UNIVERSITAT DE BARCELONA

Disseny, síntesi i avaluació biològica i biofísica d'anàlegs de polimixina

Maria Garcia Subirats

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Disseny, síntesi i avaluació biològica i biofísica d'anàlegs de polimixina

Maria Garcia Subirats

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

Director: Dr. Francesc Rabanal i Anglada
Departament de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

Agraïments

Sembla mentida, després de tant temps, escric per fi els agraïments de la tesi. Qui ho havia de dir! I em resulta mes complicat del què em pensava... Porto dies donant-li voltes, i al final he pensat que millor començar pel principi, quan va començar tota aquesta aventura, i serà més fàcil seguir el fil.

En primer lloc vull agrair al Francesc Rabanal l'oportunitat que em va donar de poder fer la tesi amb ell. Fa ja uns quants anys d'això, com passa el temps! Gràcies per endinsar-me en el món dels pèptids i de la fase sòlida, i gràcies per acompanyar-me fins aquí, ajudant-me aquests últims mesos en l'esprint final que ha suposat acabar aquesta tesi. Tot va començar en el grup 10-P, i no em puc oblidar d'aquells inicis al laboratori que recordo amb especial carinyo. Ha passat molta gent i he fet molts amics, dels que estic orgullosa de conservar, i que sempre que podem fem bromes i recordem vells temps, Moltes gràcies a tots, al grup 10-P, i al 10-O, quantes coses hem passat eh? I les que queden! També vull recordar als amics dels altres grups, i d'altres departaments amb els que vaig poder compartir la carrera, màster i tesi, i es que al final, els records, no són de química, si no de les hores de passadís, cafès, xerrades al hall, dinars, berenars....Gràcies per haver-me acompanyat en aquest camí!

Vull agrair també a la Yolanda Cajal i a la Mª Àngels Manresa que m'acollissin als seu laboratoris i m'ensenyessin a treballar amb liposomes i amb bacteris! Sense vosaltres tindria mitja tesi! Gràcies! em va agradar sortir de química i veure altres mons!

He de dir que tot això no hagués estat possible sense el suport de la meva família, que han estat sempre allà per ajudar-me, per animar-me, per consolar-me i per fer de cangur dels peques, cosa que els agrairé eternament, perquè estic segura que sinó no hagués pogut acabar. Gràcies per estar al meu costat!

Ahh i al Liam que encara no sap llegir i ja ho llegirà quan sigui gran, però cada dia em preguntava quantes pàgines em quedaven, i em deia "que et vagi bé mama amb el llibre", ets un sol!

Por último, Gracias David! La verdad es que no tengo palabras para agradecerte la paciencia infinita que has tenido. Gracias por estar siempre ahí, por animarme, por creer más en mi que yo misma, por hacerme reir cuando no quería...por quererme...Merci!

ABREVIATURES I ANNEXOS

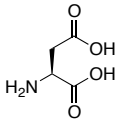
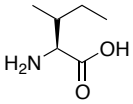
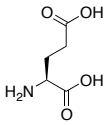
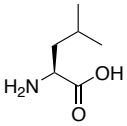
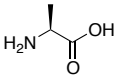
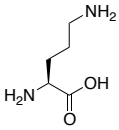
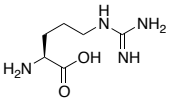
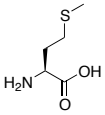
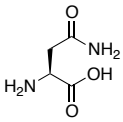
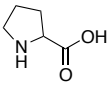
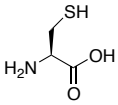
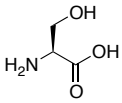
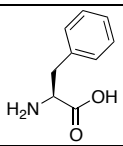
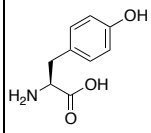
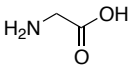
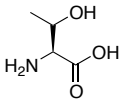
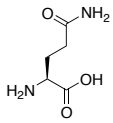
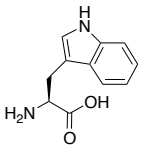
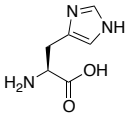
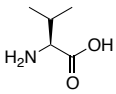
Abreviatures

AA	aminoàcid
AAA	anàlisi d'aminoàcids
AARI	aminoàcid de referència interna
ACN	acetonitril
Ac	acetil
Al	al·lil
Alloc	al·liloxicarbonil
AMP	antibiòtic peptídic
ATCC	American type culture collection
BAL	àcid 4-(4-formil-3,5-dimetoxyfenoxi) butanoic
Boc	tert-butoxicarbonil
^{t}Bu	tert-butil
Bz	benzil
CL	cardiolipina
Cl-Trt	resina clorur de 2-clorotritilpoliestirè
CMI	concentració mínima inhibitòria
DCC	*N,N´*-diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclormetà
Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil
DHB	àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DIEA	*N,N*-diisopropiletilamina
DIPCDI	*N,N'*-diisopropilcarbodiimida
DMAP	*N,N´*-dimetil-4-aminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
DSC	carbonat de N,N'-disuccinimidil
DOC	deoxicolat
EM ESI	espectrometria de masses d'ionització per electrosprai
EM MALDI-TOF	espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser asistida per matriu i anàlisi per temps de vol
eq	equivalent
f	funcionalització de la resina

F	fluorescència
FA	àcid gras (fatty acid)
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FRET	fluorescence resonance energy transfer
h	hora
HATU	hexafluorofosfat de N-òxid N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio]
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografia líquida de alta eficàcia
I	intensitat
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficàcia en fase reversa
LUV	liposoma unilamel·lar gran
MBHA	metilbenzhidrilamina
MDR	multidrug resistant
ME	membrana externa
MHB	medi de cultiu Mueller Hinton
MI	membrana interna o citoplasmatica
min	minut
MLV	liposoma multilamel·lar
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistent a meticilina
m/z	relació massa/càrrega
NBD-PE	N-(7-nitro-2-1,3-benzodiazol-4il-) dipalmitoïlfosfatidiletanolamina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil
PE	fosfatidiletanolamina
PG	fosfatidilglicerol
PM	pes molecular
POPG	1-palmitoïl-2oleoïlglicero-sn-3-fosfoglicerol
PS	poliestirè o fosfatidilserina
PTFE	politetrafluoroetilè (tefló)
p/v	pes/volum
PxB	polimixina B
PxBN	nonapèptid de polimixina B
PyBOP	hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfoni
PyrPG	1-hexadecanoïl-2-(pirendecanoïl)glicerol-sn-3-fosfoglicerol

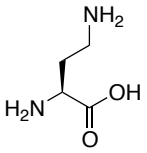
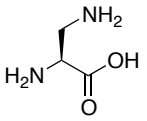
rpm	revolucions per minut
s	segons
sP	anàleg sintètic de polimixina
SPPS	síntesi de pèptids en fase sòlida
SUV	liposomes unilamel·lars petits
T	temperatura
t	temps
t.a.	temperatura ambient
TES	trietilsilà
TESBr	bromotrietilsilà
TFA	Àcid trifluoroacètic
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFMSA	àcid trifluorometansulfònic
THF	tetrahidrofurà
TIS	Triisopropilsilà
TMSBr	bromotrimetilsilà
TMSCl	clorotrimetilsilà
TMSOTf	trifluorometansulfonat de trimetilsilil
tr	temps de retenció
TRIS	tris(hidroximetil)aminometà
Trt	tritil
TSA	medi de cultiu: tripticasa soy agar
TSB	medi de cultiu: tripticasa soy broth
UV-Vis	ultravioleta-visible
v/v	volum/volum
VRE	*enterococcus* resistent a vancomicina
VRSA	*staphlylococcus aureus* resistent a vancomicina
WST-1	sal de tetrazole
Z	benziloxicarbonil

Annex 1 Aminoàcids. Codi de tres lletres, una lletra i estructura.

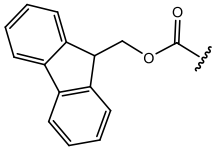
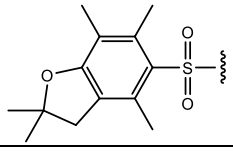
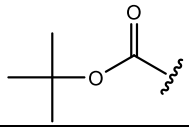
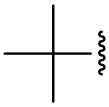
Aminoàcid	Estructura	Aminoàcid	Estructura
Àcid aspàrtic Asp D		Isoleucina Ile I	
Àcid glutàmic Glu E		Leucina Leu L	
Alanina Ala A		Lisina Lys K	
Arginine Arg R		Metionina Met M	
Asparagina Asn N		Prolina Pro P	
Cisteïna Cys C		Serina Ser S	
Fenilalanina Phe F		Tirosina Tyr Y	
Glicina Gly G		Treonina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

Annex 2: Aminoàcids especials.

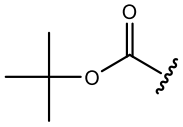
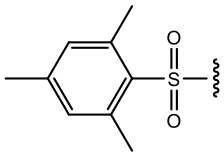
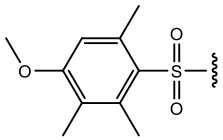
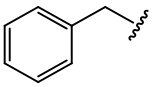
codi de tres lletres i estructura

Aminoàcid	Estructura
Àcid diaminobutíric Dab	
Àcid diaminopropiònic Dap	

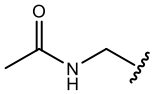
Annex 3: grups protectors en l'estratègia Fmoc/^{t}Bu

Aminoàcid	Protector	Estructura
N-terminal de tots els aminoàcids	Fmoc	
Arginina, Arg, R	Pbf	
Àcid diaminobutíric, Dab Àcid diaminopropiònic, Dap	Boc	
Treonina, Thr, T	^{t}Bu	

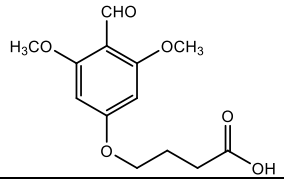
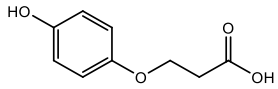
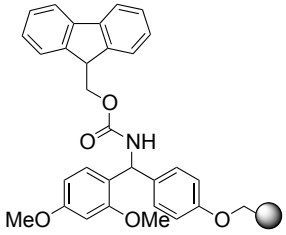
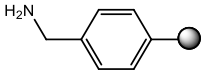
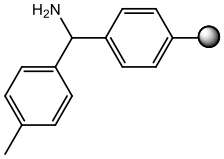
Annex 4: grups protectors en l'estratègia Boc/Bzl

Aminoàcid	Protector	Estructura
N-terminal de tots els aminoàcids	Boc	
Arginina, Arg, R	Mts	
	Mtr	
Treonina, Thr, T	Bzl	

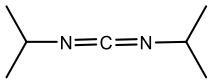
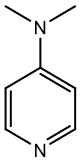
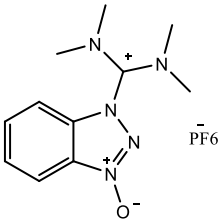
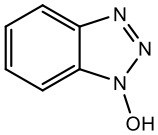
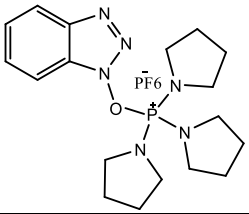
Per a la cisteïna s'ha emprat un grup protector ortogonal a Fmoc/tBu i Boc/Bzl

Aminoàcid	Protector	Estructura
Cisteïna	Acm	

Annex 5: suports sòlids i espiadors bifuncionals emprats en la síntesis en fase sòlida

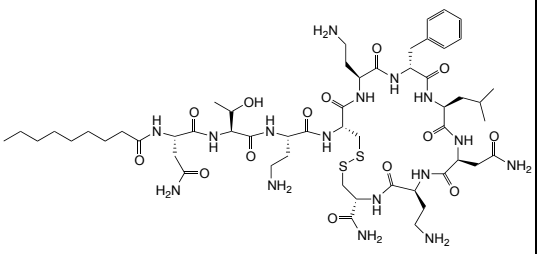
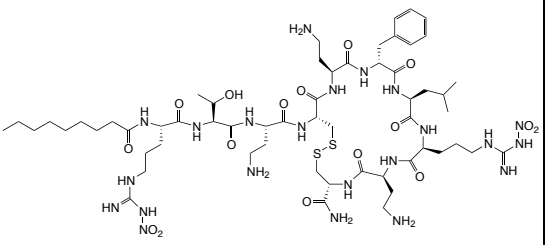
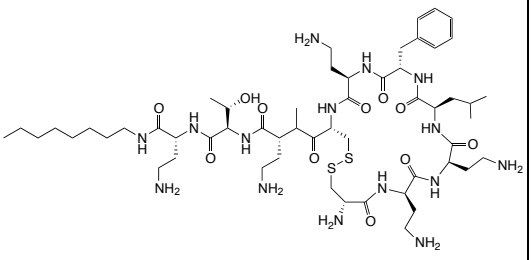
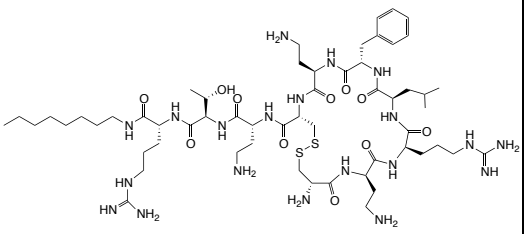
Nom	Estructura
Àcid 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butíric, BAL linker	
Àcid 3-(4-hidroxifenoxi)propiònic	
Resina Rink amida	
Resina aminometil, AM	
Resina para-metilbenzhidrilamina, MBHA	

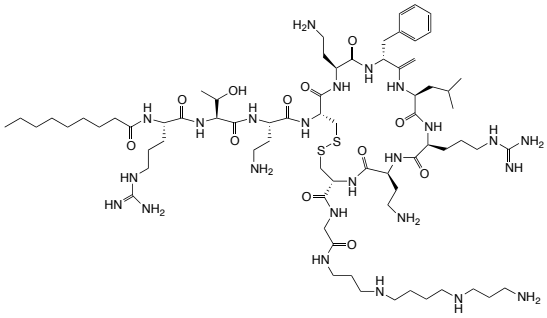
Annex 6: Agents acoblants i additius emprats en la síntesis en fase sòlida

Abreviació	Estructura	Nom
DIPCDI		N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMAP		N,N'-dimetilaminopiridina
HATU		Hexafluorofosfat de N-òxid de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanamini
HOBt		1-hidroxi-benzotriazole
PyBOP		Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfoni

Annex 7: Estructura dels pèptids presents en el treball

Pèptid	Codi seqüència	Estructura
PxB		
1 sP-B	nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys	
2 sP-2Arg	nonanoïl-Arg-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys]	
3 sP-2Dap	nonanoïl-Dap-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dap-Dab-Cys]	
4 sP-2His	nonanoïl-His-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-His-Dab-Cys]	

5 sP-2Asn	nonanoïl-Asn-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Asn-Dab-Cys]	
6 sP-2Arg(NO2)	nonanoïl-Arg(NO2)-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg(NO2)-Dab-Cys]	
7 retro-sP-B	*ciclo(S-S)*[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DDab-DThr-DDab-octilamida	
8 retro sP-2Arg	*ciclo(S-S)*[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DDab-DThr-DArg-octilamida	

9 conjugat PxB-espermina	nonanoïl-Arg-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-espermida	

ÍNDEX

ABREVIATURES I ANNEXOS ..... **VII**

ÍNDEX **21**

1. INTRODUCCIÓ **27**

1.1. ELS PÈPTIDS COM FÀRMACS 29

1.2. EL PROBLEMA DE LA RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS 32

1.3. ANTIBIÒTICS PEPTÍDICS (AMP) 35

1.3.1. Mecanisme d'acció dels AMP catiònics *36*

1.3.2. Les polimixines *39*

1.3.2.1. Estructura de les polimixines 39

1.3.2.2. Activitat i aplicacions clíniques de les polimixines 40

1.3.2.3. Mecanisme d'acció de les polimixines 42

1.3.2.4. Estructura de les membranes del bacteris Gram-negatius 42

1.3.2.5. Mecanisme d'acció de la polimixina B: Interacció amb les membranes bacterianes 44

1.3.2.6. Mecanisme de resistència a les polimixines 47

1.3.2.7. Complex LPS - Polimixina 47

2. OBJECTIUS **53**

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ **57**

3.1. ANTECEDENTS SOBRE LA SÍNTESI DE POLIMIXINES 59

3.2. ESTUDI DE LES RELACIONS ESTRUCTURA ACTIVITAT EN POLIMIXINES 63

3.2.1 Substitucions dels residus Dab i modificacions de la cadena lateral . *64*

3.2.2. Modificacions de les regions hidrofòbiques *66*

3.2.3. Anàlegs de polimixina: modificacions de l'esquelet peptídic *69*

3.2.4. Anàlegs de polimixina: modificacions en el tripèptid lineal *70*

3.2.5. Altres anàlegs de polimixina *71*

3.3. DISSENY NOUS ANÀLEGS 72

3.3.1. Disseny d'anàlegs de polimixina per substitució: modificació de la basicitat dels residus 1 i 8 ..... *75*

3.3.2. Disseny dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina: aproximació retroinverso. *77*

3.3.3. Disseny d'un anàleg conjugat de polimixina amb espermina. *79*

3.4. SÍNTESIS DELS ANÀLEGS DE POLIMIXINA 80

3.4.1. Síntesi dels primers anàlegs de polimixina *80*

3.4.2. Síntesi dels anàlegs de polimixina per substitució (1-6) *82*

3.4.3. Síntesis dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina. *88*

Estratègia 1: síntesi d'anàlegs retroenantiomèrics per desplaçament nucleòfil amb octilamina 89

Estratègia 2: síntesis dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina amb un espaiador bifuncional tipus BAL i escissió per acidòlisi 92

3.4.4. Síntesis de l'anàleg conjugat PxB-espermina *95*

3.5. AVALUACIO BIOLÒGICA DELS ANÀLEGS DE PXB 97

3.5.1. Estudi de l'activitat antimicrobiana dels anàlegs de la PxB *97*

3.5.2. Avaluació de la toxicitat dels anàlegs de polimixina *103*

3.6. ESTUDI BIOFÍSIC DELS ANÀLEGS DE LA POLIMIXINA B 106

3.6.1. Liposomes com a model de membrana 106
3.6.1.1. Tipus de liposomes 107
3.6.1.2. Preparació de liposomes 109
3.6.2. Monocapes com a models de membrana..... 113
3.6.3. Estudi biofísic de la PxB i els seus anàlegs 116
3.6.3.1. Determinació de l'agregació de vesícules per dispersió de la llum 118
3.6.3.2. Determinació de la mescla de lípids entre membranes per fluorescència.....120
3.6.3.3. Determinació de fenòmens de permeabilització i/o flip-flop en vesícules unilamel·lars per fluorescència 123
3.6.3.4. Determinació de la unió dels pèptids al LPS: cinètiques d'absorció a àrea constant.....125
3.7. DISCUSSIÓ: RELACIÓ ENTRE ACTIVITAT ANTIMICROBIANA I COMPORTAMENT BIOFÍSIC 128
4. CONCLUSIONS 132
5. PART EXPERIMENTAL..... 135
5.1. MATERIALS I MÈTODES 137
5.1.1. Dissolvents i reactius 137
5.1.2. Instrumentació 139
5.1.3. Mètodes en la síntesi de pèptids en fase sòlida..... 140
5.1.3.1.Consideracions generals.....140
5.1.3.2. Mètodes analítics 140
Assaig de ninhidrina qualitatiu (o test de Kaiser) [189] 140
Assaig de cloranil[190] 141
Test de fenols sobre resina 141
Hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids 142
Cromatografia líquida d'alta ressolució 142
Espectrometria de masses 143
5.1.3.3. Protocols de síntesi emprant l'estratègia de protecció Boc/Bzl.....144
Acondicionament de la resina.....144
Acoblament de l'aminoàcid de referència interna AARI , altres aminoàcids i grup espaiador bifuncional.....144
Acoblament del primer aminoàcid mitjançant un enllaç de tipus èster.4 145
Acetilació del N-terminal (capping).....145
Eliminació grup protector Boc.....146
Acoblament d'aminoàcids emprant PyBOP amb neutralització in situ.....146
5.1.3.4. Protocols de síntesi emprant l'estratègia de protecció Fmoc/tBu 146
Acondicionament de la resina.....146
Acoblament del grup espaiador bifuncional linker 146
Acoblament de l'octilamina sobre el BAL linker per aminació reductiva.....147
Acoblament d'aminoàcids.....147
Eliminació del grup Fmoc 148
Quantificació del grup Fmoc 148
Ciclació del pèptid per formació d'un pont disulfur.....149
Escissió del pèptid de la resina.....150
Purificació dels pèptids 151
5.1.7 Avaluació de l'activitat biològica: determinació de la concentració mínima inhibitòria (CMI) 151
5.1.8 Estudi biofísic..... 153
5.1.8.1. Preparació del tampó TRIS, 1M pH8.0.....153

5.1.8.2. Preparació dels liposomes 153
Preparació dels liposomes de POPG 153
Preparació dels liposomes POPG-30%PyPG 153
Preparació dels liposomes POPG-2.5%NBD-PE 154
5.1.8.3. Determinació de l'agregació de vesícules per dispersió de la llum a 90º 154
5.1.8.4. Determinació de la mescla de lípids entre membranes per fluorescència del pirè 154
5.1.8.5. Determinació de l'accessibilitat dels fosfolípids per fluorescencia en liposomes marcats amb el grup NBD 155
5.1.8.6. Cinètiques d'inserció dels pèptids en monocapes de lps 156
5.2. EXPERIMENTAL 157
5.2.1. Síntesi d'anàlegs per substitució de polimixina (anàlegs 1-5) 157
Síntesi de l'anàleg 1, sp-B: nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys] 157
Síntesi de l'anàleg 2, sp-2Arg: nonanoïl-Arg-Thr-Dab-cyclo(S-S)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys] 158
Síntesi anàleg 3: sp-2Dap, nonanoil-Dap-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dap-Dab-Cys] 159
Síntesi anàleg 4, sp-2His : nonanoil-His-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-His-Dab-Cys] 160
Síntesi anàleg 5, sp-2Asn : nonanoil-Asn-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Asn-Dab-Cys] 161
Síntesi de l'anàleg 6, sp-2Arg(NO_2): nonanoil-Arg(NO_2)-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg(NO_2)-Dab-Cys] 162
Síntesi d'anàlegs retroenantiòmers de polimixina: atac nucleòfil amb octilamina 163
Síntesi de l'anàleg 7, retro-sP-B: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DThr-DDab-octilamida pel mètode 1 164
Síntesi de l'anàleg 8, sPB-retroenantio 2ARG: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DThr- DArg- octilamida pel mètode 1 164
Síntesi d'anàlegs retroenantiòmers de polimixina: síntesi sobre bal linker i resina am. 165
Síntesi de l'anàleg 7, retro sP-B: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys] DThr- DDab- octilamida pel mètode 2 166
Síntesi de l'anàleg 8, retro sP-*2Arg: cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe- DDab-DCys] DThr- DArg- octilamida pel mètode 2 166
Síntesi de l'anàleg 9, conjugat de polimixina i espermina, sP-2Arg-G-espermida 167

6. BIBLIOGRAFIA 169

1. INTRODUCCIÓ

1.1.ELS PÈPTIDS COM FÀRMACS

Els pèptids són biomolècules presents arreu dels sistemes vius. Són substàncies de vital importància que desenvolupen innumerables funcions a nivell fisiològic i cel·lular, principalment senyalització i regulació de processos fisiològics com ara com immunitat i defensa, estrès, creixement cel·lular, homeòstasi, i reproducció.[1]

Aquestes molècules presenten la particularitat de ser altament selectives, interaccionen específicament amb la seva diana biològica concreta, de manera que no provoquen reaccions no desitjades amb altres dianes. També tenen un ventall d'actuació molt ampli i intervenen a nivell de molts processos bioquímics i moltes dianes diferents. Presenten a més una molt baixa toxicitat, ja que els subproductes metabòlics que generen són els aminoàcids, les seves unitats monomèriques, components naturals i imprescindibles en tots els organismes.

Malauradament, presenten una sèrie d'inconvenients a nivell fisiològic. Són relativament poc estables: les prop de 600 proteases[2,3] que conté el cos humà hi actuen de seguida i hidrolitzen ràpidament el pèptid, a nivell oral es força important aquesta situació ja que fa que la seva biodisponibilitat sigui molt limitada. Un altre desavantatge és la poca permeabilitat a nivell de membrana que presenten aquestes molècules. Aquests inconvenients, juntament amb uns elevats costos de producció, degut a la química particular que requereixen per a la seva síntesis, constituïen motius suficients per a no considerar els pèptids com a bons candidats terapèutics en el llarg procés de recerca de nous fàrmacs.

Malgrat això, en els darrers anys, amb els nous recursos biotecnològics, s'han trobat maneres d'abordar aquests problemes. En la Figura 1.1 es mostren els diferents tipus de síntesis de pèptids a nivell industrial.

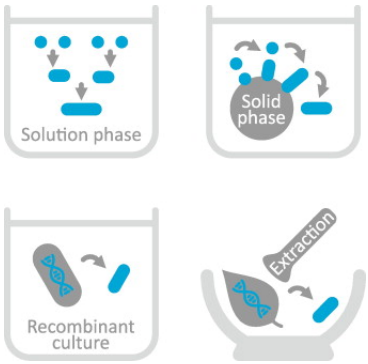


Figura 1.1. Esquema dels diferents tipus de síntesi de pèptids a nivell industrial. Es poden obtenir per síntesis química, en solució o en fase sòlida, o en una combinació d'ambdues estratègies. També per mètodes de microbiologia recombinant, i finalment per extracció directa de la font natural. Font Uhlig 2014

A partir de la invenció de la síntesis de pèptids en fase sòlida (SPPS) per Merrifield l'any 1963 [4] la síntesis dels pèptids es va veure simplificada enormement. Les tedioses estratègies de protecció i desprotecció de grups funcionals, van esdevenir més senzilles, cosa que va facilitar la mecanització i escalat del procés sintètic, sobretot de pèptids llargs i complicats. I la investigació a nivell galènic de noves formes d'administració i dosificació han permès solucionar alguns dels problemes farmacocinètics de baixa estabilitat i proteòlisi. En l'actualitat, hi ha uns 60 fàrmacs de naturalesa peptídica aprovats per la FDA i ja comercialitzats, i s'espera que vagin en augment donat que hi ha uns 140 en assajos clínics, i uns 500 en fase pre-clínica.

En termes generals, el mercat global de fàrmacs peptídics registrava moviments de 14.1 bilions de dòlars el 2011, i la previsió és que augmenti fins els 25.4 bilions de dòlars el 2018.[5]

El 2011 el Lupron® (leuprolide acetate) indicat per al tractament de càncer de pròstata i de pit, entre altres indicacions, va registrar unes ventes d'uns 2,3 bilions de dòlars, [6] en el mateix any el Zoladex® (goserelin acetate) també indicat per càncers de pròstata i mama, també va suposar uns ingressos de 1,2bilions de dòlars a l'empresa Zoladex Worldwide; i al 2013, amb el Copaxone® (glatiramer acetate) , immunomodulador en casos d'esclerosis múltiple, es van arribar als 4 milions de dòlars. Lantus TM, de Sanofi, insulina per a la diabetis, va suposar unes ventes de 7.9 bilions de dòlars al 2013.

A la següent taula es mostren alguns dels fàrmacs aprovats per la FDA en els últims anys:

Taula 1.1. Llistat de fàrmacs peptídics recentment aprovats per la FDA[7]

Nom comercial	**Nom genèric**	**Empresa**	**Indicació terapèutica**	**Any**
Lyxumia®	Lixisenatide	Sanofi	Diabetis mellitus tipus II	2013
Surfaxyn®	Lucinactant	Discovery labs	síndrome d'estres respiratori en nens prematurs	2012
Omontys®	Pegynesatide	Afymax	Anèmia	2012
Signifor®	Pasireotide	Novartis	Malaltia de Cushing	2012

Kyprolis®	carfilzomib	Onyx pharmaceuticals	Mieloma múltiple	2012
Jetrea®	Ocriplasmin	Thrombogenics	Adhesió vitreomacular	2012
Revestive®	Teduglutide	NPS Pharmaceuticals	Síndrome de l'intestí curt	2012
Victrelis®	Boceprevir	Merck	Hepatitis C	2011
Incivek®	Telaprevir	Vertex Pharmaceuticals	Hepatitis C	2011

Font: Joao 2015 [7]

Es pot observar que una gran majoria dels pèptids que es troben al mercat són hormones o derivats peptídics que simulen l'acció de les hormones; però cal destacar l'existència d'un nombre força destacable de fàrmacs antibiòtics de naturalesa peptídica. En els darrers anys, amb l'increment de les infeccions per bactèries resistents als antibiòtics convencionals, i la urgent necessitat de trobar nous compostos antibacterians, els pèptids antimicrobians han ressorgit i han anat guanyat terreny en aquest camp. En la següent taula es mostren alguns dels fàrmacs antibiòtics de naturalesa peptídics més rellevants, que ja estan comercialitzats o que encara estan en fases clíniques d'estudi.

Taula 1.2. Llistat d'alguns dels fàrmacs peptídics antimicrobians, en fases clíniques o ja comercialitzats

Nom	*Tipus*	*Activitat*	*Fase*
Polimixina B	*Lipopèptid 10 aa*	*Gram -*	*Mercat*
Colistina (Polimixina E)	*Lipopèptid 10 aa*	*Gram -*	*Mercat*
Daptomicina	*Lipopèptid 13 aa*	*Gram+*	*Mercat*
Telavancina	*Lipopèptid 10 aa*	*Gram+*	*Mercat*
Nisina	*Pèptid cíclic 34 aa*	*Gram+*	*Mercat*
PGLa	*Pèptid cíclic 21 aa*	*Ampli espectre*	*Mercat*
Dalbavancina	*Lipoglicopèptid*	*Gram+*	*Fase III*

Surotomicina	*Lipopèptid 11 aa*	*Gram+*	*Fase III*
LL-37	*37 aa (subunitat de la catelicidina)*	*Ampli espectre*	*Fase II*
LTX-109	*3 aa, pèptid de síntesis*	*Ampli espectre*	*Fase II*

Font: (Butler et al [8]; Fjell et al [9]; Hancock & Sahl, [10]).

1.2. EL PROBLEMA DE LA RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS

Un antibiòtic és una substància química generalment produïda per un microorganisme, que es caracteritza per tenir la propietat d'interferir en els processos vitals de determinades bactèries, impedint el seu creixement (bacteriostàtics) o eliminant-los (bactericides). Actualment molts d'ells es poden obtenir també per síntesis química, o per modificacions semi-sintètiques dels productes naturals.

El terme d'antibiòtic va ser introduït el 1942 per Selman Waksmam i col·laboradors [11], concepte que es referia a substància que inhibia el creixement bacterià, però que excloïa a compostos que matessin els bacteris i també els compostos de síntesis. Però ja s'havien descobert abans alguns compostos que presentaven aquesta activitat antibiòtica, com les sulfonamides i la gramicidina S [12].

L'any 1928, Alexander Flemming va descobrir accidentalment la Penicilina, compost produït per un bacteri del gènere Penicillium, però no va poder aïllar-lo ni descriure la seva estructura. Al 1942 Florey i Chain[B] van ser capaços d'aïllar i purificar la primera penicil·lina g, i al 1945, Dorothy Crowfoot Hodgkin va poder determinar la seva estructura [13] Per aquest descobriment, al 1945, van guanyar conjuntament el premi Nobel de Medicina Flemming, Florey i Chain.

A partir de l'aparició de la penicil·lina, la indústria farmacèutica va viure el que es pot anomenar "golden era", on es van dedicar grans esforços en la recerca i producció de nous productes antibiòtics. (Figura 1.2) Es pot observar que a partir dels anys 60 i fins el 2000, no es va desenvolupar cap classe nova d'antibiòtics.

En aquesta etapa es van dur a terme modificacions sintètiques dels fàrmacs ja existents, donant lloc a noves molècules a partir d'esquelets ja coneguts. No és

fins a partir del 2000 que han aparegut nous compostos antibacterians com el linezolid, la daptomicina, la retapamulina, entre altres.

S'ha de tenir en compte també que la majoria d'aquests antibiòtics són actius per a bacteris Gram+, de manera que la recerca en el camp dels Gram- esdevé una necessitat urgent.

