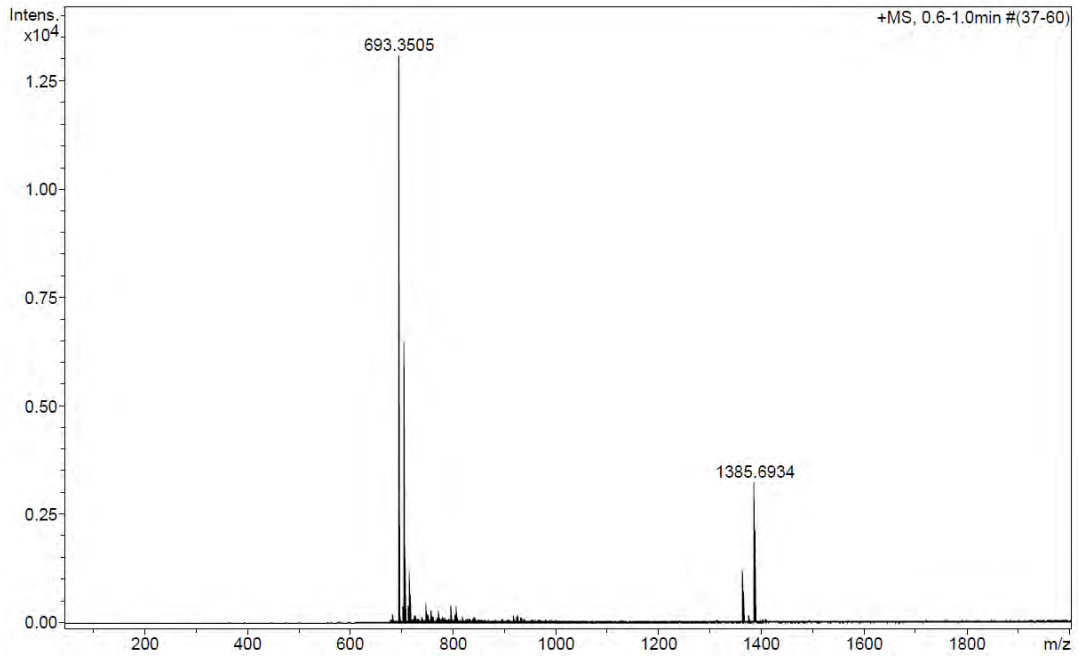
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,51	57,176	4,401	1,40
2	6,60	63,393	5,028	1,60
3	6,72	72,120	8,900	2,83
4	6,99	86,600	11,854	3,77
5	7,26	1072,517	102,753	32,70
6	7,38	415,851	55,196	17,57
7	7,58	329,665	26,936	8,57
8	7,64	333,819	90,913	28,94
9	8,25	45,622	8,208	2,61
Total:		2476,762	314,190	100,00

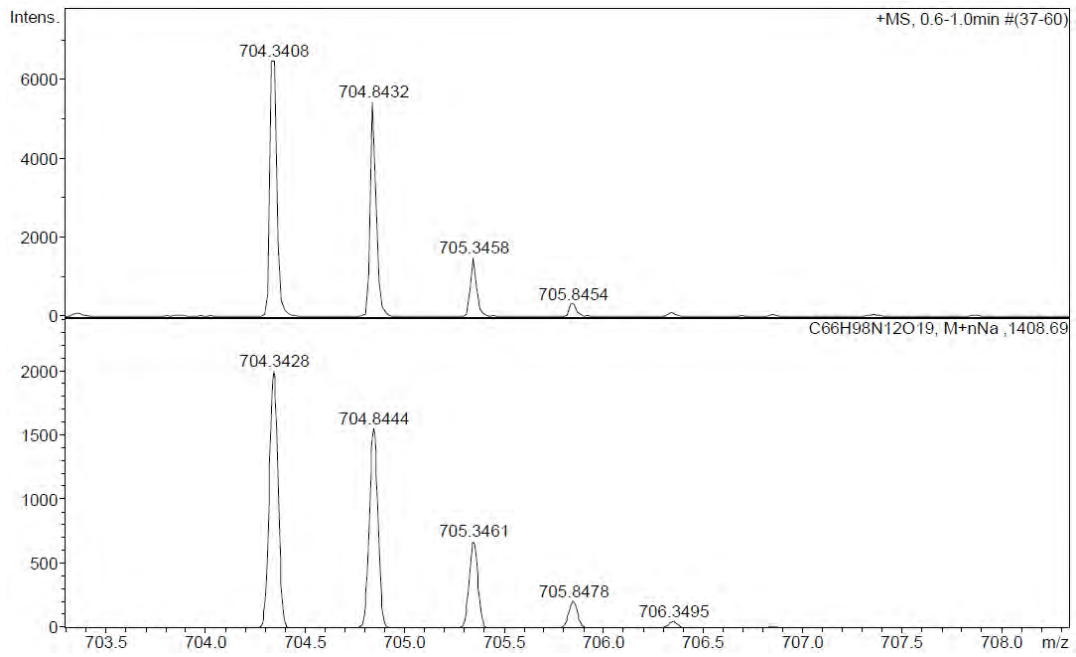
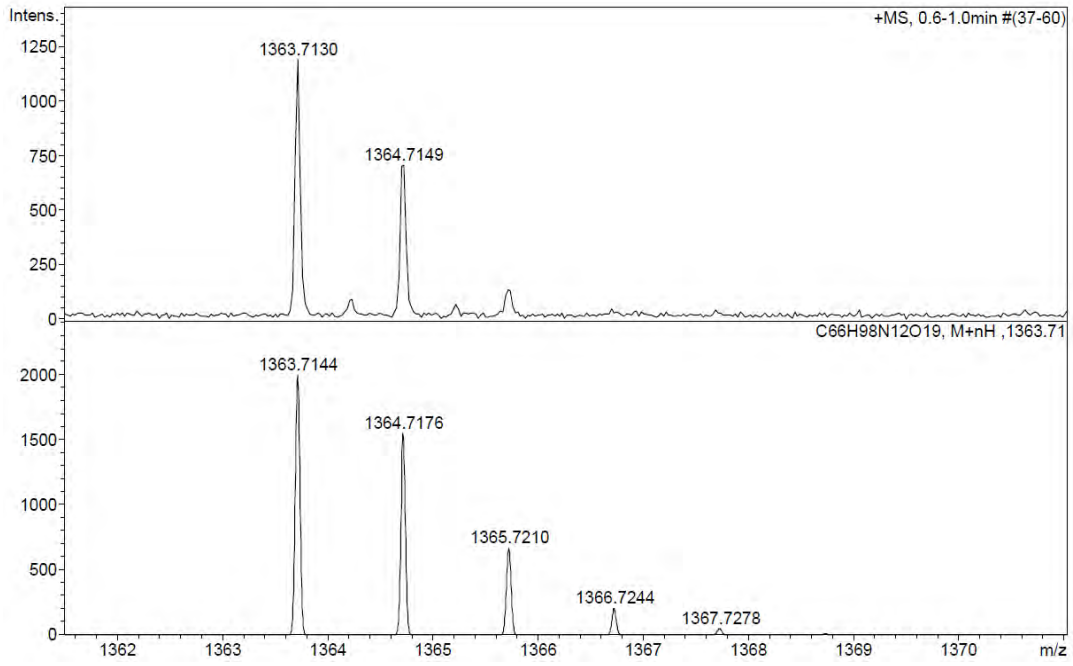
HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,45	1639,187	166,630	100,00
Total:		1639,187	166,630	100,00

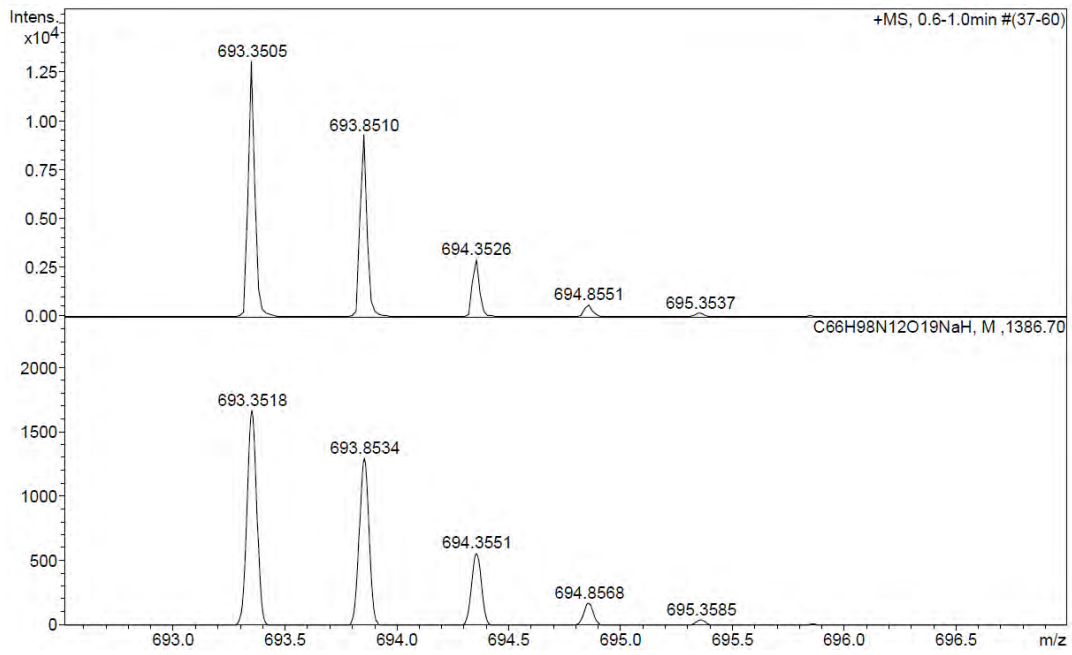
ESI-MS (m/z , +)ESI-MS (m/z , -)

HRMS (m/z)



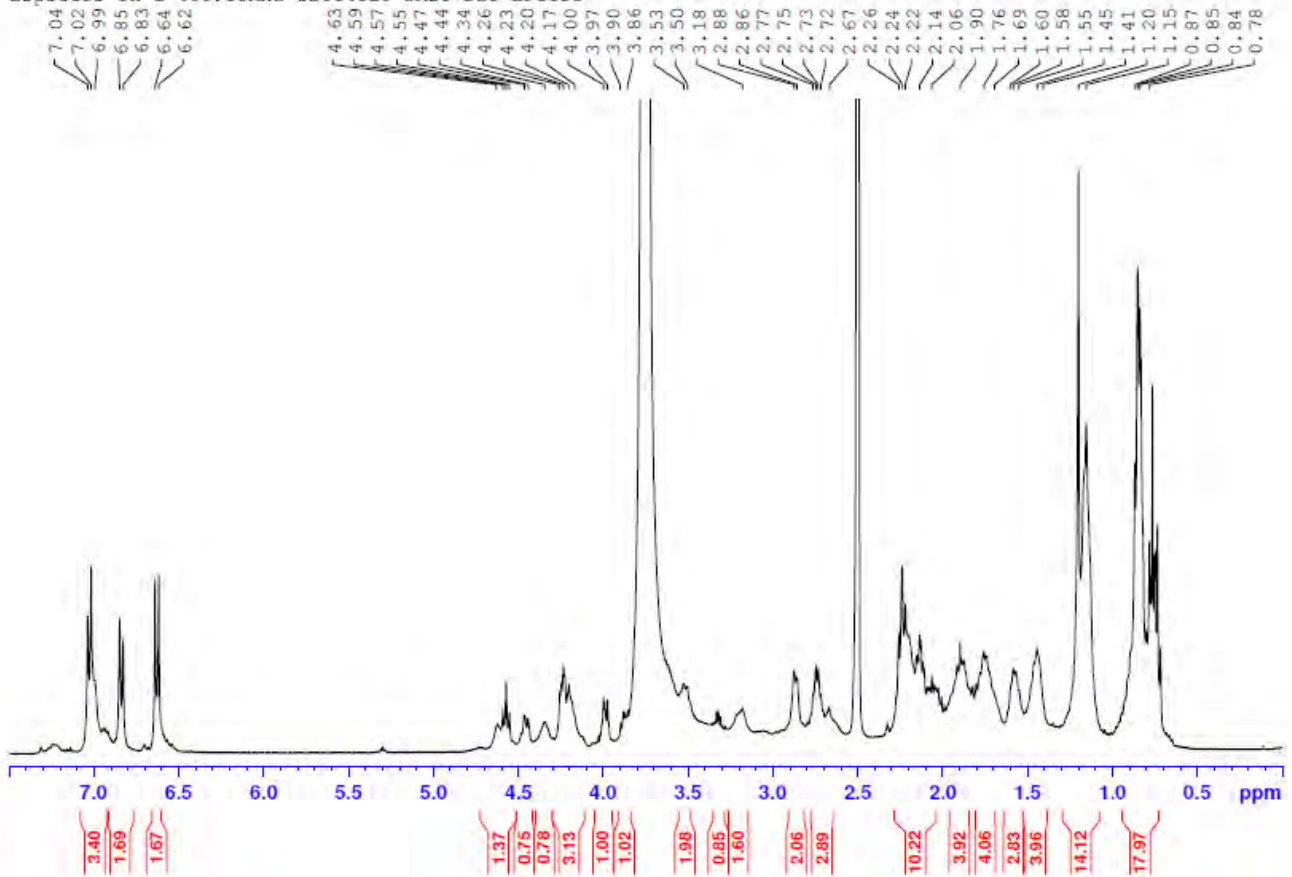


Annex: Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN



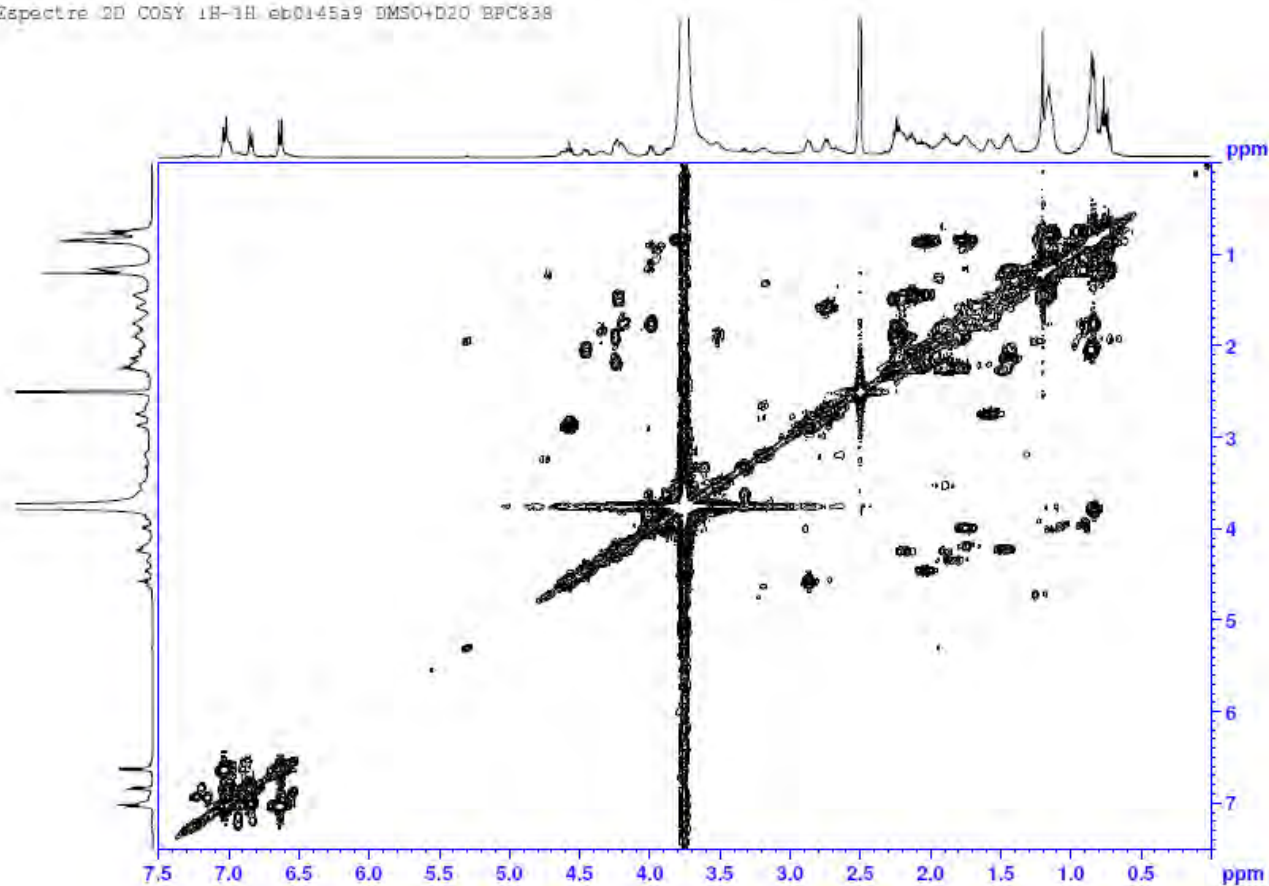
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

Espectre 1H a 400.13MHz eb0145a9 DMSO+D2O BPC838



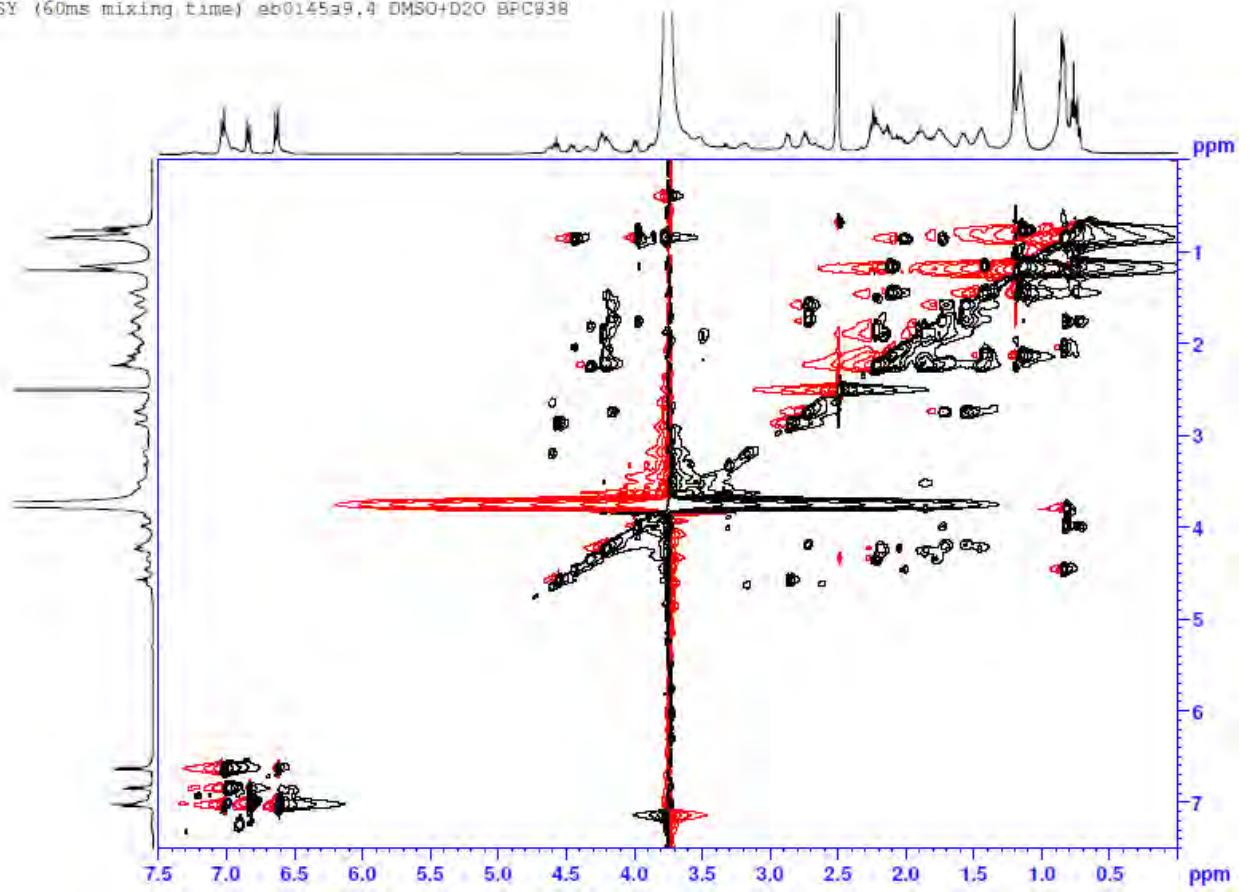
COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

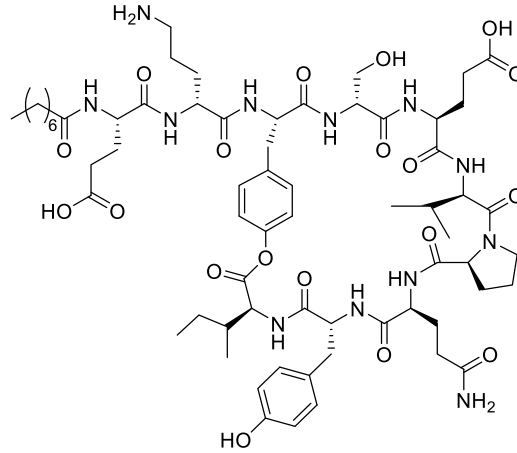
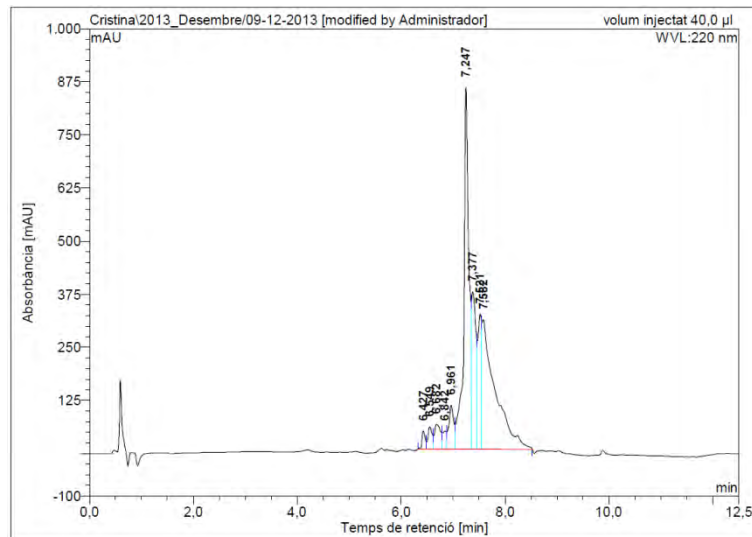
Espectre 2D COSY 1H-1H eb0145a9 DMSO+D2O BPC838



TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

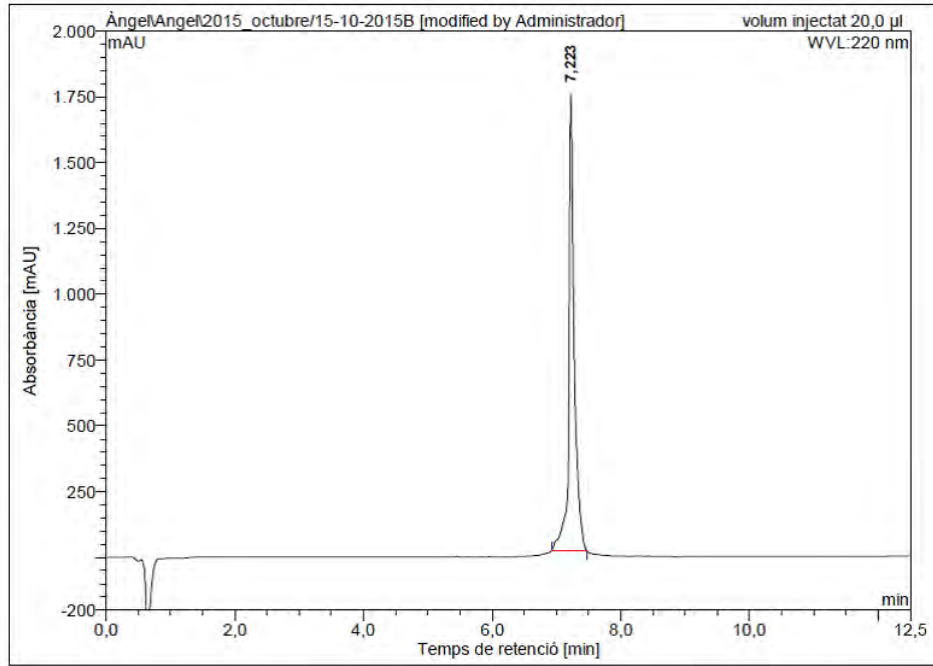
TOCSY (60ms mixing time) ab0145a9.4 DMSO+D2O BPC838



C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC840)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

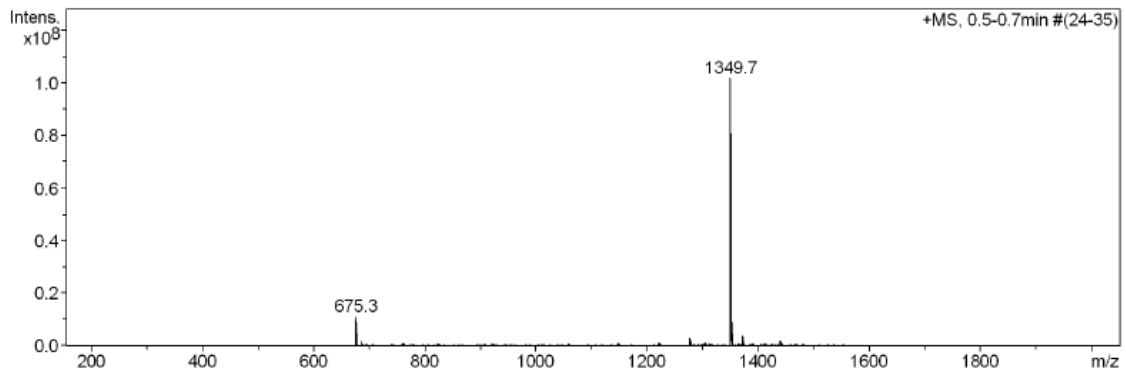
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6.43	42,852	3,162	1,12
2	6.55	52,784	5,003	1,77
3	6.68	59,002	7,874	2,78
4	6.84	42,645	3,753	1,32
5	6.96	103,813	11,418	4,03
6	7.25	850,981	98,920	34,90
7	7.38	370,669	36,311	12,81
8	7.52	318,840	26,711	9,43
9	7.58	304,930	90,247	31,84
Total:		2146,515	283,398	100,00

HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

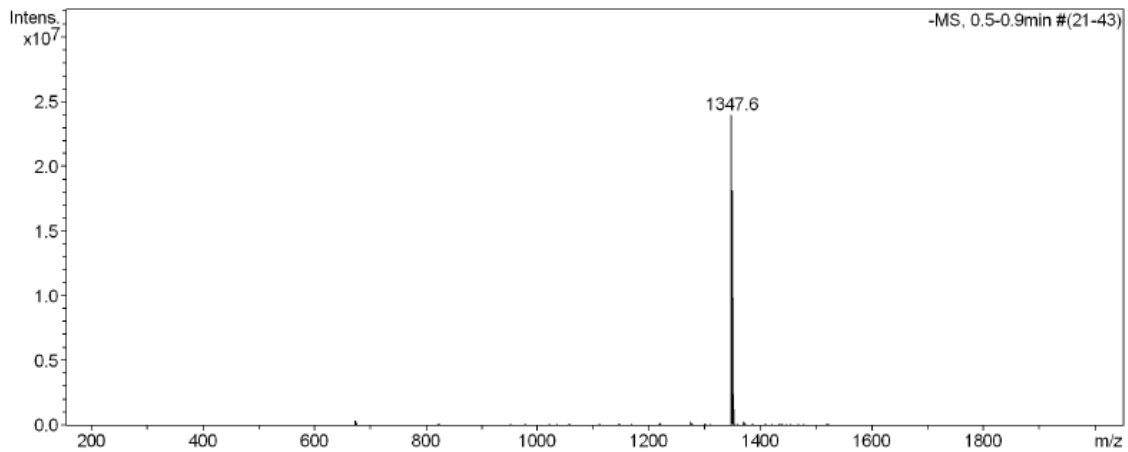


No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,22	1733,613	170,749	100,00
Total:		1733,613	170,749	100,00

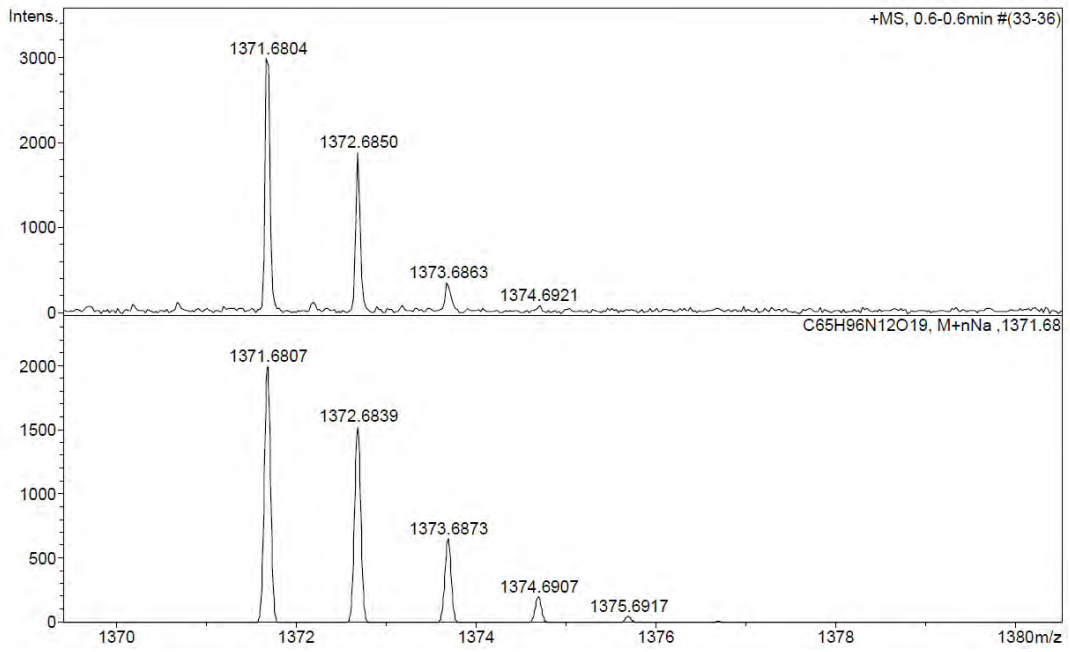
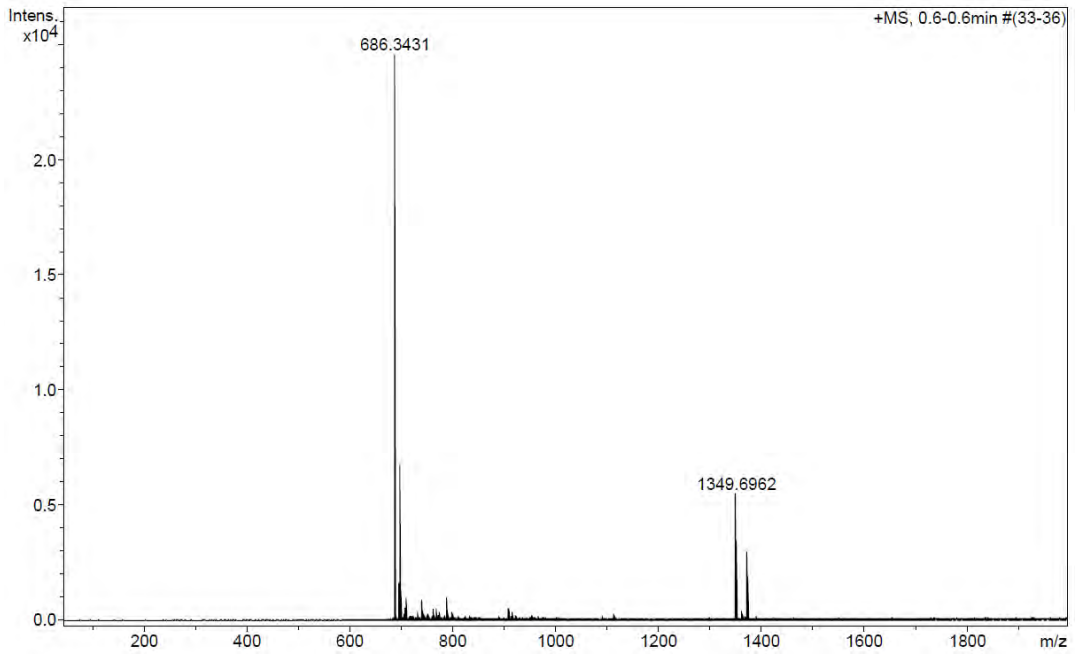
ESI-MS (m/z , +)

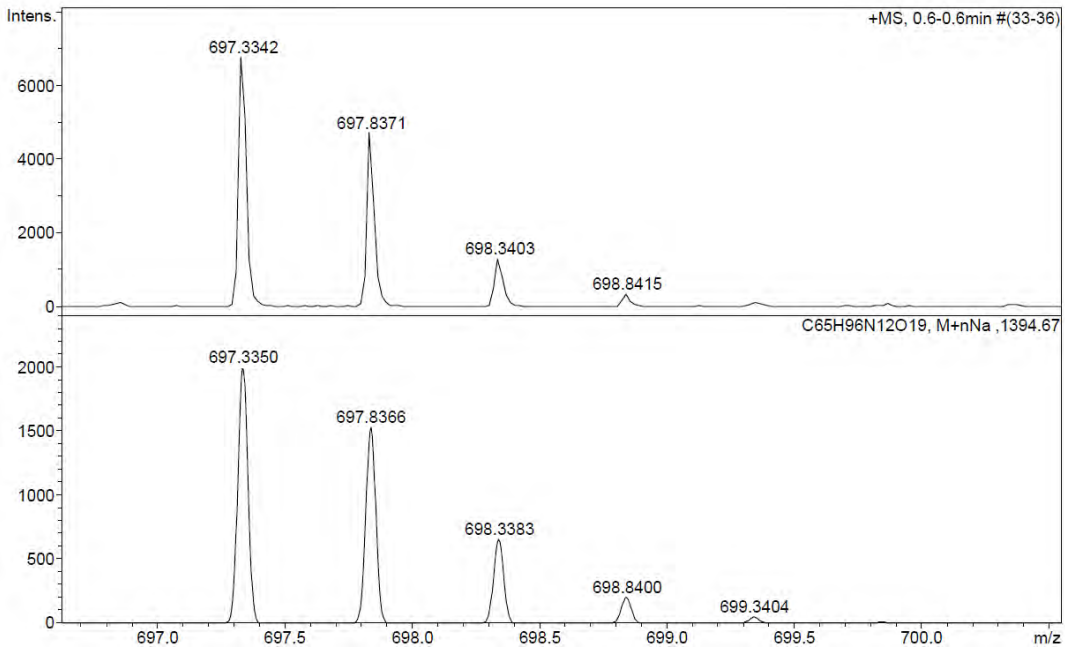
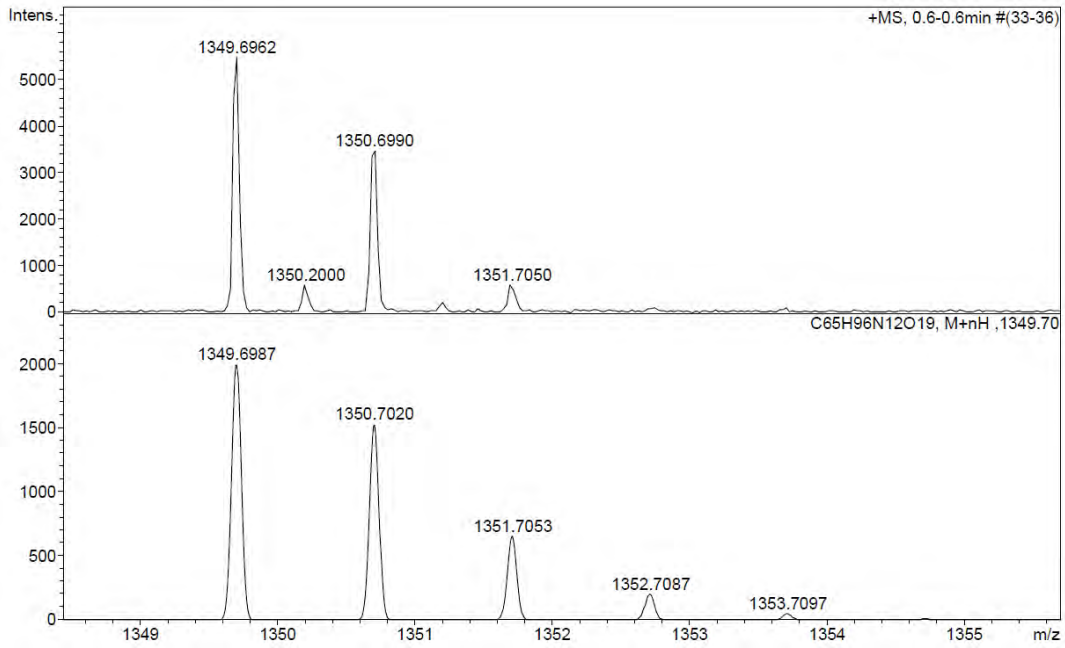


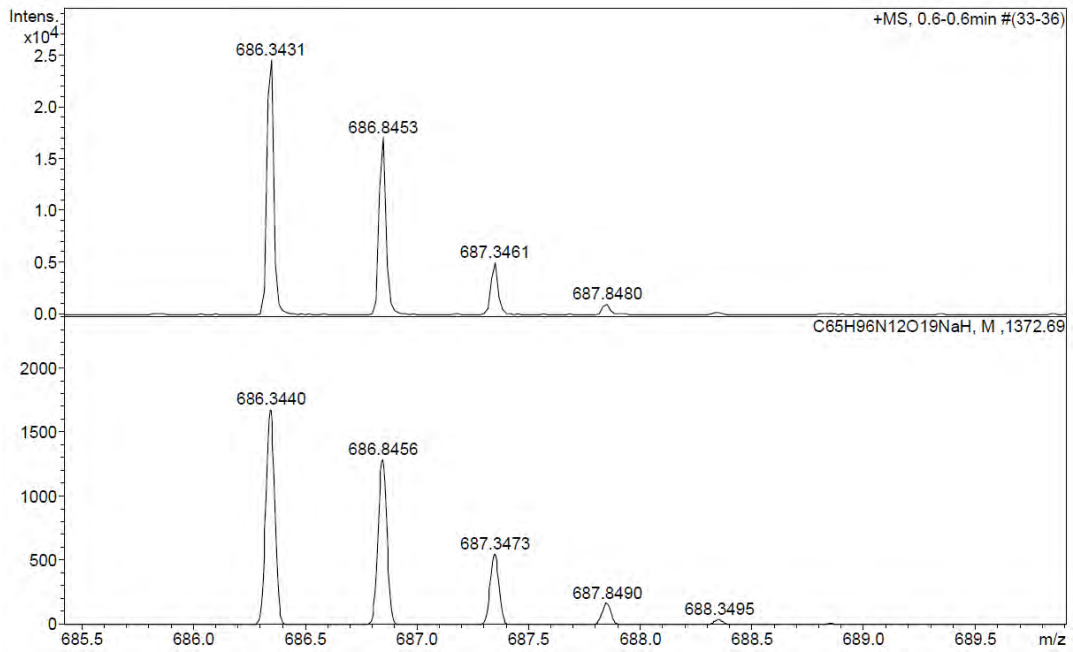
ESI-MS (m/z , -)



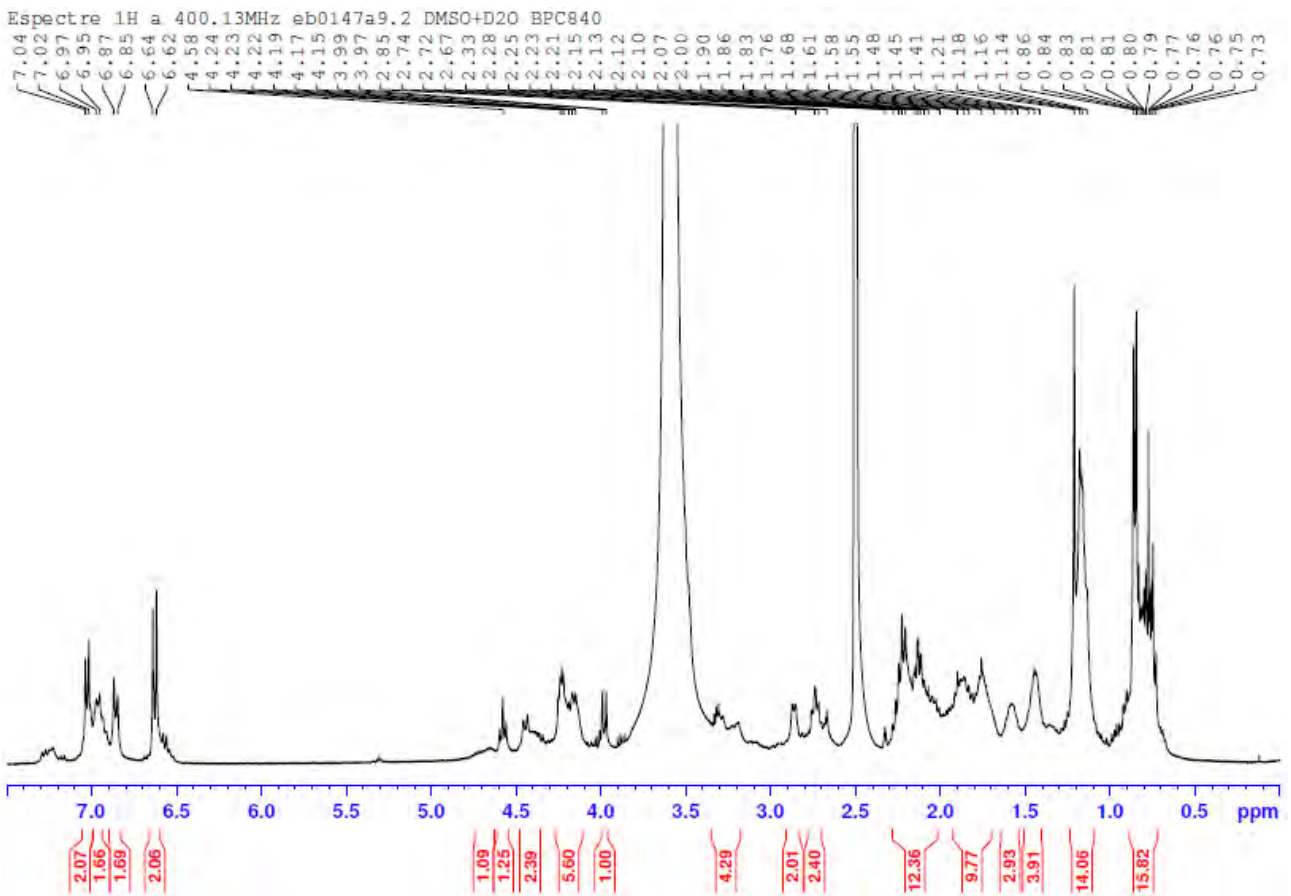
HRMS (m/z)





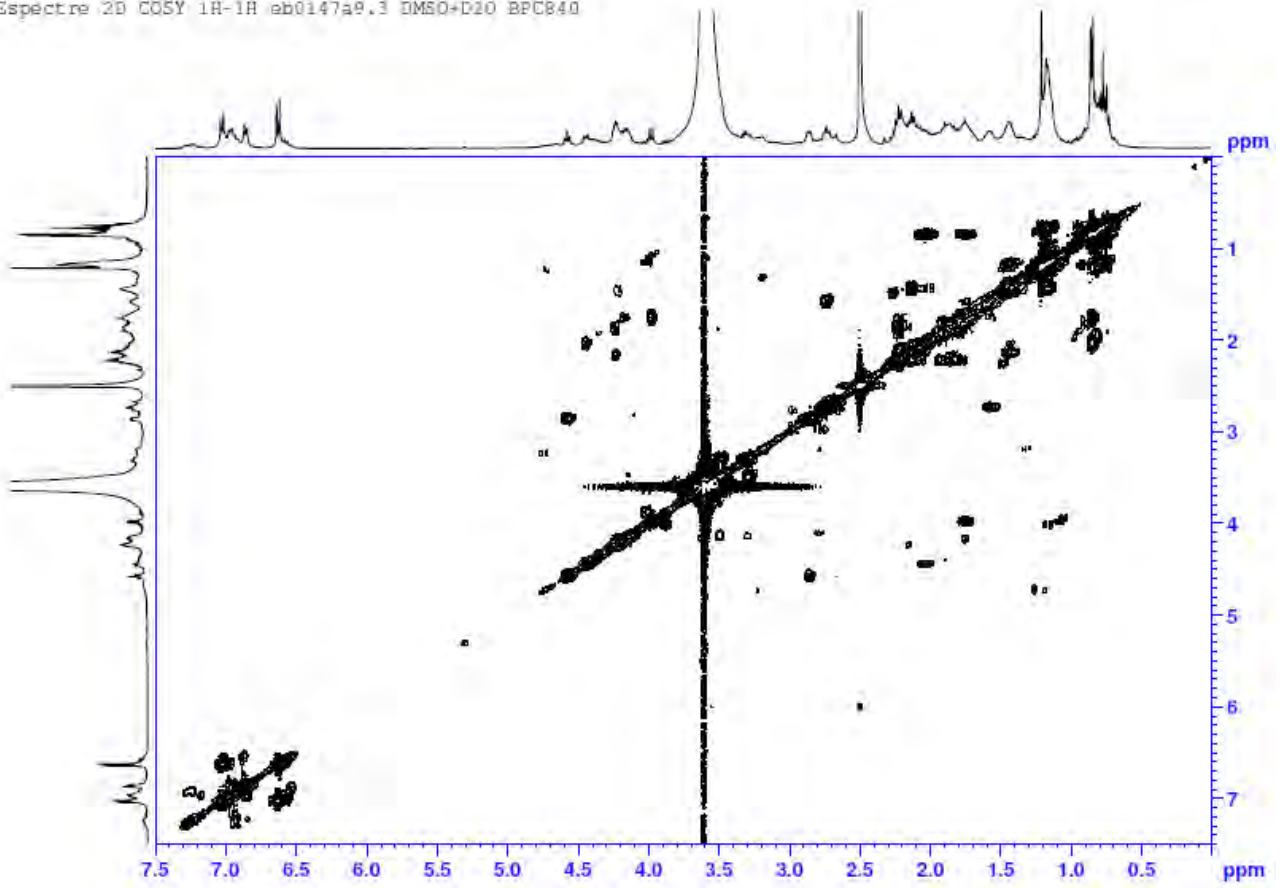


^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 + D_2O) δ (ppm)



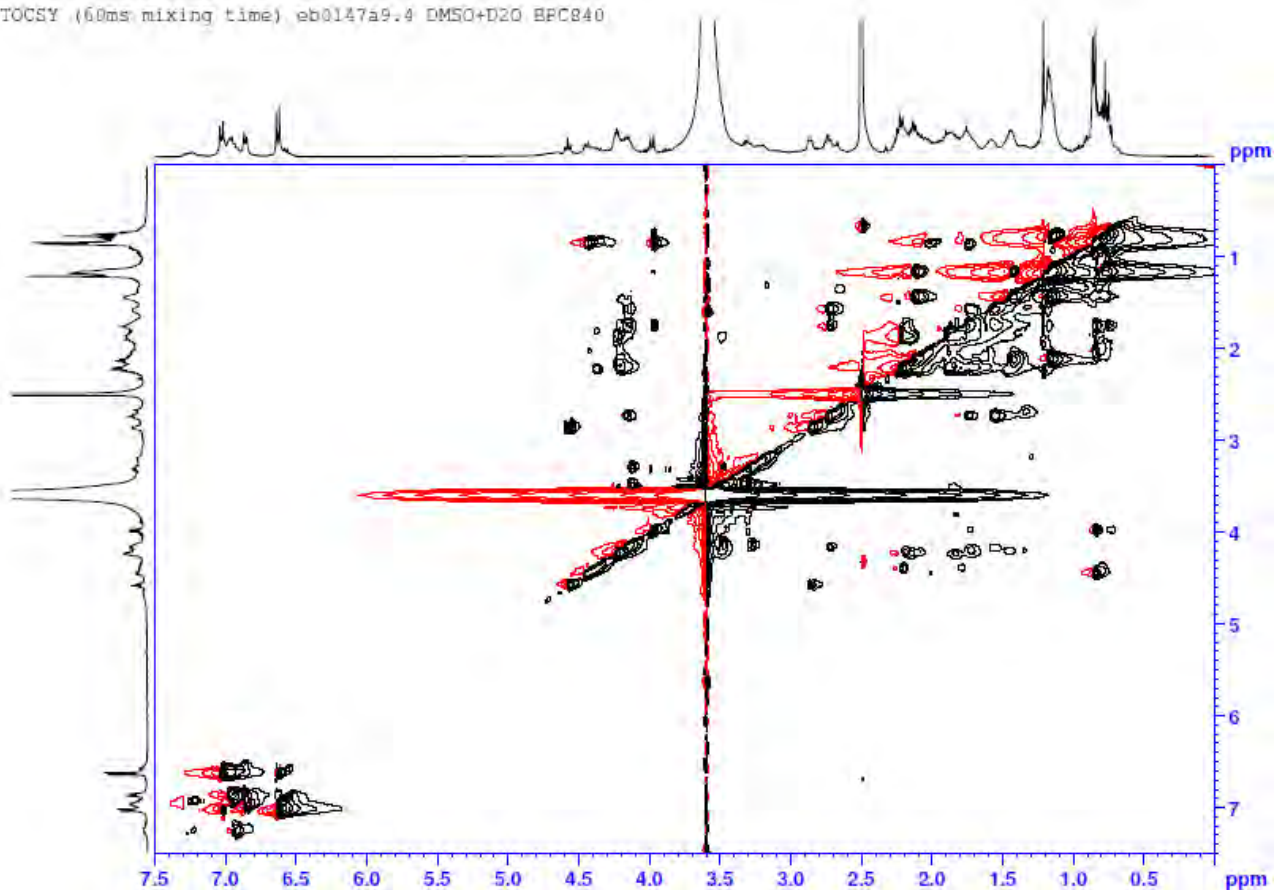
COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

Espèctre 2D COSY 1H-1H eb0147a9.3 DMSO+D2O BPC840

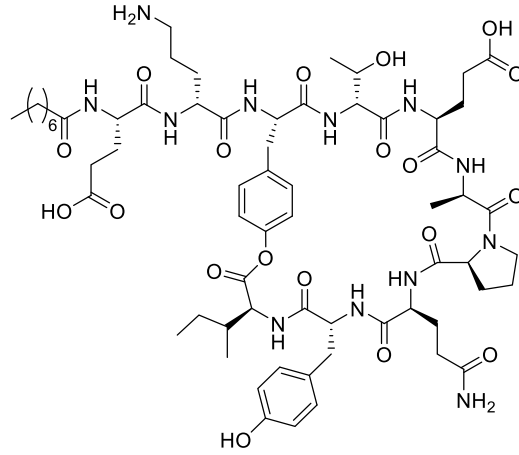


TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

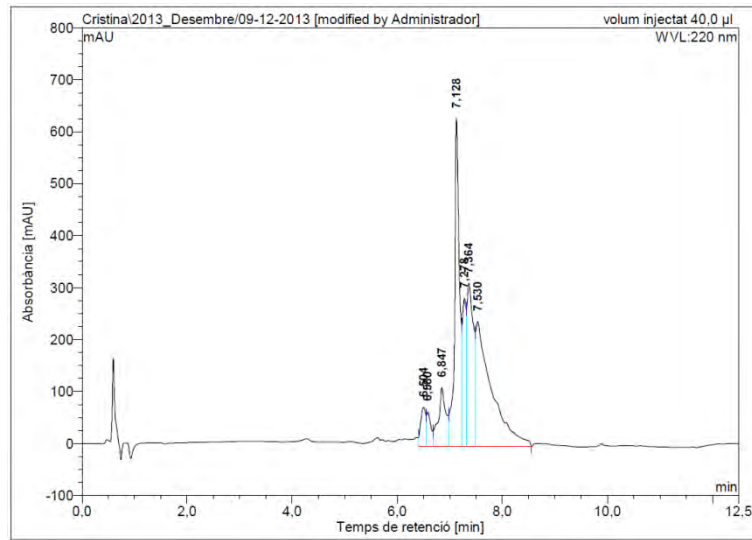
TOCSY (60ms mixing time) eb0147a9.9 DMSO+D2O BPC840



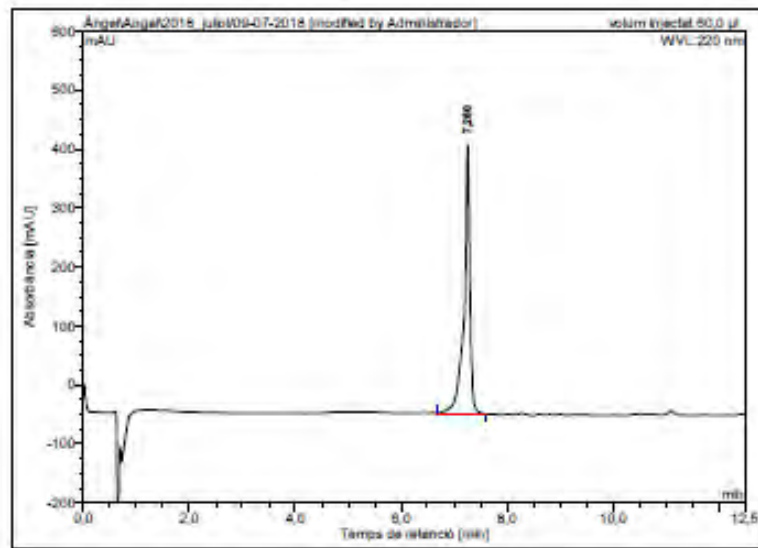
C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC842)



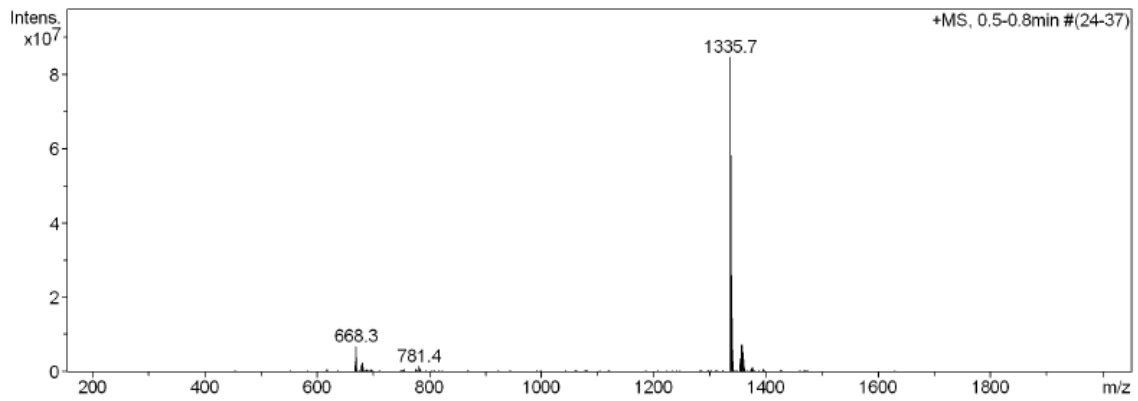
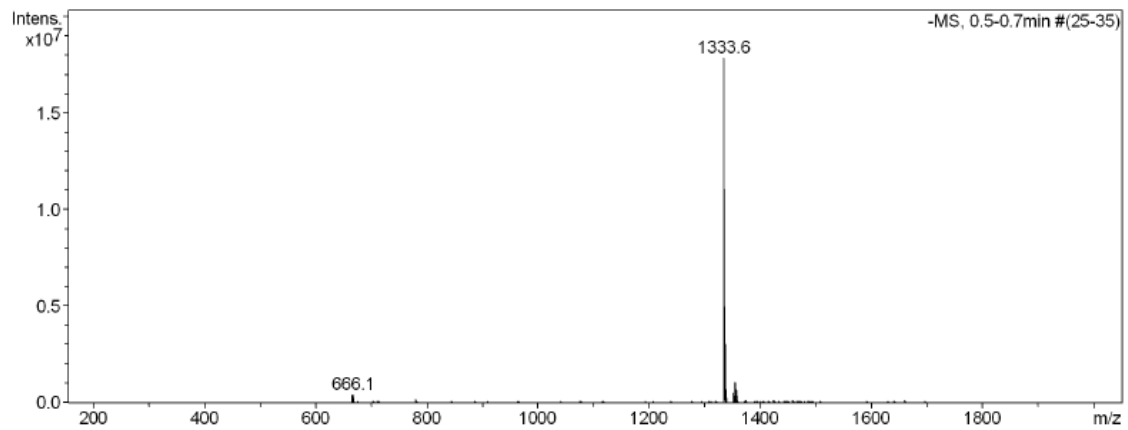
HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



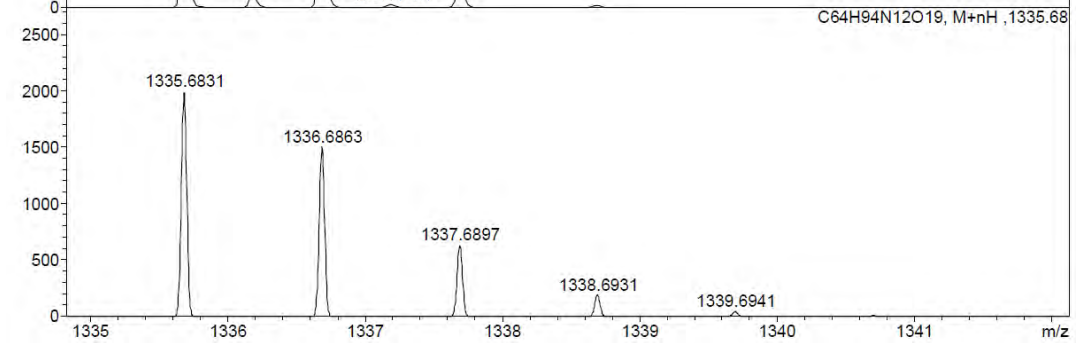
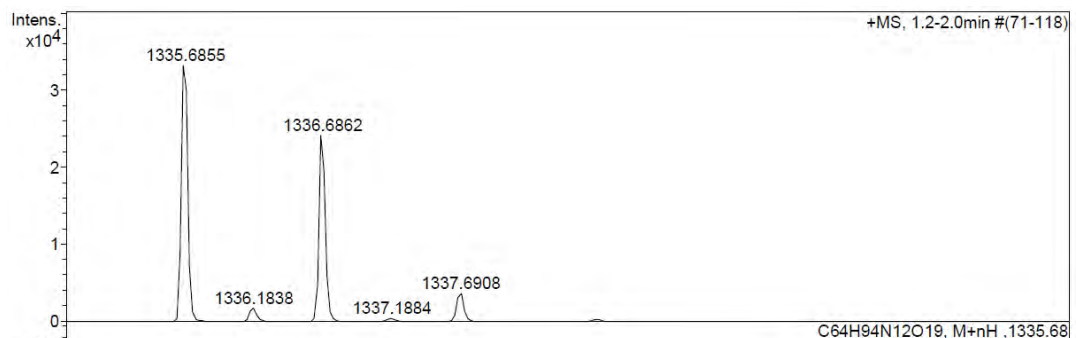
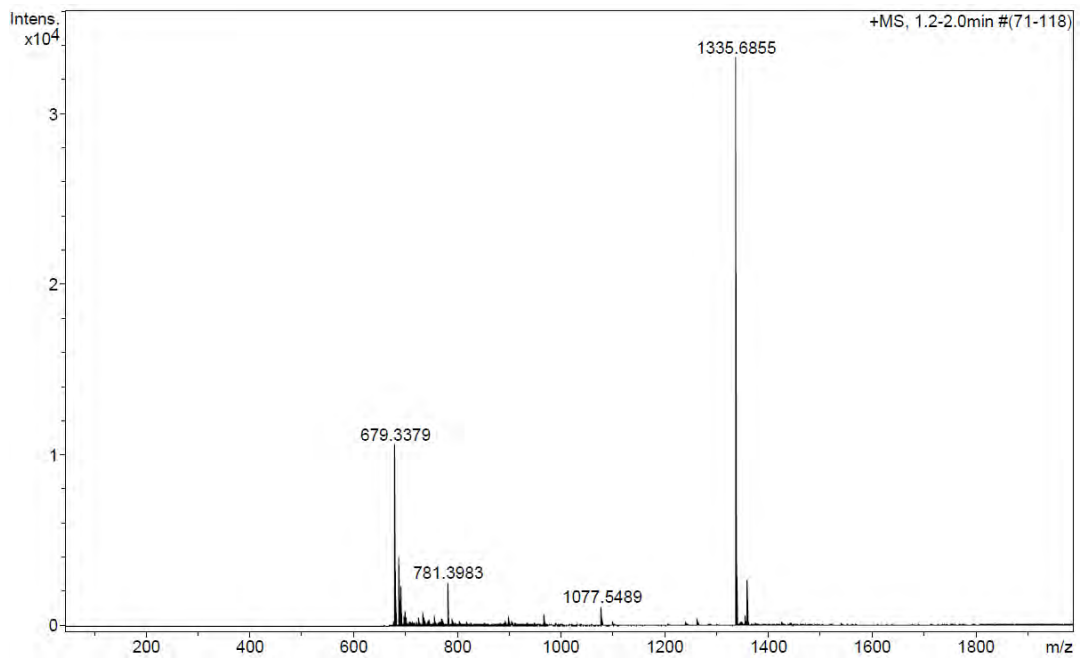
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,50	74,923	8,064	3,15
2	6,58	66,793	6,515	2,55
3	6,85	113,151	19,623	7,67
4	7,13	631,094	67,240	26,29
5	7,28	285,497	22,960	8,98
6	7,36	313,938	45,176	17,67
7	7,53	240,254	86,143	33,69
Total:		1725,850	255,722	100,00