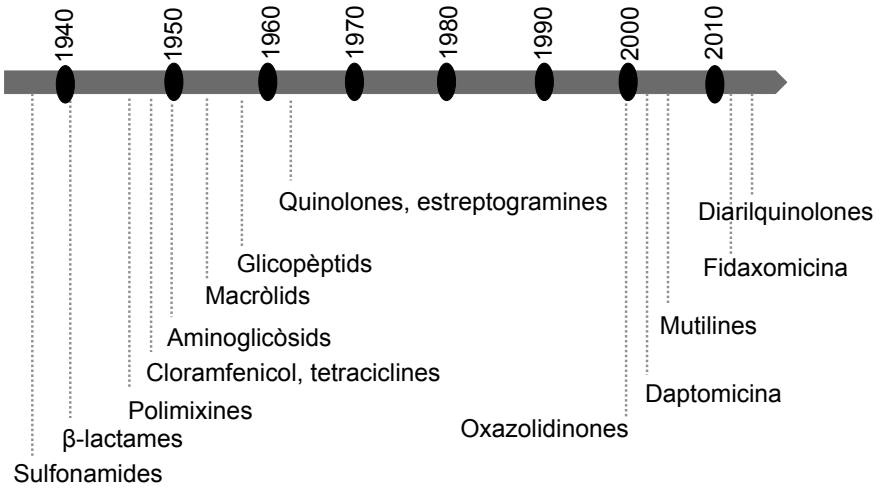


Figura 1.2. Quadre-esquema de l'aparició de nous antibiòtics en el temps

Flemming ja va advertir que un abús en la utilització de la penicil·lina podria donar lloc a l'aparició de soques resistents. Efectivament, al cap de pocs anys ja es van detectar microorganismes que ja no eren sensibles a la penicil·lina.[14] De fet, es pot observar un paral·lelisme entre l'aparició de nous antibiòtics, i al cap d'un temps l'aparició de soques resistents a aquests nous compostos.

Les malalties infeccioses són la segona causa de mort en països en vies de desenvolupament, i la tercera en els països desenvolupats[15]. Tot i que la resistència bacteriana s'ha observat tant en bacteris Gram-positius com en bacteris Gram-negatius, dos terços de les morts a causa d'infeccions bacterianes es deuen a bacteris gram-negatius [16].

Als EUA, de 2 milions de persones infectades cada any, aproximadament un 10% mor a causa de les infeccions.[8] Actualment moren mes persones per infeccions

causades per MRSA que de SIDA. I al mateix temps, l'aparició de nous antibiòtics ha disminuït considerablement: la FDA va aprovar 7 nous antibiòtics des del 2003 al 2012 (essent nomes 2 noves classes des del 1998), la majoria d'ells actius nomes contra bacteris Gram-positius [17–24]

És per això que aquest problema de resistència bacteriana ha esdevingut un problema de salut pública global, pels llargs i costosos tractaments que es requereixen i per les pèrdues humanes que suposa.

A nivell microbiològic es parla d'organismes patògens multi resistents (MDR) als microorganismes que han desenvolupat resistència com a mínim a tres antibiòtics que es troben en el mercat. Actualment quasi dos terços dels antibiòtics coneguts han vist compromesa la seva activitat deguda a l'aparició de microorganismes que en són resistents. Tant els bacteris Gram-positius com els Gram-negatius han desenvolupat resistències als agents antibacterians, com per exemple el *Staphylococcus aureus* resistent a meticilina (MRSA) i el *Enterococcus faecium* resistent a vancomicina (VRE), però és especialment preocupant l'emergència de bacteris Gram-negatius multiresistents, en particular la *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* [25,26]. La societat Americana de malalties infeccioses IDSA, Infectious Diseases Society of America) va publicar una llista en la qual aquests bacteris es trobaven entre els sis primers microorganismes multiresistents mes perillosos, i ha llençat un programa anomenat "ESKAPE" en el que s'han proposat trobar noves classes d'antibiòtics capaços de vèncer aquests microorganismes que s'acaben de citar. [27]. A més, al 2012, el IMI (Innovative Medicines Initiative) va posar en marxa també un programa anomenat New Drugs for Bad Bugs (ND4BB) per promoure la recerca en nous antibiòtics. [17,28,29]. I a nivell europeu es va crear també al febrer del 2012 el programa "COMBACTE" , un programa de 7 anys que reuneix a 20 membres participant, i amb una inversió de 195 milions d'euros, amb la que es pretén treballar per combatre la resistència bacteriana a Europa.[30]

És fonamental i urgent la recerca de nous compostos antibiòtics que permetin combatre selectivament aquests microorganismes multiresistents, si és possible a través de nous mecanismes que impedeixin o dificultin l'aparició de resistència.

Per abordar aquest problema s'ha d'analitzar quin mecanisme ha desenvolupat cada bacteri per evitar l'acció de l'antibiòtic. Generalment aquest procés passa per la modificació i/o alteració de la diana a la que va dirigida el fàrmac, així doncs es tracta de buscar maneres d'atacar aquestes noves dianes, o de cercar

unes altres, contra les quals el propi bacteri no pugui desenvolupar resistència.

Com s'exposa a continuació, els pèptids antimicrobians presenten unes particularitats que son avantatjoses per a abordar aquest problema, i és que degut al seu particular mecanisme d'acció (en primera instància actuen a nivell de membrana del bacteri) als microorganismes els és més difícil crear resistència.

1.3. ANTIBIÒTICS PEPTÍDICS (AMP)

Els pèptids antimicrobians són un grup molt ampli i variat de molècules de naturalesa peptídica amb un origen molt divers. També anomenats host defense peptides (HDP), pèptids de defensa de l'hoste, per la seva participació en els mecanismes de defensa dels diferents organismes que els sintetitzaven[31,32] els podem trobar en pràcticament tot tipus d'organisme: ja sigui en procariotes (bacteris) o en eucariotes (protozous, fongs, plantes, insectes i animals) [33,34] En animals, els trobem generalment en els teixits més exposats a l'exterior, fet que corrobora que són els components que intervenen en primera instància en la defensa de l'organisme front a l'atac de bacteris, fongs i virus. Per exemple, a la pell de la granota es poden trobar fins a 300 tipus de pèptids antimicrobians diferents.[35]

Des del 2003, podem trobar els AMP catalogats a la base de dades "The Antimicrobial Peptide Database", http://aps.unmc.edu/AP/main.php, creada i mantinguda per investigadors de la Universitat de Nebraska.

Es poden classificar els pèptids antimicrobians segons la seva composició en aminoàcids i segons la seva estructura: [36]

1. Pèptids aniònics: pèptids petits rics en àcid glutàmic i àcid aspàrtic. Per exemple, la daptomicina [37,38] i la dermicidina dels humans.[39]
2. Pèptids catiònics lineals hèlix-α. Pèptids relativament curts (menys de 40 aminoàcids) que no contenen cisteïna. En solució aquosa no presenten una estructura definida, però en presència de trifluoroetanol (TFE), micel·les de dodecilsulfat de sodi (SDS) o vesícules de fosfolípids o Lípid A, adquireixen estructura d'α-hèlix. Aquesta helicitat els hi confereix amfipaticitat a la molècula, condició necessària per a tenir certa capacitat antimicrobiana.[40] En són exemples, entre altres, la melitina dels insectes, la magainina dels amfibis, plasmina seminal de bous,

ovelles i porcs.

3. Pèptids catiònics enriquits amb aminoàcids específics. Com per exemple la histidina, (histatines de la saliva humana[41]), la prolina (apidaecines de les abelles)[42], l'àcid diaminobutíric de les polimixines, entre altres.
4. Pèptids aniònics i catiònics que contenen residus de cisteïna i formen ponts disulfur, que els permet adoptar conformació de fulla β. És el grup més nombrós. En són exemples, entre altres, la defensina A dels insectes[43], les defensines dels humans[44] i la plectasina, la primera defensina aïllada d'un fong.[45].
5. Fragments aniònics i catiònics de proteïnes més grans. Per exemple, els dominis antimicrobians de l'hemoglobina humana, i els pèptids derivats de la lactoferrina, com la lactoferricina i la Kaliocina-1.

1.3.1. Mecanisme d'acció dels AMP catiònics

Com ja s'havia esmentat, el creixent interès pels pèptids antimicrobians rau en el seu particular mecanisme d'acció. Actuen a nivell de membrana del bacteri, i això és d'especial importància donat que els diferencia dels antibiòtics tradicionals, i els afavoreix respecte aquests, en el sentit que presenten més dificultats a l'hora de que els bacteris hi creïn resistència.

Els antibiòtics peptídics catiònics actuen principalment a nivell de la membrana del bacteris Gram-negatius, alterant les propietats de barrera d'aquesta i comprometent l'homeòstasi i per tant la viabilitat del bacteri.

És fonamental, doncs, conèixer les característiques que presenten les membranes dels bacteris, tant els Gram-positius com els Gram-negatius i així veure'n les diferències. Figura 1.3.

La diferencia fonamental entre bacteris Gram positius i Gram negatius és que els primers presenten una paret bacteriana gruixuda i compacta, composada per una matriu de peptidoglicà amb àcids teïcoic i lipoteïcoic entrellaçats, mentre que els segons presenten una paret de peptidoglicà significativament més estreta i una membrana externa addicional en forma de bicapa lipídica. Aquesta bicapa lipídica està formada per lipopolisacàrids (LPS) en la seva capa externa que contenen grups fosfats, i fosfolípids aniònics i zwitteriònics en la seva capa interna.

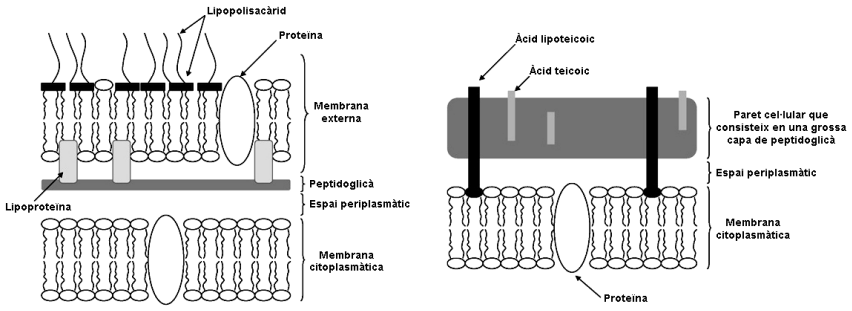


Figura 1.3. Representació esquemàtica de les membranes dels bacteris Gram-positius i Gram-negatius.

Aquesta particular composició lipídica del Gram-negatius, confereix al bacteri una elevada càrrega negativa superficial, permet als pèptids catiònics antimicrobians que interaccionin electrostàticament amb ells. Les cèl·lules humanes en presentar càrrega neta neutra, no es veuen tant afectades. Aquesta especificitat és clau per a la seva activitat com a antimicrobians. (Figura 1.4)

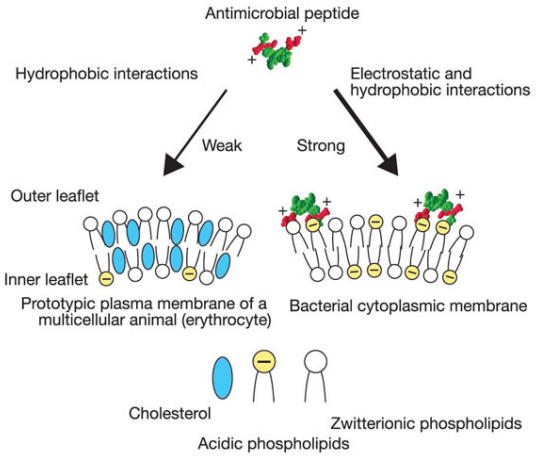


Figura 1.4. Representació esquemàtica de l'especificitat pèptids catiònics per les membranes bacterianes.[33]

El mecanisme d'acció més acceptat dels pèptids catiònics sobre els bacteris Gram-negatius consta de tres passos. Inicialment el pèptid entra en contacte amb la membrana bacteriana per interaccions electrostàtiques amb els grups fosfat del LPS de la membrana externa dels bacteris, desplaçant els cations Ca^{2+} i Mg^{2+} que estabilitzen aquesta membrana, ja que presenten una major afinitat d'unió de tres ordres de magnitud superior respecte aquests cations. Això provoca una

pertorbació en l'empaquetament de la membrana, i a través d'un mecanisme anomenat self-promoted uptake o entrada autoinduïda els pèptids poden entrar a l'espai periplasmàtic, des d'on poden interaccionar amb la membrana interna.

A partir d'aquí hi ha diferents propostes de mecanismes pels qual el pèptid podria provocar la mort bacteriana, com ara la despolarització total de les membranes i pèrdua de la seva funció, la formació de porus i canals pels quals es pot vessar el contingut cel·lular, [33,36,46], l'activació de cadenes enzimàtiques fatals pel bacteri, o la inhibició de síntesis proteica i d'àcids nucleics.[47–49]

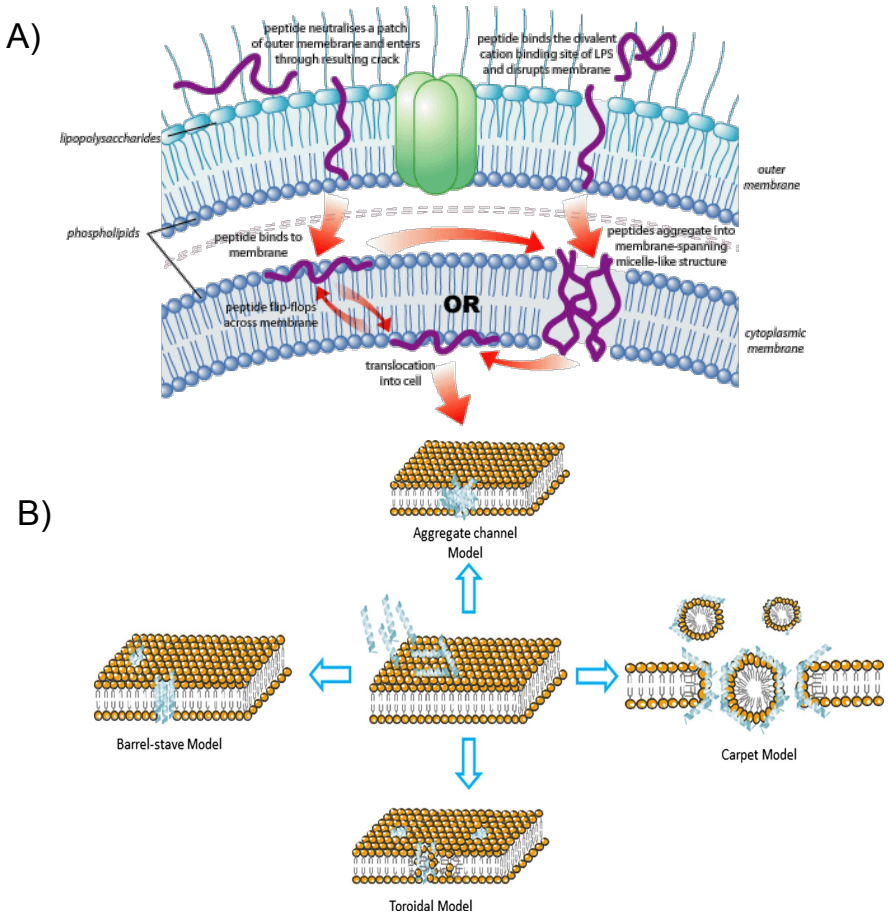


Figura 1.5[18]. A) Mecanisme proposat per a la interacció dels pèptids catiònics antimicrobians amb la membrana dels bacteris Gram-negatius. El pèptid desplaça competitivament els ions Ca2+ o Mg2+ de la superfície aniònica del LPS, provocant una pertorbació en l'empaquetament de la membrana externa.i per un mecanisme anomenat "self-promoted uptake" o entrada autoinduïda, arriba a l'espai periplasmàtic. Allà s'uneix a la monocapa externa de la membrana interna o citoplasmàtica i travessar la membrana sense alterar la seva estructura mitjançant un moviment flip-flop, o bé pot formar agregats que donen lloc a canals que faciliten el moviment d'ions i de molècules solubles en aigua

a través de la membrana. B) Representació esquemàtica de les diferents situacions que poden lloc a la formació de porus, que varien segons com el pèptid es col·loca recobrint la bicapa de lípid.

Aquest treball es centra en un grup en concret d'antibiòtics peptídics catiònics, anomenat polimixines.

1.3.2. Les polimixines

Les primera polimixina, la polimixina B, va ser descoberta l'any 1947 i la polimixina E (colistina) al 1950. En els següents anys es van aïllar, estudiar i caracteritzar diferents polimixines, i van ser utilitzades en terapèutica, però van caure en el desús degut a la nefro- i neurotoxicitat que presentaven. [50–54]

Des de mitjans dels anys 90, donada la manca d'antibiòtics per combatre les malalties provocades pels microorganismes multiresistents, especialment els Gram-negatius, com ara *P.aeruginosa, A.baumanii* i *K.pneumoniae*, s'han redescobert i tornat a estudiar. Degut a la bona activitat i la relativament baixa prevalença de resistència, la recerca d'anàlegs de polimixina amb millors propietats antibiòtiques, farmacològiques i toxicològiques, ha esdevingut un tema de recerca d'actualitat.

1.3.2.1. Estructura de les polimixines

Les polimixines són un grups de pèptids policatiònics produïts pel bacteri *Bacillus polymyxa*. Són lipodecapèptids d'un pes aproximat de 1.2kD que presenten la particularitat de tenir un alt percentatge d'un aminoàcid natural no codificat, el Dab, l'àcid L-2,4-diaminobutíric, que a pH fisiològic presenta el grup amino de la cadena lateral protonat, conferint-li el caràcter policatiònic.

L'estructura general d'aquests pèptids és la que es mostra a la figura 1.6. Presenten un cicle de set aminoàcids unit a una cua lineal de tres aminoàcids acilada en l'extrem N-terminal per un àcid gras de cadena mitja, l'àcid (S)-6-metiloctanoic o àcid 6-metilheptaoic. L'heptapèptid es tanca per mitjà d'un enllaç amida entre el grup γ-NH_2 amino del Dab-4, i el grup α-COOH del residu Thr-10 i s'uneix al tripèptid a través del grup α- NH_2 del Dab-4.

Es coneixen diferents tipus de polimixines: Polimixina A, B_1, B_2, C, D_1, D_2, E (colistina), F, M (matacina), S i T, però les més estudiades i utilitzades han estat la Polimixina B i la Polimixina E(colistina). L'estructura d'aquestes polimixines es

mostra a la figura 1.4, on es pot observar que la diferencia entre les dues formes es troba a la posició 6, on la Polimixina B presenta una D-fenilalanina, D-Phe, i en la Colistina trobem una D-Leucina, DLeu.

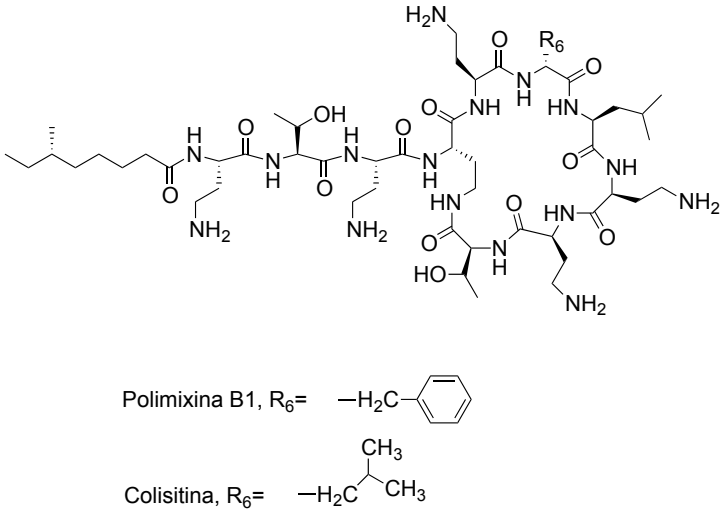


Figura 1.6. Estructura química de la polimixina B i la colisitina

Poden presentar indistintament com a àcid gras l'àcid (S)-6-metiloctanoic donant lloc a la polimixina B_1 i colistina A, o també l'àcid 6-metilheptanoic, donant lloc a la polimixina B_2 i a la colistina B.

1.3.2.2. Activitat i aplicacions clíniques de les polimixines

Les polimixines són actives front a la majoria de bacteris Gram-negatius, com ara: Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterobacter sp, Acinetobacter baumanni, Shigella spp, Salmonella spp, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Bordatella pertussis, Legionella pneumophila. [55]

Hi ha però algunes espècies de Gram-negatius que són resistents, com ara *Burkholderia spp, Proteus spp, Providencia spp, Morganella morganii, Serratia marcescens, Neisseria spp.* [56,57]

En canvi no són actives front a cocs Gram-negatius, ni microorganismes anaerobis, fongs, ni bacteris Gram-positius.

Com ja s'ha avançat abans, aquesta especificitat és deguda a la afinitat electrostàtica que presenten aquestes molècules catiòniques, amb els

components lipídics de caràcter aniònic de les membranes bacterianes. La diferent composició lipídica d'aquestes membranes és la que marca la diferència en susceptibilitats a la polimixina.

Com ja s'ha comentat les més utilitzades en clínica són la polimixina B i la colistina. Les podem trobar en preparacions per via tòpica, injectables per a via intravenosa o intramuscular, i també en aerosols per a via inhalatòria.

La polimixina B es presenta en forma de sulfat de polimixina i la colisitina en forma de sulfat o metansulfonat de colistina, fàrmacs en els que els grups amino dels residus de Dab estan protegits en forma de sulfat o metansulfonat, i que un cop en l'organisme s'hidrolitzen donant lloc al fàrmac lliure.

Ambdues polimixines s'empren com antibiòtics d'últim recurs, administrades per via parenteral, que s'utilitzen quan els habituals no han fet el seu efecte, principalment per a infeccions causades per microorganismes multi-resistents ara *P.aeruginosa, A.baumanii o Acinetobacter spp*, per exemple infeccions de les vies urinàries, pneumònies, i en casos més greu infeccions sistèmiques.

En aplicacions tòpiques és un antibiòtic més habitual donada la poca absorció que presenta i per tant la poca toxicitat associada. Són exemples les pomades Neobacitrin® i Dermisone Triantibiòtica®, oftalmològiques, per exemple. Oftalmowell® i, i gotes òtiques. Per via inhalatoria es freqüent el tractament amb PxB en el tractament de fibrosis quística. [58,59]

Com s'ha comentat, el principal problema que presenten és la toxicitat que presenten. Provoquen insuficiència renal que s'observa per un augment de les concentracions de creatinina, i també es pot observar hematúria, proteïnúria i cilindrúria o oligúria. Pel que fa a la neurotoxicitat, deguda a la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica, es manifesta en forma de nàusees, vòmits, vertigen i paràlisi facial. En casos extrems es podia observar bloqueig neuromuscular, que podia provocar parada respiratòria.

Per tots aquests motius, les polimixines van caure en desús cap als anys 80. D'aquí les poques dades que es tenen sobre farmacocinètica i farmacodinàmica d'aquests antibiòtics, i les que es tenen són relativament antigues. [50]

Com ja s'ha comentat, donada la creixent i preocupant aparició de soques resistents als antibiòtics existents, juntament amb l'absència de noves classes d'antibiòtics ha fet reconsiderar les polimixines com a agents terapèutics. La bona activitat antimicrobiana i la baixa resistència que presenten ha impulsat l'estudi i

recerca de les ja existents i de noves molècules que puguin millorar els índex terapèutics de les polimixines.

1.3.2.3. Mecanisme d'acció de les polimixines

El fonament de l'activitat antimicrobiana de les polimixines és la interacció d'aquestes molècules amb les membranes dels bacteris Gram-negatius. És important doncs veure quines característiques concretes presenten aquestes membranes i quins són els punts claus d'aquesta interacció. En aquest apartat s'ampliarà una mica més el que ja s'ha comentat amb anterioritat sobre les membranes i els pèptids antimicrobians.

1.3.2.4. Estructura de les membranes del bacteris Gram-negatius

Ja havíem vist en l'apartat 1.2.1. la diferència entre les membranes dels bacteris Gram-positius i Gram-negatius: la presència d'una membrana externa que està composada bàsicament per lipopolisacàrid (LPS), fosfolípids, i proteïnes específiques (porines). Els tres components són vitals per a la integritat i viabilitat del bacteri, però és el LPS el principal implicat en la interacció.

En la figura 1.7 es mostra més detalladament l'estructura de la membrana d'un bacteri Gram-negatiu, que està constituïda per la membrana externa, la paret cel·lular formada pel peptidoglicà, l'espai periplàsmic i la membrana citoplasmàtica:

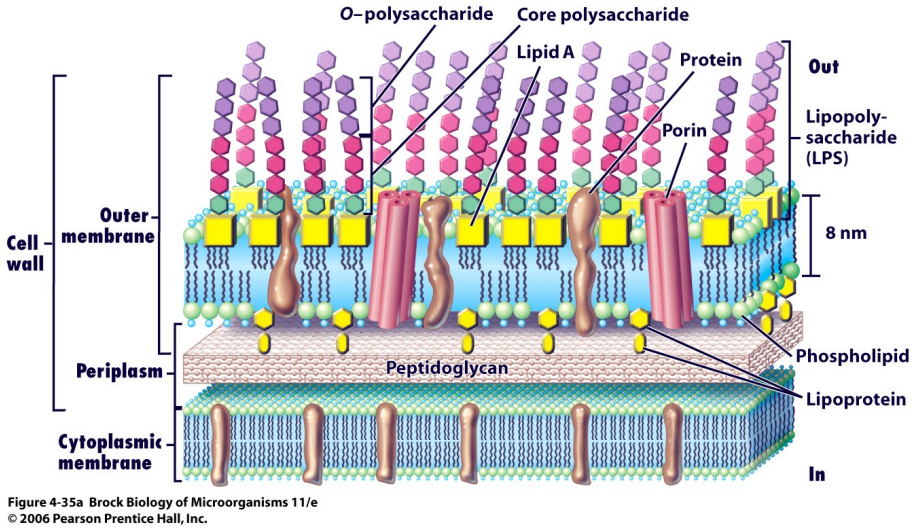


Figura 1.7. Esquema de l'estructura de la membrana d'un bacteri Gram-negatiu.

La **membrana externa, ME**, exclusiva dels Gram-negatius, es troba ancorada a la paret bacteriana mitjançant la lipoproteïna de Braun i la seva funció principal és actuar com a barrera de permeabilitat impedint l'entrada de substàncies a la cèl·lula que podrien destruir o malmetre el bacteri. [60,61]

A més, la ME regula l'entrada de substàncies a través de les porines, i alguns transportadors específics com el de la vitamina B12, i al mateix temps impedeix la pèrdua de constituents essencials dels bacteri.

La ME està constituïda majoritàriament per lipopolisacàrids (LPS), i en menys proporció per fosfolípids i proteïnes, sent el primer, el més implicat en la interacció amb la PxB. Per això el coneixement de l'estructura d'aquest LPS és fonamental per entendre la interacció amb la PxB.

El lipopolisacàrid (LPS) està format per tres dominis units covalentment: el lípid A, el cor d'oligosacàrid, i l'O-antigen (figura 1.8).

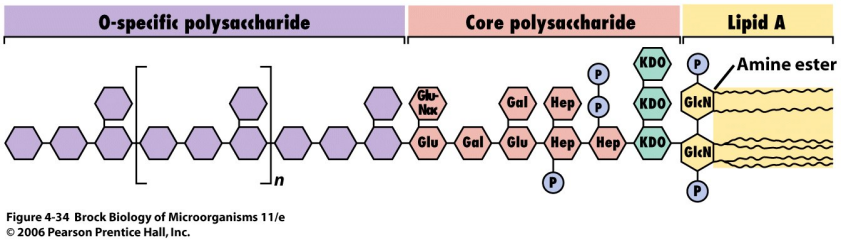


Figura 1.8. Representació esquemàtica del LPS bacterià.

El lípid A és la part del LPS que es troba ancorada a la membrana externa. La seva composició varia d'una espècie a una altra, però la seva estructura comú consisteix en un disacàrid format per dues unitats de D-glucosamina (GlcN) unides en β-1'- 6 i fosforilat en les posicions 1 i 4'. El lípid A normalment conté 6 cadenes d'àcid gras (A-F), quatre de les quals es troben unides directament a les glucosamines i són β-hidroxiàcids d'una llargada d'entre 12 i 14 carbonis, i les altres dos cadenes d'àcid gras s'uneixen a aquests hidroxils en posició β. El lípid A actua com a ancoratge hidrofòbic on les cadenes d'àcid gras fortament empaquetades contribueixen al correcte empaquetament i estabilització de la membrana externa.[61]

Unit al les glucosamines es troba el cor oligosacàrid que és una regió molt conservada d'àcid 2-ceto-3-desoxioctonoic (Kdo). I finalment es troba la part variable del LPS que és l' O-antigen, un polisacàrid format per unitats repetitives

d'hetero-oligosacàrids que es despleguen en forma de filaments des de la superfície de la ME.

Tant el lípid A com el cor oligosacàrid content grups carregats, la majoria aniònics, que són els que li confereixen la càrrega negativa a la superfície bacteriana.

Els fosfolípids, es troben situats en la monocapa interna de la membrana externa, i dirigits cap a l'espai periplasmàtic. La seva composició és rica en fosfolípids aniònics com fosfatidilglicerol (PG) i cardiolipina (CL), i també fosfolípids zwitteriòncs com la fosfatidiletanolamina (PE).

En quant a proteïnes, destaca la presència de porines, proteïnes que s'agrupen en trímers per a formar porus transmembrana que permeten la difusió de substàncies hidrofíliques de menys de 700 D.[62]

La presència de cations de Ca^{2+} i Mg^{2+} és primordial ja que amb la formació de ponts entre els grups fosfats, neutralitzen la repulsió electrostàtica entre les càrregues del lípid A i del cor d'oligosacàrid i permeten mantenir l'estabilitat de la ME. [62–64]

La **membrana citoplasmàtica o membrana interna, MI,** actua de barrera del contingut cel·lular, i és la responsable de la regulació del flux de nutrients i de productes de rebuig de l'interior a l'exterior de la cèl·lula.

Consisteix en una bicapa lipídica constituïda per fosfolípids i proteïnes. La composició en fosfolípids varia una mica respecte a la membrana externa, contenint majoritàriament fosfatidiletanolamina (PE, 70-80%), fosfatidilglicerol (PG, 15-20%) i cardiolipina (CL, 5-10%). Es poden trobar també petites quantitats d'àcid fosfatídic (PA), fosfatidilserina (PS), lisofosfolípids i diacilglicerol.[63,65,66]

Una diferència important respecte les cèl·lules eucariotes és l'absència de colesterol, fet que implica una major fluïdesa d'aquestes membranes bacterianes.[67]

1.3.2.5. Mecanisme d'acció de la polimixina B: Interacció amb les membranes bacterianes

La teoria més plausible i acceptada, com ja s'ha comentat en l'apartat 1.3.1, és l'acció sobre les membranes que provoca una disrupció d'aquestes, i un desequilibri homeostàtic en el bacteri que compromet la seva viabilitat.

El primer pas d'aquest procés, és la interacció electrostàtica entre els grups fosfat (HPO_4^-) carregats negativament, del lípid A del LPS i els grups amino (NH_3^+) carregats positivament, de les cadenes laterals dels cinc residus de Dab presents a la Polimixina. Aquesta interacció desplaça els cations Ca^{2+} i Mg^{2+} en ser una interacció més forta que la que aquests presenten amb els grups fosfats, de manera que es comença a debilitar l'empaquetament de la membrana externa i per tant comença a desestabilitzar-se.

Aquesta atracció electrostàtica permet que els dominis hidrofòbics de la polimixina B, la regió de l'àcid gras N-terminal i la regió D-Phe6-Leu7, s'apropin a les cadenes d'àcids grassos del LPS, establint també interaccions hidrofòbiques, que debiliten l'empaquetament de la membrana i provoquen una expansió d'aquesta membrana externa.

El conjunt d'aquestes interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques provoquen un trastorn en l'empaquetament de la membrana, i per tant una major permeabilitat, que permet, gràcies a un mecanisme d'entrada autoinduïda, que la polimixina travessi la membrana externa i es quedi a l'espai periplàsmic.[68,47,69]

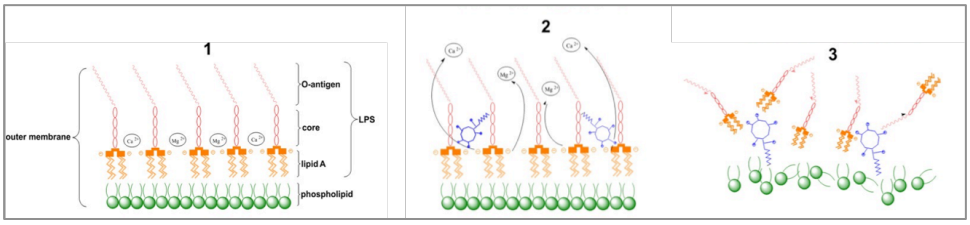


Figura 1.9. Representació esquemàtica de la interacció de la PxB amb la membrana externa dels bacteris G+. Font Deris [70]

El fet que la polimixina nonapèptid (PxBN, polimixina sense l'àcid gras terminal i el Dab-1) s'uneixi a la membrana però no tingui activitat antimicrobiana ressalta la importància de les interaccions hidrofòbiques, tant com les electrostàtiques.

Tal i com s'ha comentat per al cas general dels AMP, apartat 1.3.1, a partir d'aquí es creu que polimixina s'acumula a la superfície de la membrana i s'hi insereix,[71] de manera que es creen uns porus transitoris en la bicapa que condueixen a un col·lapse de la membrana. No obstant, molts d'aquests estudis es van realitzar a concentracions molt superiors a la concentració mínima inhibitòria (CMI) de la PxB, on la polimixina té un efecte de detergent sobre les membranes lipídiques aniòniques. A més, el fet de que la PxB sigui innòcua per als bacteris que la

produeixen es contradiu amb aquest mecanisme inespecífic de lisis cel·lular per un efecte detergent.

Fa uns anys es va posar en evidència un altre fenomen biofísic que explicaria el caràcter antibiòtic de la PxB mitjançant un altre mecanisme. Es van realitzar estudis amb vesícules lipídiques com a models de membrana (liposomes), i van demostrar que la PxB permet establir contactes moleculars estables entre les membranes de dues vesícules fosfolipídiques, i facilita l'intercanvi directe, ràpid i selectiu de fosfolípids monoaniònics.[72–74] Aquest procés té lloc sense que es produeixi hemifusió, permeabilització ni solubilització de les vesícules (figura 1.10).

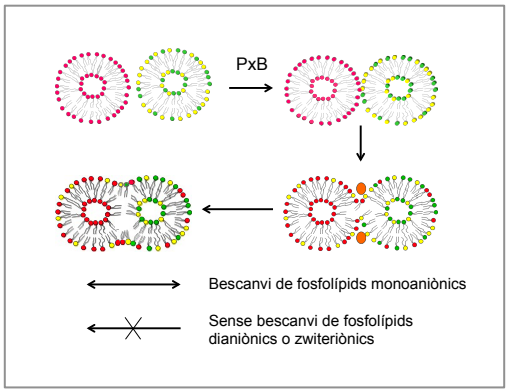


Figura. 1.10. Model dels contactes entre membranes mediats per PxB [73,74]

El mecanisme proposa una primera fase d'unió de la PxB a les vesícules amb elevada afinitat, seguit d'una agregació de les vesícules, i finalment l'establiment dels contactes moleculars entre vesícules agregades que permet l'intercanvi dels fosfolípids de les vesícules agregades.

És important el fet que els contactes que s'estableixen són estables, que es manté l'estructura de bicapa de les vesícules i que l'intercanvi només es dóna entre les monocapes externes.

Aquest intercanvi de lípids, que en la membrana bacteriana es donaria entre lípids de la monocapa interna de la ME i la monocapa externa de la MI, suposaria una alteració de la composició lipídica de les membranes que conduiria a un desequilibri osmòtic i finalment mort cel·lular.

Recentment s'ha descrit un altre mecanisme per a l'acció de la polimixina,[70] que

es basa en l'efecte que presenta la polimixina B i la colistina d'inhibir l'enzim NDH-2 oxidorreductasa de la membrana interna del bacteri. Aquest enzim forma part de la cadena respiratòria de la bacteria, de manera que s'impediria la respiració ce·lular i portaria a la mort cel·lular.

1.3.2.6. Mecanisme de resistència a les polimixines

S'han observat ja en algunes soques bacterianes com *E.coli*, *S.tiphymurium*, *K.pneumoniae* i *P.aeruginosa* algunes modificacions en la composició del LPS, de manera que han esdevingut resistents a la polimixina. El que s'ha pogut observar, figura 1.11, és la substitució dels fosfats del lípid A per grups 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, carregats positivament, i/o grups fosfoetanolamina, que redueixen la càrrega negativa neta del lípid A. De manera que la interacció electrostàtica inicial entre els residus Dab de la PxB i els fosfats el LPS no es pot donar.

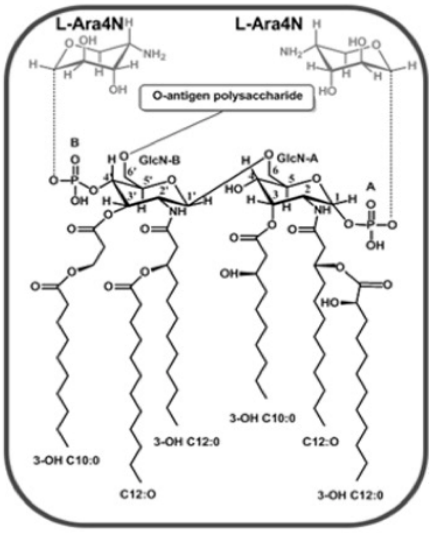


Figura 1.11. Estuctura del lípid A amb el grup fosfat 4' modificat amb 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, observat en bacteris resistents a les polimixines.[75]

1.3.2.7. Complex LPS - Polimixina

Donat que la polimixina interacciona directament amb el lípid A del LPS, per a entendre millor el seu mecanisme d'acció, les interaccions que s'hi estableixen, i poder estudiar les relacions estructura-activitat de les diferents polimixines i

anàlegs que es vulguin sintetitzar, és necessari estudiar i entendre com es produeix aquesta interacció.

Utilitzant diferents tècniques biofísiques, diferents autors han proposat el que es poden resumir en dos models d'interacció.

En el primer model, Cajal i col·laboradors [69,74] van trobar per dicroisme circular que tan la PxB com la PxBN presentaven espectres similars quan estaven en medi TFE/H_2O que quan treballaven amb vesícules de fosfolípids, de manera que el dissolvent actuava imitant el model de membrana. Van estudiar les diferents regions dels pèptids observant que la polimixina presentava unes posicions més fixes D-Phe[6], Leu[7] i Thr[10], mentre que les altres presentaven major mobilitat.

La regió lineal presentava una mobilitat força major en comparació a l'anell heptapeptídic en ambdues polimixines (PxB i PxBN), així com també les cadenes laterals dels residus de l'anell. Això permet que les cadenes laterals dels Dabs s'ancorin i interaccionin millor amb els fosfats, i que la cua d'àcid gras tingui un accés fàcil i ràpid a través de la membrana externa.

Els experiments amb l'anàleg nonapèptid mostraren que aquest era molt més flexible i presentava una mobilitat major, cosa que indicava que tot i ser prou flexible l'àcid gras, restringia d'alguna manera el moviment del pèptid. Però aquesta flexibilitat no era el factor més important per que la PxBN no presenta activitat antibiòtica.

Mitjançant experiments de RMN en una i dos dimensions de la PxB en TFE/H_2O, van trobar distàncies i angles diedres que van introduir com a restriccions ens els assajos de docking per trobar la conformació de mínima energia, i van obtenir que l'estructura més probable que podria establir els contactes entre vesícules presenta una conformació pràcticament plana.

Van realitzar també càlculs de docking de l'estructura de mínima energia de la PxB amb diferents grups fosfodiéster i van mostrar que la PxB efectivament tenia dos llocs d'unió als grups fosfats (figura 1.12) : el lloc A format pels grups amino carregats positivament dels residus Dab-1, Dab-3 i Dab-5, i el lloc B localitzat en l'heptapèptid cíclic i format pels grups amino dels residus Dab-8 i Dab-9, i per les contribucions dels ponts d'hidrogen dels grups NH-α i OH del residu Thr-10. L'enllaç amida de la posició 4-10 és el que els manté units aquests dos llocs d'unió però al mateix temps confereix la flexibilitat necessària per a que es pugui unir a dos grups fosfat del LPS simultàniament.

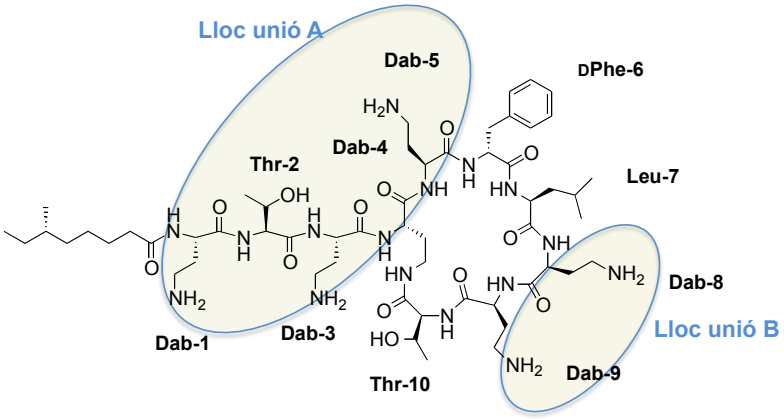


Figura 1.12. Estructura de laPxB en la que s'indiquen els dos possibles llocs d'unió als grups fosfats del LPS.[69]

Pristovsek i col·laboradors[76,77] van proposar un altre model per a explicar la interacció entre la PxB i el LPS. Mitjançant experiments de RMN en solució van determinar que la PxB es disposa en forma de sobre plegat, on els residus polars i els hidrofòbics es disposen en cares oposades de la molècula, conferint-li l'estructura amfipàtica necessària per a la seva activitat antibiòtica.

El model proposa que l'anell d'heptapèptid cobreix el disacàrid de GlcN del lípid A, i es produeixen els següents de contactes entre la PxB i el LPS (figura 1.13.):

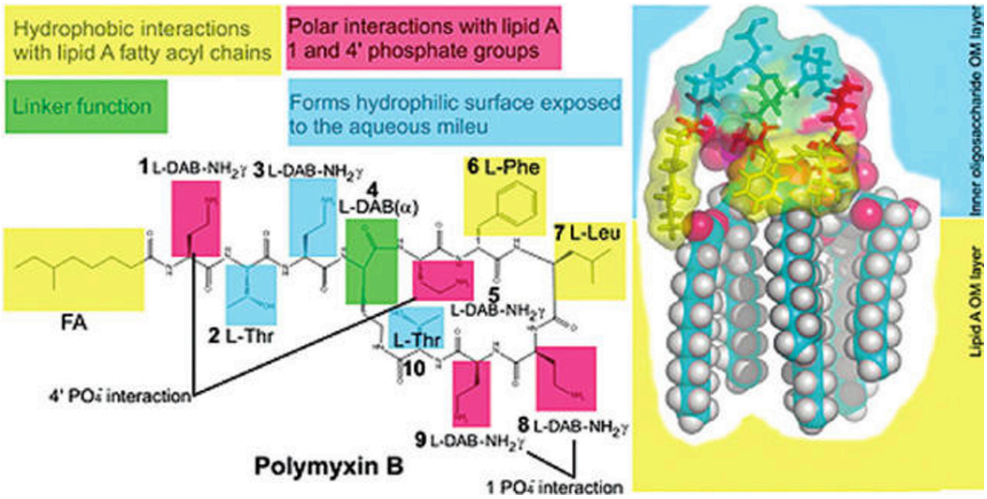


Figura 1.13. Diagrama on s'observen els contactes que s'estableixen entre la PxB i el lípid A del LPS bacterià. Font Velkov 2010 [78]

- La regió hidrofòbica de la PxB (l'acid gras N-terminal , i el segment DPhe[6]-Leu[7]) interacciona i s'hi insereix en la regió hidrofòbica del lípid A.
- Les cadenes laterals dels grups polars Thr[2], Dab[3] i Thr[10] es troben orientades cap a la regió hidrofílica on es troben els grups Kdo, és a dir, orientades cap a l'exterior cel·lular.
- Els grups amino de les cadenes laterals dels residus Dab[1] i Dab[5] interacciones electrostàticament amb el grup fosfat en 4' del lípid A.
- I els grups amino dels residus de Dab[8] i Dab[9] interaccionen electrostàticament amb el grup fosfat en 1' del lípid A.
- A més els complex s'estabilitza per contactes hidrofòbics addicionals entre: entre la cadena d'àcid gras N-terminal de la PxB i les cadenes A i B d'àcids grassos del lípid A, entre la DPhe[6] i les cadenes A i C, i entre la Leu[7] i les cadenes C i F.
- Els protons amida dels residus Dab[4] i Dab[8] participen en enllaços pont d'hidrogen que estabilitzen el cicle peptídic.
- En l'estructura 3D, els residus Dab[1] i Dab[5] es troben a prop de l'àcid gras N-terminal i l'ajuden a inserir-se en el lípid A.

Més recentment aquest model va ser corroborat pels experiments de RMN que van dur a terme Mares i col·laboradors,[79] amb la única diferència que aquests últims van determinar contactes polars entre el grup Kdo-C del cor oligosacàrid, i la Thr[10].

Com es pot observar la diferència amb el model proposat per Cajal i col. és que el el residu Dab[3] no participa en la interacció electrostàtica amb els fosfats, i es manté exposat al medi hidrofílic.

Bhattacharjya et al.[80] van estudiar l'estructura de la polimixina nonapèptid (PxBN) en solució aquosa, tant lliure com unida al LPS i van proposar un model d'interacció PxBN-LPS que presenta una topologia lleugerament diferent al de PxB-LPS. Tot i que el pèptid es situa recobrint el lípid A, sembla que no presenta les interaccions hidrofòbiques que presenta la PxB. En la primer fase, si que hi ha interacció electrostàtica i desplaçament dels cations divalents, però en no tenir l'àcid gras N-terminal, no es pot utilitzar aquest com a ancoratge per a introduir-se ell mateix en la membrana externa, i per tant perd la capacitat antibacteriana.

Amb aquest model es podria explicar el fet que la PxB tingui acció permeabilitzadora de la membrana, i també activitat antibiòtica, i la PxBN només tingui acció permeabilitzadora.

Mitjançant recents estudis de dinàmica molecular[81], s'ha pogut caracteritzar aquesta interacció entre la PxB i les membranes bacterianes. S'ha simulat de manera molt acurada la membrana externa i la interna de *E.coli* i s'han obtinguts detalls com els que es mostren a la figura 1.15, on es pot observar com és la cua hidrofòbica la que s'insereix en la membrana

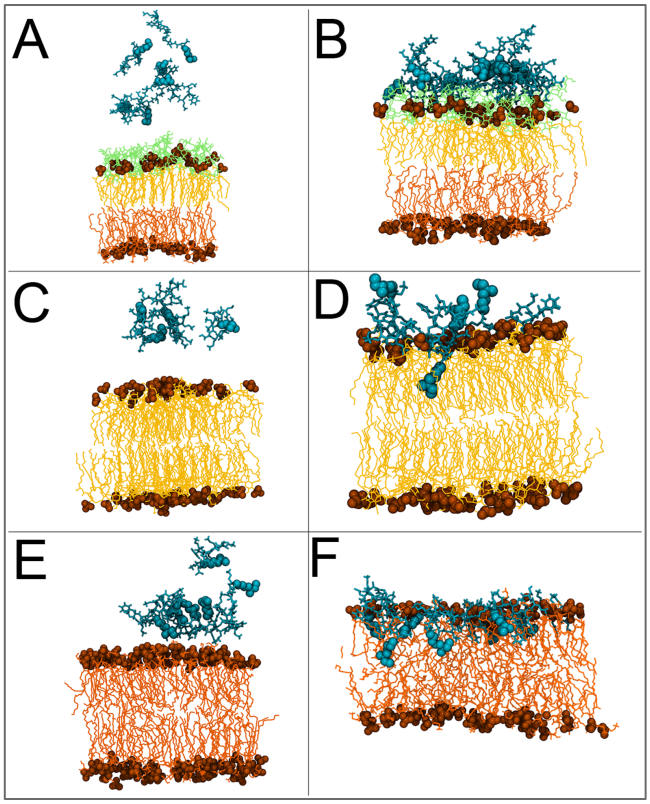


Figura 1.15. Representació de l'estudi de les interaccions de la PxB amb tres models de membrana. A, C i E abans de la interacció. I B, D i F, després de la interacció. A i B representen la interacció amb una membrana externa asimètrica de LPS, C i D amb una membrana externa simplificada que consta nomes d'una bicapa lipídica de lípid A, i finalment E i F representen la interacció amb una membrana interna composada per una barreja de lípids. Les línies blaves representen les regions de la PxB que no són la cua, "non tail regions", les esferes blaves representen les regions de la cua de la PxB, que com es pot observar són les que s'insereixen en les bicapes lipídiques. Les línies grogues representen el lípid A; les esferes taronges representen els grups fosfat del LPS; les línies taronges representen els fosfolípids del LPS. Font: Berglund et al [81].

Així doncs, en resum, tots aquests estudis recolzen la proposta d'una interacció entre PxB i LPS en dos etapes. La primera etapa és una interacció electrostàtica entre els grups amino carregats positivament de la PxB i els grups fosfats del lípid A carregats negativament. I en una segona etapa, les interaccions hidrofòbiques entre els dominis hidrofòbics d'ambdós molècules, permeten la inserció del pèptid en la membrana externa del bacteri.

Els experiments de RMN sobre el complex PxB-LPS posen en evidència que la PxB adopta una conformació en la que separa els dominis hidrofòbics i polars de la molècula, proporcionant l'amfipaticitat estructural necessària per a l'activitat antibacteriana.

A més, el model demostra un mode d'acció que desestabilitzaria l'estructura supramolecular d'empaquetament del LPS en la membrana bacteriana, conduint finalment a la mort cel·lular.

2. OBJECTIUS

Els objectius que es van plantejar en aquest treball van ser els següents:

- El disseny i la síntesis de nous pèptids antibiòtics derivats de la polimixina, que presentin una estructura accessible per tal de facilitar la seva síntesi i escalat, amb activitat antimicrobiana i amb potencial reducció de la seva toxicitat.

- Avaluació de l'activitat biològica dels anàlegs sintetitzats, mesurant l'activitat antimicrobiana *in vitro* i la citotoxicitat.

- Estudi de l'activitat biofísica; anàlisi del comportament dels anàlegs en contacte amb les membranes lipídiques bacterianes, mitjançant models de membrana dels bacteris, que permeti correlacionar l'activitat antibiòtica dels compostos, amb el seu comportament biofísic.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. ANTECEDENTS SOBRE LA SÍNTESI DE POLIMIXINES

Pocs anys després del descobriment de la polimixina, cap als anys 60, Vogler i col·laboradors van dur a terme la primera síntesis total de la polimixina. Però no va ser fins a finals dels anys 90, quan per la necessitat d'obtenir noves molècules antibiòtiques, que es va revaloritzar la polimixina, va esdevenir fruit d'estudi, i es van proposar noves síntesis.

En aquest apartat es recullen les diferents síntesis i estratègies que s'han emprat per a sintetitzar la polimixina i anàlegs d'ella.

La polimixina és una molècula que presenta algunes particularitats respecte a altres molècules de naturalesa peptídica. La cadena d'àcid gras en N-terminal, la múltiple presència d'un aminoàcid no proteinogènic, el Dab, i el tancament del cicle d'heptapèptid per mitjà d'un enllaç lactàmic entre el grup amino de la cadena lateral d'un Dab i el grup carboxílic de la Thr[10] fan que la seva síntesis no sigui una síntesis fàcil d'aconseguir.

Vogler i col·laboradors[82–86] van descriure l'any 1964 la primera síntesis total de la polimixina. Es tractava d'una aproximació de condensació de fragments en solució, on la ciclació es duia a terme al final, un cop s'havia obtingut el pèptid lineal.

Es va veure, però, que per aconseguir noves síntesis i nous anàlegs de la polimixina, es requeria un desenvolupament paral·lel de les tècniques de síntesi, per exemple en fase sòlida, com també un desenvolupament de noves estratègies de protecció dels aminoàcids. Es tractava d'obtenir sistemes de protecció ortogonal que permetessin obtenir un precursor protegit apte per a la ciclació. Aquest fet va limitar el progrés en aquesta línia, ja que protegir els residus de Dab no era fàcil, però mica en mica es van arribar a obtenir diferents opcions comercials del Dab convenientment protegit: Fmoc-L-Dab (Boc)-OH[87], Fmoc-L-Dab (Dde)-OH[88], Fmoc-L-Dab (ivDde)-OH,[89] Fmoc-L-Dab (Mtt)-OH[90] i Fmoc-L-Dab (2-ClZ)-OH [91].

La primera síntesis en fase sòlida va ser descrita per Sharma i col·laboradors l'any 1999, en la que empraven una estratègia Fmoc/tBu sobre una resina SASRIN®, (super acid sensitive resin) Figura 1.16. El grup Dde va ser l'escollit per a protegir la cadena lateral del Dab[4], que s'eliminava selectivament per tractament amb 2% d'hidrazina. Per desancorar el pèptid de la resina es va tractar amb 1% TFA, unes condicions àcides molt suaus que deixaven intactes

els altres grups proptectors, i un cop es tenia el pèptid parcialment protegit en solució, es va ciclar en presència de difenilfosforilazida, DPPA. Finalment es va desprotegit totalment per tractament acidolític amb 95% TFA.

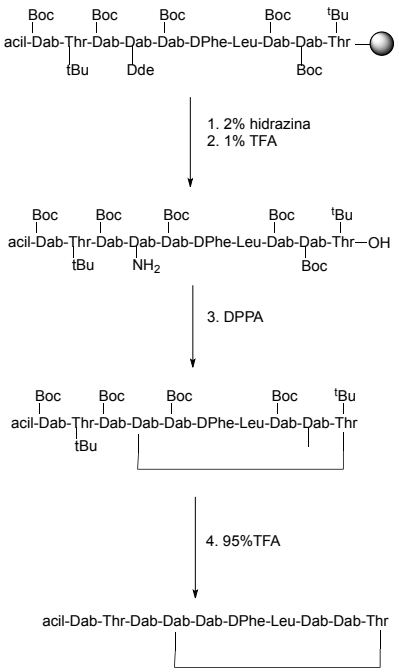


Figura 3.1. Esquema de la síntesis de la PxB descrita per Sharma i col.[88]

Tsubery i col·laboradors [90] van sintetitzar la polimixina nonapèptid, PxBN, d'una manera similar, en aquest cas utilizant la resina clorotritil, Cl-Trt, també làbil a àcids suaus, i el grup protector del Dab-4 va ser el metoxitritil, Mtt. Per un tractament amb 1% TFA es va obtenir el pèptid parcialment protegit en solució, la ciclació es solució es va realitzar amb PyBOP com a agent acoblant, i finalment el tractament amb 95% TFA va permetre obtenir el pèptid final.

En aquest mateix grup van optimitzar una síntesis una mica diferent, utilitzant l'estratègia Fmoc/tBu sobre la resina Wang[92], el grup protector Boc per a la cadena lateral del Dab-4, i per als altres residus de Dab van utilitzar el protector 2-ClZ, que és estable al TFA. Per tractament amb 95%TFA van eliminar el grup Boc i escindir el pèptid de la resina simultàniament, obtenint doncs el pèptid parcialment protegit, el van ciclar amb PyBop o DPPA en solució, i finalment per hidrogenació catalítica es van eliminar els altres grups protectors.

Recentment, els grups de Sakura[91] i Vaara[93] també han realitzat síntesis seguint

la mateixa estratègia Fmoc/tBu sobre resina Wang, desprotecció i escisió amb TFA 95%, ciclació amb DPPA o PyBOP i finalment hidrogenació catalítica o acidòlisis amb HF per la desprotecció total dels grups protectors.

Tots aquest mètodes es caracteritzen per dur a terme la ciclació del pèptid parcialment protegit en solució. La dificultat de realitzar la ciclació sobre el suport polimèric venia donada per la necessitat de tenir el C-terminal lliure, però de Visser i col·laboradors[94] van aplicar el anomenat "safety-catch". Es basava en seguir una estratègia Fmoc/tBu sobre una resina sulfonamida "safety-catch" de Kenner[91], el grup Dab-4 es protegia amb el grup ivDde per a l'elongació de la cadena peptídica, i posteriorment es canviava pel grup Mmt per a l'activació de l'acilsulfonamida. La ciclació intramolecular amb DIEA alliberava simultàniament el pèptid de la resina. Finalment s'aconseguia la desprotecció total amb acidòlisi en TFA 95% .

Aixímateix, Tsubery i col·laboradors[90] van descriure una ciclació en resina, utilitzant un enllaç carbamat amb la resina a través de la cadena lateral del Dab-9.

En el nostre grup, al principi d'aquest projecte, també es va emprar una estratègia similar, en la que s'ancorava el Dab-9 a la resina per la seva seva cadena lateral via un enllaç carbamat benzílic (figura 3.2). La resina, funcionalitzada en forma de hidroximetilfenoxipropionamida, s'activava en forma de carbonat actiu Biblio master (DSC i DMAP), i s'hi acoblava l'aminoàcid Fmoc-Dab-OAl, prèviament sintetitzat. A continuació, s'eliminava l'ester al·lílic (Pd(PPh3)4 i Ph3Si) i s'acoblava la Thr-10, en sentit invers (H-Thr(tBu)-OAl). La síntesis es continuava eliminant el Fmoc del Dab-9 i s'elongava la cadena fins al Dab-4, protegit en forma de Fmoc-Dab(alloc)-OH. Un cop es tenia l'heptapèptid lineal, s'eliminaven els grups protectors al·lílics i es ciclava amb PyBop/DIEA. Finalement s'hi acoblaven els tres aminoàcids de la cua lineal i l'àcid (S)-6-metiloctanoic.

Recentment, s'ha publicat una síntesi similar[95]: sobre una resina 2-clorotritil s'ancora el Dab-9, en forma de Fmoc-Dab-OAl, per la seva cadena lateral, s'elimina el grup Fmoc i es construeix l'esquelet peptídic fins a l'àcid gras. El Dab-4 es troba protegit amb un grup Dde (*N*-(1-(4,4-dimethil-2,6-dioxociclohexiliden) ethil) en la seva cadena lateral, de manera que pot ser eliminat selectivament amb hidrazina, i sobre aquesta cadena lateral s'hi acobla la Thr-10, en forma de Fmoc-Thr(^{t}Bu)-OH. S'elimina aquest grup Fmoc, i el grup OAl del Dab-4 i es cicle el pèptid en resina mitjançant PyOAP/DIEA. Una acidòlisi estàndar final proporciona la polimixina desitjada.

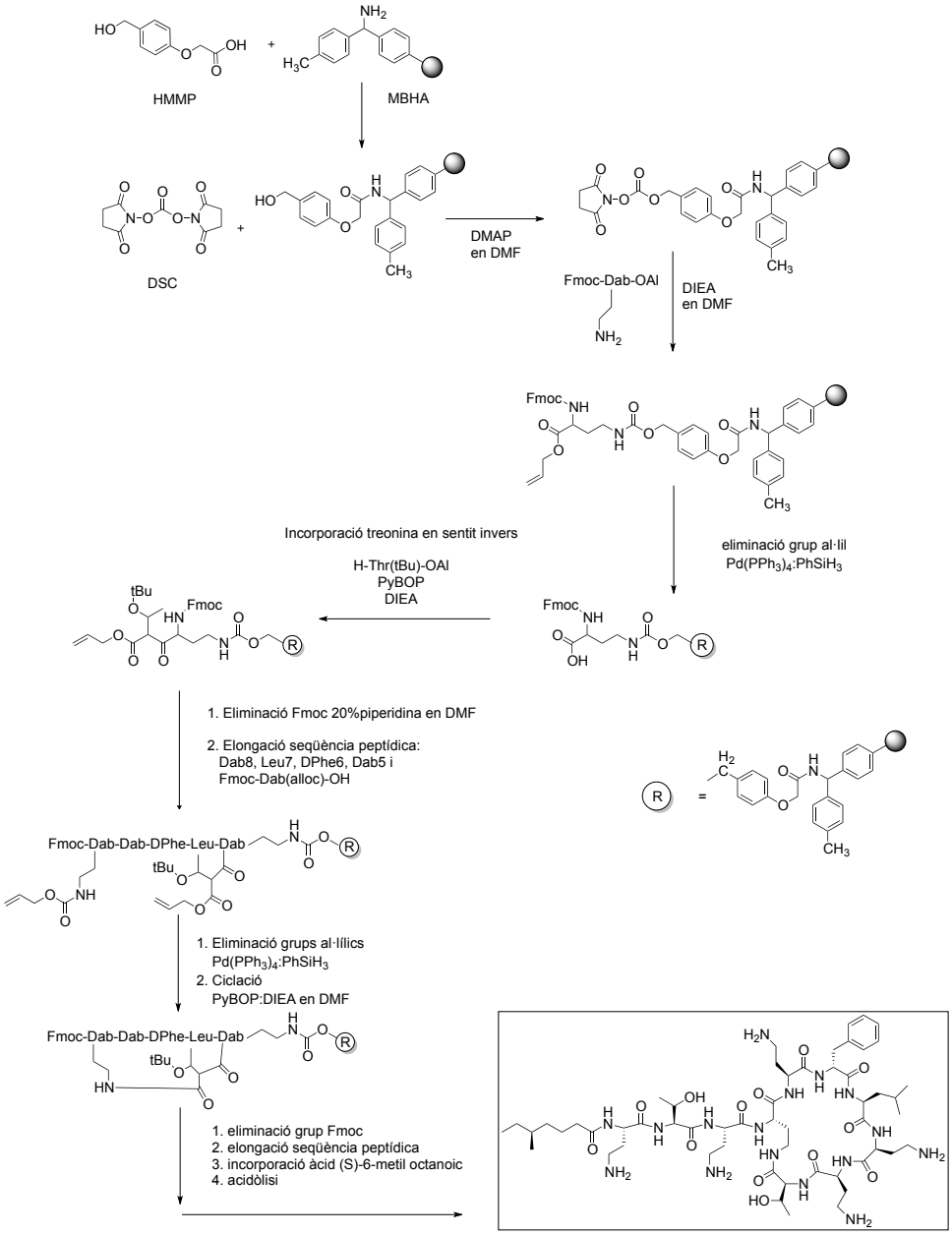


Figura 3.2. Esquema de síntesis de la PxB que es va realitzar en el grup.

Donada la relativa complexitat de la síntesis de les polimixines, és lògic pensar en

la substitució de l'enllaç lactama per un altre tipus d'enllaç sintèticament mes fàcil de dur a terme. S'ha de tenir en compte, però, la implicació que aquest canvi pot suposar pel que fa a una possible disminució de l'activitat antimicrobiana dels anàlegs obtinguts.

Rustici i col·laboradors[96] van sintetitzar una sèrie d'anàlegs de PxBN, on el tancament del cicle era per un enllaç disulfur entre dues cisteïnes que substituïen el Dab-9 i la Thr 10. En el nostre grup (màster experimental Maria Garcia) es van sintetitzar també uns anàlegs seguint aquesta estratègia.[97,98]

La síntesis sota aquestes condicions era més senzilla de concepció: sintesi normal Fmoc/tBu (sense altres protectors), es sintetitza el pèptid lineal i es cicla espontàneament per oxidació al aire, cosa que en permet obtenir rendiments molt més alts i purificació senzilla i amb altes rendiments de recuperació.

3.2.ESTUDI DE LES RELACIONS ESTRUCTURA ACTIVITAT EN POLIMIXINES

Des de que les polimixines han pres novament rellevància, s'han desenvolupat diferents estudis amb la finalitat d'obtenir informació estructura-activitat i modificacions possibles per millorar la seva activitat i disminuir la seva toxicitat.[78] S'han estudiat variacions en la llargada de la cadena d'àcid gras, en els residus de Dab, en la regió hidrofòbica DPhe[6]-Leu[7], en la mida de l'anell peptídic, i en la llargada del segment lineal. (Figura 3.3) També s'han assajat altres modificacions com la linealització de la seqüència, la conjugació, i la generació de compostos mimètics.

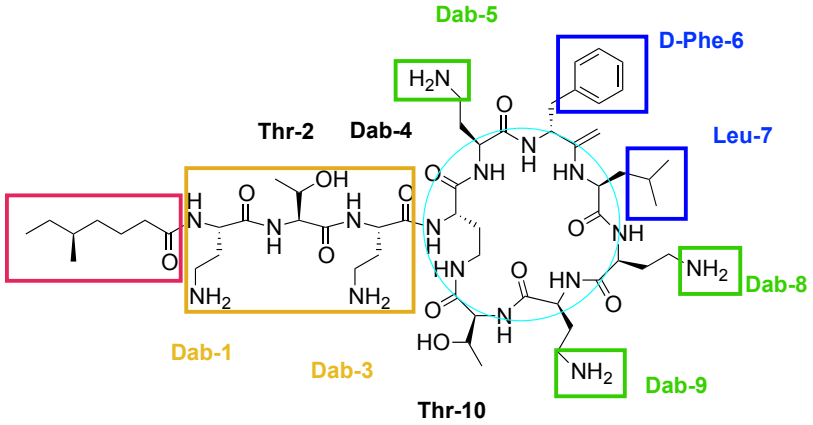


Figura 3.3. Estructura de la Polimixina B1. Detall de les zones que s'han estudiat les modificacions. Vermell: àcid gras terminal; groc: tripèptid lineal; verd: residus Dab; blau: motiu hidrofòbic; blau turquesa: anell peptídic.

A continuació es detallen aquests resultats

3.2.1 Substitucions dels residus Dab i modificacions de la cadena lateral

Com ja s'havia determinat, les càrregues positives associades als grups amino de les cadenes laterals dels residus de Dab són importants i necessàries per a la interacció electrostàtica amb les membranes, i per a la seva activitat antimicrobiana. De fet, si es bloquegen aquestes cinc càrregues, per exemple amb grups metanosulfonat, s'obté un compost inactiu. [99]

Els primers intents d'obtenció d'anàlegs, els trobem descrits pels grups de Srinvinasa[100], Teuber [101] , Witzke [102] i Schindler [103] cap a finals dels anys 70. Van dur a terme modificacions sobre els grups γ-amino dels residus de Dab, que incloien l'acetilació[100,101], la desaminació[100], la formilació [100], la dinitrofenilació [100,102], la guanidilació[100], la carbamilació[102], i reaccions amb 5-amino-2,4-dinitrofluorobenzè[100], fosfat de piridoxal[100] o dimetilaminonaftalen-5-sulfonil (dansil)[103]. Cap d'aquestes modificacions va donar cap anàleg actiu. Només uns derivat poli-formilats van donar una activitat similar (triformil[1,3,8]-PxB) o inclús superior (diformil[1,3]-PxB) a la de la PxB[100], i uns altres derivats N-γ-benzilats que es van mostrar actius front el Gram-positiu *Staphylococcus aureus*[102]. Sembla que la reducció del caràcter catiònic, i la presència de grups lipofílics augmenta l'activitat front a bacteris Gram-positius.[102,104]

Weinstein i col·laboradors [104] van sintetitzar una sèrie d'anàlegs modificats en la cadena lateral dels residus Dab-1 i Dab-9, amb diferents Nγ acilacions i Nγ alquilacions, observant que només els anàlegs amb substituents carregats positivament, o substituents polars, mostraven millor activitat que la PxB, destacant l'anàleg L-arginil-Dab^{9}-PxB. Al llarg de tota la sèrie, es va observar que el Dab-9 era el més important quant a l'activitat microbiana, ja que els anàlegs que el duien modificat, presentaven en general, activitats 4 vegades menors respecte als anàlegs que presentaven la mateixa modificació en el Dab1.

Es va observar també que introduir en posició Nγ grups lipòfils, com en els anàlegs Nγ-etil-PxB, Nγ-propil-PxB, Nγ-6-metiloctanoil-PxB i Nγ-α-aminooctanoil-PxB, s'amplia l'espectre d'acció, mostrant una potent activitat contra bacteris Gram-positius[104].

També s'ha estudiat la substitució dels Dab per altres aminoàcids proteinogènics neutres o bàsics. Kurihara et al [105] van fer un anàleg de colistina amb tots els residus Dab substituïts per Lys, obtenint activitats similars a la de la colistina. Rustici i col·laboradors [96] van substituir els diferents Dab per Lys, i a més van canviar la DPhe per la LPhe, i van ciclar l'heptapèptid ser per formació d'un enllaç disulfur intramolecular. Els anàlegs resultants van mostrar poca activitat antimicrobiana, tot i que alguns mostraven molta afinitat pel LPS, demostrant una vegada més que una unió forta al LPS no implica una bona activitat antibiòtica.

Porro i col·laboradors [106–108] van observar que la substitució dels Dabs per Lys, Arg o His donava lloc a pèptids que s'unien fortament al LPS, de fet alguns inclús millor que la PxB, però per ells sols no mostraven activitat antimicrobiana, si no que tenien capacitat de sensibilitzar la membrana en presència d'altres antibiòtics hidrofòbics.

Més recentment, Sakura [91] i col·laboradors, per estudiar la contribució de cada Dab en la interacció amb el LPS i l'activitat antimicrobiana van realitzar substitucions dels diferents residus de Dab per alanines, Ala. Del seu estudi es desprèn que els Dab de l'anell d'heptapèptid (Dab 5,8,9) són més importants per a l'activitat antimicrobiana que els de la cadena lineal (Dab 1,3). Tots els anàlegs sintetitzats amb alanines van mostrar menys afinitat pel LPS, i el que presentava els 5Dabs substituïts va ser el que presentava la major reducció d'activitat.

En un intent de reduir la nefrotoxicitat associada a les polimixines, en el grup de Vaara [93] es van sintetitzar anàlegs que contenien només les tres càrregues positives de l'anell d'heptapèptid. En les posicions dels Dab1 i Dab3 es van introduir aminoàcids neutres tals com Thr, Ser, Abu (àcid aminobutiric). Els anàlegs obtinguts van mostrar una potent activitat, fins i tot més gran que la de la PxB. En canvi, en la substitució dels Dab de l'anell per Abu, es perd del tot l'activitat, remarcant una vegada més la importància d'aquests tres aminoàcids de l'anell.

En altres estudis SAR, Tsubery i col·laboradors [90] van substituir els diferents Dab per altres aminoàcids de caràcter bàsic, i amb cadenes laterals més llargues, com ara Lys, ornitina (Orn), o més curtes com ara 2-amino-4-guanidinobutíric i 2,3-diaminopropionic. Es va poder comprovar que a part del caràcter catiònic dels residus, es requeria una llargada òptima de la cadena lateral, que havia de ser de dos grups metilènics, com en el Dab. Les altres substitucions donaven una disminució de l'activitat antibacteriana.

En resum, els trets principals dels residus de Dab que són importants per a l'activitat i la afinitat pel LPS són:

- S'ha de complir el caràcter catiònic de la seva cadena lateral.
- La longitud òptima d'aquesta cadena és de dos grups metilens.
- La posició dels residus Dab en la seqüència peptídica és important ja que confereix a la molècula la distribució espacial correcta de les càrregues per a una eficient interacció electrostàtica amb els fosfats del lípid A.

Fins al moment, els anàlegs que s'han sintetitzat substituint els Dab per altres residus han tingut un èxit variable. En general, els residus de Dab, i especialment els de l'anell d'heptapèptid, són indispensables per a l'activitat antimicrobiana.

3.2.2. Modificacions de les regions hidrofòbiques

La molècula de PxB presenta dues regions hidrofòbiques: la formada per l'àcid gras de l'extrem N-terminal, i la que formen els aminoàcids de les posicions 6 i 7. Ambdues regions estableixen interaccions hidrofòbiques amb el LPS, i permeten la inserció del pèptid en la pared cel·lular bacteriana.[76,77]

En primer lloc es tractaran en les modificacions en la cadena d'pàcid gras, i seguidament en la regió hidrofòbica de l'anell peptídic

Ja s'ha vist que la presència de l'àcid gras és necessària per a l'activitat antimicrobiana de la polimixina donat que aquest és el que s'insereix en la membrana externa, pertorba l'empaquetament dels àcids grassos del lípid A i permet la entrada auto induïda del pèptid . [76,77]

A més, com s'ha pogut comprobar, els anàlegs als quals se'ls ha eliminat l'àcid gras i l'aminoàcid en posició 1, i que anomenem nonapèptids, perden la seva capacitat antibiòtica, però conserven la capacitat d'unir-se al LPS.[109] De fet, conserven la propietat de desestabilitzar i permeabilitzar la membrana externa, de manera que si s'administren conjuntament amb altres antibiòtics que no poden penetrar la ME, s'observa l'efecte sinèrgic en que col·laboren i finalment si que s'observa activitat antimicrobiana.

Es va observar que els nonapèptids de colistina i polimixina presentaven un perfil toxicològic significativament més reduït.[93,109,110] De manera que la toxicitat de les polimixines es va atribuir en part a l'àcid gras N-terminal.

Les polimixines que es troben en la natura presenten com a àcid gras N-terminal l'àcid (S)-6-metiloctanoic en la PxB_1, 6-metilheptanoic en la PxB_2, octanoic en la PxB_3, heptanoic en la PxB_4, nonanoic en la PxB_5 i 3-hidroxi-6-metiloctanoic en la PxB_6. [109,111–113]També s'han trobat en la natura anàlegs de la colistina amb àcids 6- i 7-metiloctanoic. [94] però s'ha observat que la variació de del grup metil de la posició 6 a la 7 no comporta diferències significatives d'activitat antimicrobiana entre els diferents anàlegs (tots ells sintetitzats per separat mitjançant síntesis en fase sòlida)[88,114]. En canvi si que es va observar que s'unien amb més afinitat al LPS les polimixines que tenien substituents més hidrofòbics, com el nonanoil (PxB_5), que no pas l'octanoil (PxB_3) o l'heptanoïl (PxB_4).[114,115]

Chihara i col·laboradors cap als anys 70.[116,117]. I Sakura més recentment[115,118] han estudiat més detalladament aquestes relacions N^{α}-SAR, observant que anàlegs amb els grups ciclohexilbutanoil, 4-bifenilacetil i 1-adamantanacetil presentaven activitats comparables a la PxB i la colistina, i amb una unió al LPS lleugerament més forta. En canvi, la introducció d'un grup pirè va disminuir l'activitat antimicrobiana respecte a la polimixina.

El grup Pfizer [119] van dur a terme estudis partint de la polimixina nonapèptid, i introduint diferents cadenes d'àcids grassos, de llargades variables (C8, C9, C10), lineals i amb ramificacions, observant que les cadenes de més de 8 carbonis, i amb ramificacions (com ara el grup 6-metil) reduïen l'activitat respecte a la PxB. Cal tenir en compte, però, que eren derivats del nonapèptid de la polimixina, i per tant, la reducció observada en quant a l'activitat es pot associar també a la manca del Dab-1, que ja s'havia vist que era important per a la interacció amb LPS i l'activitat antimicrobiana.

La substitució per àcids grassos de cadena més curta (<C7) i no ramificades van donar anàlegs menys actius,[94] Es va observar que el substituent hexanoïl presentava activitat, encara que menor respecte a la polimixina, i en canvi els substituents pentanoïl i butanoïl presentaven una activitat 10 i 20 vegades menor, respectivament.

Tsubery i col·laboradors[120], van substituir la cadena d'àcid gras per una seqüència hidrofòbica d'aminoàcids. A la polimixina nonapèptid se li va afegir una cua de 3 i 6 alanines, que no va comportar un augment de l'activitat respecte a la PxBN. Es va assajar el grup hidrofòbic Fmoc, obtenint un augment de l'activitat i una disminució de la toxicitat, en assajos in vitro amb ratolins, essent el compost Fmoc-PxB decapèptid més actiu que el seu anàleg nonapèptid, Fmoc-PxBN.

En definitiva, una bona activitat antimicrobiana ve donada per una relació òptima entre la llargada de la cadena i el volum en l'espai dels seus substituents. Així, segons el que es desprèn de la bibliografia, una llargada òptima seria entre 7 i 9 carbonis, tal i com es troba en la natura. Cadenes més llargues o més curtes presenten disminució de l'activitat. Els substituents llargs o molt voluminosos, presenten un impediment estèric que dificulta la inserció del pèptid en la membrana de manera que no es pertorba l'empaquetament de la membrana i no hi ha activitat antibiòtica

Pel que fa als aminoàcids en posicions 6 i 7 observem que, en les polimixines naturals, la posició 6 normalment està ocupada per DPhe (PxB) o DLeu (colistina), i la posició 7 està ocupada per Leu tant per la PxB com per la colistina. Es poden trobar, però, en algunes polimixines naturals minoritàries, aminoàcids diferents en posició 7 com ara la isoleucina (Ile), treonina (Thr), norvalina (NorVal) i valina (Val), sense afectar significativament a la seva activitat antibacteriana.[114,121]

Tsubery i col·laboradors[122], van mesurar la capacitat de sensibilitzar la membrana bacteriana d'anàlegs de la PxBN. I es va veure que les substitucions per aminoàcids més polars, reduïen la capacitat de permeabilitzar la membrana, i substituint la DPhe pel seu enantiòmer, la LPhe provocava una pèrdua total de la permeabilització. La única substitució que donava una mica d'activitat era la de DPhe per DTrp, donada la naturalesa conservativa de la substitució.

Més recentment, Sakura i col.[91] han reexaminat aquestes substitucions a partir de la PxB. Van obtenir que els anàlegs obtinguts per les substitucions de la DPhe-6 per DTrp, DAla i LPhe , com de la Leu-7 per Ala o Trp donaven tant bones activitats com bones afinitats d'unió al LPS, donant a entendre que tant la pèrdua d'hidrofobicitat com el canvi de configuració de la DPhe no eren tan importants com s'havia cregut fins al moment. Se suposa doncs que l'àcid gras N-terminal es capaç de compensar la pèrdua d'hidrofobicitat en aquesta regió.

Cal remarcar que si la pèrdua del motiu hidrofòbic és total, com en el cas de l'anàleg Gly[6,7]-PxB, es perdia totalment l'activitat antimicrobiana.

En el nostre grup es va sintetitzar un anàleg de PxB, ciclat per enllaç disulfur entre dos residus de cisteína,[97] on es va permutar la Leu7 pel Dab8, de manera que ara el motiu hidrofòbic quedava trencat per la presència d'un Dab (DPhe6-

Dab7-Leu8). No es van realitzar assajos microbiològics, però si es va determinar una pèrdua de selectivitat pels lípids que es bescanvien en els contactes vesícula-vesícula i també una disminució de la capacitat de permeabilitzar els les vesícules que s'empraven com a model de membranes. En canvi, l'anàleg que es va sintetitzar on es va substituir la D-Phe per D-Trp si que va mostrar bona unió a les vesícules, i formació dels contactes entre elles.

De Visser[94] i col·laboradors van substituir aquest segment DPhe6-Leu7 per dipèptids mimètics, com ara l'acid δ-aminovalèric, la 4-fenil-4-carboximetilpiperidina, l'àcid *m*-aminometilbenzoic, la (S)-3-amino-1-carboximetilcaprolactama, la *N*-carboximetilpiperazina i el trans-4-aminometilciclohexà. Malauradament cap d'aquests anàlegs va donar activitat front a *E.coli*.

Resumint, s'ha pogut observar que aquest fragment hidrofòbic és un segment altament conservat entre les polimixines i que sembla que ser important, tot i que no és indispensable per a l'activitat antibacteriana ni la unió al LPS.

3.2.3. Anàlegs de polimixina: modificacions de l'esquelet peptídic

En l'estructura de la polimixina trobem com a element principal un cicle de set aminoàcids, tancat per un enllaç amida entre el grup NH_2-γ del residu Dab-4 i el grup COOH-α del residu Thr-10. El cicle resultant és de 23 baules, i sembla ser, pels models moleculars del complex PxB-LPS que s'han obtingut, que aquest tamany és l'òptim per a una bona interacció electrostàtica i hidrofòbica amb el LPS.[86,90,123]

Es troben descrits en la bibliografia diferents intents de modificar l'anell, bé sigui agrandint-lo o fent-lo més petit.

Vogler i col[84,86] van addicionar un nou residu de Dab obtenint un compost que era menys actiu en comparació a la PxB. Tsubery i col [90] partien de la PxBN: van substituir els Dab per Lys i per Orn, de manera que es tancava el cicle pel residu de Lys o Orn, que tenien 2 i 3 metilens més en la cadena lateral, de manera que el cicle passava de 23 a 25 i 26 àtoms respectivament. També van ciclar la PxBN Dab-3 (augmentant en un aminoàcid el cicle) o pel Dab-5, disminuint en un aminoàcid el cicle. En cap cas es va obtenir una capacitat permeabilitzadora de membrana comparable a la de la PxBN.

En definitiva, sembla que l'anell peptídic ha de complir aquest requisit dels 23

àtoms, per a poder mostrar bona unió al LPS i bona activitat antibiòtica.

3.2.4. Anàlegs de polimixina: modificacions en el tripèptid lineal

El segment lineal que uneix el cicle heptapeptídic a la cua d'àcid gras està format per tres aminoàcid, dos d'ells Dab i una treonina. Tot i que aquest segment N-terminal (N-acil-Dab1-Thr2-Dab3) s'ha comprovat que no té ni activitat antimicrobiana, ni afinitat d'unió pel LPS,[124] és un dels elements estructurals importants de la PxB. Aporta dues càrregues positives a la càrrega total de la PxB, i amb els enllaços d'hidrogen que pot establir amb altres residus de la molècula, contribueix a mantenir la correcta estructura amfipàtica necessària per a la seva activitat.

Es troben en la natura polimixines que presenten substitucions en el tripèptid lineal, per exemple la Thr2 per Ser (Polimixina E_4), o el Dab3 per Ser (Polimixina D_1, D_2 i S_1)[125–128]. Totes aquestes substitucions conservatives no afecten a l'activitat antimicrobiana.

Al llarg d'aquests anys s'han realitzat diversos estudis de delecions o substitucions d'aminoàcids d'aquesta regió. Sakura i col[114] van sintetitzar una sèrie d'anàlegs escurçant la cadena del tripèptid. Es va observar que eliminant el Dab1, l'octanoil-PxB nonapèptid tenia una activitat comparable a la PxB; eliminant el Dab1 i la Thr2, l'octanoil- PxB octapèptid reduia 6 vegades la seva activitat respecte la PxB; i eliminant sencer el tripèptid, l'octanoil-PxB heptapèptid no presentava activitat antimicrobiana. Van sintetitzar també els anàlegs deacilats, amb el tripèptid intacte i amb dos i un aminoàcid, observant que només l'anàleg amb el tripèptid intacte era actiu.

En aquest mateix grups es va substituir cada aminoàcid d'aquest segment per alanina, i van constatar que la Thr-2 era més important per a la activitat, que no pas els Dab1 i Dab3, ja que l'anàleg Ala[2]-PxB era força menys actiu que els altres dos anàlegs Ala[1]-PxB i Ala[3]-PxB.[91]

Es va poder extreure d'aquests estudis SAR, que el Dab1, tot i que estava implicat en la interacció electrostàtica, no era un element indispensable per a l'activitat antimicrobiana.

S'han descrit altres anàlegs deacilats de la PxB, on es va substituir el Dab-1 per altres aminoàcids tant polars com hidrofòbics com Arg, Dap, Ser, Phe i Trp,[129] obtenint-se anàlegs que presentaven una activitat comparable a la del compost

de partida, des-FA-Dab1-PxB. En canvi, els anàlegs amb Lys, Ala o Leu en posició 1, tenien l'activitat reduïda respecte al compost de referència.

També van estudiar el comportament dels anàlegs deacilats, amb el tripèptid substituit per [Dab-Dab-Dab] i [Arg-Arg-Arg] observant disminució d'activitat antimicrobiana, però mantenint l'afinitat pel LPS. En canvi, substituint el tripèptid per [Ala-Ala-Ala] es perdia tota activitat.

Per altra banda, Tsubery i col van descriure la síntesis d'anàlegs de PxB i colistina amb el tripèptid [Met-Leu-Phe] unit a la Thr2,[130] i tot i que es perdia l'activitat, es mantenia la capacitat d'unió al LPS i de sensibilitzar els bacteris front a altres antibiòtics hidrofòbics.

En conclusió, es pot extreure de les dades que trobem a la bibliografia, que només es pot eliminar un aminoàcid de la seqüència del tripèptid N-terminal, essent el Dab1 el que menys afecta a l'activitat. I també que per a mantenir les propietats de les polimixines, només són vàlides les substitucions d'aminoàcids de caràcter conservatiu.

3.2.5. Altres anàlegs de polimixina

Per concloure amb els estudis de SAR que s'han fet fins al moment, trobem a la bibliografia diferents autors que han intentat obtenir anàlegs de PxB mitjançant linealització de la seqüència, conjugació o per obtenció de compostos mimètics.

Rustici[96], Vaara[110], i Kurihara[105] descriuen en els seus articles com obtenir anàlegs lineals de la polimixina, però sense obtenir resultats positius. De manera que l'heptapèptid cíclic esdevé un requeriment estructural imprescindible per a l'activitat antimicrobiana i permeabilitzadora de membrana.

Altres, han intentat conjugar dos o més polimixines, a través d'enllaços covalents amb molècules que fan de pont entre elles, amb la finalitat de neutralitzar els efectes del shock sèptic provocat pel LPS.[131] No es tenen, però, dades microbiològiques ni toxicològiques d'aquests compostos.

I finalment, altres grups han estudiat l'obtenció de compostos que imitin no l'esquelet de la polimixina, sinò les seves propietats fisicoquímiques. Segons això, Frecer i col.[132] descriuen una sèrie de compostos peptídics on alternen aminoàcids catiònics com la Lys, amb aminoàcids apolars, com Val o Phe, intentant simular l'estructura cíclica amfipàtica de la PxB. Aquests compostos van mostrar una potent activitat i una alta afinitat pel LPS.

Altres compostos mimètics inclouen derivats de l'espermina [133] i de l'àcid còlic[134,135], i resulten també molt actius.

3.3. DISSENY NOUS ANÀLEGS

En aquest treball ens vam plantejar com a objectius preparar noves molècules derivades de la polimixina, que igualéssin o milloréssin la seva capacitat antibiòtica, i presentessin menys toxicitat. Al mateix temps que es planejava ampliar la capacitat antimicrobiana front a bacteris multi-resistents i estudiar el potencial contra els Gram-positius.

Com ja s'ha comentat amb anterioritat, la polimixina presenta una sèrie d'elements estructurals que determinen que la seva síntesis no sigui trivial, i impedeix que es pugui sintetitzar a gran escala amb bons rendiments i encara més si pretenen fer diferents anàlegs d'ella. És per això que uns dels objectius que es van plantejar quan es va començar aquest projecte va ser trobar una manera de simplificar la seva estructura, i per tant la seva síntesis, de manera que aconseguint un esquelet peptídic menys complexe, sense que això comportés una pèrdua en l'activitat de les molècules resultants.

En el disseny dels anàlegs es van plantejar les següents modificacions:

En la polimixina, el cicle de set aminoàcids es tanca per un enllaç lactàmic entre el grup carboxílic de la Thr-10, i el grup γ-amino del Dab-9. Aquest enllaç implica haver d'utilitzar un sistema de grups protectors que fa la síntesis complexa i amb risc de baixos rendiments. S'havia descrit ja a la literatura algun anàleg del nonapèptid de polimixina que presentava un enllaç disulfur per tancar el cicle com ara els de Rustici et al, que treballaven amb compostos capaços d'unir-se al LPS.[136] També s'ha trobat en la natura compostos com la ranalexina, esculentina i pipinina (tots tres provinents de diferents tipus de granotes) que presenten cicles tancat per enllaç disulfur.[137] Altres molècules que ja es comercialitzen com a fàrmacs, i a gran escala, com els derivats de la somatostatina, octreotide, lanreotide i vapreotide, que són fàrmacs peptídics per al tractament de l'acromegalia i alguns tumors endocrins, presenten un esquelet heptapeptídic molt similar al de les polimixines, amb un enllaç disulfur tancant el cicle., com es pot observar a la figura 3.4.

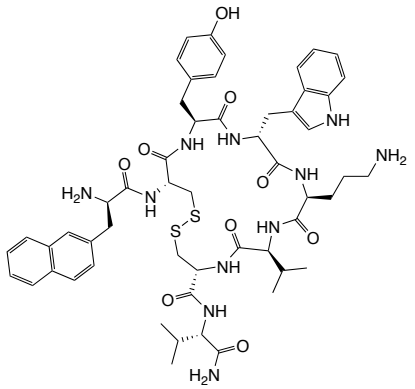


Figura 3.4. Estructura del Lanreotide, fàrmac peptídic amb enllaç disulfur que presenta similituds amb l'esquelet simplificat de polimixina que s'ha dissenyat. Veure Figura 3.5.

En aquest projecte es va decidir doncs tancar el cicle a través d'un enllaç disulfur, de manera que tant el Dab-9 i la Thr-10 es substituirien per Cys, i es podria tancar el cicle mitjançant una oxidació dels grups tiols per a donar un enllaç disulfur. Aquest nou cicle té la particularitat de mantenir la mida requerida i necessària per a mantenir l'activitat, com es va trobar en els estudis SAR que hem comentat en l'apartat anterior: 23 baules.

A més, aquesta substitució presentava també un avantatge pel que fa a la farmacologia de les polimixines: com ja s'ha esmentat, les polimixines, degut a la seva alta estabilitat proteolítica, poden acumular-se al ronyó, essent per tant nefrotòxiques[138,139]. Una hipòtesi de treball és que aquests, si s'acumulessin a l'interior cel·lular del ronyó, en trobar-se amb el medi reductor intracel·lular, provocat per la presència del glutatió i les oxidorreductasses, podrien facilitar la reducció de l'enllaç disulfur i la corresponent apertura del cicle, facilitant doncs la degradació proteolítica de la seqüència peptídica.[138–142]

En substituir la Thr-10 per Cys, queda com a extrem C-terminal el grup COOH en comptes de la cadena lateral de la treonina. Aquest grup carboxílic, aportaria una càrrega negativa a la molècula que no ens interessa, ja que provocaria repulsions amb els fosfats del lípid A, per això es va decidir que estigués en forma de carboxamida. D'aquesta manera, es mantenien els enllaços per pont d'hidrogen que Cajal i col. van proposar que intervenien en la interacció de la PxB amb el lípid A.[69]

L'obtenció de la carboxamida vindrà donada pel tipus d'enllaç que es formi entre la Cys i l'espaiador bifuncional i el tractament d'àcidolisi final.

L'últim canvi que es va proposar a l'esquelet de la polimixina va ser decidir substituir l'àcid (S)-6-metiloctanoic per l'àcid nonanoic. Aquest, és comercialment

assequible, i a més també es troba, minoritàriament, a la natura en la PxB_5 de manera que no s'introdueix un canvi vital en l'estructura, és tracta d'un canvi conservador. L'àcid nonanoic acomplia també els requisits estructurals per a la òptima activitat de la PxB, que dicten que la cadena d'àcid gras ha de tenir una llargada d'entre set i nou àtoms de carboni, i en aquest cas, l'àcid nonanoic manté el número de carbonis que presenta també l'àcid (S)-6-metiloctanoic, 9 àtoms de carboni.

Així doncs, un cop realitzades aquestes modificacions sobre l'estructura de la PxB, obtenim el que anomenem l'anàleg canònic sPB, que serà l'anàleg de partida a partir del qual farem altres modificacions:

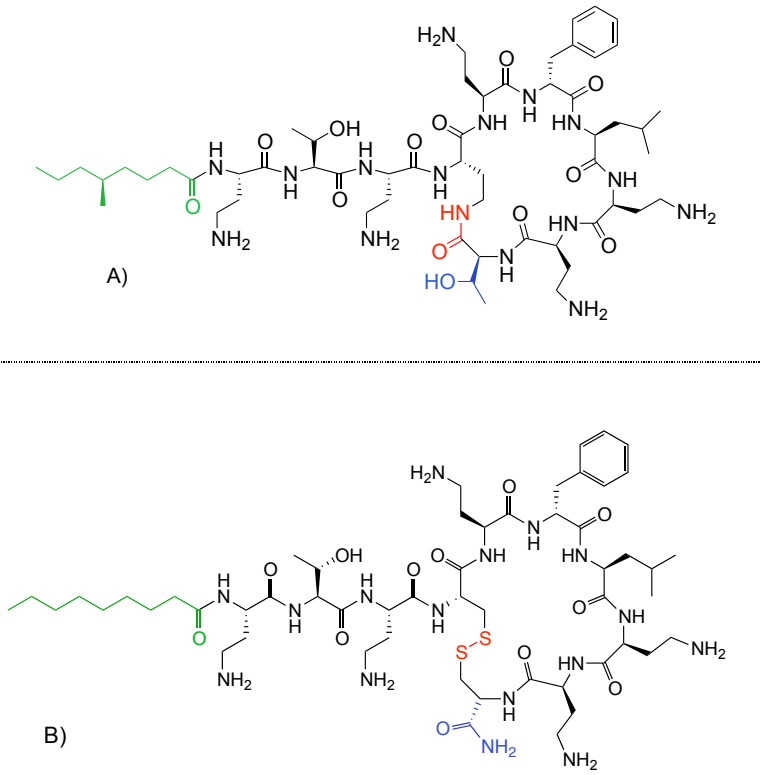


Figura 3.5. A) Estructura de la PxB, B) estructura de l'anàleg sPB, en colors s'han ressaltat els canvis realitzats: verd: canvi en l'acid gras N-terminal; vermell: tancament del cicle per enllaç disulfur; blau: extrem C-terminal en forma de carboxamida.

Com es pot observar, les modificacions aplicades a aquest esquelet simplificat de polimixina, a més de rebaixar la complexitat estructural i sintètica, li confereixen unes potencials propietats farmacològiques que el fan interessant per a posteriors

processos de síntesi a gran escala. Cal destacar la presència d'un aminoàcids D, la DPhe, en l'estructura, que li confereixen estabilitat proteolítica a la molècula, així com la ja esmentada ciclació per enllaç disulfur, que li proporciona estabilitat extracel·lular, i també la presència de regions hidrofíliques i hidrofòbiques, necessàries per a una interacció amb les dianes biològiques.

3.3.1. Disseny d'anàlegs de polimixina per substitució: modificació de la basicitat dels residus 1 i 8

Segons el model proposat per Cajal i col·laboradors, hi ha dos llocs d'unió en l'estructura de la polimixina, que interactuen electrostàticament amb el lípid A (apartat 1.3.2.7, figura 1.12). Es va decidir fer modificacions conservadores en els dos llocs d'unió simultàniament, i així es van agafar el Dab-1 del lloc A i el Dab-8 del lloc B com a residus que serien modificats. D'aquesta manera s'agafava un residu del cicle d'heptapèptid, i un residu de la regió lineal.

Es va decidir fer un estudi de com afectava la variació de la basicitat dels residus 1 i 8 a l'activitat microbiana dels anàlegs obtinguts. Així doncs es van triar residus que anessin des dels més bàsics com l'arginina, Arg, a residus neutres con l'asparagina, Asn, fins a residus poc bàsics com la histidina, His. Passant pel diaminopropiònic, que rebaixa lleugerament la basicitat respecte al Dab. En la següent taula es mostren els aminoàcids que s'utilitzaran en la síntesis dels anàlegs, amb els seus valors de pKa dels grups funcionals de les cadenes laterals.

*Taula 3.1. Aminoàcids emprats en els anàlegs de polimixina i valors de pKa dels grups funcionals de les seves cadenes laterals. * pKa simulat amb el programa Marvin beans.*

	pK_a cadena lateral	
Asn	---	aa neutre
His	6,8	Menys bàsic
Arg(NO_2)	7.65*	
Dap	9,74*	
Dab	10,8	
Arg	12,5	Més bàsic

La substitució dels Dab per Arg, és una substitució de caràcter conservador, on es passa de tenir un grup γ-amino, a un grup guanidini, que també és bàsic i proporciona caràcter catiònic, a més d'allargar un grup metilè la cadena lateral. Aquest lligand ambidentat permet deslocalitzar la càrrega negativa entre els tres àtoms de N, fet que provoca que la interacció electrostàtica amb els grups fosfats del lípid A pugui ser més forta que la que s'estableix entre els grups γ-amino del Dab.

La nitro arginina es va escollir per ser menys bàsica que l'argininia: es preten veure l'efecte d'aquest canvi en l'activitat de l'anàleg resultant.

I finalment es va decidir assajar amb l'asparagina, Asn, per tal de verificar si el canvi per un residu neutre, que pot formar ponts d'hidrogen però no interaccions electrostàtiques ja que no està carregat, feia disminuir l'activitat com s'havia previst.

Així doncs els anàlegs que es van dissenyar van ser:

Taula 3.2. Anàlegs de la polimixina amb les seves corresponents seqüències

Pèptid	Seqüència
PxB	*(S)*-6-metiloctanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo*[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]
1, sP-B	nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys]
2, sP-2Arg	nonanoïl-Arg-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys]
3, sP-2Dap	nonanoïl-Dap-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dap-Dab-Cys]
4, sP-2Asn	nonanoïl-Asn-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Asn-Dab-Cys]
5, sP-2His	nonanoïl-His-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-His-Dab-Cys]
6 sP-2Arg(NO2)	nonanoïl-Arg(NO2)-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg(NO2)-Dab-Cys]

3.3.2. Disseny dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina: aproximació retroinverso.

Per a avaluar la implicació de l'esquelet peptídic de la polimixina en la seva activitat antibiòtica, es va pensar en utilitzar l'estratègia retro-enantio.[143]

Aquesta estratègia descriu que, en una determinada seqüència peptídica, si invertim l'ordre dels aminoàcids en la seqüència, i utilitzem els seus enantiòmers, el pèptid que s'obté presenta dues característiques importants (figura 3.6):

- la topologia de les cadenes laterals queda inalterada, és a dir, presenten la mateixa disposició que en la seqüència de partida.

- la direccionalitat de l'enllaç amida canvia, és la inversa.

Aquestes característiques, han de permetre estudiar quina influència pot tenir l'esquelet peptídic. En un principi és d'esperar que no hi hagi variacions importants pel que fa a l'activitat antimicrobiana, ja que aquesta principalment ve donada per la interacció electrostàtica i hidrofòbica que experimenten les cadenes laterals dels aminoàcids, en contacte amb el lípid A de les membranes bacterianes. Però com alguns dels protons dels enllaços amida podrien intervenir en enllaços de pont d'hidrogen, es va creure convenient observar el comportament d'aquests anàlegs.

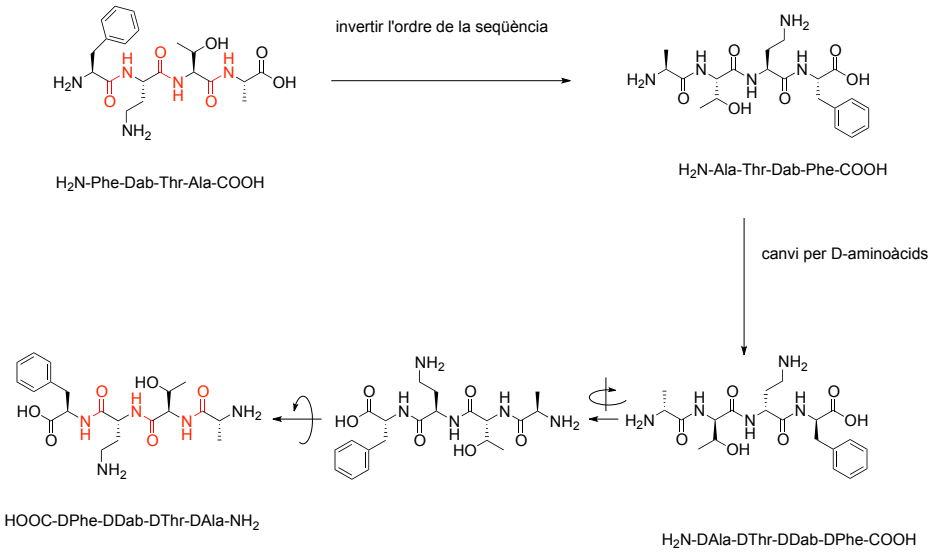


Figura 3.6. Representació esquemàtica de la aproximació retroenantio en la síntesis de pèptids.

A més, com es treballa amb aminoàcids D, excepte la LPhe, es minimitza el problema de la proteòlisis, degradació que experimenten inevitablement els pèptids L quan entren en contacte amb les proteases del cos humà.

Així doncs, amb aquestes premises de la utilització de D-aminoàcids, inversió de l'ordre de la seqüència, i les que ja s'havien establert com a modificacions en l'estructura de la PxB descrites en l'apartat anterior, ciclació per enllaç disulfur i simplificació de l'àcid gras terminal, es van dissenyar els següents anàlegs: l'anàleg retroenantio del sP-B, i l'anàleg retroenantio del sP-2Arg, que fins el moment era l'anàleg que millor activitat havia donat.

Com es pot observar, en invertir la seqüència, la cadena hidrofòbica de l'àcid gras, es veu transformada en una amina alifàtica, en aquest cas l'octilamina.

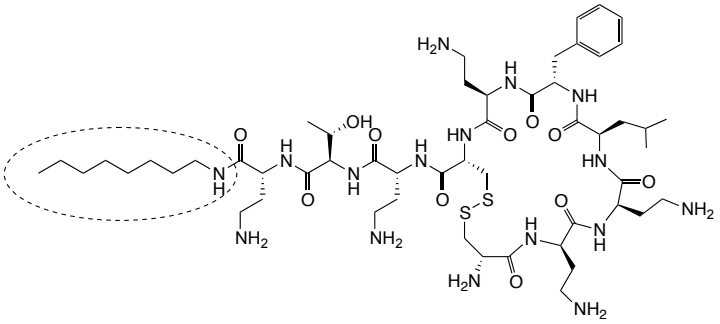


Figura 3.7. Estructura de l'anàleg retroenantiomèric del sP-B, on és destaca l'amina alifàtica de l'extrem C-terminal.

Taula 3.3. Anàlegs retroenantiòmers de polimixina amb les seves corresponents seqüències.

Pèptid	Seqüència
7 retro sP-B	*ciclo(S-S)*[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DDab-DThr-DDab-octilamida
8 retro sP-2Arg	*ciclo(S-S)*[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DDab-DThr-DArg-octilamida

3.3.3. Disseny d'un anàleg conjugat de polimixina amb espermina.

Donada la importància del caràcter catiònic d'aquests pèptids antimicrobians derivats de polimixina, es va pensar en sintetitzar un anàleg que presentés encara un número major de càrregues positives, un anàleg de polimixina conjugat amb una poliamina.

S'ha trobat descrit a la literatura que l'espermina, una poliamina de cadena llarga (figura 3.8) presenta propietats antibiòtiques per ella mateixa, i en administració conjunta amb un altre antibiòtic, augmenta l'efectivitat d'aquest.[133,144] Es va decidir explorar aquests conjugats, acoblant aquesta molècula a un dels anàlegs, al sP-2Arg, el que fins al moment havia donat millors resultats. Per a conferir-li certa flexibilitat conformacional a l'anàleg resultant, es va pensar en incorporar una glicina, Gly, entre la polimixina i l'espermina. La seqüència de l'anàleg resultant és la que es mostra a la taula 3.4. i annexe 6.

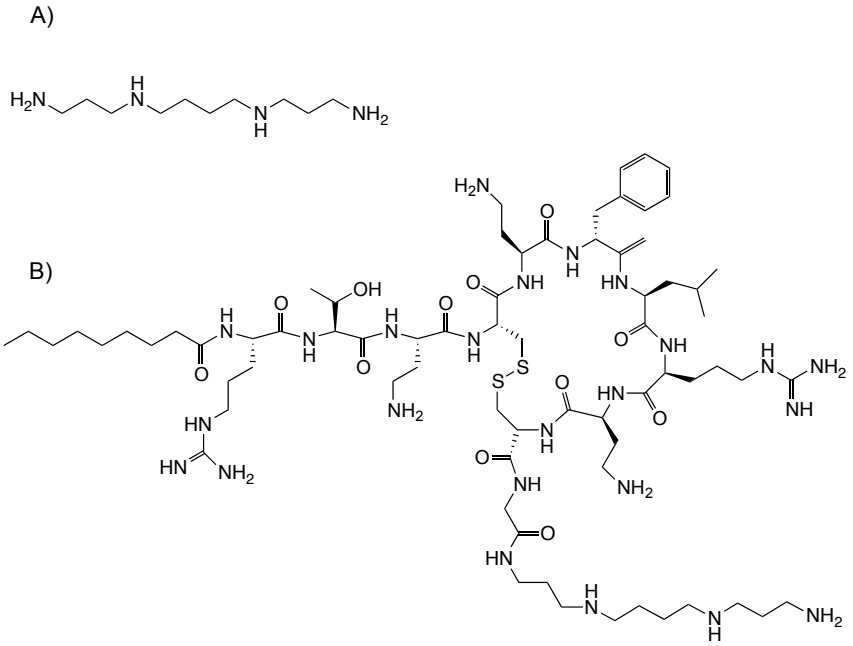


Figura 3.8. A) Estructura de l'espermina. B) estructura de l'anàleg conjugat de polimixina i espermina

Taula 3.4. Seqüència de l'anàleg conjugat de polimixina i espermina.

Pèptid	Seqüència
9 sP-2Arg-G-espermida	nonanoïl-Arg-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-espermida

3.4. SÍNTESIS DELS ANÀLEGS DE POLIMIXINA

3.4.1. Síntesi dels primers anàlegs de polimixina

En una primera etapa d'aquest projecte, durant la realització del màster experimental previ al present treball, es van sintetitzar els anàlegs de PxB que es mostren a la taula 3.5. Aplicant les simplificacions de l'estructura que s'esmenten en l'apartat anterior (enllaç disulfur, àcid nonanoic i extrem C-terminal en forma de carboxamida) es va dissenyar l'anàleg de la PxB sense cap modificació, l'anàleg sP-B. A continuació l'anàleg sP-D, on es permuta la Leu7 pel Dab8 per tal de disposar d'un model d'alternancia d'aa hidrofòbic/hidrofílic al cicle; l'anàleg sP-Trp on es substitueix la DPhe per DTrp, un aminoàcid també hidrofòbic i aromàtic, i finalment un anàleg on l'àcid gras alquílic es va substituir per l'àcid pirenbutíric, que proporcionava una sonda fluorescent molt útil per als estudis de seguiment per fluorescència dels experiments biofísics amb liposomes que s'havien de realitzar posteriorment. [97,98,145]

Taula 3.5. Anàlegs sintetitzats durant el màster experimental. La primera entrada correspon a la PxB per a poder comparar les seqüències.

Pèptid	Seqüència
PxB	*(S)*-6-metiloctanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo*[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]
sP-B	nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys]
sP-D	nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Dab-Leu-Dab-Cys]
sP-Trp	nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DTrp-Leu-Dab-Dab-Cys]
sP-W	pirenbutanoïl-Dab-Thr-Dab-*ciclo(S-S)*[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys]

La síntesis es va realitzar manualment en fase sòlida, seguint l'estratègia estàndard Fmoc/tBu, sobre una MBHA funcionalitzada amb un espaiador bifuncional de tipus Rink,i amb escissió del pèptid i eliminació de tots els grups protectors per tractament acidolític amb TFA:TIS:H2O(95:3:2). (Figura 3.9) La formació de l'enllaç disulfur es va dur a terme, prèvia purificació dels pèptids, per oxidació amb l'oxígen atmosfèric en medi bàsic (solució tampó de bicarbonat d'amoni 20mM a pH10).

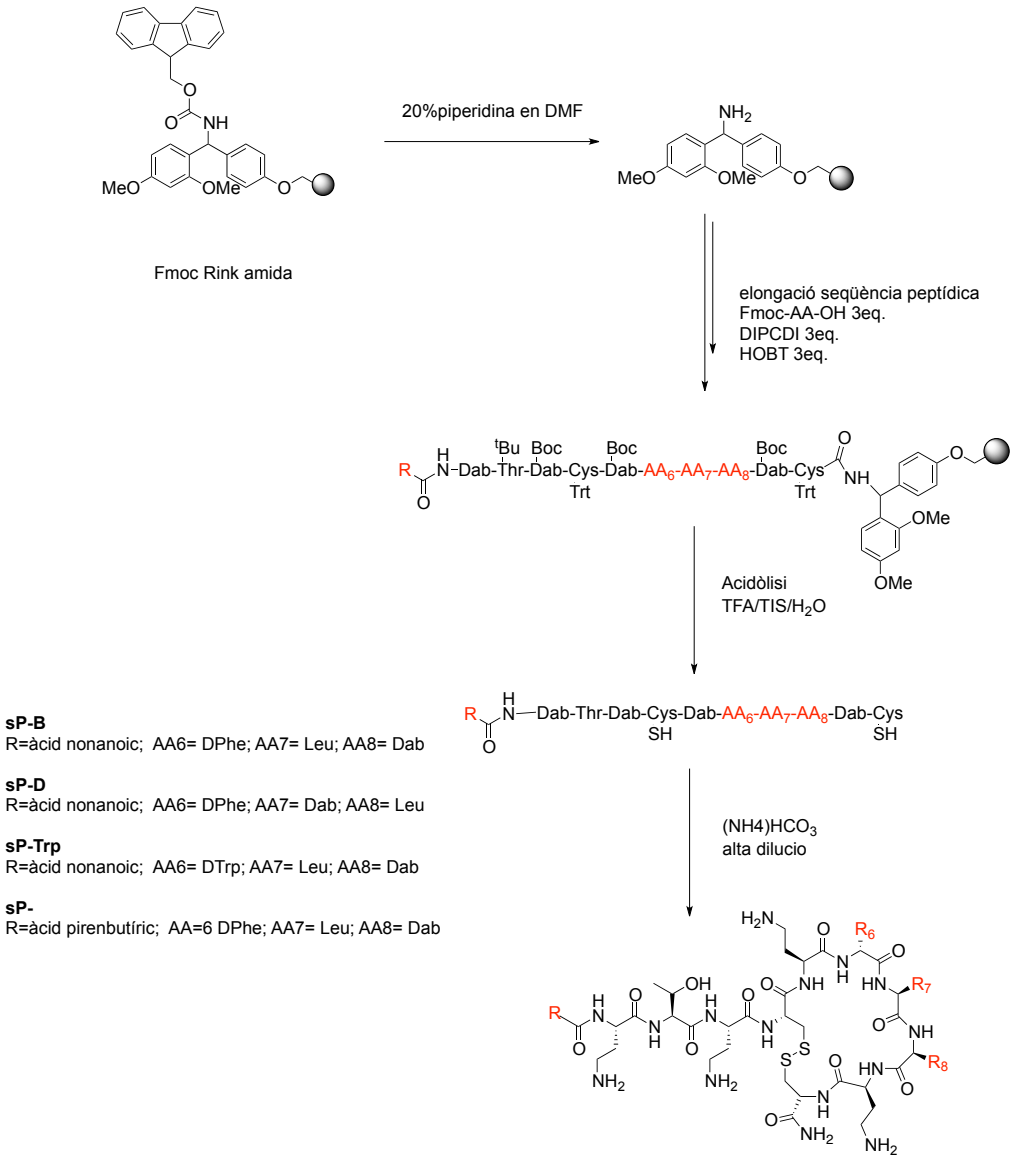


Figura 3.9. Esquema de síntesis dels primers anàlegs de polimixina

3.4.2. Síntesi dels anàlegs de polimixina per substitució (1-6)

En una segona etapa, es va decidir explorar la ciclació oxidativa en resina aprofitant l'efecte de pseudo-dilució[146]. En el grup, s'havia posat a punt una metodologia que permetia ciclar el pèptid en resina, de manera que s'evitava la ciclació en alta dilució i els llargs temps de liofilització, i un reactiu d'acidòlisis que estalviava l'ús d'un grup espaiador bifuncional, de manera que la síntesis es podia dur a terme íntegrament en fase sòlida i en menys passos, cosa que repercutia positivament tant en el temps com en els rendiments de síntesis. (tesi doctoral Montse Rodriguez[147]). Així doncs quan va ser possible, es va utilitzar aquesta nova metodologia en la síntesis dels nous anàlegs dissenyats.

Els anàlegs es van sintetitzar manualment en fase sòlida seguint una estratègia de protecció Fmoc/tBu, emprant una resina MBHA, per a poder obtenir l'extrem C-terminal en forma de carboxamida. El grup protector dels residus de cisteína va ser l'acetamidometil, Acm, que en ser ortogonal als de l'estratègia Fmoc/tBu, permetia eliminar-lo sense afectar a la resta dels aminoàcids. Per a els altres aminoàcids de la seqüència, els grups protectors emprats van ser: Boc per al Dab, Pbf per Arg, ^{t}Bu per Thr, Trt per His i Boc per Dap.

A meitat de la síntesi, per comprovar que els rendiments dels acoblaments i desproteccions són els esperats i que la seqüència està creixent correctament, es va realitzar una acidòlisi a petita escala. S'agafa una petita mostra de la peptidil-resina i realitzant un tractament acidolític es comprova que es tingui el producte de massa esperada i un bon perfil cromatogràfic que indiqui una síntesis adequada. Per acabar, s'elimina l'últim grup Fmoc, i s'hi introdueix l'àcid nonanoic.

El següent pas és la ciclació del pèptid en fase sòlida. L'eliminació dels grups Acm i la formació simultània de l'enllaç disulfur té lloc en una sola etapa de síntesi. Es pot dur a terme de dues maneres: o bé pel tractament de la resina amb una dissolució de iode en DMF o bé per tractament amb trifluoroacetat de tal·li (III) en DMF-anisole. En ambdós casos es deixa reaccionar 2h a temperatura ambient, i posteriorment es neteja la peptidil-resina. En cas d'haver utilitzat el trifluoroacetat de tal·li (III) , cal un rentat addicional amb dietilditiocarbamat de sodi en DMF. En la figura 3.11. es mostra un esquema del mecanisme d'aquesta oxidació en resina.

L'esquema general de l'estratègia de síntesis es mostra a la següent figura:

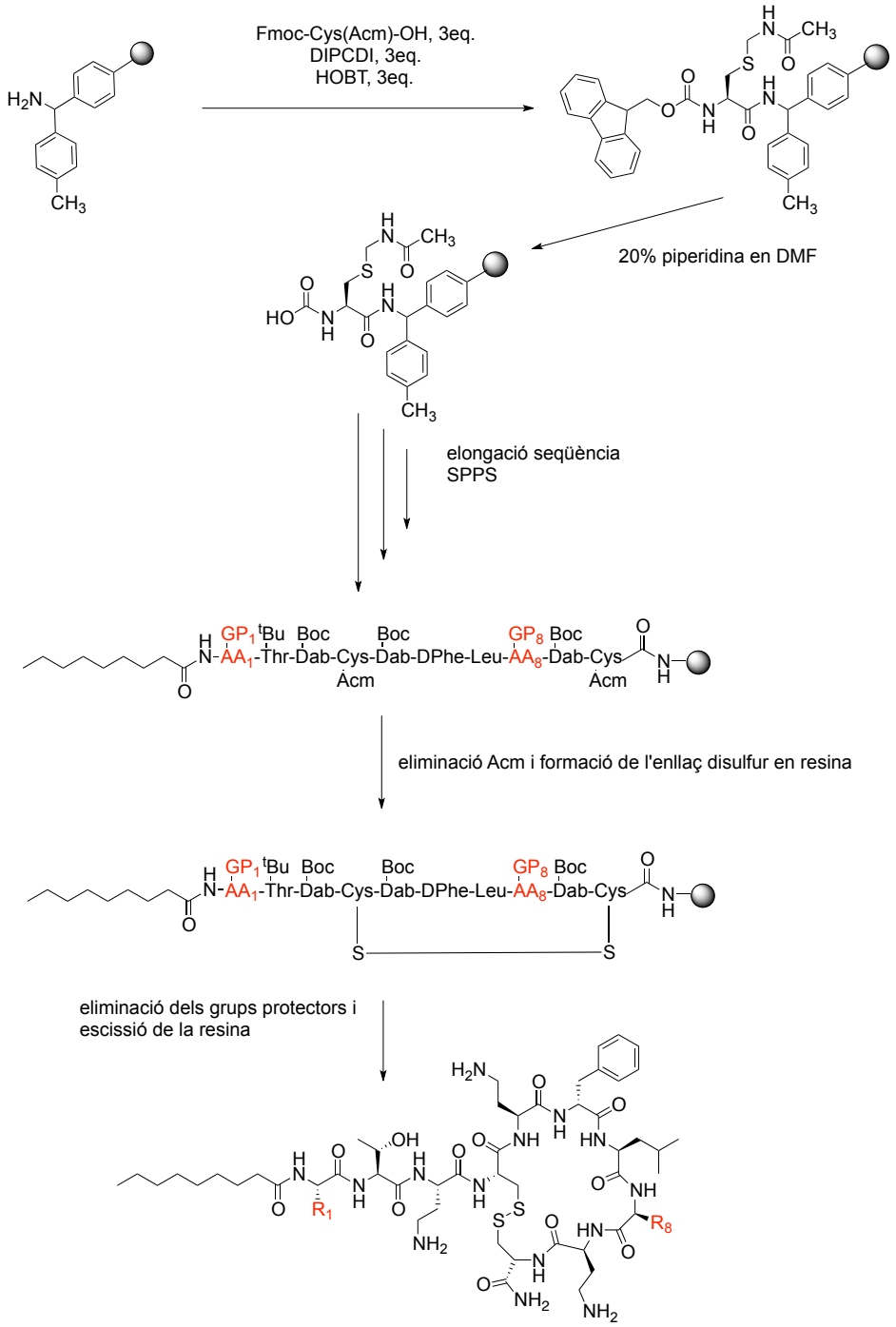


Figura 3.10. Esquema de síntesis dels anàlegs de polimixina 1-5.

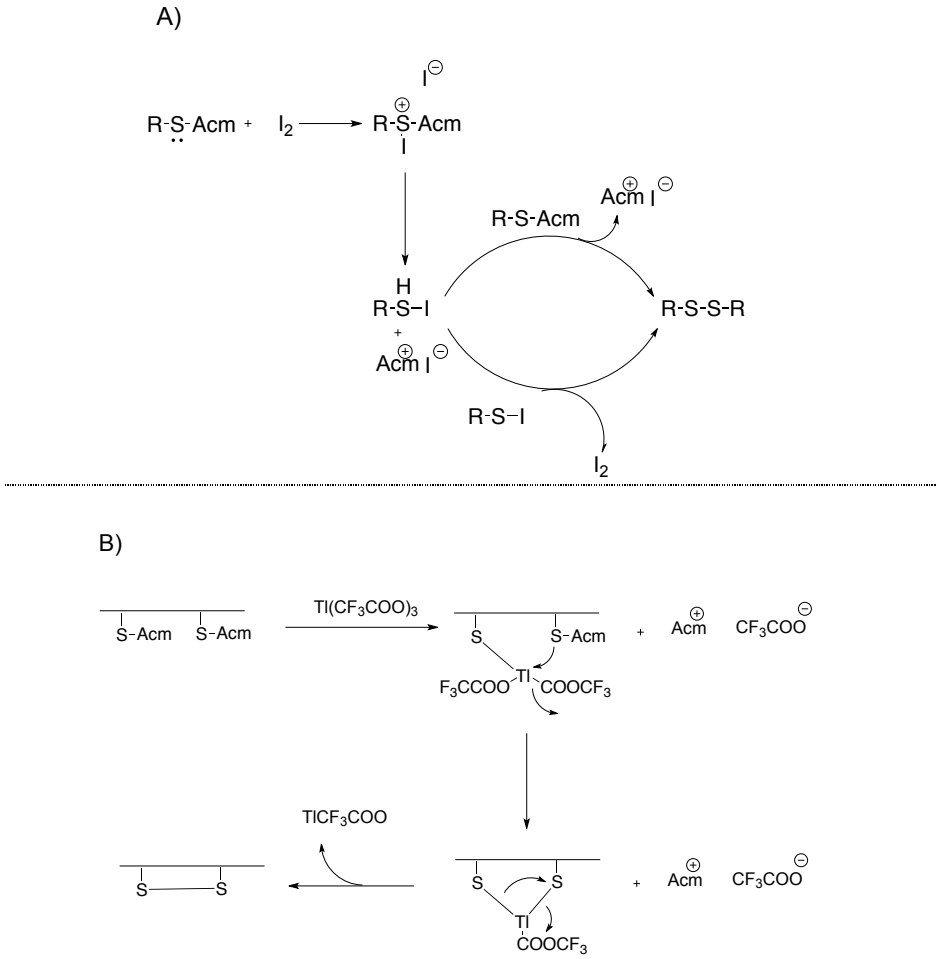


Figura 3.9. Mecanisme proposat per a la eliminació dels grups Acm i formació simultània de l'enllaça disulfur. A) per oxidació amb iode.[148,149] B) per oxidació amb trifluoroacetat de tal·li (III).[150]

Per finalitzar la síntesis s'havien de desancorar els pèptids de les resines. Es van realitzar assajos amb petites mostres de peptidilresina per veure quin era el reactiu d'acidòlisis que donava millor perfil cromatogràfic i posteriorment es va procedir a l'acidòlisis total de la resina. Es va realitzar la caracterització dels crus peptídics per RP-HPLC i EM MALDI-TOF.

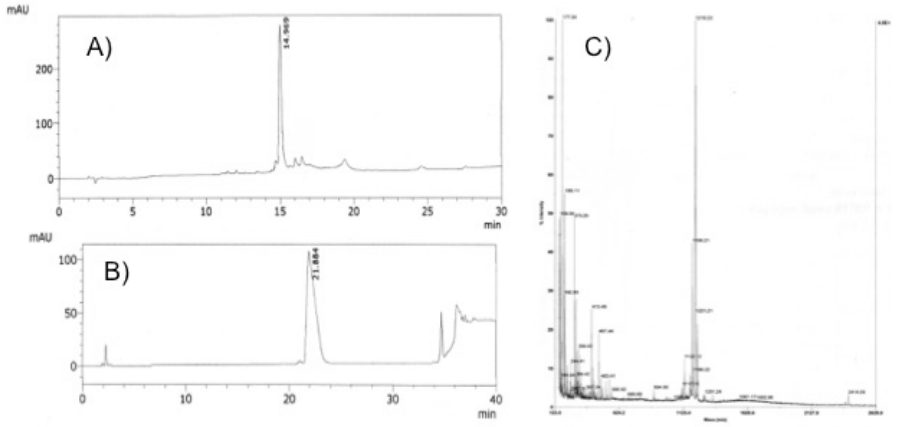


Figura 3.12. Caracterització dels anàlegs. Es mostra l'exemple de l'anàleg 3, sP-2Dap. A) cromatograma del cru peptídic, B) espectre de masses del cru i C) cromatograma del producte purificat.

En la següent taula, 3.6, es mostren els resultats obtinguts, amb les corresponents condicions de formació de l'enllaç disulfur i de desancoratge del pèptid. Es van purificar els crus per HPLC en fase reversa a escala semi-preparativa, obtenint els pèptids amb bones pureses i rendiments acceptables. Es van caracteritzar els productes finals per HPLC i EM MALDI-TOF.

Taula 3.6. Resultats i condicions de formació de l'enllaç disulfur i de desancoratge dels diferents anàlegs de la Polimixina. a) Trifluoroacetat de talli en DMF: anisole. b) TFA/TMSCl/TES/HBr 33% en AcOH. c) TFA/TMSCl/TES

Anàleg PxB	Reactiu oxidació	Reactiu acidòlisis	cru peptídic	Puresa (%)	EM MALDI-TOF	Rendiment global	Pèptid pur
sP-B	a	b	133 mg	80%	$[M+H]^+$=1223,94, $[M+Na]^+$=1245,93 $[M+K]^+$= 1261,90	17%	24 mg
sP-2Arg	a	b	208 mg	80%	$[M+H]^+$=1336,01, $[M+Na]^+$=1358,00 $[M+K]^+$= 1373,98	15%	32 mg
sP-2Dap	a	c	335 mg	85%	$[M+H]^+$=1196,27 $[M+Na]^+$=1218,41 $[M+K]^+$= 1234,35	23%	54 mg

sP-2Asn	a	c	305 mg	75%	$[M+H]^+$=1297,59, $[M+Na]^+$=1319,57 $[M+K]^+$= 1335,49	18%	49 mg
sP-2His	a	c	278 mg	64%	$[M+H]^+$= 1251,66, $[M+Na]^+$=1273,64 $[M+K]^+$= 1289,0	10%	25 mg

Síntesis l'anàleg de polimixina **6**, sP-2Arg(NO_2)

La síntesis d'aquest anàleg s'explica a part perquè es va dur a terme seguint una metodologia lleugerament diferent, ja que va ser dels primers anàlegs que es van sintetitzar.[151,152]

Es va treballar amb una resina MBHA, a la que se li incorporava el grup espaiador bifuncional de tipus Rink. Es va seguir una estratègia Fmoc/tBu i es va es va construir tota la seqüència peptídica. Es va treballar amb el grup acetamidometil per a protegir el grup tiol de les cisteïnes. Un cop s'ha incorporat l'àcid nonanoic, es va procedir a la formació de l'enllaç disulfur en resina, per oxidació dels grups Acm amb iode en DMF. I finalment es va realitzar una acidòlisi, donat que es va treballar amb el Rink linker, es va poder realitzar en les condicions estàndar TFA:TIS:H2O, tal i com es mostra en la figura 3.13.

Taula 3.7 Resultats de la síntesi de l'anàleg 6.

Anàleg PxB	Reactiu oxidació	Reactiu acidòlisis	cru peptídic	Puresa (%)	EM ESI	Rendiment global	Pèptid pur
6 sP-2Arg(NO2)	I2 DMF:anisol	TFA:TIS:H_20	133 mg	80%	$[M+2H]^{2+}$ /2 714.0 $[M+3H]^{3+}$ /3 476.5	22%	64 mg

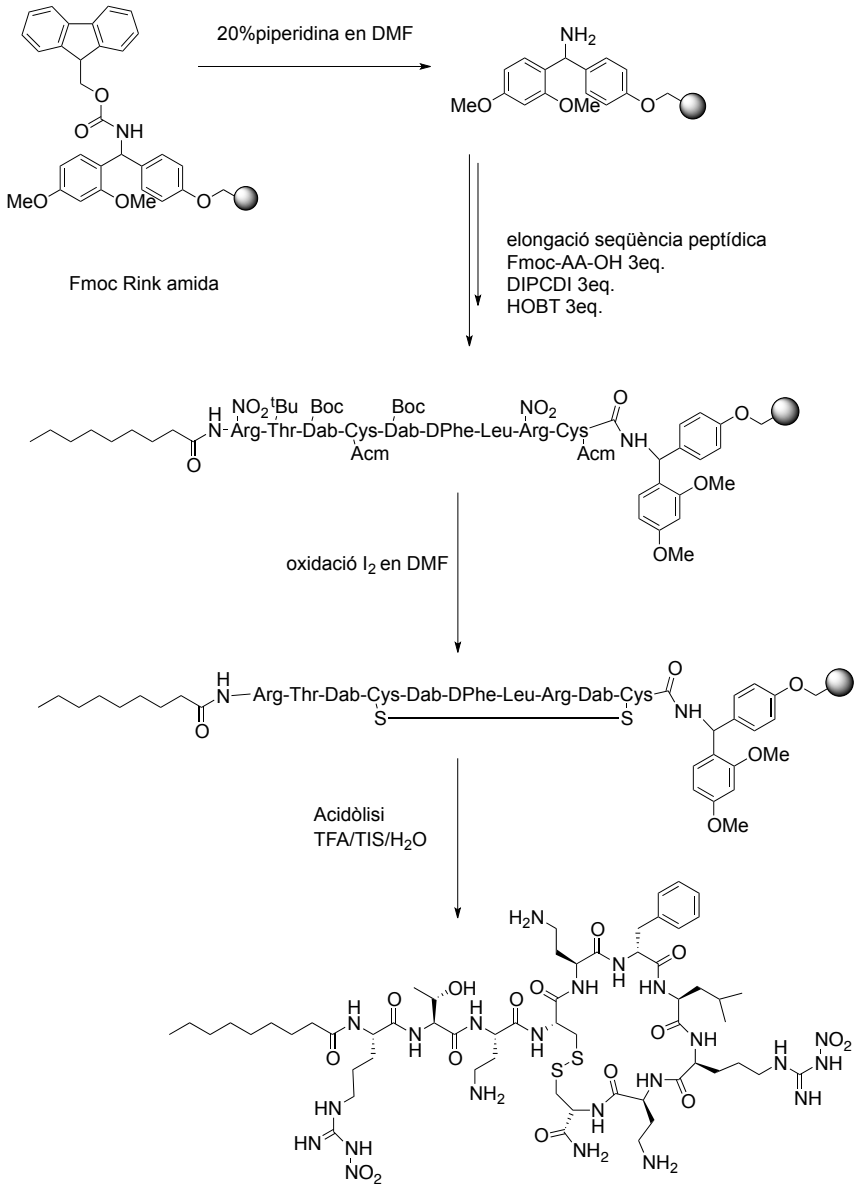


Figura 3.13. Esquema de la ruta sintètica utilitzada per a l'obtenció de l'anàleg 6, sP-2Arg(NO_2).

3.4.3. Síntesis dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina.

Tal i com ja s'ha descrit en l'apartat de disseny dels anàlegs, es va proposar sintetitzar dos anàlegs retroenantiomèrics de polimixina. Aquests anàlegs presentaven una disposició de les cadenes laterals dels aminoàcids idèntica a la dels seus anàlegs, però que mostraven la direccionalitat de l'enllaç amida invertit, és a dir, l'enllaç amida es formava entre el grup amino del aminoàcid AA i el grup carboxílic de l'aminoàcid AA+1, tal i com es pot observar a la figura 3.14.

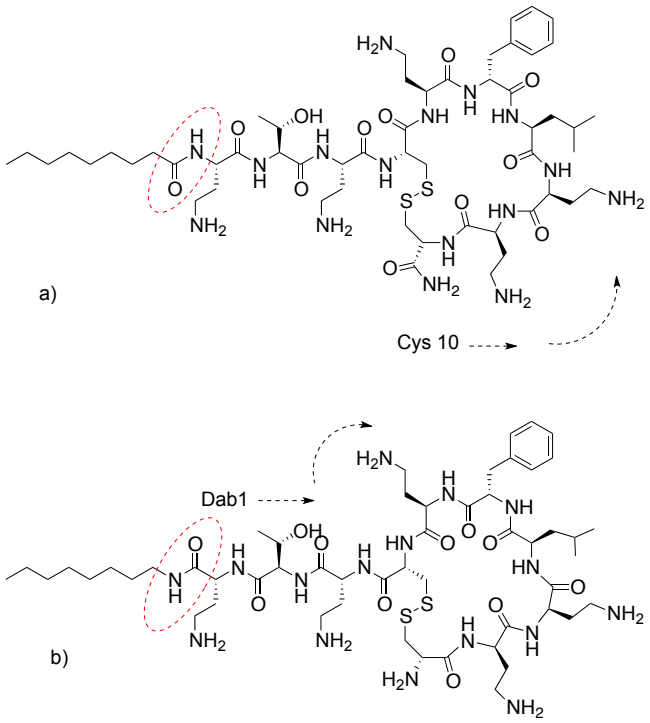


Figura 3.14. Esquema de l'anàleg sP-B (a) i l'anàleg retro-sP-B(b), on es pot comprovar , en vermell, la direccionalitat de l'enllaç amida. Les fletxes indiquen el sentit de la síntesi.

Aquesta diferència estructural és la que ens marca la diferent ruta sintètica que s'ha de seguir per a aquests anàlegs, on el punt clau és el tipus d'espaiador bifuncional ("linker"), i el tipus de tractament que serà necessari per a la seva escissió.

Així doncs es van pensar dues rutes sintètiques diferents per a abordar la síntesi d'aquests anàlegs, que es detallen a continuació

Estratègia 1: síntesi d'anàlegs retroenantiomèrics per desplaçament nucleòfil amb octilamina

La síntesis de pèptids amb modificacions en l'extrem C-terminal ofereix versatilitat i amplia el ventall de possibilitats de síntesi, però al mateix temps requereix d'una química lleugerament diferent a la utilitzada fins ara. Principalment la diferència rau en el tipus d'espaiador bifuncional que es necessita, depenent del tipus de modificació que es vulgui en aquest extrem C-terminal es triarà un o altre grup espaiador. En aquest cas dels anàlegs retroenantiomèrics, es necessita que es pugui formar un enllaç amida entre l'aminoàcid ancorat a la resina i l'alquilamina que es vol introduir.

En aquesta primera aproximació sintètica, es va decidir treballar amb un espaiador bifuncional de tipus fenòlic, que ens proporcionava un enllaç entre la resina i la seqüència peptídica de tipus ester, i que permetia alliberar el producte final per aminòlisi amb l'amina escollida, en aquest cas l'octilamina (figura 3.15).[153,154]

El grup protector dels residus de cisteína va ser novament l'acetamidometil, Acm, que continuava sent ortogonal als de l'estratègia Boc/Bzl, i es podia eliminar sense afectar a la resta dels aminoàcids. Per als altres aminoàcids de la seqüència, els grups protectors emprats van ser: benziloxicarbonil (Z) per al Dab i Arg i benzil (Bzl) per Thr.

Els anàlegs es van sintetitzar manualment en fase sòlida seguint una estratègia de protecció Boc/Bzl, emprant una resina MBHA, a la que se li incorporava en primer lloc un aminoàcid de referència interna, en aquest cas la Fmoc-Gly-OH. A continuació s'hi incorpora el grup espaidaor bifuncional àcid 3-(4-hidroxifenil)propionic, i tot seguit s'incorpora el primer aminoàcid de la seqüència, Boc-D-Arg(Z_2)-OH o Boc-DDab(Z)-OH, segons l'anàleg. Aquesta reacció d'esterificació es va dur a terme dues vegades, per assegurar un acoblament quantitatiu. Les condicions van ser Boc-AA-OH, 3eq, DIPCDI 3eq i quantitats catalítiques de DMAP, 0,3eq. Es procedeix a la eliminació el grup Boc, i a continuació es continuen acoblant els següents aminoàcids fins arribar a l'últim, la Boc-D-Cys(Acm)-OH de la posició 10 seguint les condicions estàndard.

Un cop finalitzada la seqüència, es porta a terme la ciclació de l'heptapèptid, per formació de l'enllaç disulfur entre les dues cisteïnes, mitjançant oxidació amb iode (I_2 4eq. en DMF).

Per alliberar el pèptid de la resina es van assajar diferents condicions, i finalment es va observar que passades 12 hores ja s'havia escindit completament tot el pèptid de la resina. Es va filtrar, i eliminar per evaporació el dissolvent en excés, i l'oli obtingut es va fer precipitar amb acetonitril.

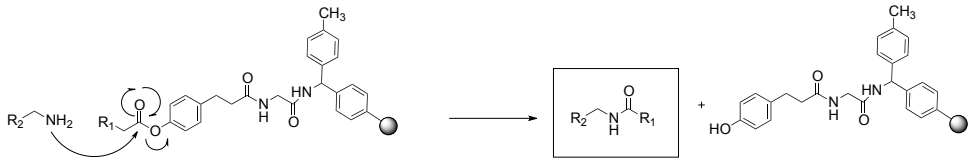


Figura 3.15. Esquema del mecanisme d'aminòlisi per alliberar el pèptid de la resina. R1 és la seqüència peptídica, R2 és la cadena alifàtica de la amina.

Per finalitzar amb la síntesi, calia eliminar els grups protectors de tipus benzílic de la seqüència. Així doncs, per tractament acidolític amb TFA:HBr(33%en AcOH):tioanisol (85:5:10) durant 3 hores a 35ºC es va obtenir el pèptid final.

En la figura 3.16 es mostra com a exemple un dels anàlisi per HPLC i EM del pèptids sintetitzat amb aquesta metodologia.

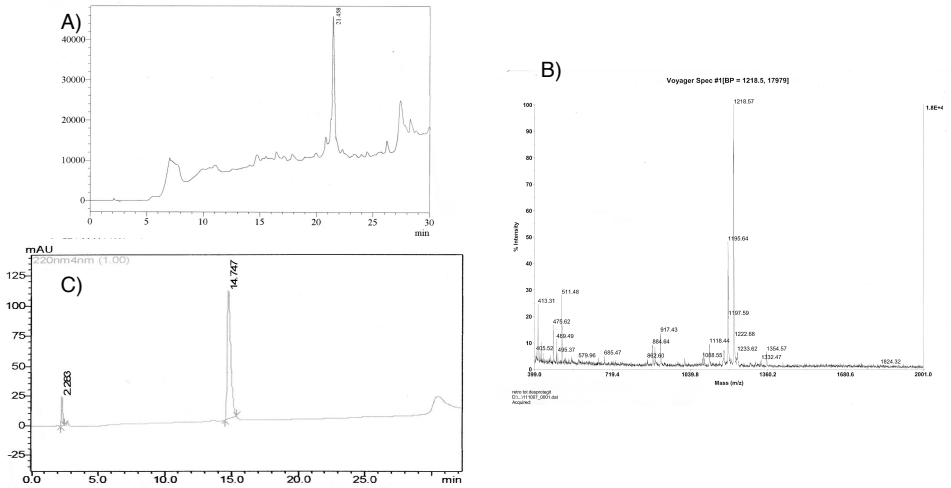


Figura 3.16. Detall dels perfils cromatogràfics del cru (A) i del pèptid purificat (B) i de l'espectre de masses MALDI-TOF de l'anàleg 7, retro sp-B (C).

El procediment que s'ha seguit es troba representat en la figura següent:

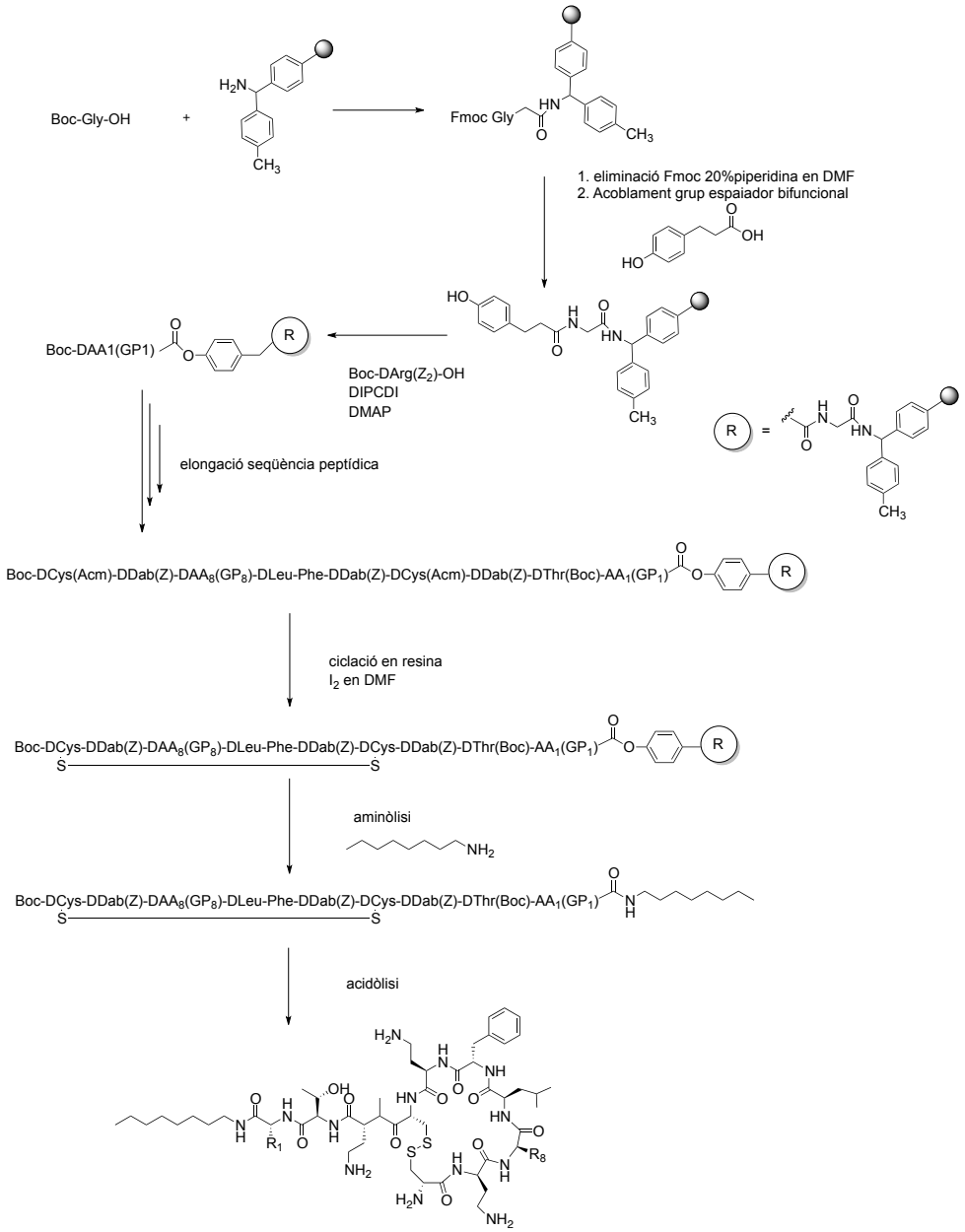


Figura 3.17. Esquema de l'estratègia sintètica per als anàlegs retroenantio.

I en la següent taula es mostren els resultats obtinguts, amb les corresponents condicions de formació de l'enllaç disulfur i de desancoratge del pèptid.

Es van purificar els crus per HPLC en fase reversa a escala semi-preparativa, obtenint els pèptids amb bones pureses i rendiments moderats. Es van caracteritzar els productes finals per HPLC i EM MALDI-TOF. Es mostren els resultats a la següent taula:

Taula 3.8. Resultats de la síntesi dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina pel mètode de desplaçament nucleòfil amb octilamina.

Anàleg PxB	Reactiu oxidació	cru peptídic	puresa	EM MALDI-TOF	Rendiment sintesi	Pèptid pur
7 Retro sP-B	I_2 DMF:anisol	190mg	40%	$[M+H]^+$=1195.58, $[M+Na]^+$=1217.6	3,5%	8mg
8 Retro sP-2Arg	I_2 DMF:anisol	90mg	40%	$[M+H]^+$=1308.5, $[M+Na]^+$=1330.6	3%	10mg

Estratègia 2: síntesis dels anàlegs retroenantiomèrics de polimixina amb un espaiador bifuncional tipus BAL i escissió per acidòlisi

Un altre tipus de grup espaiador bifuncional que permetés modificar l'extrem C-terminal dels pèptids sintetitzats era el BAL, Backbone Amide Linker, o àcid 4-(4-formil-3,5-dimetoxyfenoxi)butanoic.[155] Aquest linker, que s'ancora a la resina pel seu grup àcid, presenta un grup aldehid sobre el qual es podrà incorporar la amina desitjada via aminació reductiva.

Es va acoblar aquest àcid sobre la resina aminometil-poliestirè, a la que prèviament s'hi havia incorporat un aminoàcid de referencia interna que ens servirà com a control de la síntesis. Es va incorporar l'àcid per activació amb HOBt i DIPCDI. I donat que aquest espaiador bifuncional és làbil a condicions àcides, la síntesi es va dur a terme segons una estratègia Fmoc/tBu.

Un cop incorporat l'espaiador, s'ha de realitzar la incorporació de l'octilamina, sobre el grup aldehid, mitjançant una aminació reductiva amb $NaBH_3CN$. Després d'un tractament de 12h (overnight) es va procedir a incorporar el primer aminoàcid de la seqüència. Com es realitzava l'acoblament sobre una amina

secundaria, les condicions havien de ser una mica més enèrgiques: es va realitzar l'activació de l'aminoàcid mitjançant una sal d'uroni més reactiva, com és l'HATU. Per a comprovar l'eficàcia de l'acoblament es realitza el test de cloranil, que ens mostrarà si hi ha encara presència d'amines secundàries lliures. Un cop comprovat que efectivament no hi ha amines lliures, es va decidir fer una quantificació de Fmoc, per quantificar l'extensió de l'acoblament i per tant també de la incorporació de la octilamina. Es va obtenir que segons la quantificació del grup Fmoc, la funcionalització de la resina era de 0,3-0,4 mmol/g, s'havia reduït pràcticament a la meitat.

Es va considerar que, tot i la probable disminució de rendiment, la reducció de funcionalització podria facilitar la síntesi car és d'esperar que les amines ancorades siguin més accessibles i reactives. Un cop es tenia tota la seqüència incorporada, es va realitzar una altra quantificació de Fmoc i es va observar que es mantenia el grau de funcionalització de la resina. També es va comprovar realitzant una acidòlisi a petita escala que el creixement de la seqüència havia estat correcte realitzant una acidòlisi a petita escala, obtenint les masses esperades i uns perfils cromatogràfics correctes.

Com a últims passos de la síntesi es va procedir a ciclar el pèptid en resina, com ja s'havia realitzat anteriorment, amb iode en DMF i tioanisol. I finalment el tractament acidolític final ens proporcionava els dos anàlegs esperats.

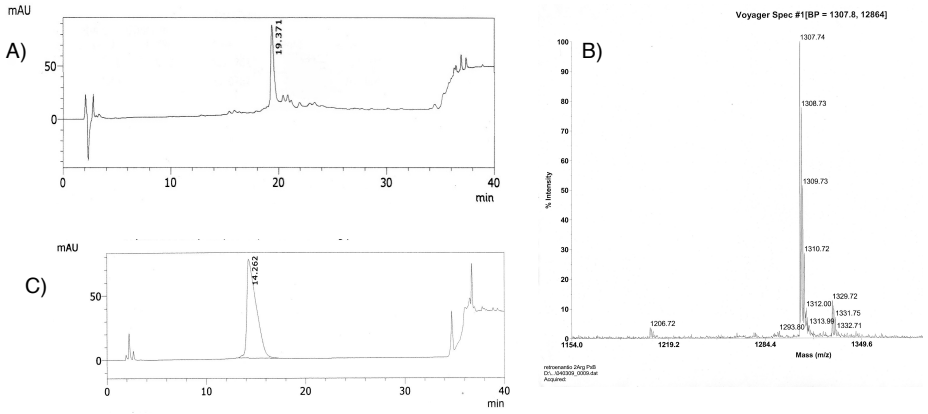


Figura 3.18. Detall dels perfils cromatogràfics del cru (A) i del pèptid purificat (B) i de l'espectre de masses MALDI-TOF de l'anàleg 8, retro sp-2Arg (C).

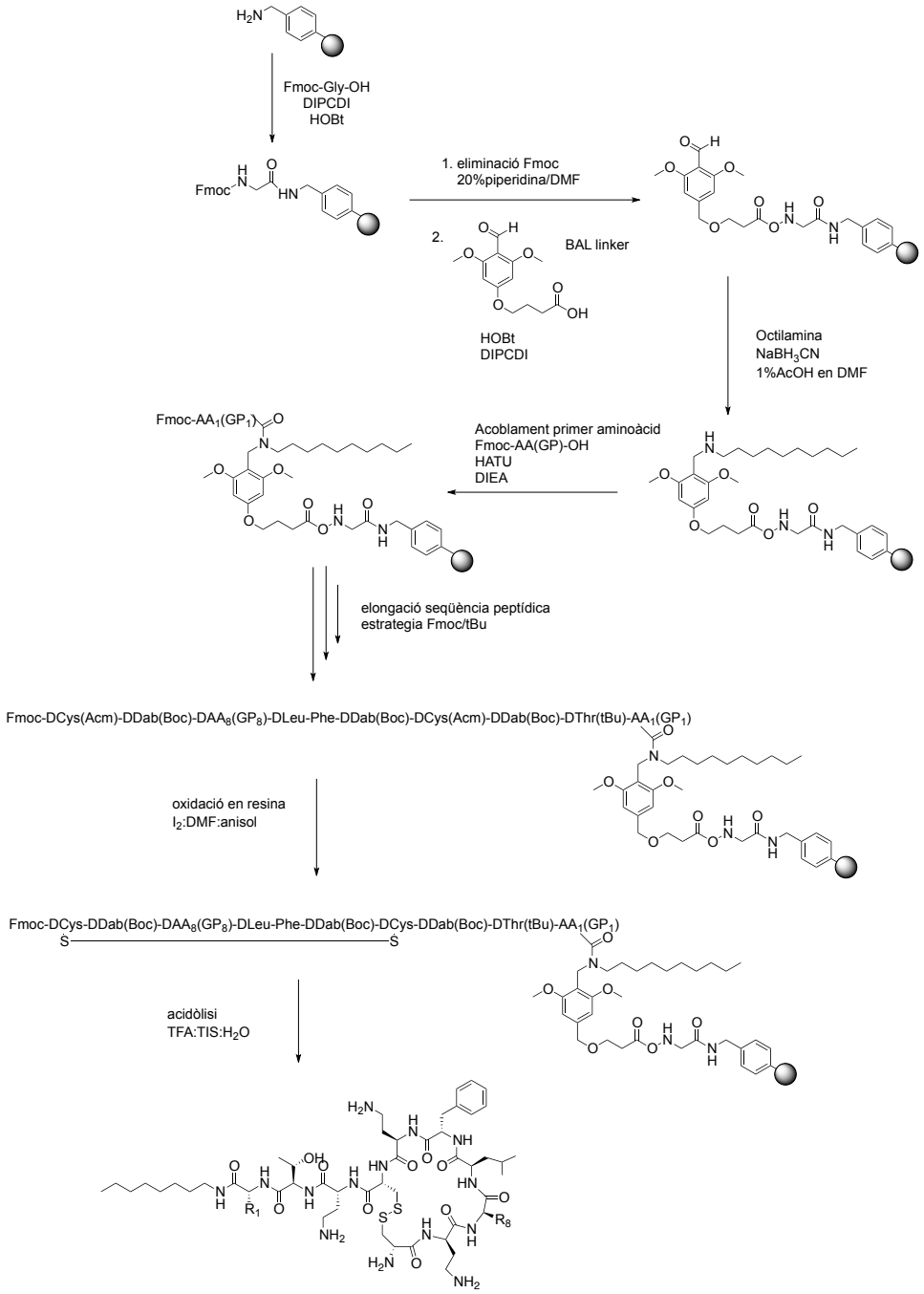


Figura 3.19. Esquema de la ruta sintètica que s'ha seguit per a la síntesi dels anàlegs retroenantio, seguint l'estratègia amb el grup espaiador bifuncional de tipus BAL.

3.4.4. Síntesis de l'anàleg conjugat PxB-espermina

Per a la síntesis d'aquest anàleg, es va decidir dur a terme la mateixa estratègia sintètica que per als anàlegs retroenantiomèrics, la utilització d'un espaiador de tipus fenòlic i una aminòlisi final amb l'amina desitjada per alliberar el pèptid d la resina i incorporar l'amina a la seqüència. Es va seguir un esquema de síntesi similar, tal i com es pot observar en la figura 3. 13, utilitzant en aquest cas aminoàcids L, i construint l'esquelet peptídic des de la Cys10 a l'àcid nonanoic en l'extrem N-terminal.

Un cop es disponia de la seqüència peptídica en resina, es va dur a terme l'oxidació en resina per a tancar el cicle, seguit de l'aminòlisi amb l'espermina. Es va procedir a una acidòlisi final per a eliminar els grups protectors.

Es van obtenir 191 mg de cru peptídic, de 50% de puresa, que es va purificar quedant 7 mg de pèptid pur,que representa un rendiment global 4%.

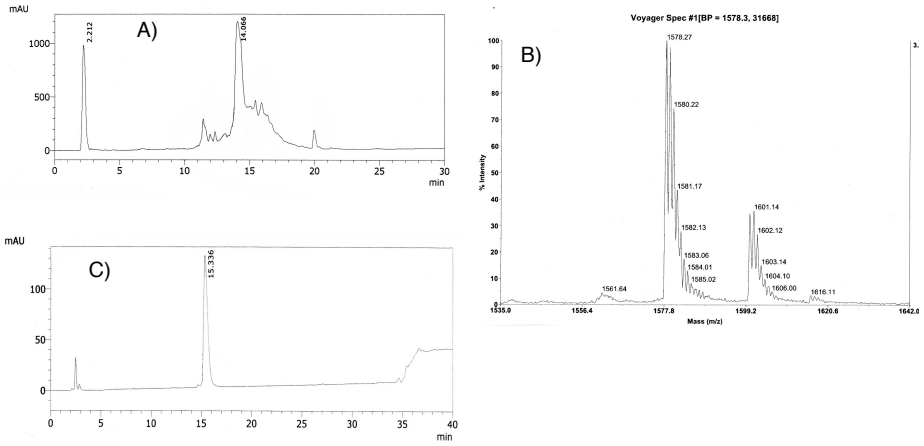


Figura 3.20. Detall dels perfils cromatogràfics del cru (A) i del pèptid purificat (B) i de l'espectre de masses MALDI-TOF de l'anàleg 9, conjugat PxB-espermida (C).

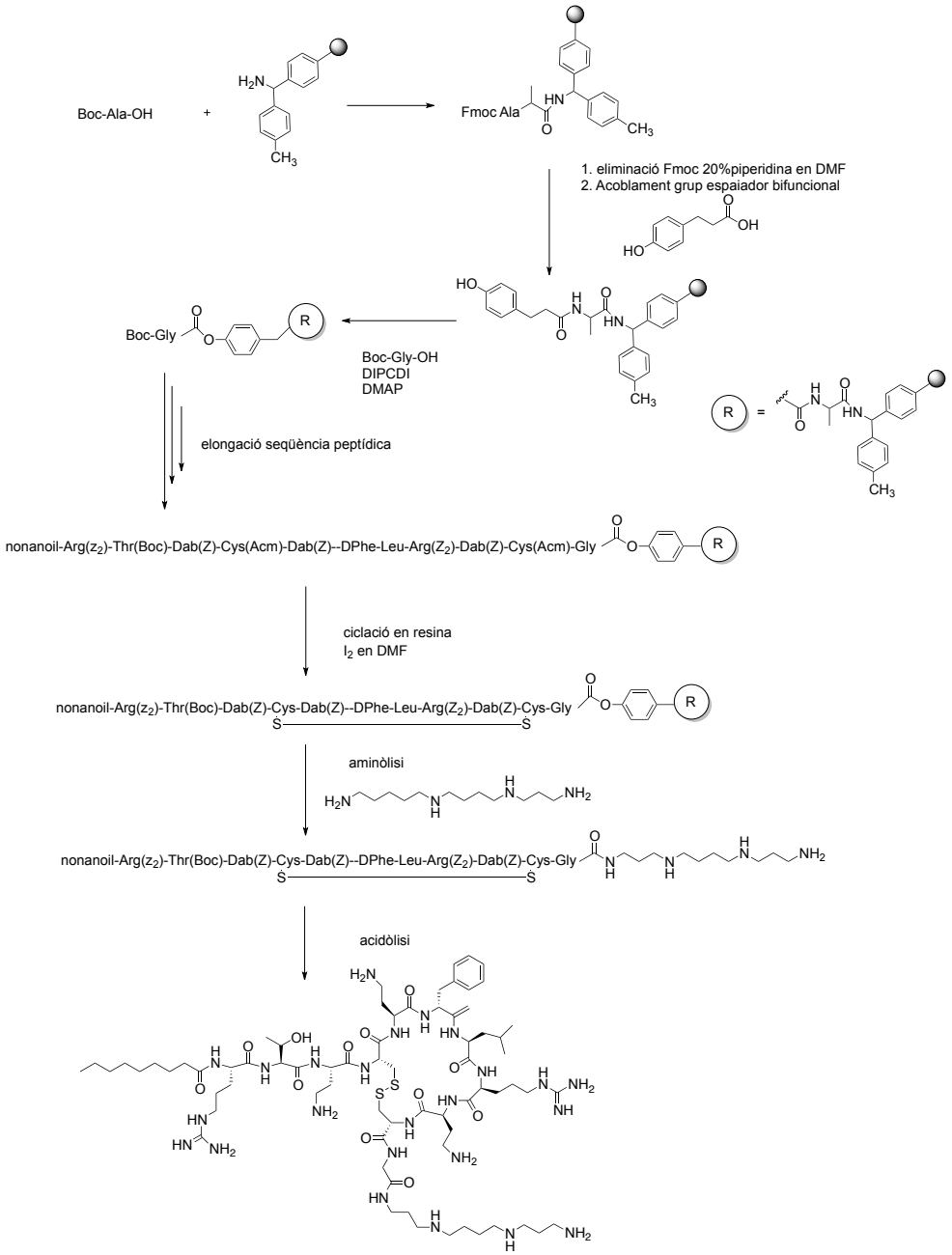


Figura 3.21. Esquema de la ruta sintètica que s'ha seguit per a la síntesis de l'anàleg conjugat PxB-espermina.

3.5. AVALUACIO BIOLÒGICA DELS ANÀLEGS DE PXB

3.5.1. Estudi de l'activitat antimicrobiana dels anàlegs de la PxB

Un cop dissenyats i sintetitzats els pèptids anàlegs de la polimixina, s'havia d'avaluar la seva capacitat antibiòtica, per tal de comprovar si s'havia millorat respecte la PxB o si pel contrari havia disminuït.

Aquests assajos es van dur a terme al laboratori de microbiologia de la Dra. Àngels Manresa, de la facultat de farmàcia.

Per avaluar l'activitat antibiòtica es van realitzar assajos de concentració mínima inhibitòria, CMI, on es determina la concentració de pèptid més baixa a partir de la qual no hi ha creixement bacterià.

La CMI es va determinar pel mètode de les dilucions seriades de Jorgensen i Turnidge[156] seguint el protocol descrit a l'apartat 5.1.7 de materials i mètodes. Breument, aquest mètode consisteix en el següent: es preparen dilucions dels pèptids en aigua a partir d'una dissolució mare (636 mg/mL) prèviament quantificada per anàlisis d'aminoàcids. A continuació, a partir d'aquestes es preparen dilucions dels pèptids en el medi de cultiu (Mueller Hinton Broth, MHB) de manera que s'obté un ventall de dilucions de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 i 0.06 µg/mL. En plaques estèrils de 96 pouets s'addicionen 200 µL de cada dilució dels pèptids, i s'hi inocula el bacteri corresponent, en una concentració de 10^7 UFC/mL (unitats formadores de colònies per mL, ajustada per un patró de McFArland 0.5). En cada placa es deixa una columna com a control positiu (inòcul de bacteris sense pèptid, de manera que ha de ser un patró de correcte creixement bacterià) i una altra columna com a control negatiu (només medi de cultiu, on no s'hauria d'observar cap tipus de creixement). S'incuben les plaques entre 18-24h a 37ºC i transcorregut aquest temps la lectura de la CMI es realitza *de visu* mitjançant un amplificador (Figura 3.22).

Els assajos es realitzen per duplicat, i es comparen sempre amb la polimixina natural, de manera que es puguin detectar irregularitats en l'assaig.

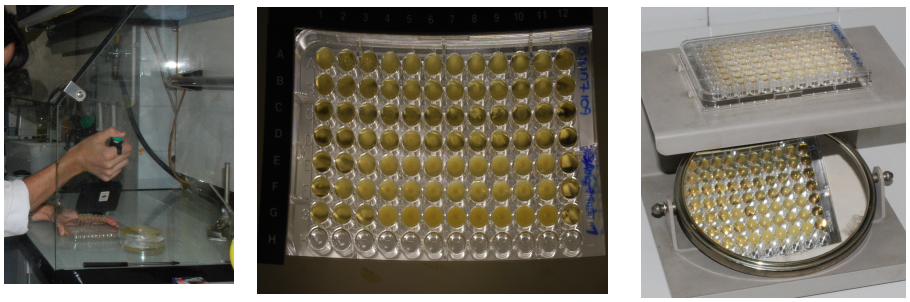


Figura 3.22. A) Preparació de les plaques en cabina de flux laminar. B) Detall de la placa de 96 pouets en la que es realitza l'assaig de CMI. Cada fila correspon a un microorganisme diferent; a cada columna una concentració diferent de pèptid: de la més concentrada, columna 1, a la més diluïda, columna 10. La columna 11 és un control de creixement positiu, on només hi ha bacteri i no pèptid, i la columna 12 és un control negatiu, on només hi ha medi de cultiu. C) Lupa que s'utilitza per a llegir les plaques

Els bacteris que es van utilitzar van ser:

- Gram negatius: *Escherichia coli ATCC 8739, Salmonella typhimurium ATCC 14028, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.*

- Gram positius: *Enterococcus hirae ATCC 10541, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Mycobacterium phlei ATCC 41423, Micrococcus luteus ATCC 9341*.

Tot i sabent que la polimixina actua sobre els bacteris Gram negatius, es van triar també alguns Gram positius per veure si en alguna de les modificacions realitzades, es podia ampliar o modificar l'espectre d'acció. S'han escollit aquest bacteris i aquestes soques per ser models estàndard molt utilitzats en aquests tipus d'assajos de manera que no suposen cap risc de seguretat, i els podem manipular nosaltres mateixos, i per a poder contrastar els resultats amb el que ja està descrit en la literatura. Cada un d'ells s'ha triat ja sigui per la seva rellevància clínica i patològica o per les seves característiques estructurals:

- L'*Escherichia coli* és el model més utilitzat de bacteris Gram-negatius. És una enterobacteria que forma part de la flora intestinal de la majoria de mamífers. Fora del seu àmbit intestinal és la responsable de més del 80% de les infeccions del tracte urinari. A més, pot causar diarrea, meningitis, peritonitis, mastitis, septicèmia i pneumònia. En els últims anys s'ha vist incrementada notablement la resistència de la *E.coli* als antibiòtics.

- La *Salmonella typhimurium* es tracta d'un model de microorganisme alimentari,

causant d'infeccions del tracte gastrointestinal que cursen amb diarrees i vòmits abundants (salmonel·losi).

- La *Pseudomonas aeruginosa* es tracta d'un bacteri Gram-negatiu, causant de moltes de les infeccions adquirides en l'ambient hospitalari. Pot provocar infeccions del tracte urinari, infeccions de ferides quirúrgiques, pneumònia, i bacterèmia en pacients hospitalitzats. Degut a la seva baixa susceptibilitat als antibiòtics representa un greu problema de salut pública.

- El *Micrococcus luteus* és un exemple de coc Gram-positiu. Es pot trobar en la pell dels animals, i no és patogen.

- L' *Staphylococcus aureus* és el principal causant de les infeccions nosocomials. Pot causar infeccions molt diverses que van des d'infeccions cutànies a malalties greus com meningitis, endocarditis, pneumònia o sepsis. Algunes soques d'aquest microorganisme presenten resistència a la penicil·lina, i en els darrers anys, ha aparegut una soca resistent a la meticilina, MRSA, molt perillosa ja que provoca infeccions nosocomials greus i cada vegada existeixen menys antibiòtics per a combatre'l, ja que ha desenvolupat ràpidament resistència als antibiòtics que s'utilitzaven: β-lactàmics, vancomicina.

- El *Mycobacterium phlei* s'ha escollit perquè és el microorganisme que, sent inocu, s'assembla més al *Mycobacterium tuberculosis*, agent causant de la tuberculosi. Té la particularitat de presentar una membrana externa més gruixuda, i molt més hidrofòbica degut a la presència d'àcids micòlics (àcids grassos de cadena llarga, 30-40 carbonis). Aquest embolcall oposa dificultat als tractaments antibiòtics.

Aquest bacteri, presenta certa dificultat en el seu creixement, de manera que s'ha de deixar incubar fins a 48 hores per a poder observar creixement bacterià en les plaques en els pouets corresponents.

- L' *Enterococcus hirae*, és important des del punt de vista estructural perquè presenta antígens especials en la seva superfície externa.

Les mesures de CMI, com el seu nom indica, representen la mínima quantitat de substància que inhibeix el creixement bacterià, de manera que com més petit sigui el valor, més activa és la substància.

Són mesures qualitatives, ja que el què es mesura és si hi ha hagut creixement o no, no es determina quant ha disminuït aquest creixement. A més, tant l'ajust de l'inòcul com la lectura de les plaques es fa *de visu.*

Es van realitzar els experiments per duplicat, dues plaques per a cada pèptid, i es van repetir els experiments en dies diferents per a confirmar resultats. En cas de dubte es van repetir fins a una tercera vegada. Quan la diferència és només d'un pouet, no es significativa, si ha més diferència, vol indicar normalment que no s'ha realitzat bé l'inòcul. Els controls tant positiu com negatiu en cada placa, ens permeten observar problemes com ara problemes de creixement bacterià o la contaminació de les plaques.

Els valors de CMI obtinguts dels anàlegs sintetitzats es mostren en les següents taules, expressats en µg/mL que són les unitats amb la que se sol treballar en microbiologia.

A la taula 3.9 es mostren els resultats de la primera sèrie d'anàlegs, on s'ha modificat la basicitat dels residus 1 i 8. En la primera fila s'indiquen els valors de la Polimixina B, que es prenen com a referència.

Taula 3.9. Resultats de CMI dels anàlegs canònics de polimixina

		PxB	**1 sPB**	**2 2 Arg**	**3 2 Dap**	**4 2 His**	**5 2 Asn**	**6 2 Arg NO_2**
Bacteris	*P.aeruginosa*	1	2	4	4	4	32	16-32
Gram	*S.tiphymurium*	2	16	16	16	32	>32	16-32
negatius	*E. coli*	1	8	8	8	16	32	4-8
Bacteris	*S. aureus*	>32	>32	32	>32	>32	>32	>32
Gram	*M. luteus*	32	32	8-16	8	>32	>32	16-32
positius	*M. phlei*	32	16-	4	32	32	>32	8-32
	E. hirae	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32

D'aquests valors, podem destacar diferents aspectes:

- en primer lloc, tot i no millorar l'activitat de la Polimixina B, l'anàleg sP-B presenta una activitat del mateix ordre de magnitud, indicant que les modificacions que s'havien plantejat en el disseny d'aquests anàlegs no

interfereixen negativament en l'activitat de la polimixina. Així doncs és una bona estratègia de disseny, ja que per una banda s'ha simplificat la síntesis i per altra no ha disminuït significativament l'activitat.

- Si es compara l'activitat del sP-B amb el seu anàleg sP-2Dap, veiem que el fet d'escurçar la cadena dels residus 1 i 8 no afecta a l'activitat, obtenint fins i tot un valor de CMI front a *M.luteus* força millor (8 µg/mL).

- El fet de substituir els Dab de les posicions 1 i 8 per per arginines (sP-2Arg) no millora especialment l'activitat front a els Grams negatius, però si lleugerament front als Gram-positius, com el cas del *M.phlei* amb una CMI de 4 µg/mL, i 8-16 µg/mL per al *M.luteus*. De fet, en altres treballs del grup[147] s'ha comprovat que el fet de substituir els Dabs de la seqüència per Arg, amplia l'espectre d'acció dels anàlegs, observant que els anàlegs sP-3Arg[1,3,8] i sP-5Arg[1,3,5,8,9] presenten bones activitats front a bacteris Gram-positius. I en canvi, disminueix en el mateix sentit l'activitat front als bacteris Gram-negatius, observant que l'anàleg sP-5Arg[1,3,5,8,9] pràcticament no és actiu contra *P.aeruginosa*.

- L'anàleg sP-2Arg(NO2) presenta una activitat menor respecte al seu homòleg sense grup nitro. Això es pot explicar perquè el caràcter de lligand bidentat que té el grup guanidini de l'arginina, queda bloquejat per la presència del grup nitro, de manera que la capacitat de coordinar-se als grups fosfats del lípid A queda minvada. A més, disminueix el caràcter catiònic de la molècula. En canvi, presenta una millora molt lleu front als Gram-positius, particularment front a *M.luteus* i *M.phlei*.

- Pel que fa a l'anàleg sP-2His, sorprenentment s'observa que front als bacteris Gram-negatius mostra certa activitat genys menyspreable. Era d'esperar que en substituir dues càrregues positives, les del grups amino dels Dab 1 i 8, per grups menys bàsics com els imidazol de l'histidina es perdés l'activitat, però s'ha observat que conserven una mica. Respecte als Gram-positius no s'observa cap mena d'activitat antimicrobiana.

- Finalment, i com era d'esperar, el fet d'introduir grups neutres com en l'asparagina (sP-2Asn) elimina completament l'activitat. De manera que es fa evident la presència necessària de grups catiònics en les posicions 1 i 8.

Per a la sèrie d'anàlegs retroenantio de la polimixina es van obtenir els següents resultats de CMI, taula 3.10. Es comparen els resultats amb la polimixina natural i els anàlegs sP-B i el sP-2Arg.

Sorprenentment al que s'esperava, no hi ha una correspondència entre les activitats dels anàlegs sP-B i sP-2Arg i els seus homòlegs retroenantio. Com es pot observar a la taula tant sPB com sP2Arg mostren activitats lleugerament superiors a la de la PxB, però retro-sPB i retro-sP2Arg no donen bons resultats. Encara és mes sorprenent que front als bacteris Gram positius s'observi certa millora respecte la Polimixina, i els anàlegs de la primera sèrie, sobretot en *M.Luteus* i *M.phlei*.

Taula 3.10. Resultats de CMI dels anàlegs retroenantiòmers de polimixina. S'inclouen a la taula la polimixina i els seus homòlegs, per a poder comparar els resultats

		PxB	**1 sPB**	**7 retro sP-B**	**3 2 Arg**	**8 retro sP-2Arg**
Bacteris	*P.aeruginosa*	**1**	2	>32	4	32
Gram	*S.tiphymurium*	**2**	16	32	16	16-32
negatius	*E. coli*	**1**	8	16	8	8-16
Bacteris	*S. aureus*	**>32**	>32	16-32	32	8?32
Gram	*M. luteus*	**32**	32	8-16	8-16	8
positius	*M. phlei*	**32**	16	8	4	8
	E. hirae	**>32**	>32	>32	>32	>32

Pel que fa a l'anàleg policatiònic, amb l'espermina, podem observar que amb *P.aeruginosa* i *E.coli* mostra activitat, però no amb *S.typhimurium*. I en canvi, amb els Gram positius presenta força activitat. Això concorda amb els resultats obtinguts amb l'anàleg sP2-Arg, on un augment de la càrrega positiva neta, amplia l'espectre d'acció del pèptid. (biblio)

Taula 3.11. Resultats de CMI de l'anàleg conjugat de polimixina amb espermina , sP-2Arg-G-espermida, comparat amb la PxB1natural, i els anàlegs sPB i sP-2Arg.

		PxB	**sPB**	**2 Arg**	**2 Arg-G-spermine**
Bacteris	*P.aeruginosa*	**1**	2	4	4-8
Gram	*S.tiphymurium*	**2**	16	16	32
negatius	*E. coli*	**1**	8	8	8-16
Bacteris	*S. aureus*	**>32**	>32	32	2-8-16
Gram	*M. luteus*	**32**	32	8-16	4-8
positius	*M. phlei*	**32**	16	4	4-8
	E. hirae	**>32**	>32	>32	>32

3.5.2. Avaluació de la toxicitat dels anàlegs de polimixina

Un cop s'havia avaluat l'activitat antimicrobiana, es va voler analitzar la toxicitat d'alguns dels anàlegs, per veure si s'aconseguia disminuir-la respecte a la polimixina, o en qualsevol cas, no augmentar-la.

Es va triar el compost de sP-2Arg que era el que fins al moment havia donat millors resultats.

L'estudi de citotoxicitat el van dur a terme a l'empresa Celltec-UB, del Parc Científic de Barcelona.

Es van triar els següents models cel·lulars per a realitzar l'estudi:

- hDF (Human Dermal Fibroblasts): Fibroblasts de la dermis humana (Homo sapiens) com a model de les cèl·lules de la pell humana.

- MDCK (NBL-2) (ATCC CCL-34): es tracta d'un model de cèl·lules renals qeu provenen del ronyó d'un gos adult de raça cocker spaniel.

- PC12 (ATCC CRL-1721): es tracta d'un model de cèl·lules del sistema nerviós central qeu provenen d'una rata . Aquestes cèl·lules es van sotmetre a un procés de diferenciació amb el factor de creixement nerviós. (NGF).

Es va realitzar un assaig in vitro amb les cèl·lules que s'han comentat mitjançant un assaig de viabilitat WST-1. Aquest assaig es basa en la mesura de l'activitat d'un enzim, la succinat deshidrogenasa mitocondrial, que és un indicador de la viabilitat cel·lular. Al cultiu cel·lular se li afegeix com a substrat de l'enzim una sal de tetrazole (WST-1, figura 3.23) que en ser metabolitzat genera un metabòlit soluble de color vermell fosc. Aquest metabòlit es quantifica per mesures d'absorbància a 450nm en un lector Elisa. Uns valors elevats d'aquest metabòlit indiquen una taxa d'activitat enzimàtica elevada, i per tant una menor toxicitat del pèptid que s'hi ha afegit a les cèl·lules.

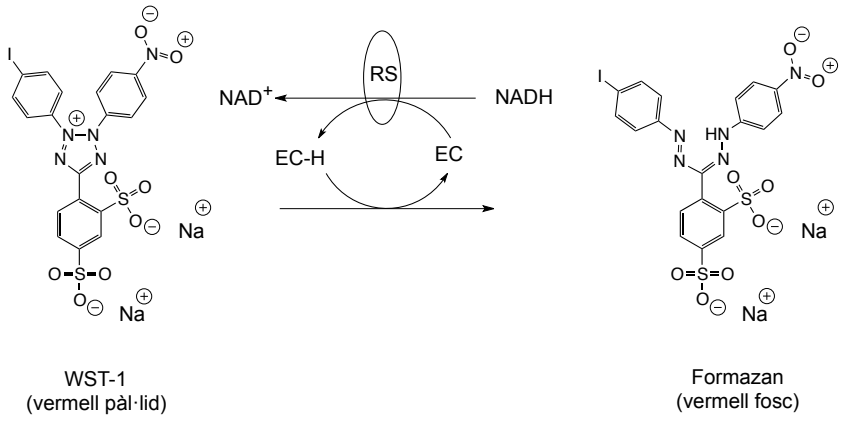


Figura 3.23. Representació esquemàtica del funcionament del test de viabilitat WST-1. Reducció de la sal de tetrazole WST-1 a formazan per acció de l'enzim succinat deshidrogenasa mitocondrial. RS: sistema mitocondrial succinat-tetrazole-reductasa; EC: electró reactiu d'acoblament.

La citotoxicitat es va expressar en valors de IC_{50}, que es defineix com la concentració de substància a la que l'activitat reductora cel·lular es redueix a la meitat. De manera que un valor elevat de IC50 indica que es necessita molta quantitat de pèptid per a fer disminuir l'activitat cel·lular, i per tant la substància és poc tòxica. Tot el contrari si el valor de IC50 és baix, que representa que amb poca quantitat de substància ja disminueix l'activitat cel·lular.

El protocol que es va seguir va ser el següent: en plaques estèrils de 96 pouets es sembren les diferents cèl·lules de les tres línies cel·lulars escollides (hDF, MDCK i PC12). Passades 24 hores d'incubació s'addicionen els pèptids (en el nostre cas, la polimixina B de control, i l'anàleg sP-2Arg) a 8 concentracions

diferents, i realitzant triplicats i quadruplicats de cada concentració. Es deixa incubar a 37ºC, i passades 24 hores, es determina la viabilitat cel·lular amb el kit WST-1. Els valors obtinguts de IC_{50} per als dos pèptids, assajats en les tres línies cel·lulars es mostren en la taula 3.12.

Taula 3.12. Valors de IC_{50} obtinguts de l'anàleg sP-2Arg i la PxB mitjançant l'assaig de viabilitat WST-1. Els resultats s'expressen en µg/mL i entre parèntesis en µM.

Línea cel·lular	PxB (µg/mL) (µM)	sP-2Arg[1,8] (µg/mL) (µM)
hDK	981 (815)	534 (400)
MDCK	973 (808)	548 (410)
PC12	908 (754)	629 (471)

Com es pot observar, els valors de IC_{50} de l'anàleg són lleugerament inferiors, és a dir, que l'anàleg sP-2Arg és lleugerament més tòxic que la polimixina natural. Malgrat això, si comparem aquests valors (de l'ordre de 100 µg/mL) amb els valors d'activitat antibacteriana, CMI, que oscil·laven entre 2-8 µg/mL, s'obté una relació aproximada de 1:100, que indica que aquest compost té una selectivitat de 1 a 100, és a dir, que és 100 vegades més actiu sobre un bacteri que sobre una cèl·lula eucariota sana.

3.6. ESTUDI BIOFÍSIC DELS ANÀLEGS DE LA POLIMIXINA B

Un cop s'havien estudiat l'activitat microbiològica i la citotoxicitat es va procedir a l'estudi biofísic d'aquests anàlegs per tal de determinar el seu mecanise d'acció.

Se sap que l'acció antibiòtica de la Polimixina B és deguda a la interacció amb el component lipídic de la membrana bacteriana. Es pretenia, doncs, estudiar el comportament dels pèptids que s'havien sintetitzat, en entrar en contacte amb les membranes.

Les membranes dels bacteris presenten una gran diversitat estructural i de composició, associada a la gran varietat de famílies, espècies i soques existents. Aquest fet suposa que la reproducció d'una membrana bacteriana a nivell de laboratori sigui complicada i feixuga.[157] Una de les alternatives àmpliament utilitzada és la utilització de fosfolípids qeu es troben disponibles comercialment ja siguin naturals o sintètics, per formar membranes model. Aquests lípids, components majoritaris de les membranes, es poden disposar de manera que formin una pel·lícula d'una molècula de gruix (monocapes lipídiques)[158–161], o si es sotmeten a uns determinats tractaments poden adquirir disposició de bicapa lipídica (liposomes)[162–168]. D'aquesta manera es pot disposar d'un model de membrana a nivell de laboratori amb el qual es pot treballar.

A continuació es descriuran els dos models de membrana que es van emprar en aquest treball.

3.6.1. Liposomes com a model de membrana

Els liposomes, decrits per primer vegada l'any 1961 per Bangham i col·laboradors[169], són vesícules submicroscòpiques tancades formades per una o més d'una bicapa lipídica, i que engloben al seu interior un espai aquós. Les mides poden anar dels 20nm a alguns micròmetres de diàmetre.

Els components principals dels liposomes són els fosfolípids, molècules amfipàtiques que en entrar en contacte amb el medi aquós s'organitzen i agrupen de manera espontània en forma esfèrica, de manera que els caps polars resten exposats al medi aquós, i les cues apolars dels àcids grassos

queden cap a l'interior. Figura 3.24.[170–172]

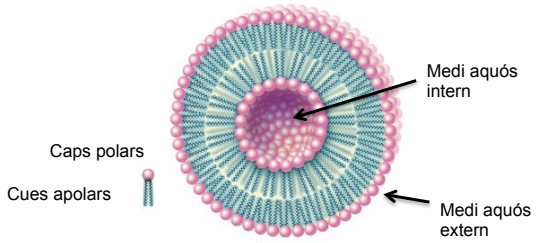


Figura 3.24. Representació esquemàtica d'un liposoma, on es pot observar l'estructura de bicapa lipídica.

Inicialment es van utilitzar com a models de membrana, però en els últims anys, donades les particulars característiques estructurals, s'ha estès àmpliament la seva utilització per a l'alliberament de fàrmacs, *" drug delivery".* És a dir, es poden incorporar substàncies hidrofòbiques entre els fosfolípids de la bicapa lipídica, o substàncies hidrosolubles que quedarien encapsulades a l'interior del liposoma amb el medi aquós, i es transporten aquestes substàncies cap a l'interior cel·lular. Es poden incorporar també marcadors de superfície en la capa externa, de manera que es pugui dirigir el liposoma vers una diana concreta.

En aquest treball, però, es treballarà amb els liposomes com a model de membrana, per estudiar com interaccionen les molècules sintetitzades amb les membranes lipídiques.

3.6.1.1. Tipus de liposomes

Existeixen diferents tipus de liposomes, que es poden classificar segons la seva grandària, i el nombre de bicapes que els formen.

Així, trobem els liposomes unilamel·lars, com el seu nom indica, formats per una única lamel·la o bicapa lipídica, dintre dels quals podem trobar els petits, grans o gegants; i els liposomes multilamel·lars constituïts per vàries lamel·les o bicapes lipídiques. (Figura 3.25) [173]

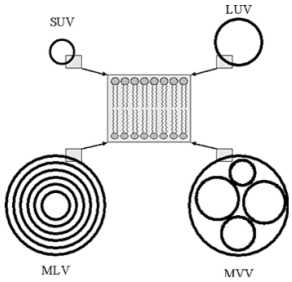


Figura 3.25. Representació esquemàtica dels diferents tipus de liposomes.

Els **SUV's** (Small Unilamellar Vesicles), liposomes unilamel·lars petits tenen unes dimensions que oscil·len entre els 15 i els 50 nm.

Els **LUV's** (Large Unilamellar Vesicles), liposomes unil·lamelars grans, oscil·len entre els 50 i 500nm. Són els que presenten una composició més similar en ambdues capes de la bicapa, i els que presenten una pressió superficial més similar a la de les membranes biològiques, 30-32mN/m. Per això són els més utilitzats per a estudis com a models de membrana.

Degut a les seves majors dimensions respecte els SUV, presenten una major estabilitat, i són dels més emprats en encapsulació de substàncies hidrosolubles.

Els **GUV's** (Giant Unilamellar Vesicles), liposomes unilamel·lars gegants, com el propi nom indica són els de mida més gran, i poden anar des de 1 µm fins a més de 20 µm.

La bicapa lipídica generalment té un gruix de l'ordre del doble de la llargada del fosfolípid més llarg present en la seva composició, i si hi ha la presència abundant de proteïnes, pot augmentar lleugerament, no sobrepassant generalment els 10 nm.

Finalment, els **MLV** (Multilamellar Vesicles) són els liposomes que estan formats per més d'una bicapa lipídica (o lamel·les), normalment entre 7 i 19, i generalment concèntriques. La seva grandària oscil·la entre 100 i 1000 nm. Existeixen també els **MVV**, Multivesicular Vesicles, que són liposomes que engloben a altres liposomes al seu interior.

3.6.1.2. Preparació de liposomes

Existeixen diferents mètodes per a la preparació de liposomes. El més comunment utilitzat és el de la rehidratació dels fosfolípids. Aquest mètode consisteix en deixar assecar la solució de lípids que comercialment es troben en un dissolvent orgànic, i rehidratar aquest film que es forma amb un dissolvent aquós i aplicant agitació (vòrtex). D'aquesta manera s'obtenen liposomes multilamelars, MLV. El procés de rehidratació resulta de vital importància per a l'obtenció d'uns liposomes ben formats.[174]

A partir d'aquests MLVs i mitjançant diferents tractaments físics, es poden obtenir els liposomes unilamel·lars més petits, figura 3.26.

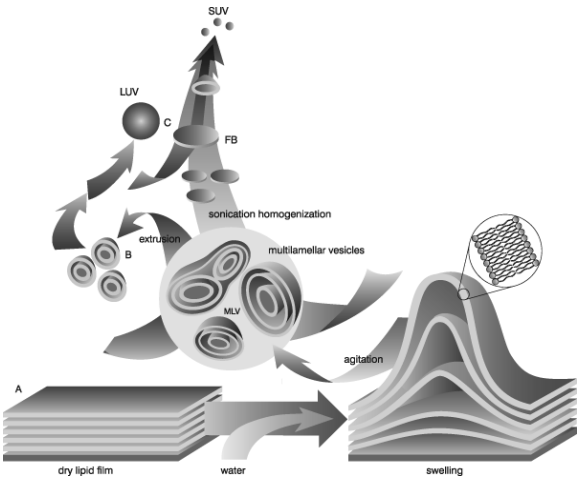


Figura 3.26. Representació esquemàtica de la preparació dels liposomes. Extret de www.avantilipid.com

A la següent taula es resumeixen les característiques principals dels diferents processos de preparació de liposomes:

Taula 3.13. Resum dels principals mètodes per a l'obtenció de liposomes unilamel·lars

Mètode	Fonament
Sonicació[175]	Aplicació d'un bany d'ultrasons a la mostra de MLVs. No s'obtenen alts percentatges d'encapsulament de compostos, ja que el procés pot malmetre les substàncies a encapsular.
Extrusió[176]	Aplicar pressió per fer passar la mostra de MLVs a través de filtres de membrana de policarbonat. Es controla la mida final dels liposomes modificant la mida dels porus dels filtres, així com el nombre de vegades que s'extrueix la preparació.
Electroformació[177]	Es diposita una fina capa de lípid sobre un elèctrode. S'hidrata i s'hi aplica un determinat voltatge, per a formar les vesícules.
Evaporació invertida[178]	Es prepara una emulsió O/W per sonicació de fosfolípids en un dissolvent orgànic i un tampó aquós. I a continuació s'evapora a pressió reduïda el dissolvent orgànic, donant lloc a un gel viscós que per evaporació continuada del dissolvent dóna lloc als liposomes amb un alt percentatge d'encapsulament, però no una elevada homogeneïtat de la mostra.
Injecció de solvent	S'injecta el lípid dissolt en un dissolvent com ara alcohol, o èter, a una solució aquosa que conté el material que es vol encapsular. La posterior eliminació del dissolvent orgànic a pressió reduïda, dóna lloc als liposomes. No s'aconsegueix una mostra homogènia tampoc.

.

En aquest estudi es van treballar amb liposomes petits, SUV, obtinguts per sonicació en un bany d'ultrasons d'alta potència

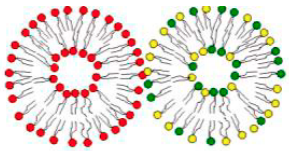
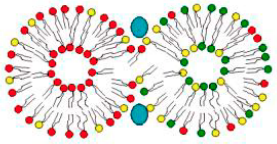
Hem d'esmentar que aquest mètode de sonicació és dels més utilitzats per la seva simplicitat, però presenta inconvenients quan es volen encapsular determinades substàncies, ja que podrien resultar alterades.

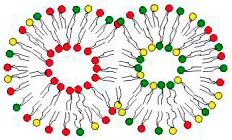
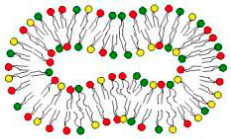
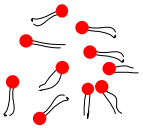
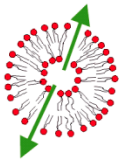
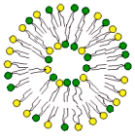
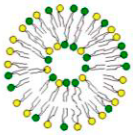
Existeixen diferents tècniques biofísiques que permeten estudiar les interaccions pèptid-lípid, ja sigui amb membranes model o bé amb cèl·lules. Els antibiòtics peptídics catiònics poden induir diferents tipus d'alteracions en les membranes bacterianes, com ara agregació, formació de contactes moleculars i intercanvi de fosfolípids, hemifusió o fusió de membranes, permeabilització o solubilització. Segons el que es pretén observar, les tècniques que s'utilitzaran seran unes o altres. En la taula 3.14 es mostren les tècniques més utilitzades segons el procés que es vol estudiar.

En aquest treball, per a estudiar la interacció entre els pèptids i els liposomes es va treballar amb tècniques d'espectroscòpia UV-Vis, i de fluorescència, que combinades entre elles, ens permeten entendre una mica més el mecanisme a través del qual actuen aquests tipus de pèptids policatiònics. Concretament es van realitzar experiments de:

- determinació de la llum dispersada a 90º .
- fluorescència associada a lípids marcats amb pirè
- disminució de fluorescència de NDB associat a fosfolípids, per adició de diotionit

Taula 3.14. Resum de les tècniques més utilitzades en la caracterització i l'estudi biofísic dels liposomes.

Procés	Esquema	Mètode de determinació
Agregació - sense barreja lipídica - sense permeabilització.		- Dispersió de la llum - FRET.
Contactes funcionals - intercanvi selectiu de monocapes externes - sense permeabilització - sense flip-flop		- FRET (NBD-Rh), vesícules simètriques i asimètriques. - Fluorescència de pirè (selectivitat).

Hemifusió - Mescla inespecífica de capes externes. - Sense permeabilització		- FRET (NBD-Rh), vesícules simètriques. - ANTS/DPX
Fusió - Mescla inespecífica total. - Amb/sense permeabilització.		- FRET (NBD-Rh). - ANTS/DPX.
Lisi - Efecte detergent - Permeabilització		- Dispersió de la llum. - ^{31}P- RMN. - ANTS/DPX. - NBD/Ditionit. - Microscòpia confocal.
Canals - Permeabilització - Sense mescla de lípids - Sense agregació		- ANTS/DPX. -Microscòpia confocal (GUV's+calceïna). - Despolarització de membrana.
Flip-Flop - Moviment transmembranal de fosfolípids. - Sense permeabilització. - Sense fusió.		- NBD/Ditionit
Translocalitzacio - Sense permeabilització. - Sense lisi. - Sense flip-flop.		- FRET amb vesícules asimètriques (Trp-lisoMC) - Microscòpia confocal de fluorescència (pèptids marcats)

3.6.2. Monocapes com a models de membrana

Les monocapes lipídiques, o pel·lícules monomolecul·lars lipídiques, són un dels models de membrana més senzills que trobem per a estudiar el comportament de les membranes.

Aquestes monocapes, es formen en extendre sobre una solució aquosa una fina capa de lípid. En ser immiscible amb la fase aquosa, resta a la superfície disposant-se en forma de film, amb els caps polars dels lípids dirigits vers el medi aquós, i les cues apolars dirigides vers l'aire. Tenen el gruix que correspon a una molècula individual de fosfolípid, i representa la meitat d'una membrana biològica. Figura 3.27.[158,179]

1982)

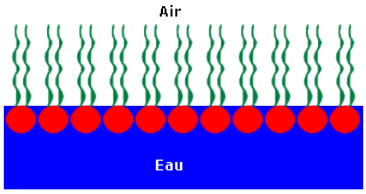


Figure 11 : Monocouche

Figura 3.27. Representació esquemàtica de la disposició d'una monocapa de fosfolípid en medi aquós.

És un model senzill, però que presenta l'avantatge que permet controlar la composició dels lípids que es dipositen, com també el grau d'empaquetament de la monocapa segons la quantitat de lípid que s'hi afegeix, variant per tant la pressió superficial de la monocapa. També permet modificar la composició de la subfase aquosa (pH, força iònica), així com controlar la temperatura del sistema. Totes aquestes variables, permeten analitzar i obtenir informació sobre les interaccions lípid-lípid, lípid-subfase i lípid-substància bioactiva[158,180,181]

Podem distingir dos tipus de monocapes segons el procés de formació d'aquesta. Així doncs, tenim: monocapes d'absorció de Gibbs i monocapes d'extensió [182]

- Monocapes d'absorció de Gibbs: s'anomenen així les monocapes formades per molècules amfipàtiques que s'introdueixen parcialment en la fase aquosa deixant la part apolar a l'exterior, de manera que queden adsorbides en la interfície aigua/aire. Aquest fet provoca una disminució de la tensió superficial

del solvent, i s'hi estableix un equilibri dinàmic entre les molècules de la superfície i la resta de la solució, intercanviant-se contínuament entre elles.

- Monocapes d'extensió o de Langmuir: Les monocapes d'extensió es produeixen quan molècules amfipàtiques insolubles en aigua, i no volàtils, com els lípids de membrana, es dipositen sobre la superfície d'un líquid polar, en forma pura sòlida o líquida, o bé en solució diluïda en un dissolvent volàtil, formant una pel·lícula superficial o monocapa d'extensió. La part apolar és la responsable de que la molècula no es solubilitzi en el medi aquós i la part polar determina l'orientació de la molècula respecte la subfase, i és la responsable de que es produeixi l'extensió.

El caràcter amfipàtic dels pèptids antimicrobians els converteix en molècules amb una significativa activitat superficial, i com que la seva acció biològica requereix de la interacció amb les interfícies de les membranes lipídiques, la tècnica de les monocapes resulta molt convenient per a estudiar les seves propietats fisicoquímiques i biològiques, ja que els experiments realitzats en la interfície aire/aigua proporcionen informació de sobre la flexibilitat i l'activitat superficial de les molècules que s'estudien[157,161,179,183].

L'estudi de la variació de la tensió superficial en funció de la quantitat de lípid i/o de la quantitat de substància bioactiva afegida ens permetrà analitzar el comportament dels lípids que formen la monocapa, i per extensió, extrapolarem a la interacció que podria tenir lloc amb les membranes biològiques.

Concretament en aquest treball s'han realitzat experiments de seguiment de la cinètica de penetració a àrea constant. Aquesta tècnica es basa en la mesura de la pressió superficial pel mètode Wilhemy. El mètode de Wilhemy consisteix en introduir parcialment en la interfície aire/aigua una làmina de platí rugosa, connectada a una electrobalança que mesura la força que la superfície del líquid exerceix sobre ella. Figura 3.28.

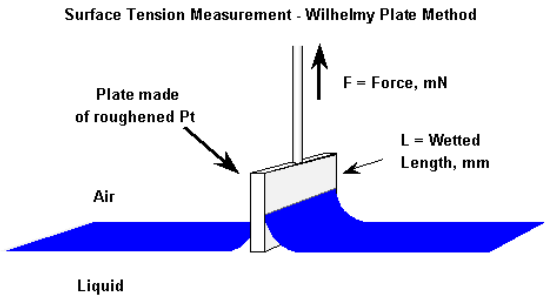


Figura 3.28. Esquema d'una balança de Wilhemy

La balança experimenta tres forces al mateix temps: la gravitacional, la que exerceix la pressió superficial cap a l'aigua, i la flotabilitat, que desplaça la làmina cap a dalt. Si es coneixen les dimensions de la làmina i es calibra l'electrobalança amb un pes conegut, la força que la superfície exerceix sobre la làmina, es pot convertir en unitats de tensió superficial ($mN \cdot m^{-1}$)

La naturalesa d'aquestes monocapa ens permet assolir diferents pressions superficials modificant el grau d'empaquetament de la monocapa, és a dir, modulant la quantitat de lípid que hi depositem. En aquest tipus d'experiments, es tracta d'estendre una monocapa de lípid sobre la superfície d'un líquid polar, i un cop s'hagi assolit la pressió superficial desitjada, s'introdueix en la subfase aquosa una solució del pèptid a estudiar. A mesura que passa el temps s'observa si les molècules de pèptid s'inserten a la monocapa, cosa que es traduirà per una variació de la pressió superficial.

Així doncs, les cinètiques de penetració a àrea constant consisteixen en el seguiment dels canvis produïts en la pressió superficial en funció del temps d'interacció i mantenint constant l'àrea superficial. Figura 3.29.

La magnitud d'aquests canvis es pot utilitzar per a comparar el grau d'interacció dels diferents pèptids objecte d'estudi.

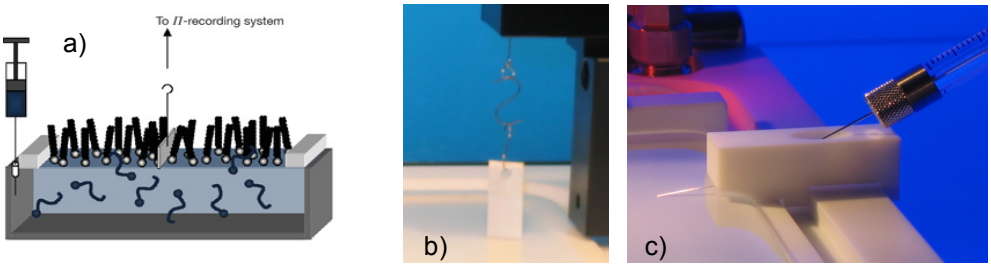


Figura 3.29. A) Esquema d'una balança de Langmuir per a realitzar les cinètiques de penetració. B) imatge d'una electrobalança de Whilhemy, amb la placa de platí rugós. C) Detall de la xeringa amb la que s'injecta el pèptid en la subfase aquosa.

3.6.3. Estudi biofísic de la PxB i els seus anàlegs

Un cop sintetitzats els pèptids anàlegs de la PxB i havent determinat la seva capacitat antibiòtica, el següent objectiu d'aquest treball era estudiar i caracteritzar el comportament d'aquests pèptids en contacte amb les membranes. Com ja s'ha comentat es va treballar amb liposomes i monocapes moleculars com a models de membrana.

Els liposomes que es van emprar com a model de membrana interna dels bacteris Gram-negatius eren vesícules unilamel·lars petites (SUV's) de fosfatidiletanolamina (PE) i fosfatidilglicerol (PG) (taula 3.15) que són els components majoritaris de les membranes bacterianes, juntament amb la cardiolipina (CL).

Per a la preparació de les monocapes lipídiques com a model de membrana externa dels bacteris Gram-negatius es va emprar lipopolisacàrid (LPS) de *Salmonella enterica sv.* Minnesota Re 595 (Re mutant)

Taula 3.15. Taula on es mostren els lípids utilitzats en aquests assajos.

POPG	
Pyr-PG	
NBD-PE	

Finalment es pretén correlacionar el tipus d'interacció biofísica que s'ha observat amb aquests experiments, i la seva activitat antibiòtica observada front als diferents microorganismes.

Els pèptids anàlegs de PxB que s'han sintetitzat haurien de ser capaços de :

- Interaccionar selectivament amb les membranes aniòniques i presentar una alta afinitat amb el LPS.
- Formar contactes moleculars entre membranes, tal i com s'havia descrit per PxB[72,73,184]. Aquests contactes donen lloc a un intercanvi de fosfolípids que provoca la pèrdua de la composició específica de la membrana, imprescindible per a mantenir l'homeostasis, i per tant la viabilitat ce·lular. Aquest és el mecanisme biofísic que es proposa com a base de l'acció antibiòtica de la PxB.
- No induir la lisi de la membrana a concentracions pròximes a la concentració mínima inhibitòria (CMI), és a dir, no han de presentar un efecte detergent inespecífic.

A continuació es detallen els experiments que es van dur a terme per a realitzar aquest estudi biofísic.

3.6.3.1. Determinació de l'agregació de vesícules per dispersió de la llum

Amb aquest experiment es vol determinar quin és l'efecte d'afegir diferents pèptids a una solució de vesícules lipídiques. El que es vol observar és si les molècules sintetitzades permeten la formació de contactes entre vesícules i si com a conseqüència provoquen un augment del tamany de partícula, o si pel contrari, presenten un efecte detergent o lític.

Els canvis en la distribució de mides en les poblacions de vesícules de lípids sintètics es determinaran per canvis de terbolesa de la solució: si aquestes han agregat, i per tant, han adquirit una mida més gran, la terbolesa de la solució augmenta, ja que les partícules més grans dispersen més la llum.

Si pel contrari hi ha efecte detergent, i les vesícules es trenquen, té lloc una disminució de la mida de partícula, i per tant, es redueix la dispersió de la llum[185].

Es van preparar vesícules unilamel·lars petites (SUV's) de POPG (1-palmitoïl-2-oleoïlglicero-sn-3-fosfoglicerol) en tampó TRIS a 10mM a pH8.0 a una concentració 10mM.

El canvi en la terbolesa es va mesurar com el canvi en la intensitat de la llum dispersada a un angle de 90º en un espectrofluorímetre AMINCO-Bowman Series 2. Per a aquest fi, es van situar els monocromadors tant d'excitació com d'emissió, a 360 nm, i els amples de banda van fixar-se en 1 nm. A una cubeta que conté tampó TRIS 10mM a pH8 s'addiciona una alíquota de liposomes de POPG 10mM. Un cop tenim una lectura estable de la intensitat de la llum dispersada (valor que es pren com a I_0, que correspon a la intensitat en absència de pèptid) es van afegint alíquotes d'una solució dels pèptids en aigua, prèviament quantificada per anàlisis d'aminoàcids (0.5mM) amb agitació constant i a 25ºC. (Experimental apartat 5.1.8.3). A mida qeu es va afegint pèptid es va observant com varia la intensitat de la llum dispersada (I).

Es van assajar la PxB i els diferents anàlegs sintetitzats, i es van representar els resultats obtinguts com a el canvi en la intensitat de la llum dispersada , que es defineix com a $I-I_{0,}$ en funció de la fracció molar de pèptid addicionat a les vesícules de POPG (pèptid/POPG (mol:mol)), tal i com es pot observar a la figura 3.30.

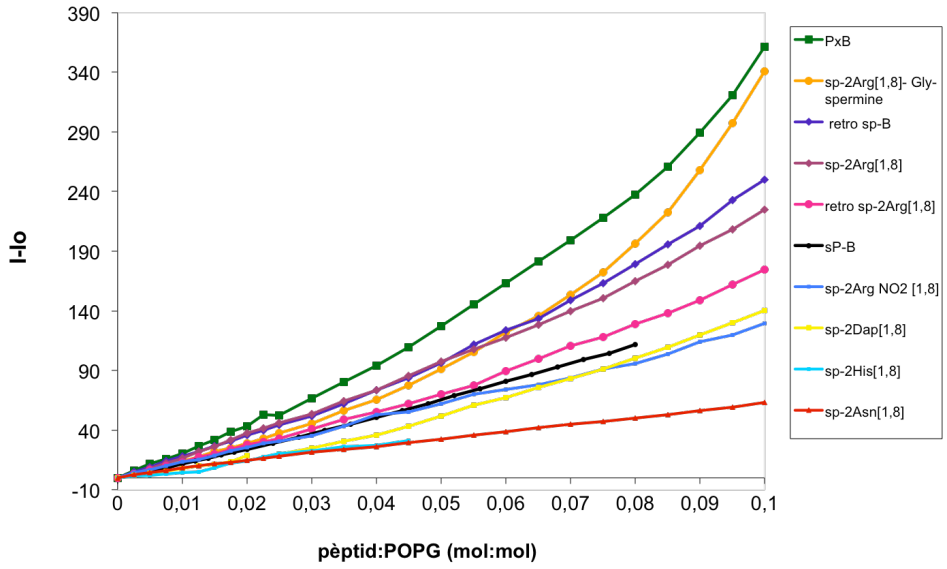


Figura 3.30. Representació gràfica dels canvis en la intensitat de la llum dispersada a 90º de les vesícules de POPG causats per l'addició de la PxB i els anàlegs sintetitzats.

Es pot observar en primer lloc que, en tots els casos, en produeix un increment en la intensitat de la llum dispersada que depèn de la concentració del pèptid, així doncs, tots els pèptids indueixen una agregació de les vesícules, obtenint per tant vesícules de mida mes gran.

Aquesta agregació, però, no te lloc en la mateixa mesura: s'observa que el pèptid més actiu és la PxB, i cap dels anàlegs sintetitzats millora l'activitat d'aquesta. En segon lloc es situa l'anàleg conjugat d'espermina, 9 (sp-2Arg-G-espermina), que presenta una activitat força similar a la PxB a concentracions altes.

Els que presenten menys activitat són els anàlegs on s'havien substituït els residus de Dab per Dap, His o Asn, així com també el que presenta el grup guanidini de la arginina protegit amb el grup NO_2. Aquest fet confirma que es necessita més càrrega positiva per a promoure la interacció amb el lípid.

L'anàleg sP-B presenta una capacitat d'agregació menor de la que s'esperava, i sorprenentment força menor que la del seu anàleg retroenantiòmers, que esperàvem que fossin similars Segons la teoria retro-enantio, aquest anàleg mantenia la topologia de les cadenes laterals, que de fet són les que interaccionen més amb els caps polars dels fosfolípids del LPS. Una possible

explicació és que en canviar la direccionalitat de l'enllaç amida, es perdi alguna interacció de pont d'hidrogen.

En canvi, amb els anàlegs sP-2Arg[1,8] i retro sP-2Arg[1,8] no s'observa la mateixa correlació. L'anàleg retro sP-2Arg indueix més agregació de vesícules que el seu anàleg de seqüència sense invertir.

3.6.3.2. Determinació de la mescla de lípids entre membranes per fluorescència

Per a estudiar el bescanvi de lípids entre vesícules s'aplicarà una tècnica de fluorimètrica basada en la fuorescència del grup pirè, que es detalla a continuació. En certes ocasions, una molècula excitada pot formar un complex amb una altra molècula idèntica però no excitada i formar un complex estable que perdura fins que es separa i emet fluorescència a una longitud d'ona diferent a la de la molècula sola. La molècula excitada és la que anomenem monòmer, i la molècula dimèrica és la que anomenem excímer.

A + fotó → A* (compost excitat: monòmer)

A + A* → B* (dímer excitat : excímer)

B* → A + A + fotó (fluorescència del dímer)

Aquesta propietat de presentar diferents espectres d'emissió de fluorescència permet quantificar la proporció de les dues espècies.

El complex B* es caracteritza per presentar una banda de fluorescència a una longitud d'ona superior respecte a la banda que s'observa a l'espectre d'emissió normal del monòmer.

Així doncs s'aprofita aquesta característica del grup pirè per a estudiar si hi ha intercanvi de lípids. Es barregen liposomes amb una elevada proporció de fosfolípids marcats amb el grup pirè (en les que predomina la banda de fluorescència de l'excímer a 480nm), amb liposomes sense marcar. Si els pèptids indueixen intercanvi de lípids entre vesícules, es produirà una dilució superficial de l'excímer, i per tant s'ha d'observar que la intensitat de la banda d'emissió de l'excímer disminueix, al mateix temps que augmenta la banda a 395 nm corresponent al monòmer. Figura 3.31.

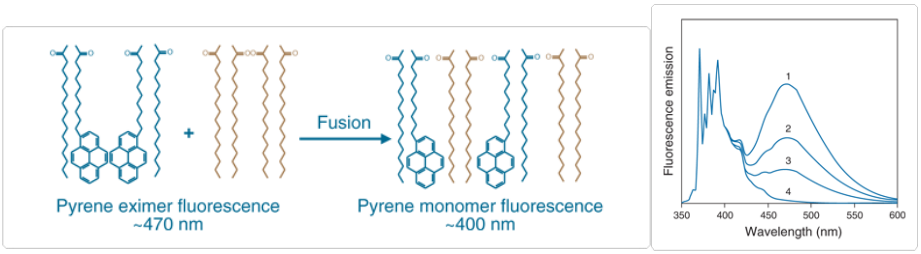


Figura 3.31. Representació esquemàtica d'un experiment d'intercanvi de lípids basat en la fluorescència de l'excímer/monòmer del pirè. A) Barreja de liposomes marcats amb el grup pirè, formant l'excímer, amb liposomes sense marcar. B) S'observa com disminueix la banda de l'excímer i augmenta la del monòmer. Extret de http://www.thermofisher.com/

Es van preparar liposomes de POPG marcats amb un 30% de pyr-PG (1-hexadecanoïl-2-(1-pirendecanoïl)glicero-sn-3-fosfoglicerol) (taula 3.15) en tampó TRIS 10mM a pH8.0 a una concentració final de lípid de 0.25mM.

En una cubeta que conté tampó TRIS es va addicionar una alíquota de liposomes marcats POPG/30% pyr-PG i una alíquota de liposomes sense marcar POPG (la concentració d'aquests és 100 vegades superior). Es va anar afegint progressivament volums determinats de la solució de pèptid. Després de cada addició, s'enregistra l'espectre d'emissió de fluorescència, anotant les intensitats de fluorescència d'emissió a 395 nm (monòmer) i 480 nm (excímer). La longitud d'ona d'excitació és 346nm.

Els resultats obtinguts es mostren en la figura 3.32, on es representa el canvi relatiu en la fluorescència d'emissió, F-Fo, on Fo és la fluorescència d'emissió en absència de pèptid, i F en presencia de pèptid, en funció de la fracció molar de pèptid addicionat a la mescla de vesícules.

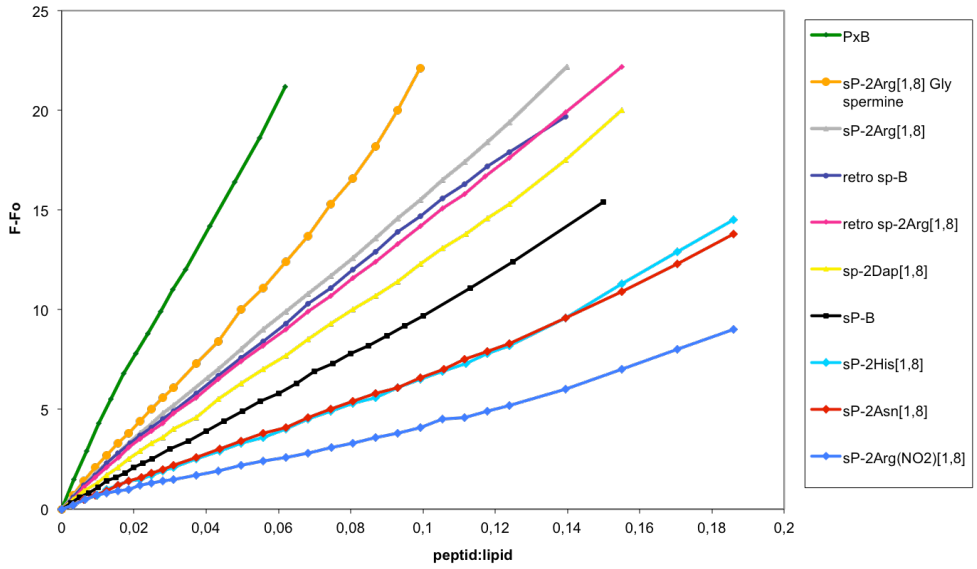


Figura 3.32. Representació gràfica de l'intercanvi de lípids entre vesícules, que ve representat pels canvis en la fluorescència d'emissió del monòmer a 395nm

Cal destacar que l'intercanvi de lípids és molt ràpid: es va observar que pocs segons un cop afegit el pèptid ja s'havia donat l'intercanvi de lípids i la fluorescència del monòmer havia augmentat. També s'observa que el bescanvi de lípids es dóna fins i tot que a fraccions molars petites de pèptid addicionat.

Es pot observar que tant la PxB com els anàlegs assajats, indueixen l'intercanvi de lípids dels liposomes, sent la PxB la que presenta més activitat, seguida de l'anàleg policatiònic que conté la unitat d'espermina, com ja s'havia observat en l'experiment anterior d'agregació de vesícules.

Els anàlegs que presenten una menor activitat inductora de mescla de lípids són 4, 5 i 6 (sP-2His, 2Asn i sP-2Arg(NO_2)). En canvi, el pèptid que presenta la substitució de Dab per Dap presenta una activitat major, per sobre fins i tot de l'anàleg sP-B.

Els anàlegs de la sèrie retroenantio presenten una activitat intermitja entre la PxB i el sP-B, on cal remarcar que el perfil que presenten l'anàleg 2, sP-2Arg, és força similar al del seu anàleg retro 9, retro sP-2Arg; al contrari que l'anàleg 8, retro sP-B, que presenta una activitat força diferent a la del seu anàleg sP-B.

3.6.3.3. Determinació de fenòmens de permeabilització i/o flip-flop en vesícules unilamel·lars per fluorescència

Un altre experiment basat en tècniques espectroscòpiques de fluorescència ens servirà per estudiar si els liposomes esdevenen permeables en presència dels pèptids sintètics, o si els seus lípids experimenten el fenomen de *flip-flop*, que consisteix en el moviment de lípids entre les dues monocapes qeu formen la membrana

Vesícules unilamel·lars petites (SUV´s) que contenen lípids marcats amb el grup NBD (7-nitro-2-1,3-benzodiazol) es fan reaccionar amb un agent reductor, el ditionit de sodi, de manera que els grups NDB de la cara externa del liposoma es redueixen i s'observa una disminució de la senyal fluorescent[186,187].En canvi els lípids de la capa interna no resulten afectats ja que el ditionit no pot penetrar la membrana.

La mateixa reacció en presència de pèptid ens permetrà observar si la disminució de fluorescència és major o no. Si el pèptid ha induït la permeabilització de la vesícula, i per tant ha permès que el ditionit hagi arribat a reduir els grups NDB de la cara interna del liposoma, o bé si ha facilitat que es dóni un intercanvi de posició dels lípids, flip-flop, i ara els grups NBD interns estiguin exposats a l'exterior, s'hauria d'observar una pèrdua de fluorescència que pot arribar a ser total. (Figura 3.33)

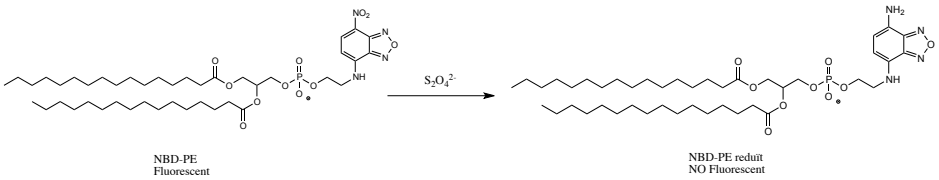


Figura 3.33. Representació esquemàtica del la reducció del grup NDB en presencia del diotionit.

Es van preparar vesícules unilamel·lars petites de POPG amb un 2,5% de NBD-PE (POPG/2,5%NBD-PE) en tampó TRIS 10mM a pH 8.0. (experimental 5.1.8.2). En una cubeta que conté tampó TRIS afegim una alíquota dels liposomes marcats. Un cop estabilitzada la lectura de fluorescència, s'afegeix una alíquota del pèptid, i també deixem estabilitzar(F_o). Tot seguit afegim una alíquota de la dissolució de ditionit de sodi en tampó bicarbonat, que tenim

conservada en gel i en atmosfera de nitrogen. Es va mesurar la fluorescència del grup NBD a 535 nm (excitació a 460nm) durant 1000s (F). Finalment s'addiciona deoxicolat (DOC), un agent detergent que provoca la lisis dels liposomes de manera que el NBD que restava intacte, acaba reduint-se i per tant esgotant la senyal fluorescent (F_t)

Cal destacar que la reacció de reducció comença immediatament quan s'afegeix el ditionit, reduint ràpidament els grups NBD més accessibles, que són els de la monocapa externa, i després, més lentament, es van reduint els de l'interior del liposoma degut a la permeabilització que pot haver provocat el pèptid.[187]

Es va calcular el percentatge de fosfolípid NBD-PE present en la monocapa externa de la següent manera:

$$\%NBD\text{-}PE = \left[1 - \frac{F - F_t}{F_0 - F_t} \right] \times 100$$

En el primer assaig, sense afegir cap pèptid, es va determinar que per a les vesícules que s'havien preparat, el percentatge de fosfolípid marcat en la cara externa era d'un 68% de NBD-PE.

Els resultats es van representar en gràfics de barres, on s'indica el % de NBD-PE reduït, en funció de la fracció molar de pèptid addicionat, figura 3.34.

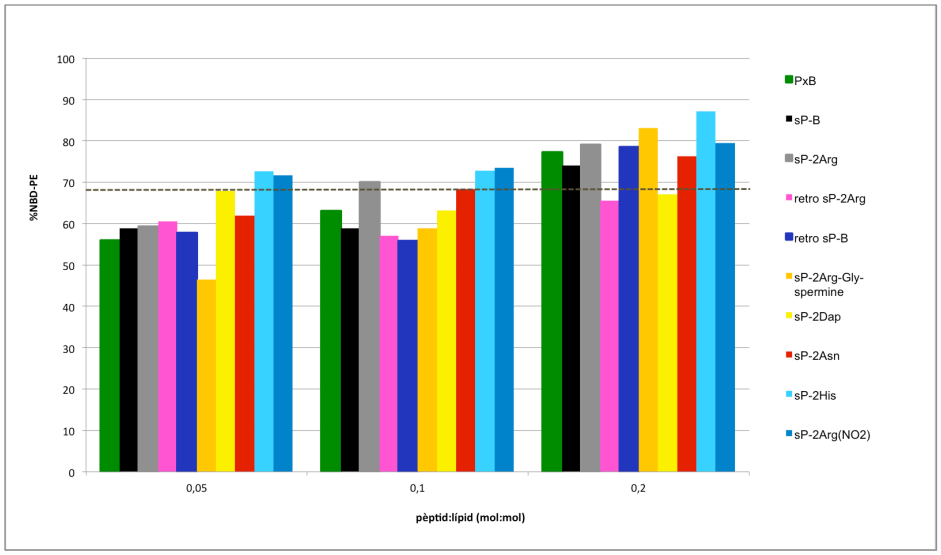


Figura 3.34. Representació gràfica de la quantitat de NBD-PE reduït en funció de la fracció molar de pèptid afegit a les vesícules de POPG/2,5% NBD-PE. La línia discontínua horitzontal indica el % de NBD-PE en la monocapa externa de les vesícules.

A grans trets el que s'observa és que a fraccions molars petites de pèptid, per sota de 0,2, no se supera la barrera del 68% que havia sortit en el control sense pèptid. És a dir, que no s'ha induït significativament una permeabilització de les vesícules. Només superen aquesta barrera l'anàleg 4 (sP-2His) i l'anàleg 6 (sP-2Arg(NO_2)).

A major concentració de pèptid, fracció molar 0,2, si que s'observa que la proporció de NBD que s'ha reduït és major, però d'un ordre similar al de la PxB en quasi tots els casos. El que destaca més és l'anàleg 9, (conjugat amb espermina), amb una activitat lleugerament superior a la de la PxB, i també sorprenentment l'anàleg que conté dos histidines. Podria ser per que en tenir dos grups imidazol en les cadenes laterals, faci mes interaccions de caràcter hidrofòbic amb el lípid de les vesícules.

3.6.3.4. Determinació de la unió dels pèptids al LPS: cinètiques d'absorció a àrea constant

Les monocapes lipídiques, com ja s'ha esmentat en l'apartat anterior (apartat 3.6.2), són un bon model per a estudiar el comportament dels anàlegs de

polimixina amb la membrana exterior dels bacteris Gram-negatius.

Es van realitzar cinètiques de penetració a àrea constant, en una electrobalança *NIMA Technology*, utilitzant com a fosfolípid el LPS extret de *Salmonella enterica* sv. Minnesota, varietat R595[188] figura 3.35.

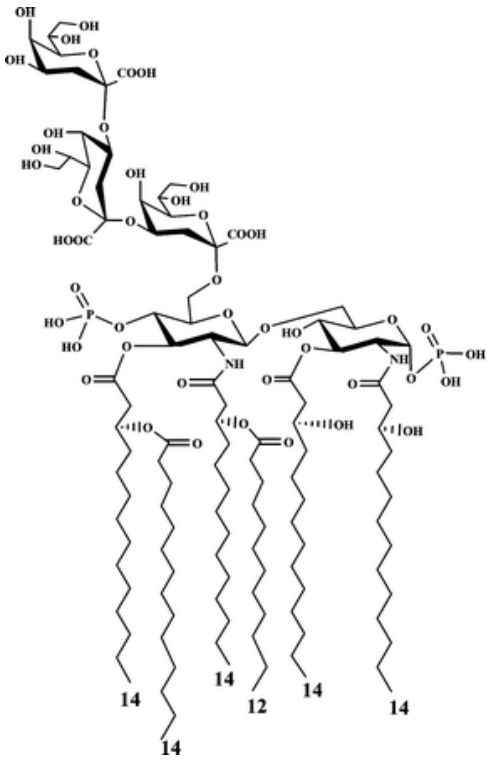


Figura 3.35. Estructura del LPS extret de extret de Salmonella entèrica sv. Minnesota, varietat R595

Es va dipositar en la cubeta de tefló (5cm de diàmetre o 19.6 cm^2 d'àrea) que conté 30 mL de tampó TRIS, una monocapa del LPS dissolt en cloroform/metanol. El lípid s'ha d'anar addicionant en petites alíquotes fins assolir la pressió inicial adequada, $32 mN \cdot m^{-1}$, que és la pressió superficial de les membranes biològiques. Un cop estabilitzada aquesta pressió, i evaporat el dissolvent, s'afegeix en la subfase la solució del pèptid en aigua, i es va registrant l'evolució de la pressió superficial en funció del temps. Els resultats que es van obtenir es mostren en la següent gràfica, on es representa la variació de la pressió superficial $\pi - \pi_0$, on π és la pressió superficial en un moment donat i π_0 és la pressió superficial inicial, abans d'addicionar el pèptid,

respecte el temps, al que se li ha de restar el temps t_0 que és quan s'afegeix el pèptid.

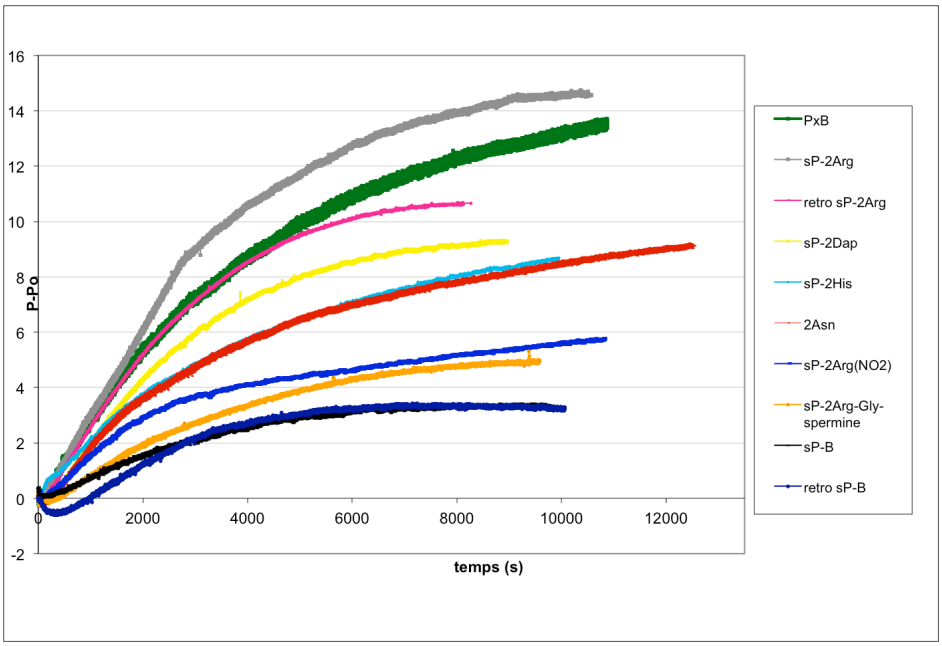


Figura 3.36. Representació gràfica de les cinètiques de penetració a àrea constant, on es representa el canvi en la pressió superficial després de la injecció de la PxB i dels anàlegs sintetitzats.

Es pot observar que tots els pèptids interaccionen amb la monocapa de LPS i s'hi insereixen, fent augmentar la pressió superficial. Però s'observen diferents comportaments, així, l'anàleg amb 2Arg, és el que presenta una afinitat major pel LPS, major que la pròpia PxB, però la resta d'anàlegs presenten afinitats menors. L'anàleg 8 (retro-sP-2Arg) presenta una afinitat comparable a la de PxB, en canvi l'anàleg 7 (retro sP-B) presenta una afinitat força menor, encara que per sobre de sP-B, que mostra molt poca capacitat d'inserció en la monocapa de LPS.

L'anàleg 3 (sP-2Dap) presenta una afinitat intermèdia, així com l'anàleg 4 (sP-2His) i l'anàleg 5 (sP-2Asn).

Destaca la poca capacitat d'inserció que presenta l'anàleg 9, conjugat de polimixina i espermina (sP-2Arg-G-espermina), que tant bons resultats havia donat en els anteriors experiments amb liposomes. Es pot haver donat la situació de que en ser un anàleg més voluminós que els altres, presenti mes

impediment estèric, i tot i tenir més càrrega positiva, aquesta no sigui accessible per a interaccionar amb els fosfats del lípid A.

3.7. DISCUSSIÓ: RELACIÓ ENTRE ACTIVITAT ANTIMICROBIANA I COMPORTAMENT BIOFÍSIC

Un cop realitzats els experiments d'activitat antimicrobiana (CMI) i interacció amb models de membrana, es pot observar que efectivament, en la majoria dels casos, s'estableix una bona correlació entre els resultats que s'han obtingut de concentració mínima inhibitòria i els resultats d'activitat biofísica amb models de membrana.

Tal i com es pot observar a la taula 3.9, cap dels