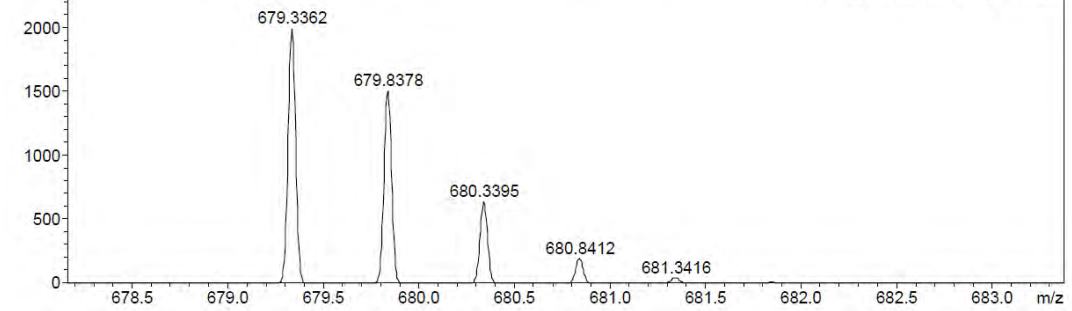
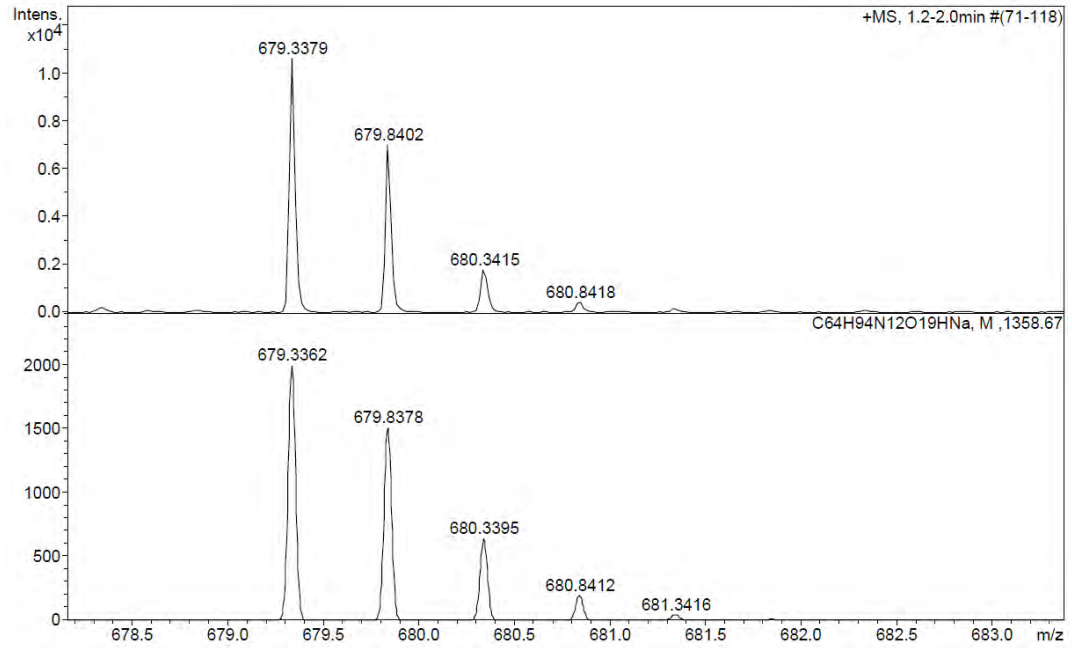
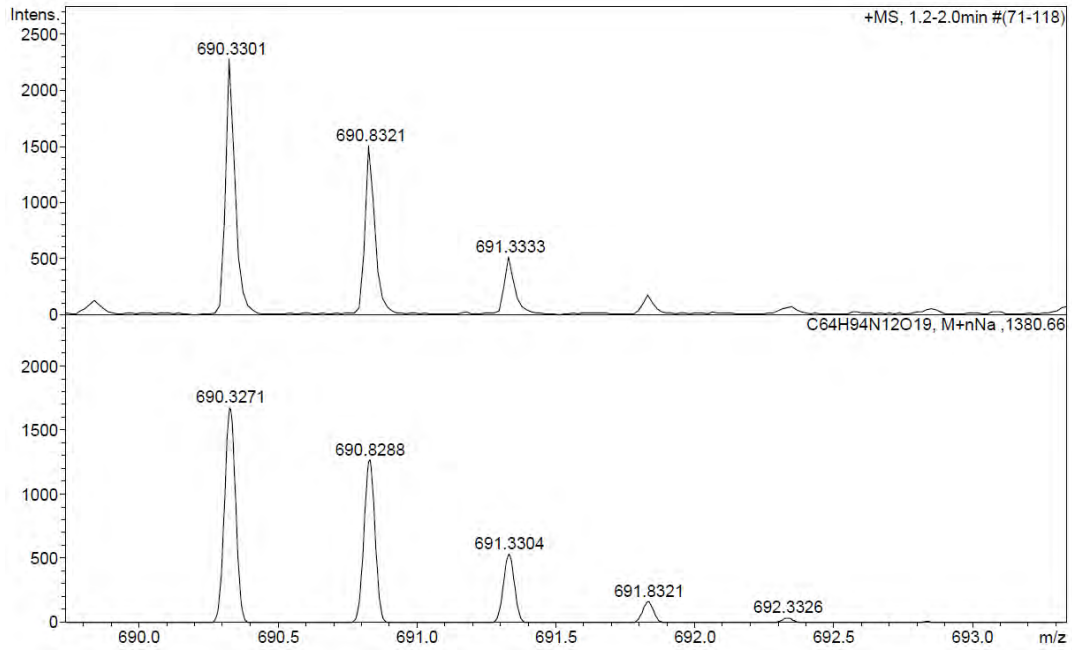
HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	7,26	455,599	59,042	100,00
Total:		455,599	59,042	100,00

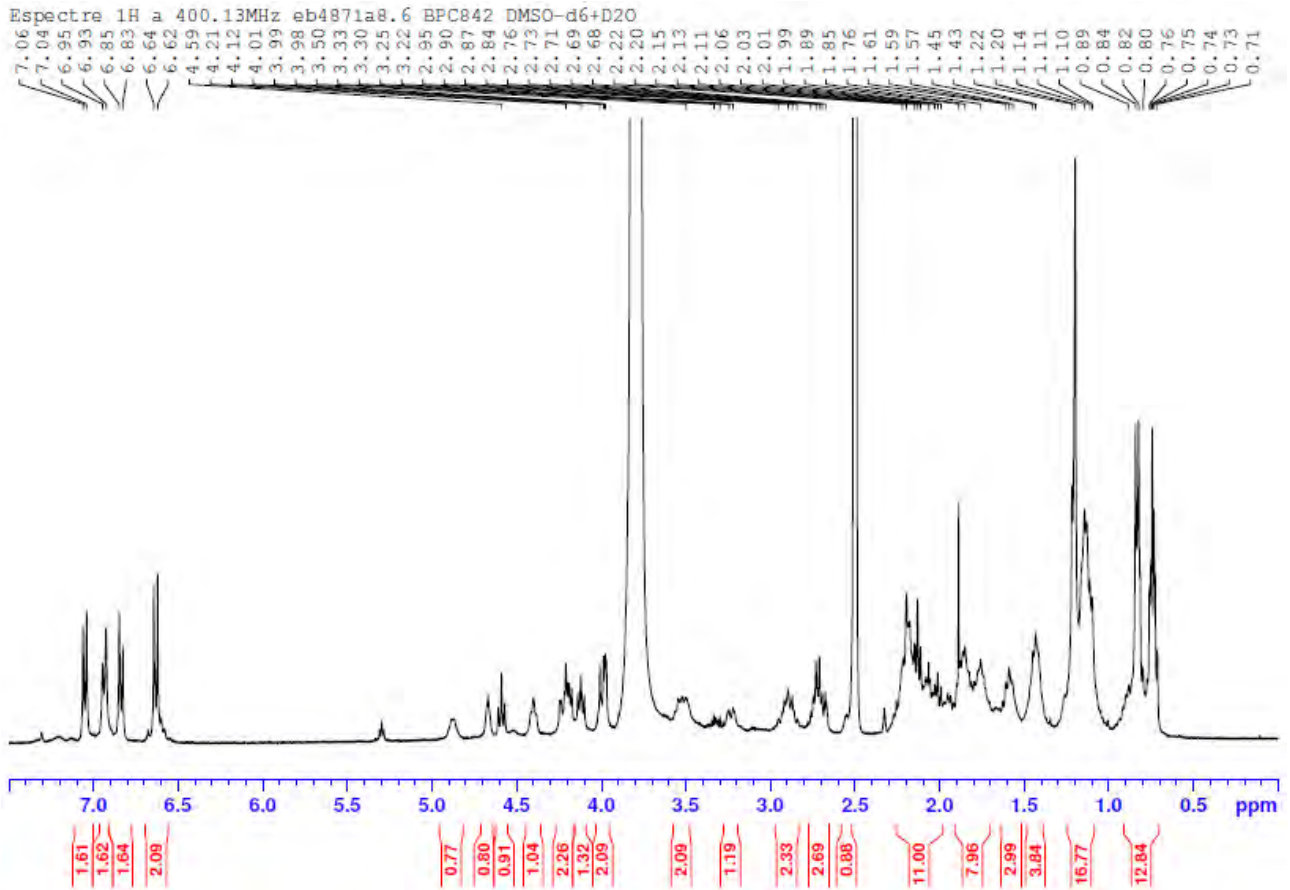
ESI-MS (m/z , +)ESI-MS (m/z , -)

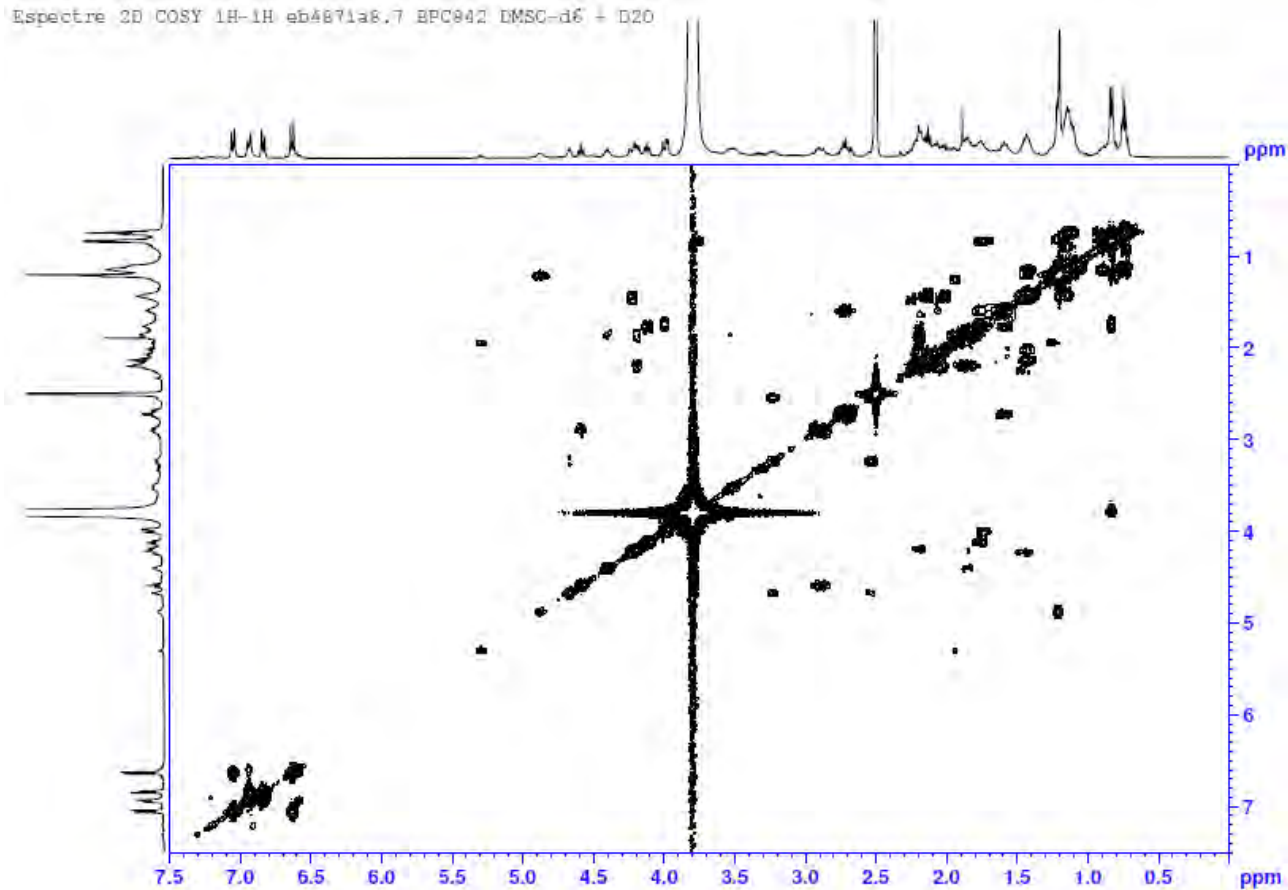
HRMS (m/z)





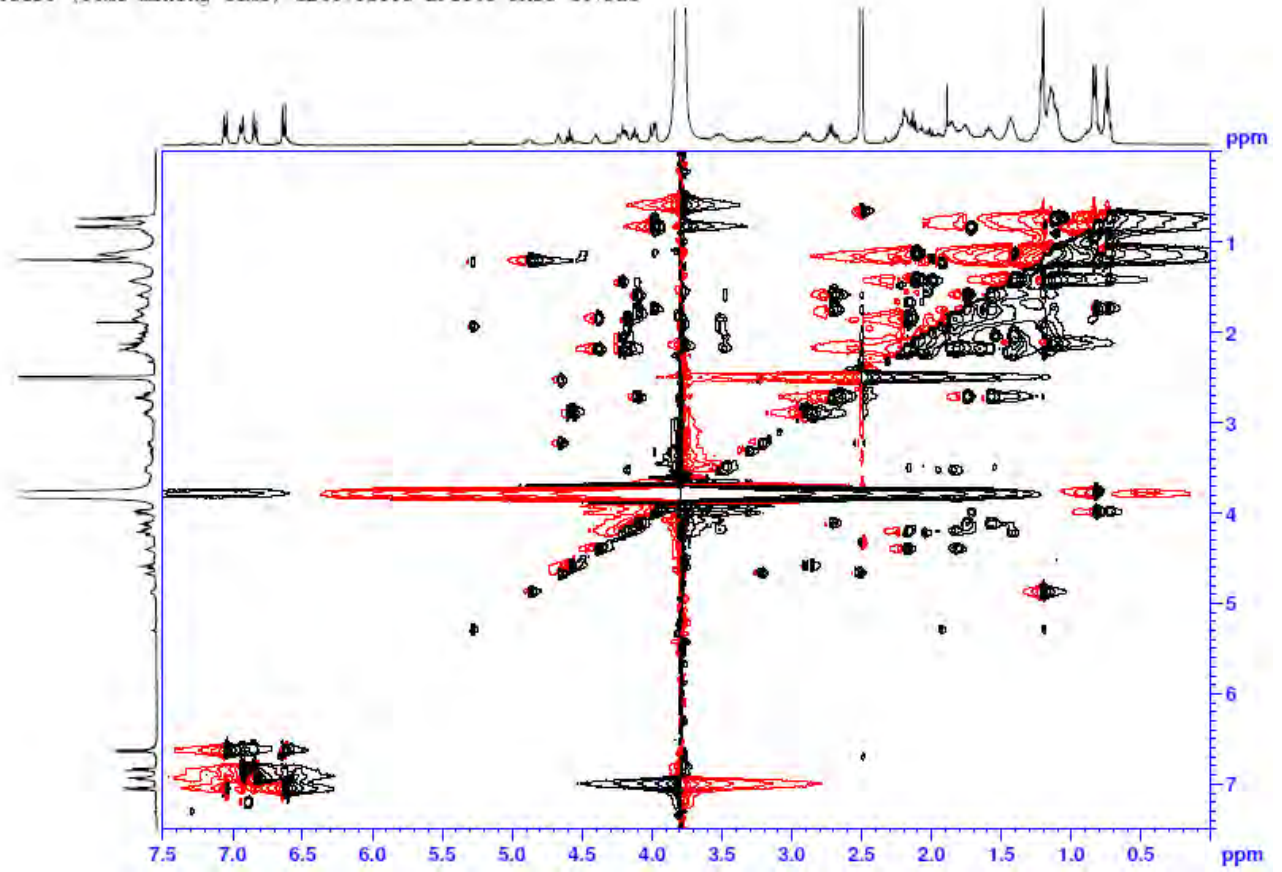
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 + D $_2$ O) δ (ppm)

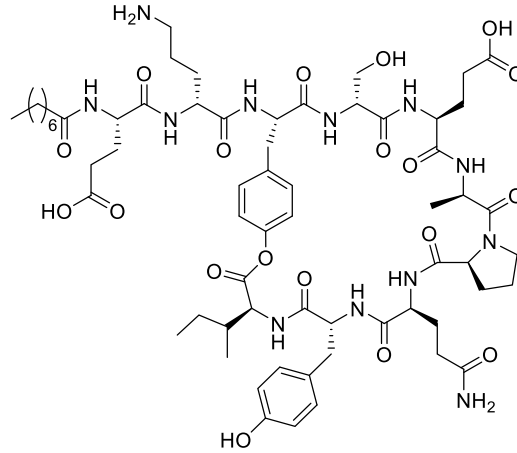
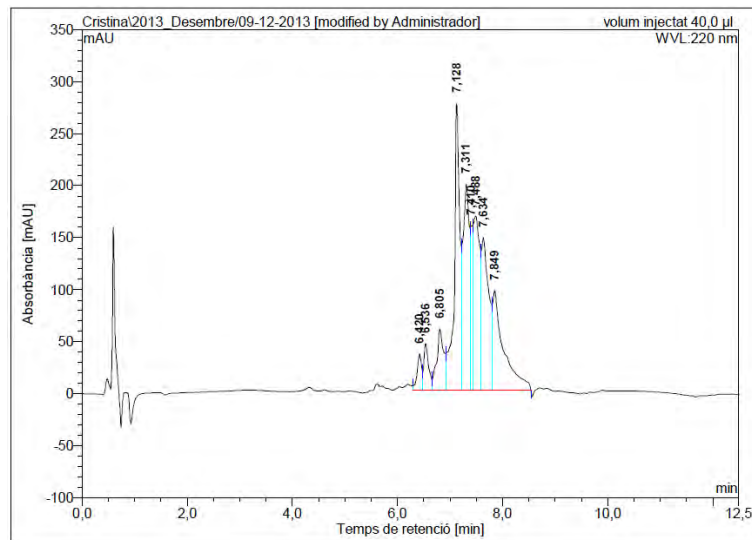


COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)Espectre 2D COSY 1H-1H eb4871a8.7 BPC942 DMSO-d₆ + D₂O

TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

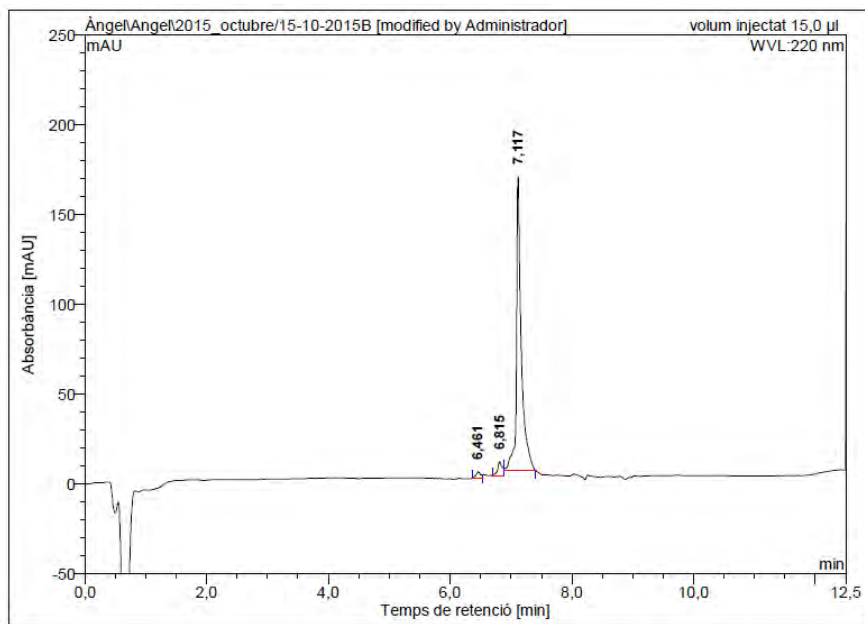
TOCSY (50ms mixing time) eb4871a8.8 BPC842 DMSO-d6+D2O



C₇H₁₅CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Ser-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC844)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

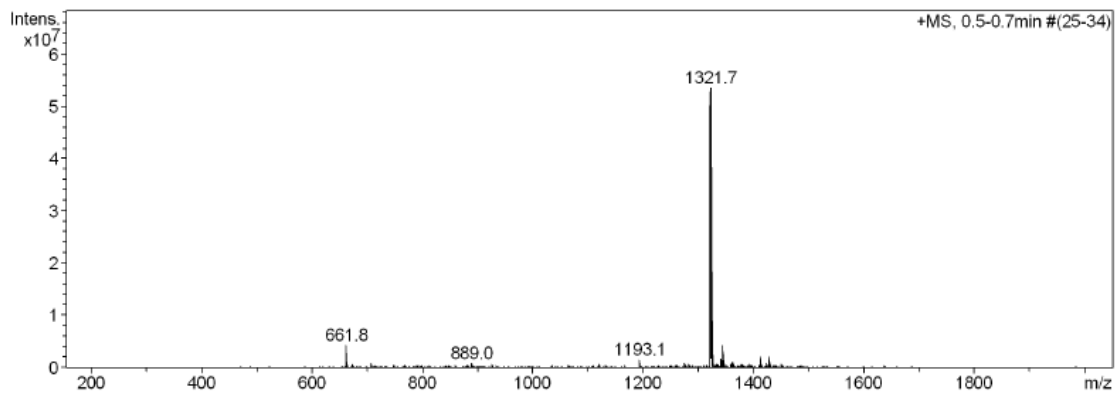
No.	Ret. Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %
1	6,42	34,901	3,470	2,19
2	6,54	44,610	4,621	2,91
3	6,80	58,705	9,060	5,71
4	7,13	276,146	33,466	21,09
5	7,31	198,027	28,209	17,78
6	7,41	158,253	7,907	4,98
7	7,49	167,561	24,711	15,57
8	7,63	146,525	22,972	14,48
9	7,85	95,792	24,260	15,29
Total:		1180,520	158,677	100,00

HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

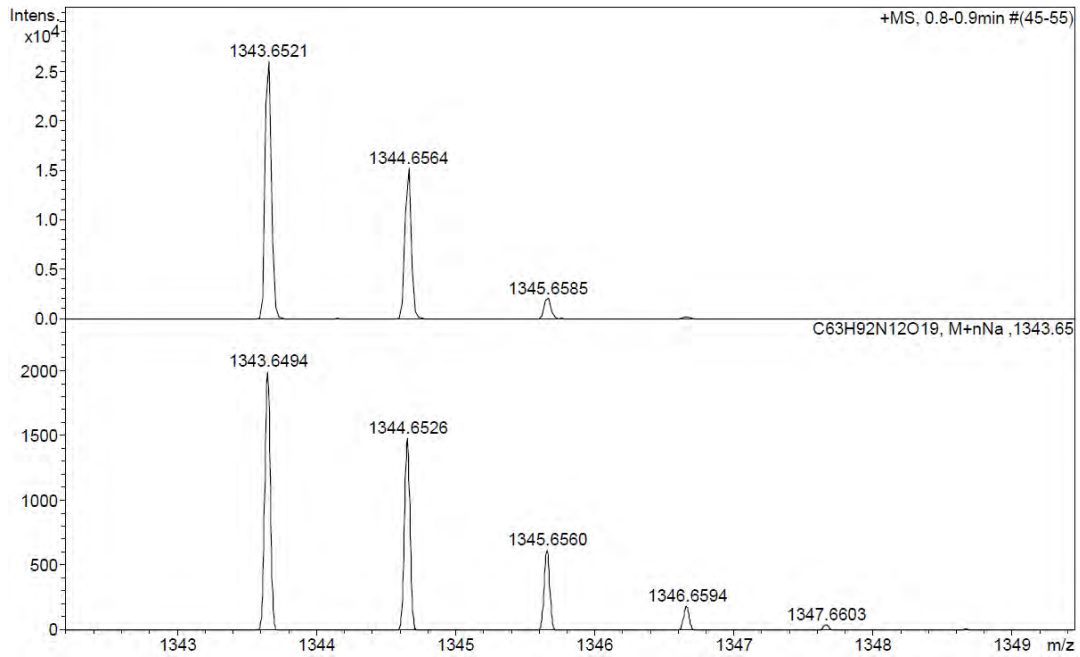
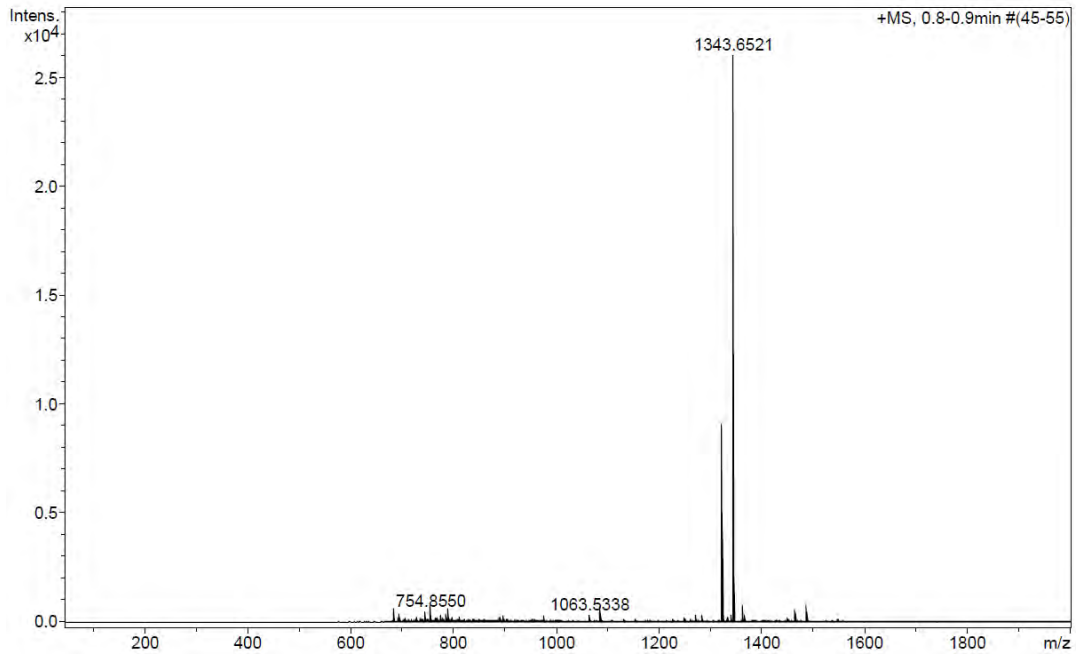


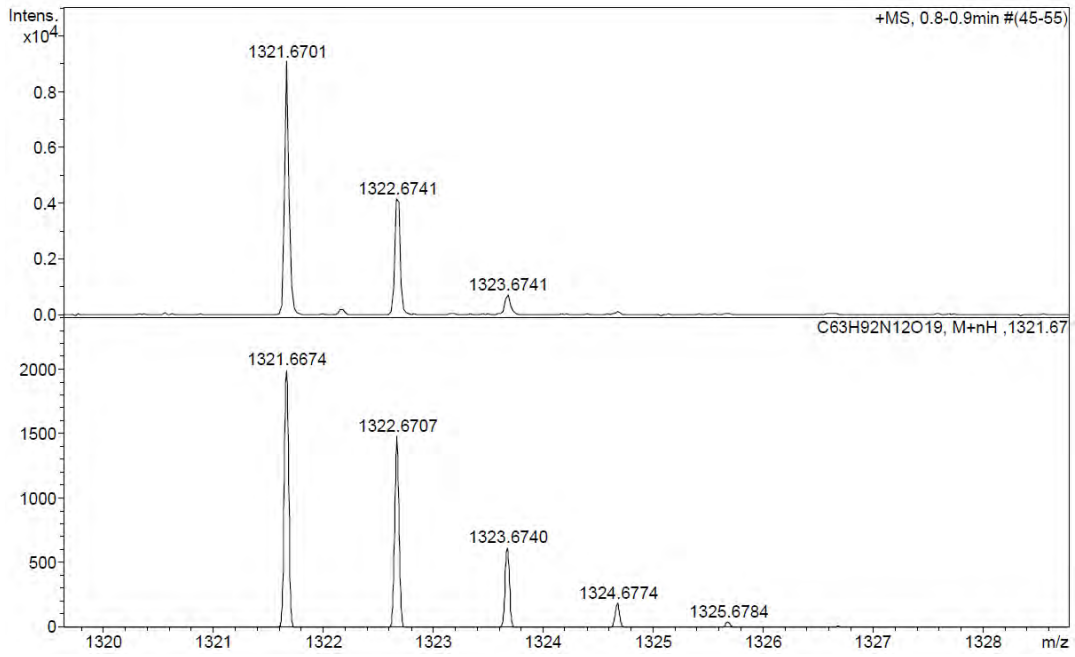
No.	Ret.Time (detected) min	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	6,46	3,377	0,294	1,83
2	6,82	7,633	0,663	4,13
3	7,12	163,313	15,074	94,03
Total:		174,323	16,031	100,00

ESI-MS (m/z , +)

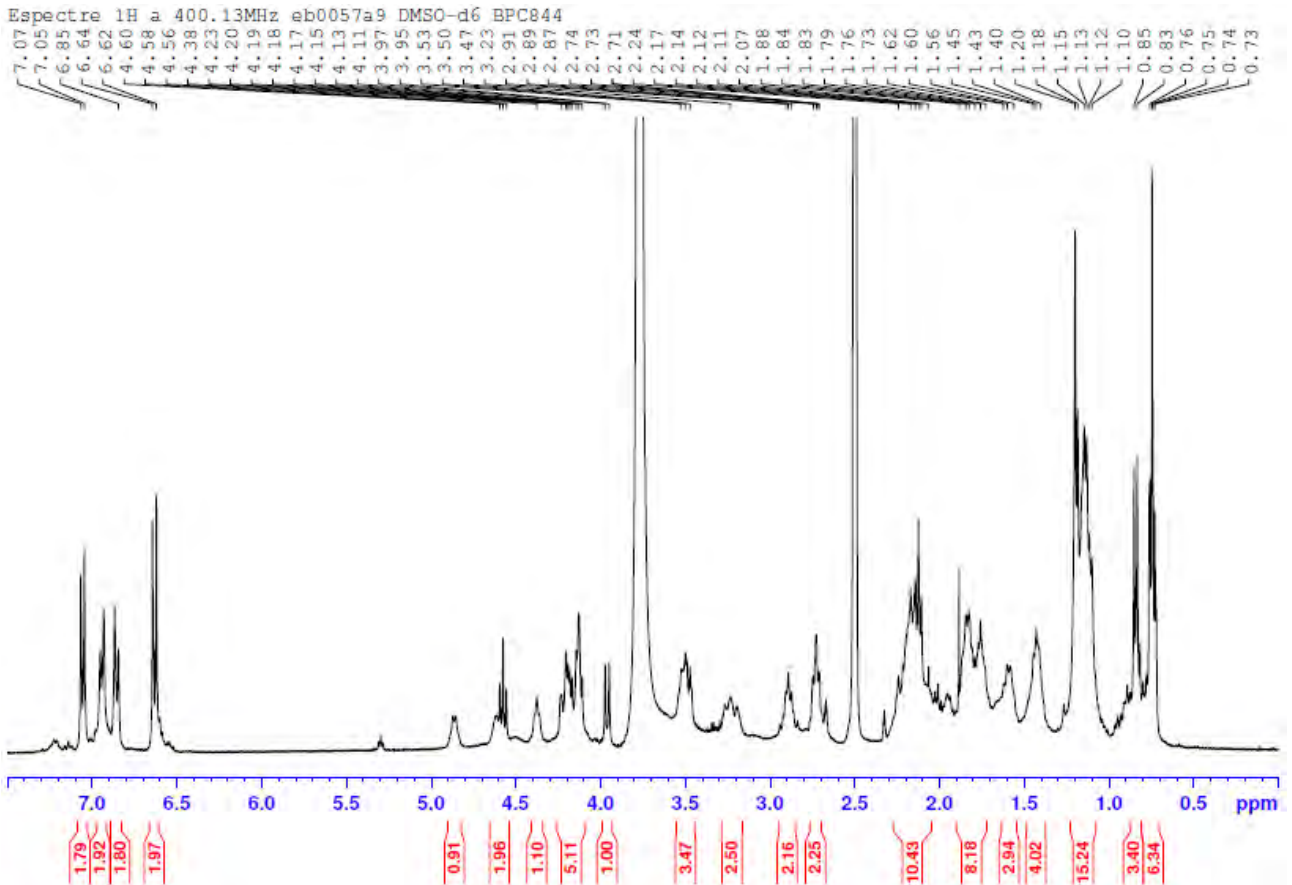


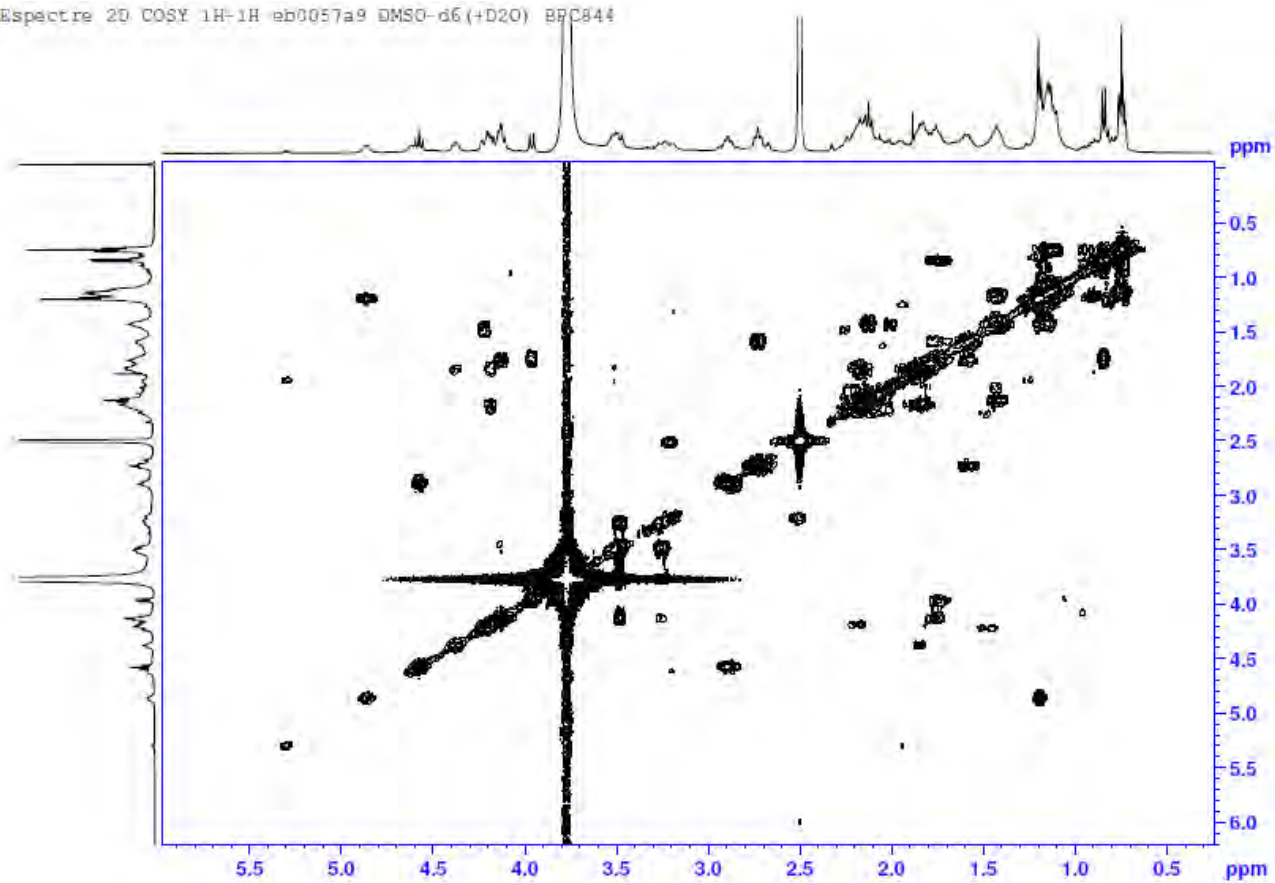
HRMS (m/z)





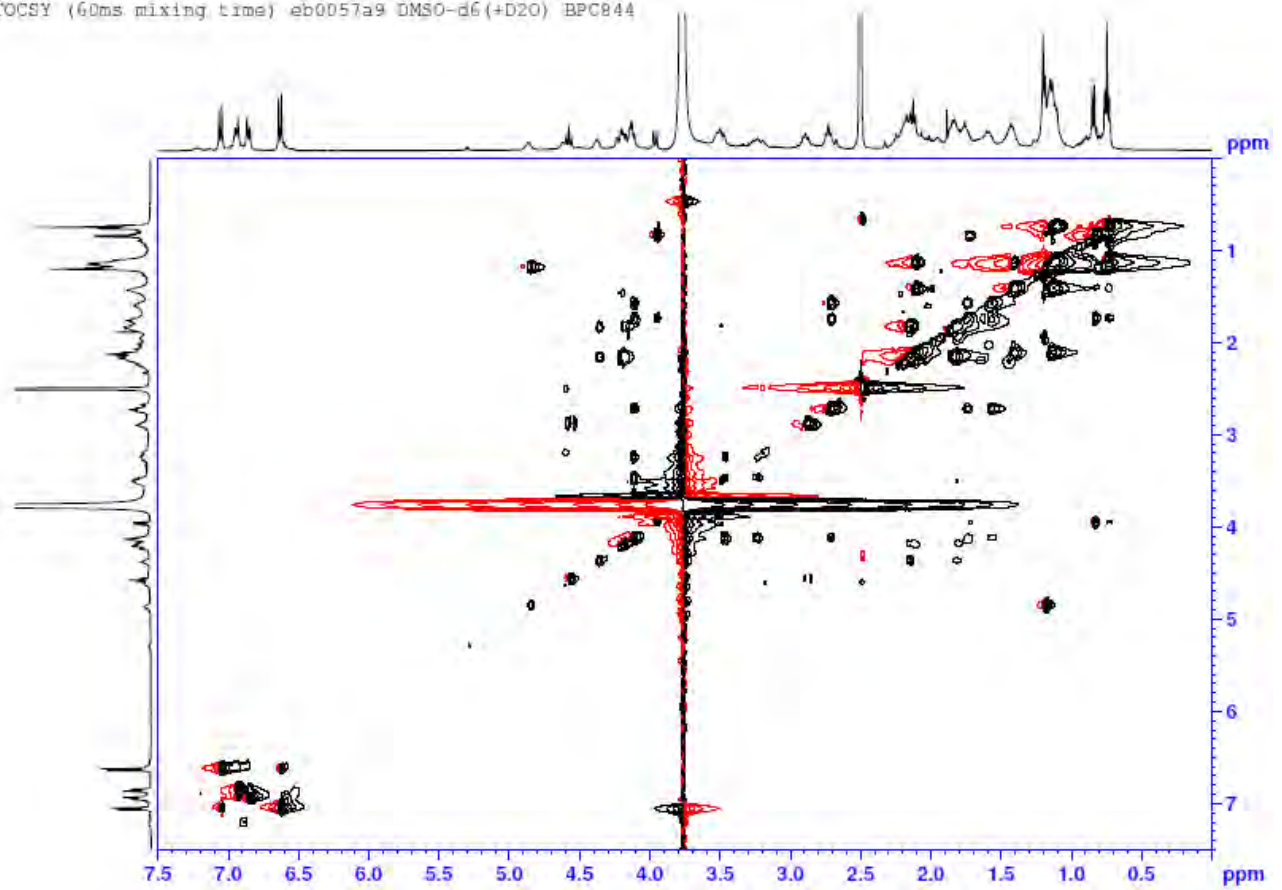
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

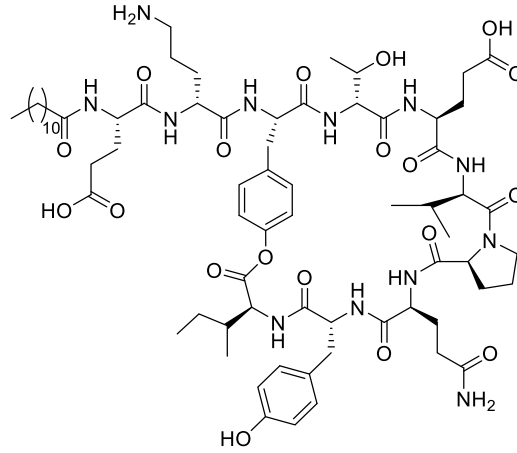
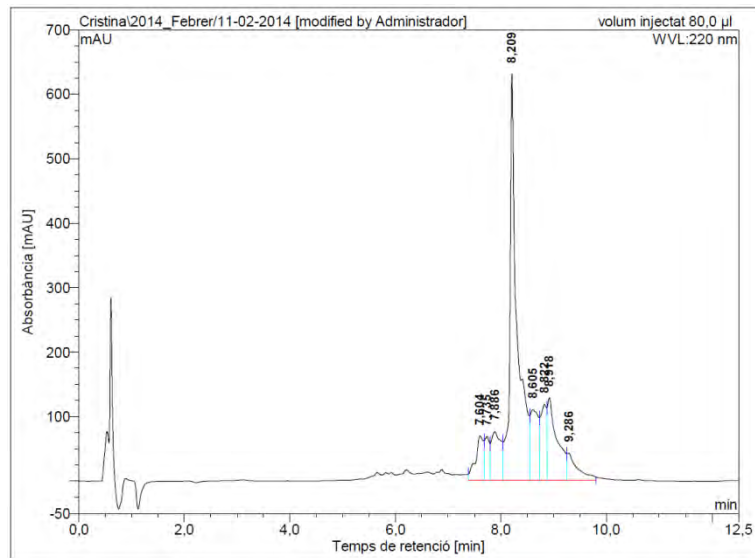


COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)Espectre 2D COSY 1H-1H eb0057a9 DMSO-d₆(+D₂O) BPC844

TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

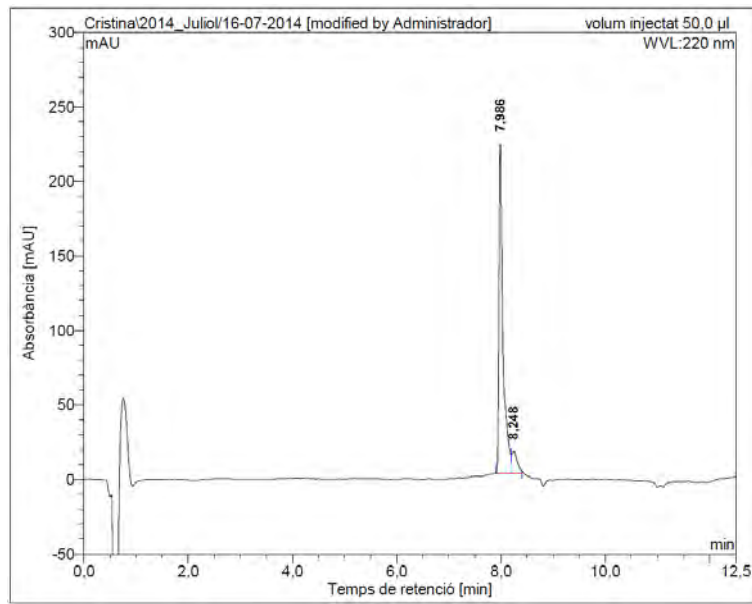
TOCSY (60ms mixing time) eb0057a9 DMSO-d6(+D2O) BPC844



C₁₁H₂₃CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC854)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

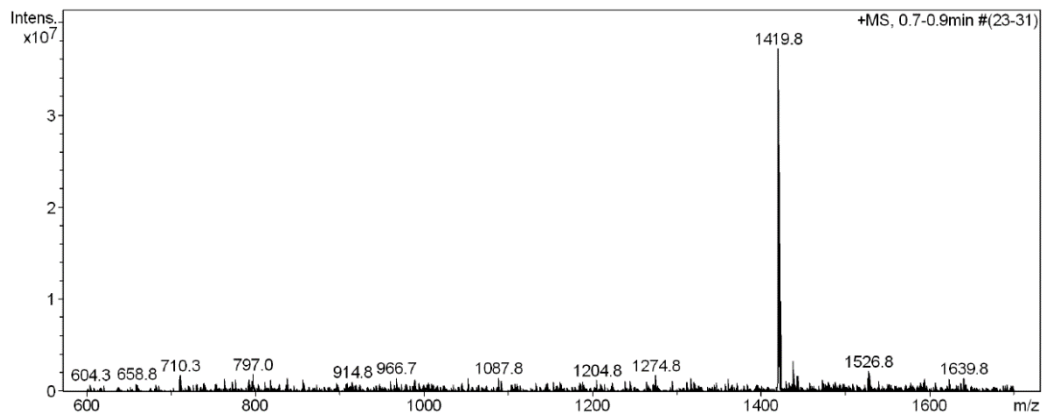
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,60	68,251	11,675	5,61
2	7,74	67,271	7,601	3,65
3	7,89	75,164	15,242	7,32
4	8,21	629,027	101,597	48,81
5	8,61	108,887	19,339	9,29
6	8,82	117,086	15,346	7,37
7	8,92	127,446	27,719	13,32
8	9,29	41,573	9,634	4,63
Total:		1234,705	208,154	100,00

HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

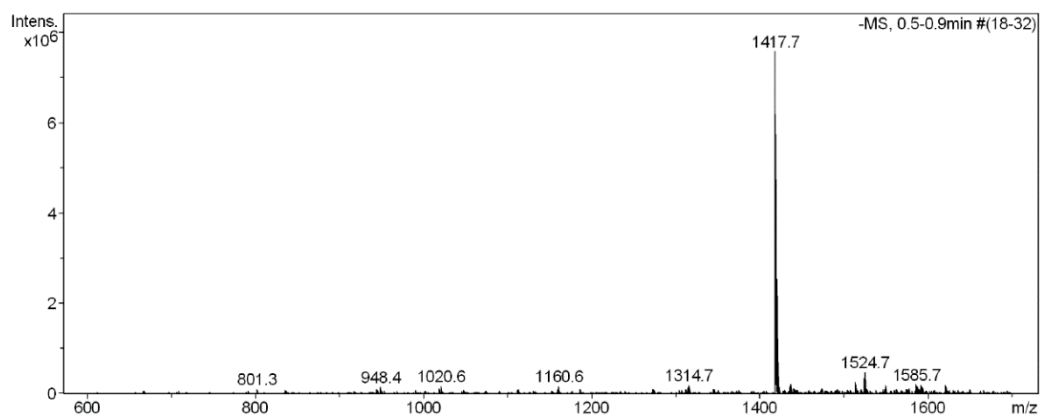


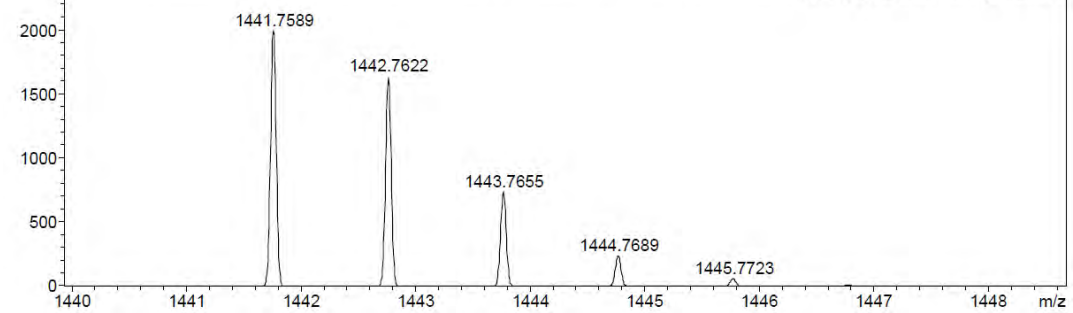
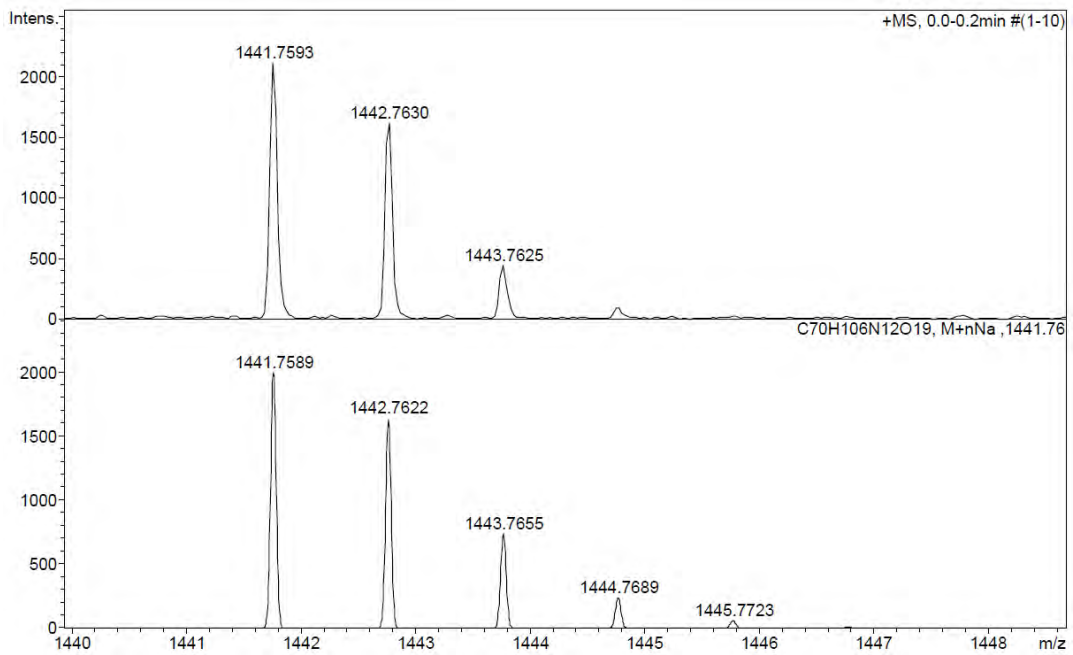
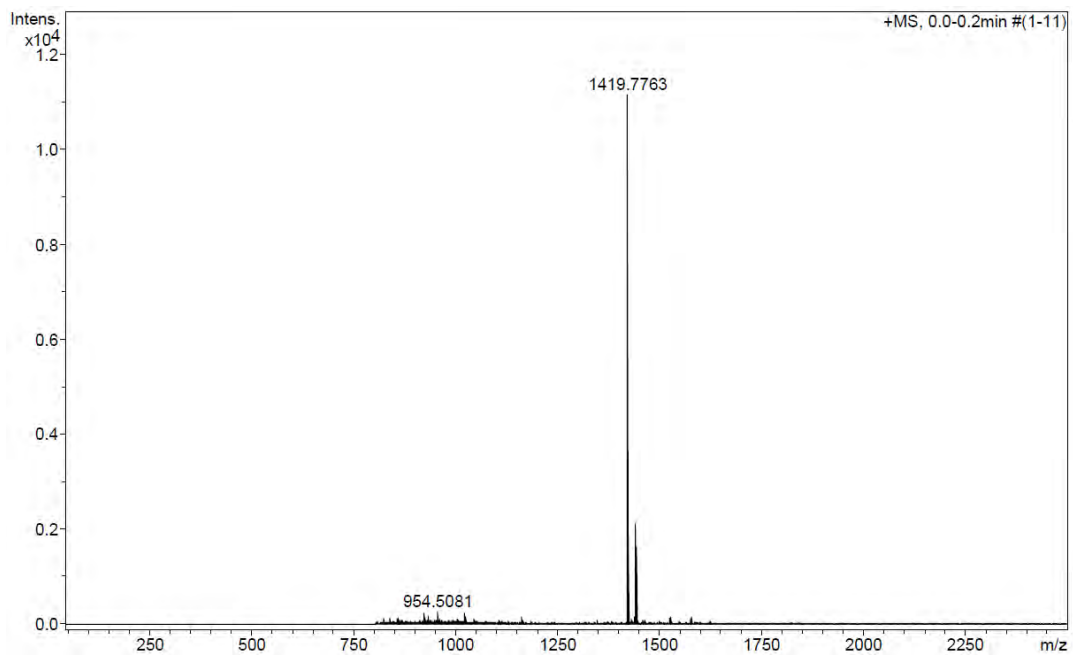
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,99	220,926	19,578	91,98
2	8,25	14,253	1,706	8,02
Total:		235,179	21,285	100,00

ESI-MS (m/z , +)

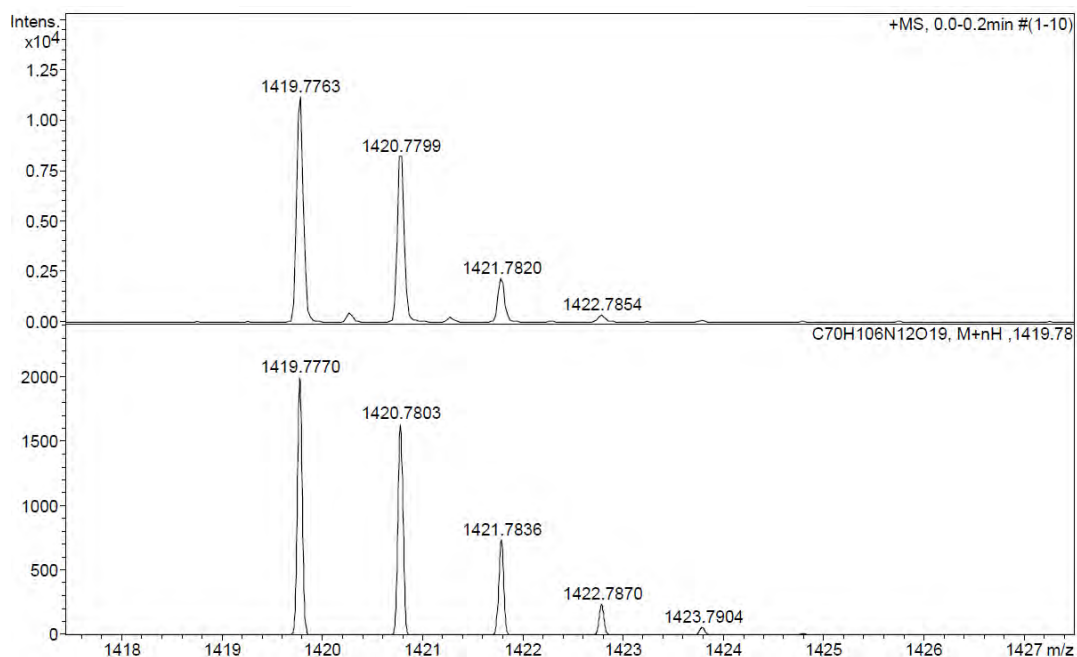


ESI-MS (m/z , -)

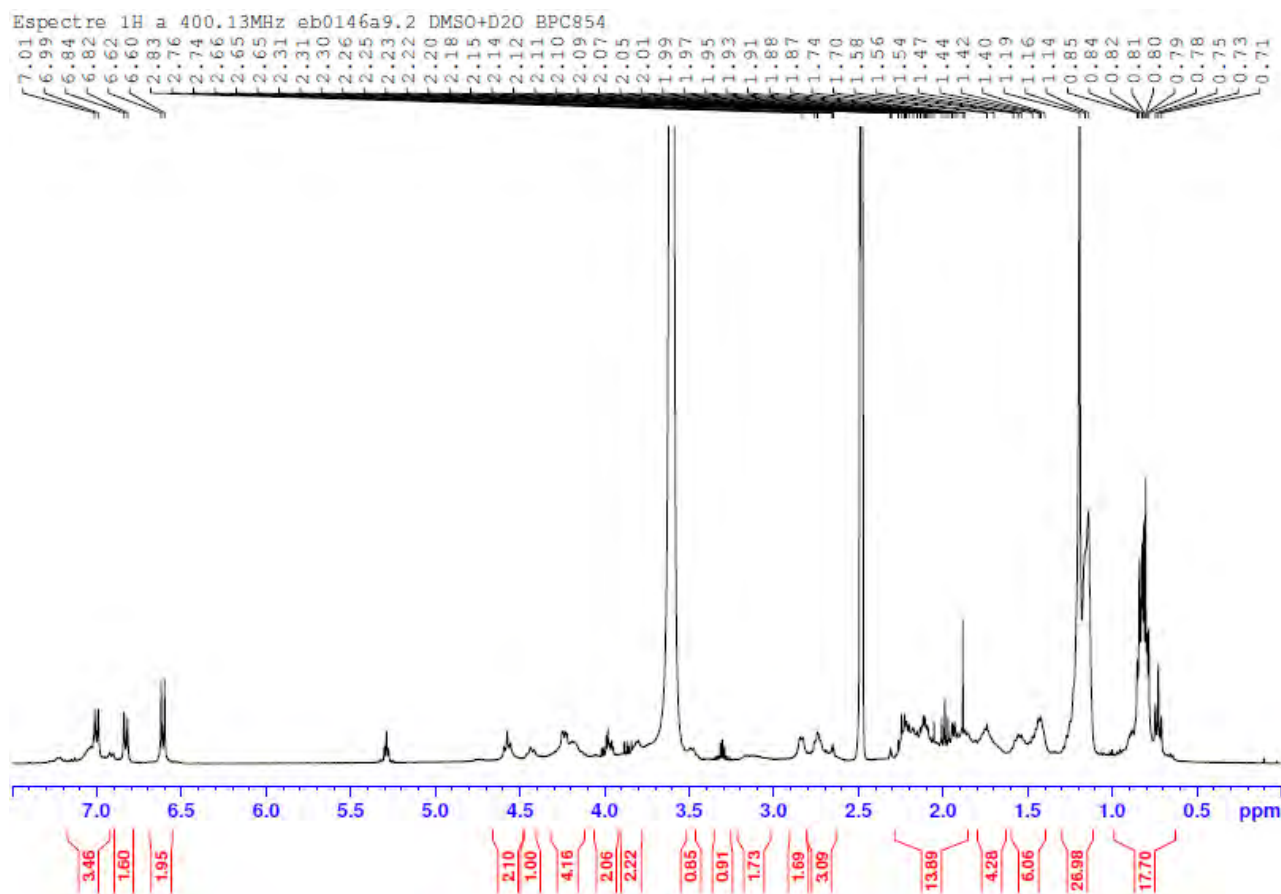


HRMS (m/z)

Annex: Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN

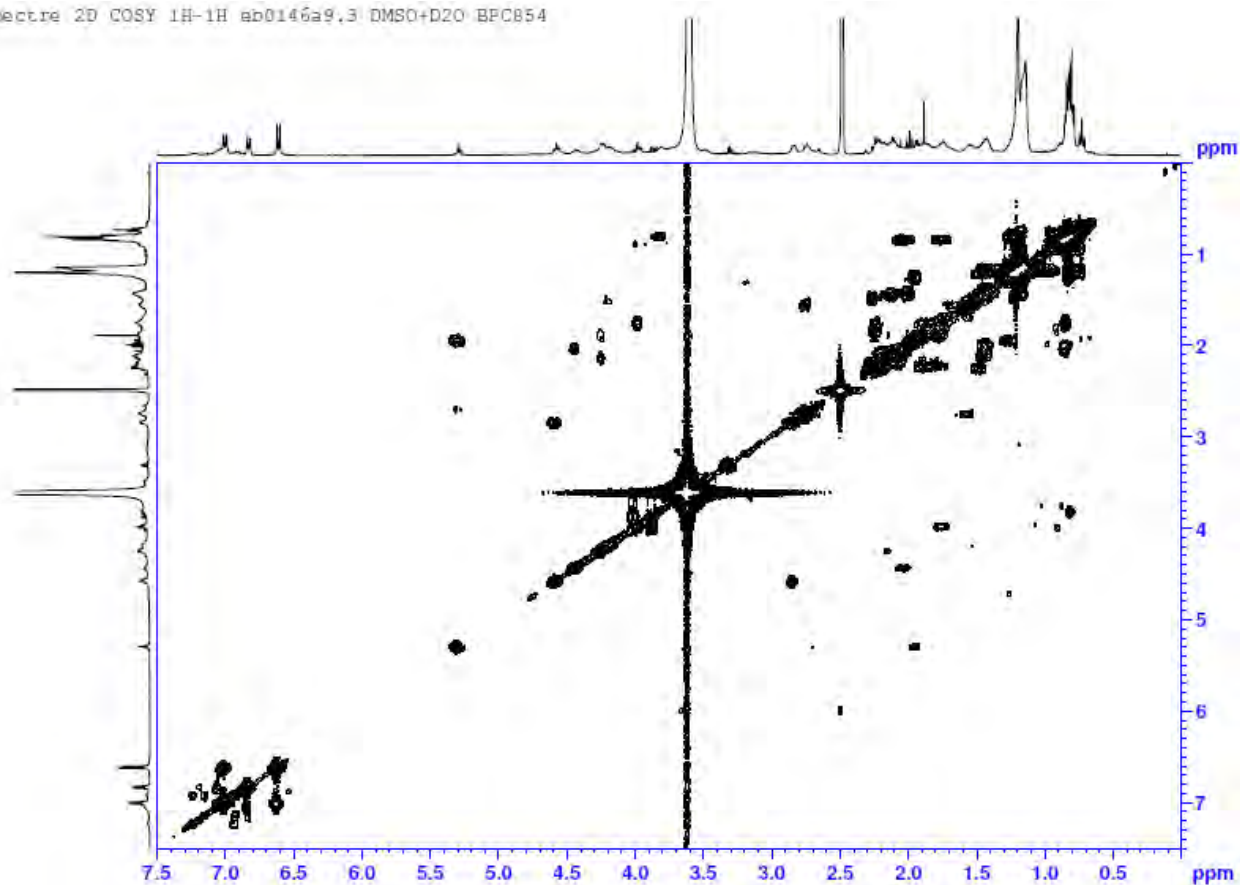


¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)



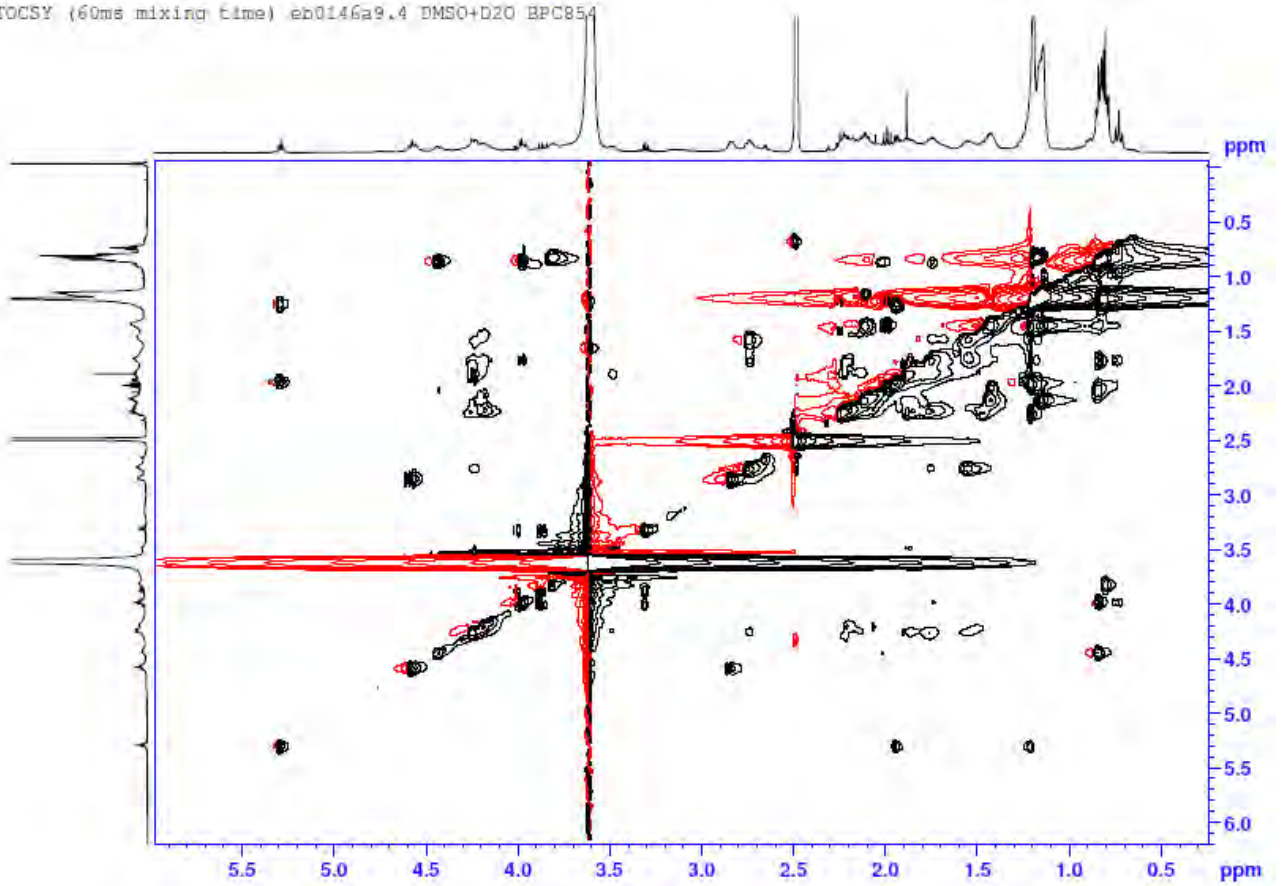
COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

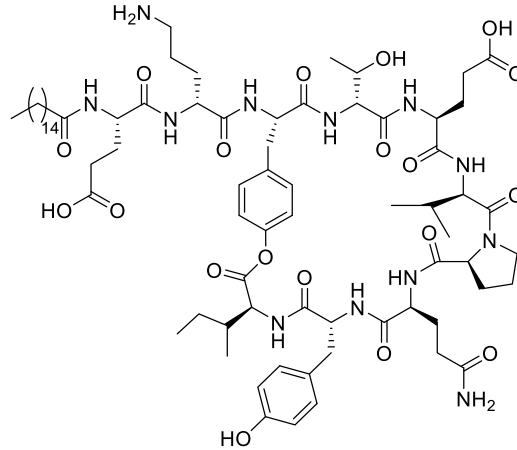
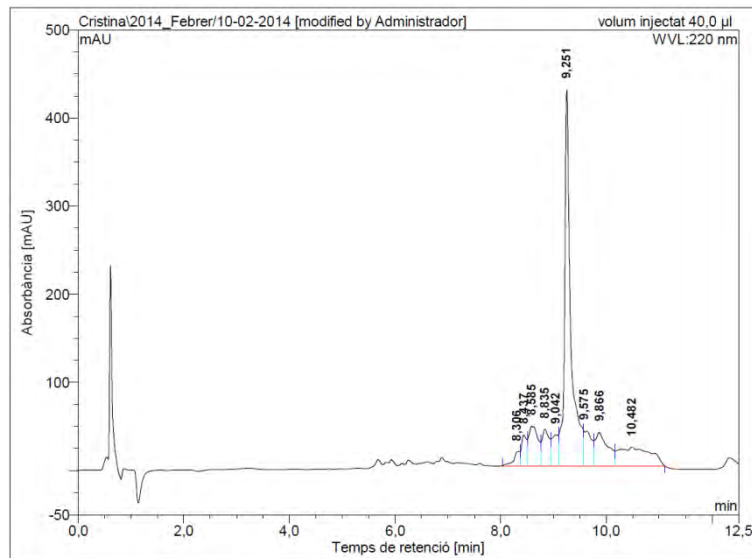
Espectre 2D COSY 1H-1H ab0146a9.3 DMSO+D2O BPC854



TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

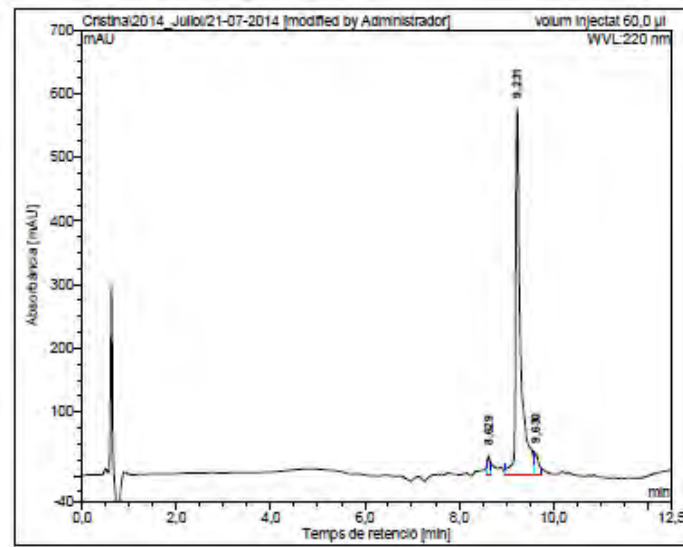
TOCSY (60ms mixing time) eb0146a9.4 DMSO+D2O BPC854



C₁₅H₃₁CO-Glu-D-Orn-Tyr(&)-D-Thr-Glu-D-Val-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-& (BPC856)HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)

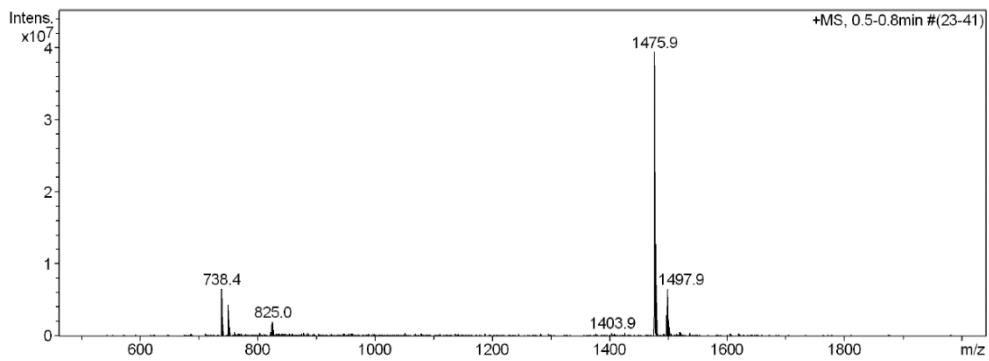
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,31	15,833	2,287	1,95
2	8,44	34,719	4,080	3,47
3	8,59	44,658	9,124	7,76
4	8,84	41,326	6,455	5,49
5	9,04	35,057	5,068	4,31
6	9,25	426,475	58,591	49,84
7	9,57	39,600	6,674	5,68
8	9,87	37,737	10,741	9,14
9	10,48	21,235	14,538	12,37
Total:		696,641	117,557	100,00

HPLC del peptid purificat ($\lambda=220$ nm)

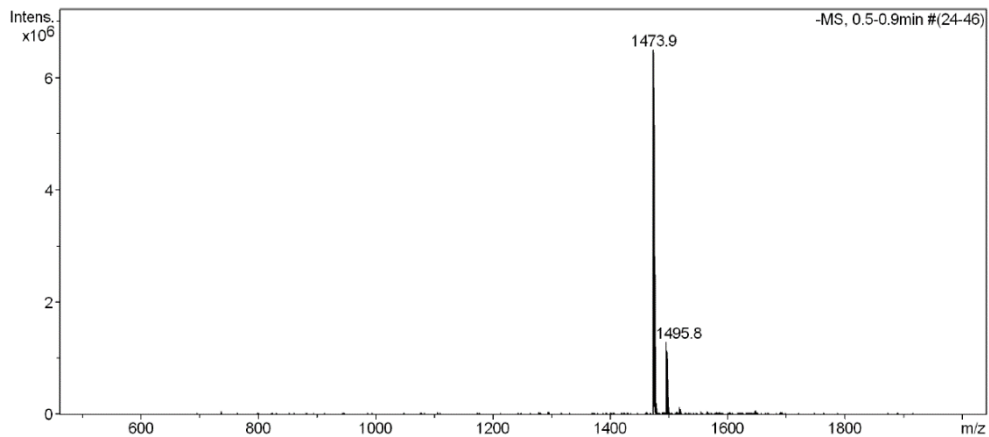


No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	8,63	30,870	2,184	2,89
2	9,23	575,618	69,894	92,59
3	9,63	34,041	3,405	4,51
Total:		640,529	75,473	100,00

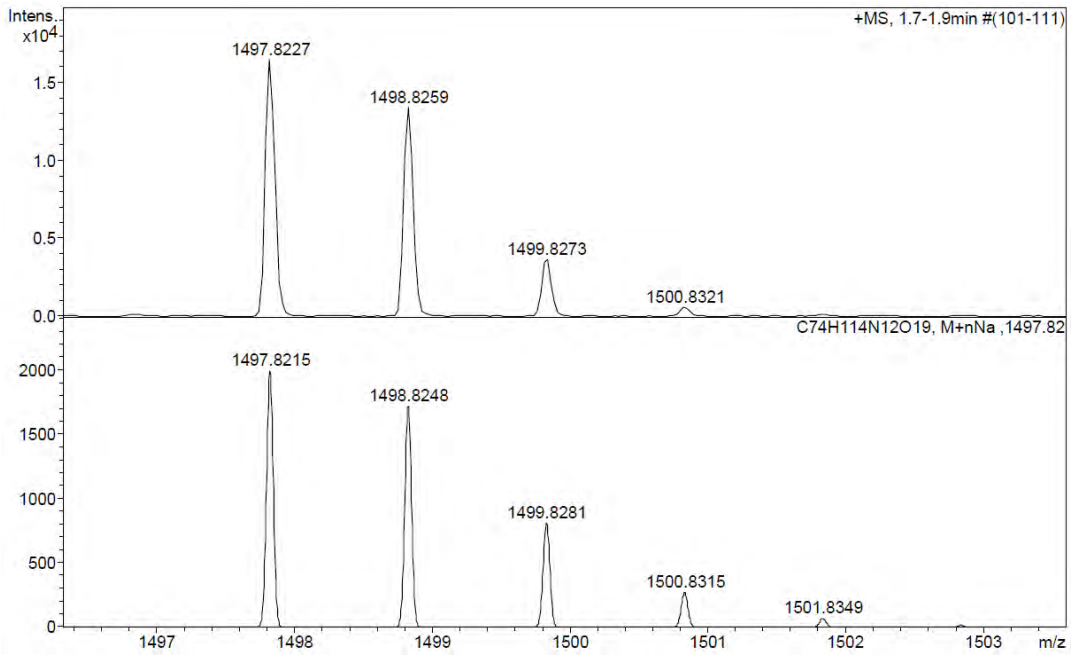
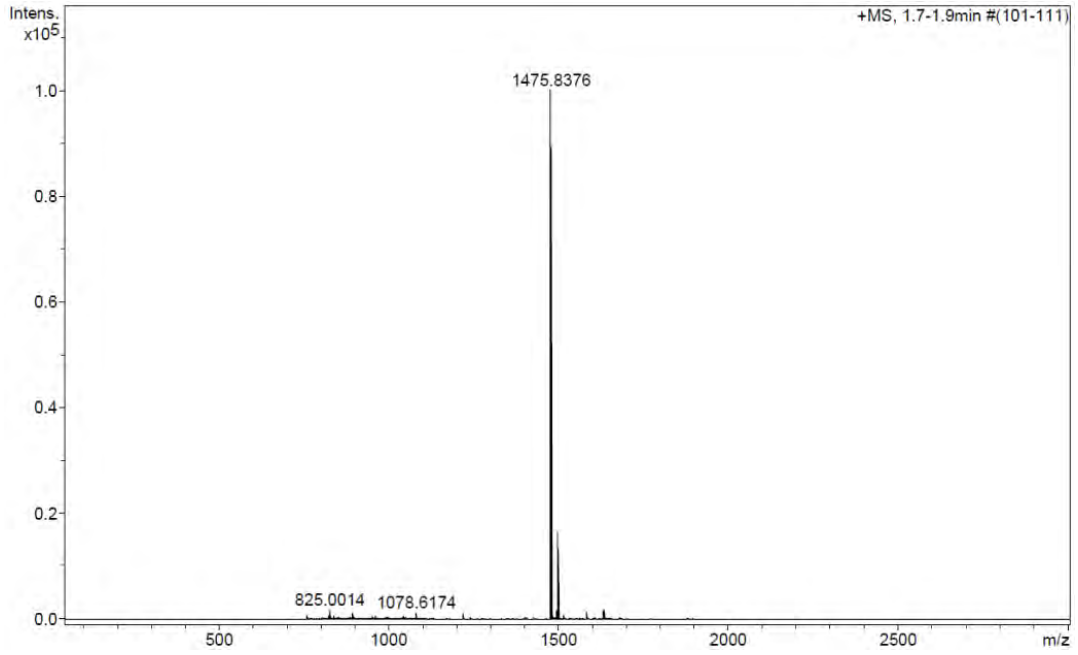
ESI-MS (m/z , +)



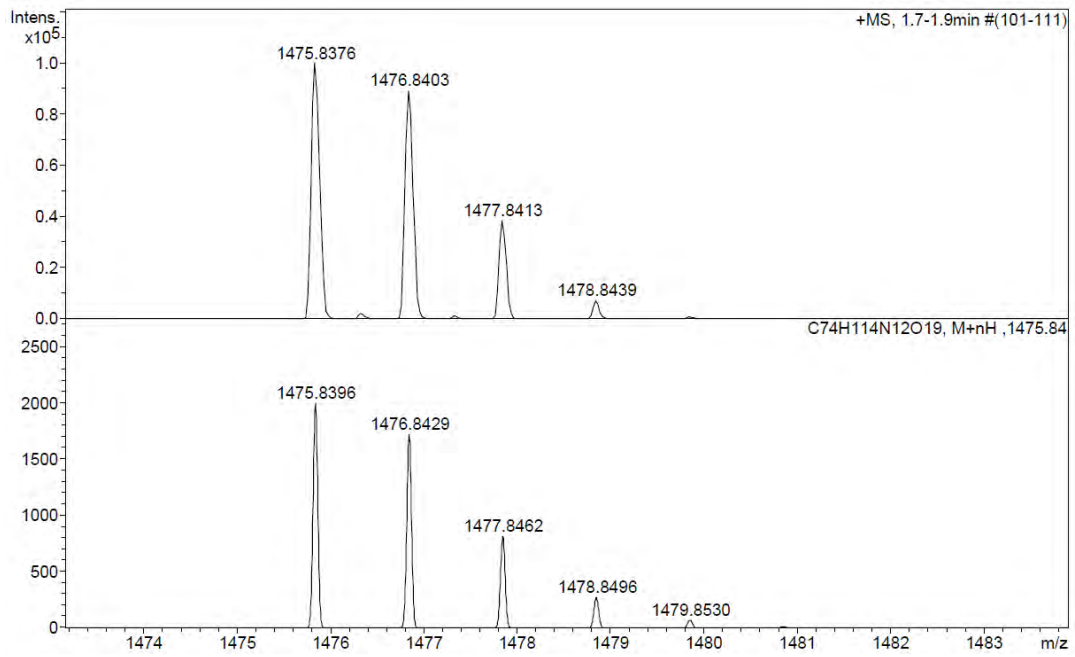
ESI-MS (m/z , -)



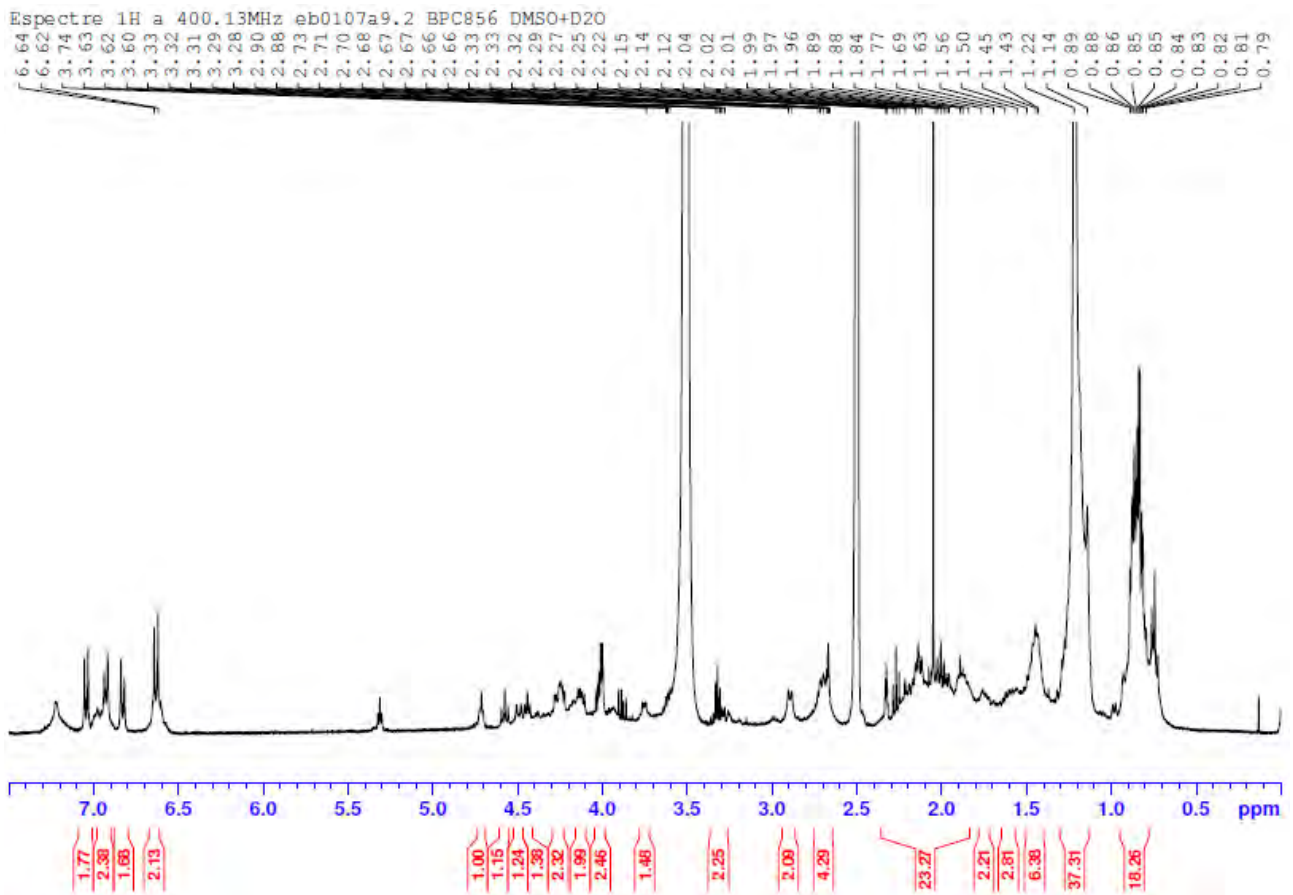
HRMS (m/z)



Annex: Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN

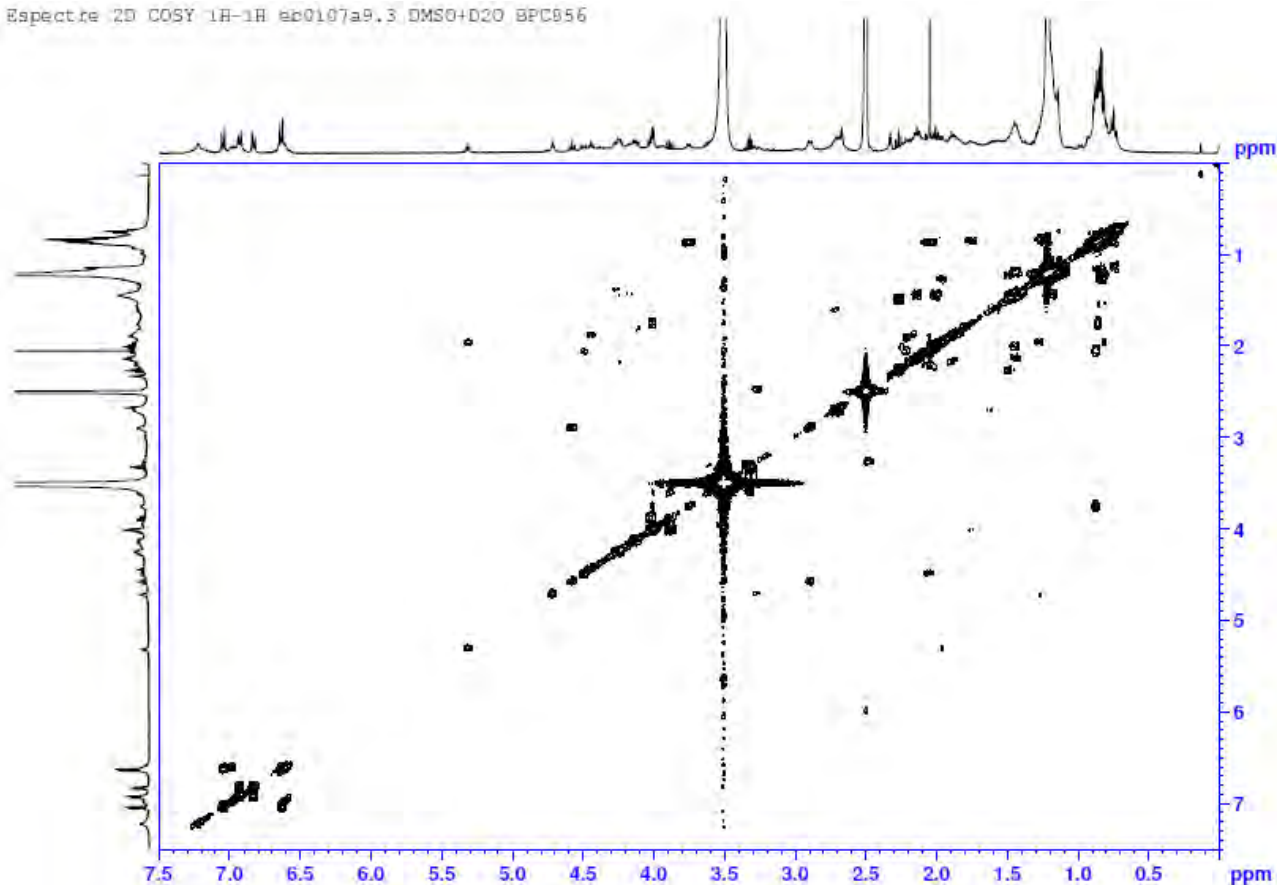


¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)



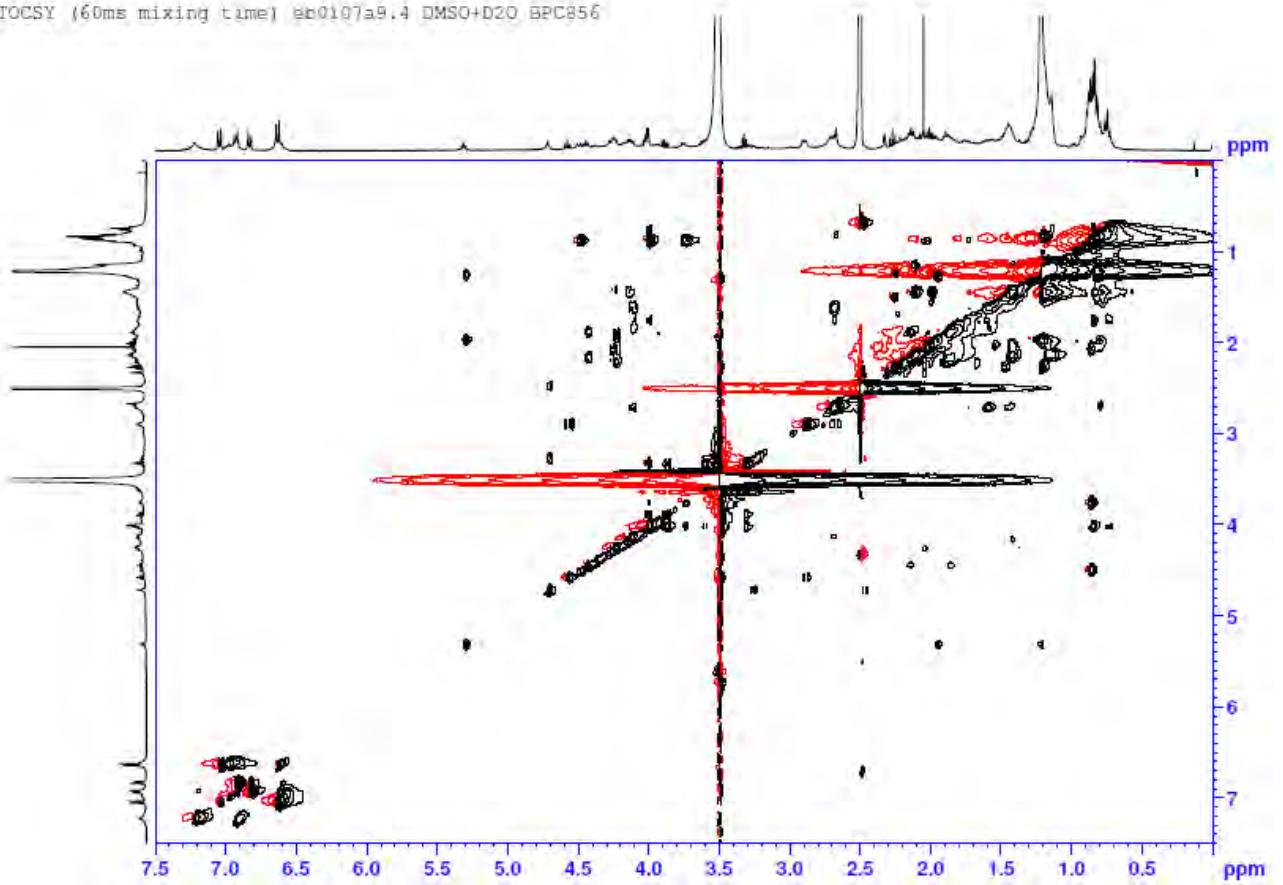
COSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

Espectre 2D COSY 1H-1H ep0107a9.3.DMSO+D2O BPC956



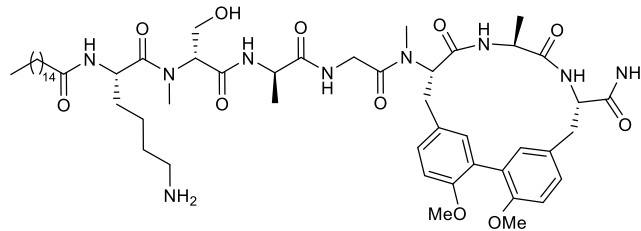
TOCSY (400 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ (ppm)

TOCSY (60ms mixing time) @b0107a9.4 DMSO+D2O BPC856

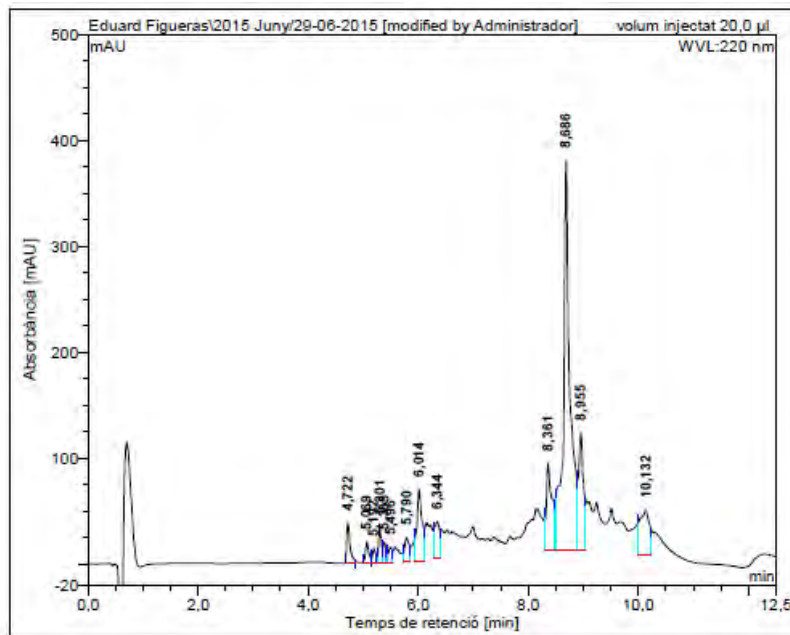


5 Ciclolipopèptid biarílic 20 derivat de les arilomicines

$C_{15}H_{31}CO$ -Lys-D-(NMe)Ser-D-Ala-Gly-(NMe)Tyr(3-&4-Me)-Ala-Tyr(3-&4-Me)-NH₂ (20)

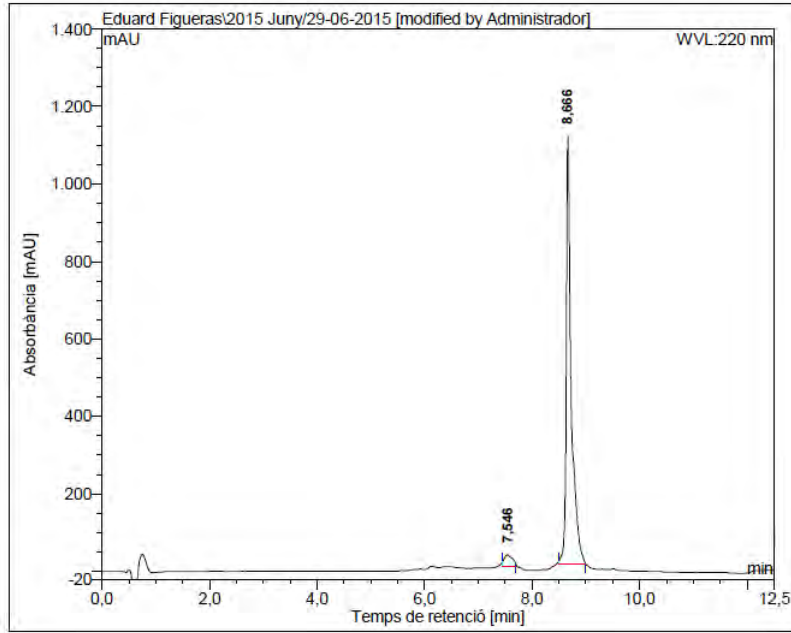


HPLC del cru del pèptid ($\lambda=220$ nm)



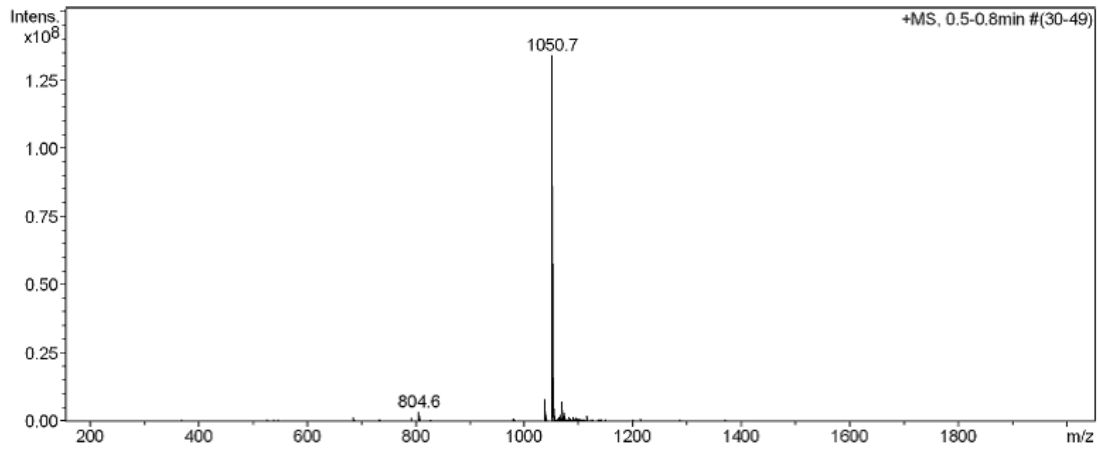
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	4,72	36,783	2,536	2,50
2	5,07	18,858	1,295	1,28
3	5,19	13,202	0,862	0,85
4	5,30	33,732	2,092	2,06
5	5,39	19,164	0,935	0,92
6	5,50	14,431	1,028	1,01
7	5,79	22,899	2,255	2,22
8	6,01	68,334	7,377	7,27
9	6,34	35,026	3,826	3,77
10	8,36	81,777	9,114	8,98
11	8,69	368,226	51,598	50,85
12	8,95	110,767	10,765	10,61
13	10,13	41,158	7,779	7,67
Total:		864,358	101,462	100,00

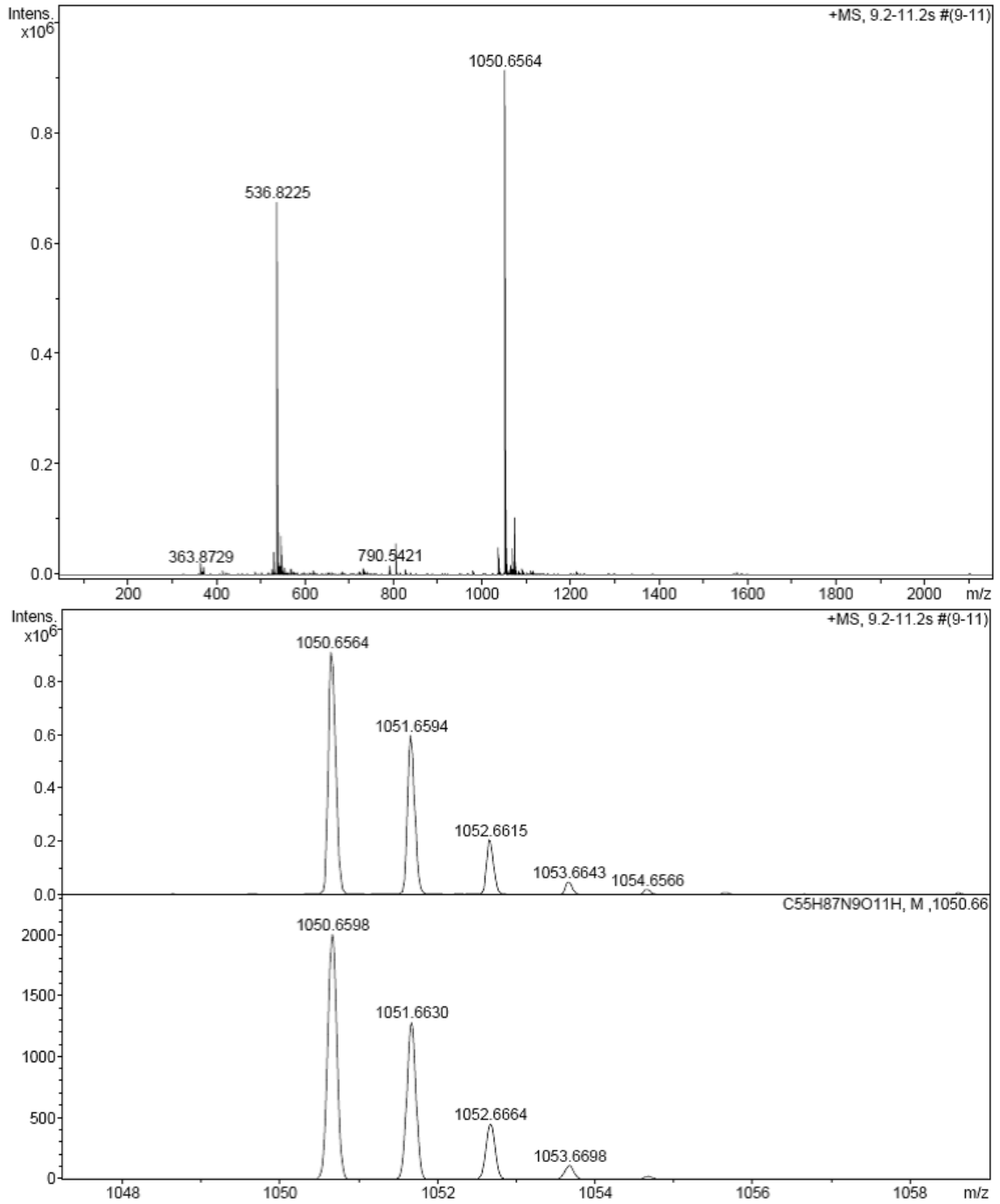
HPLC del pèptid purificat ($\lambda=220$ nm)



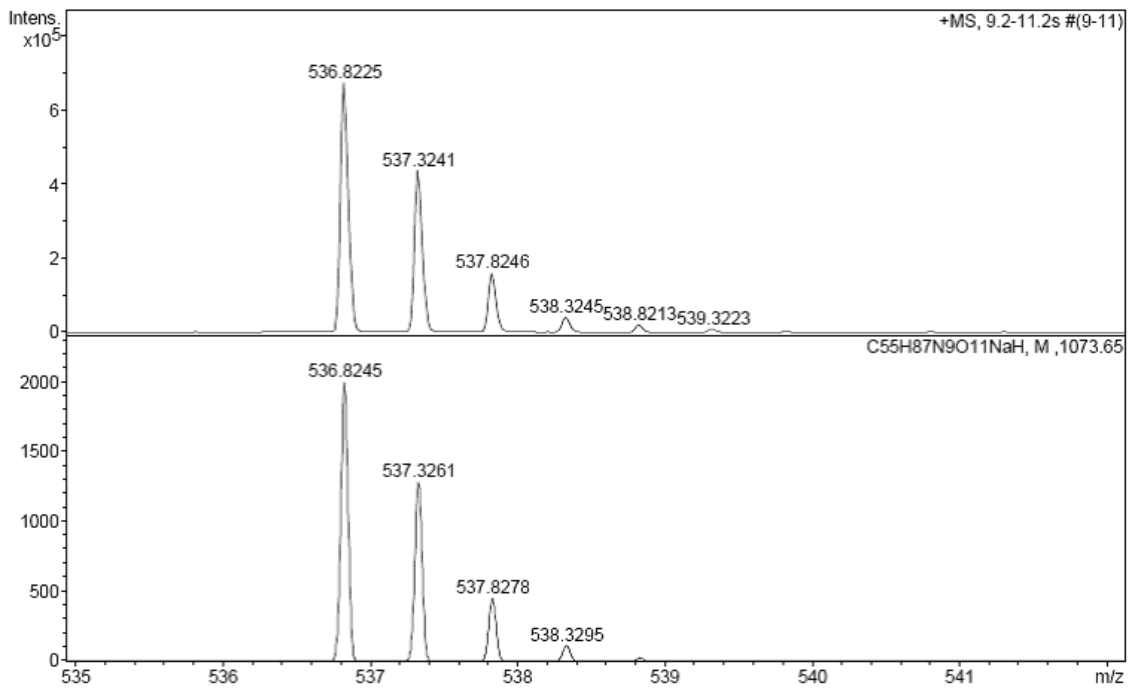
No.	Temps retenció min	alçada mAU	Area mAU*min	Area relativa %
1	7,55	29,941	5,277	4,22
2	8,67	1103,636	119,757	95,78
Total:		1133,577	125,034	100,00

ESI-MS (m/z)

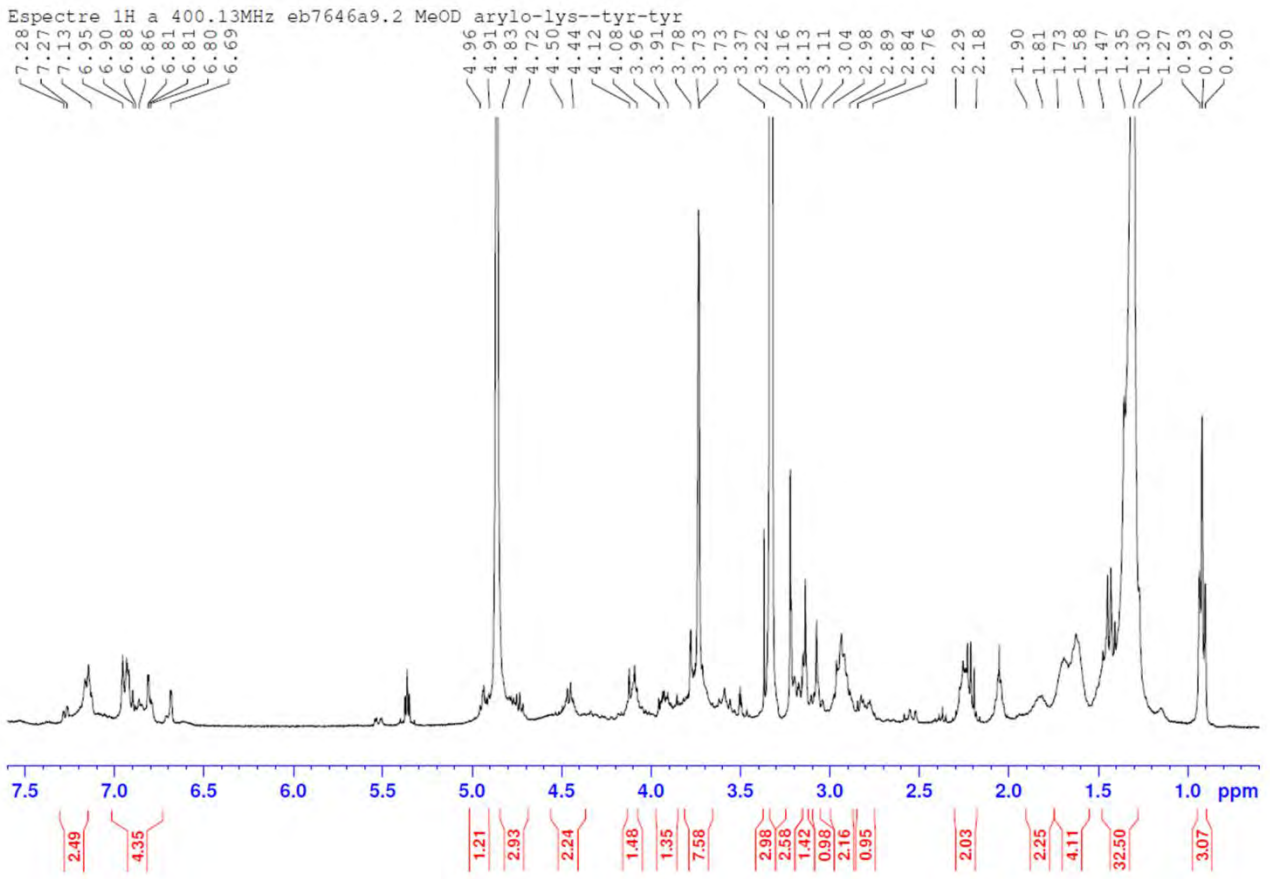


HRMS (m/z)

Annex: Caracterització de lipopèptids mitjançant RMN

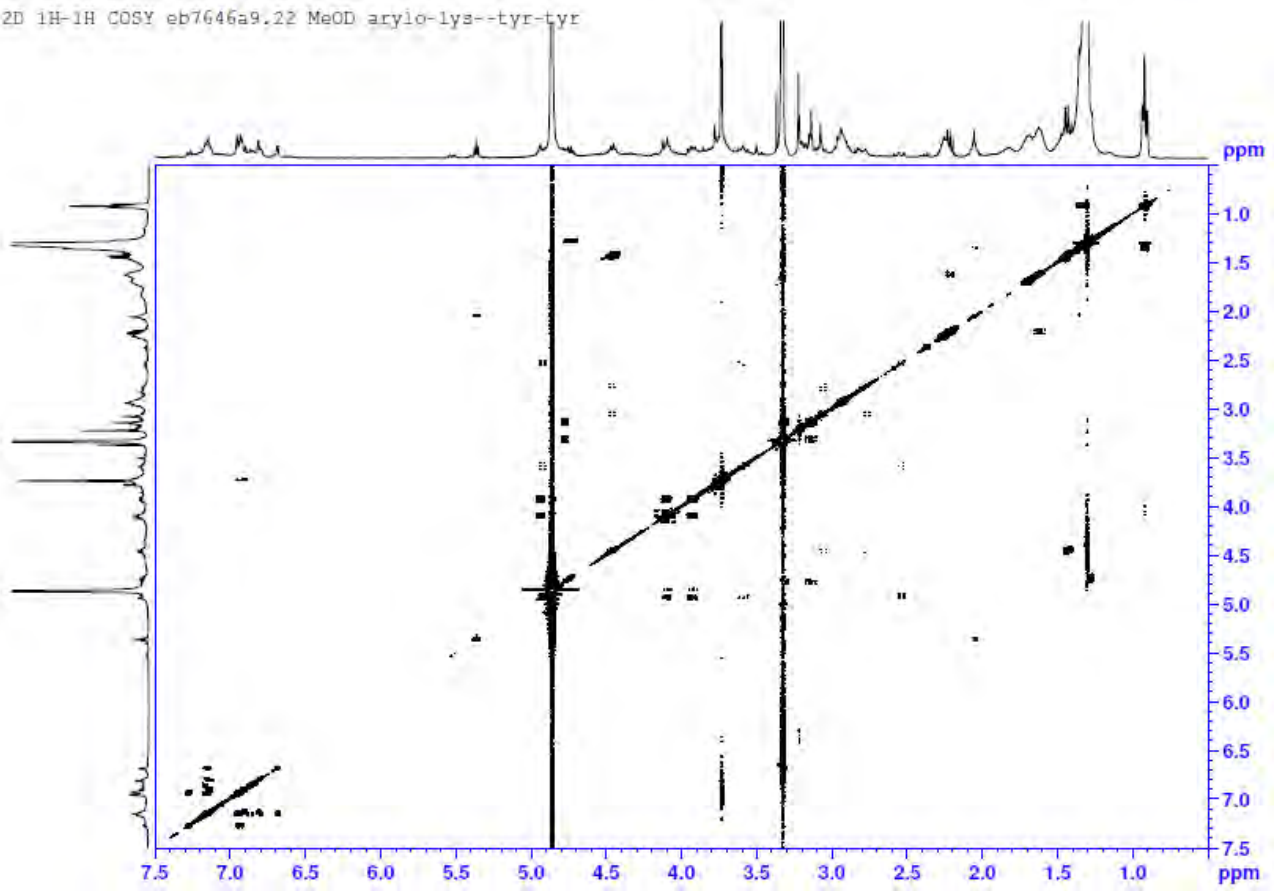


^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm)



COSY (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm)

2D 1H-1H COSY eb7646a9.22 MeOD aryl0-lys--tyr-tyr



TOCSY (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm)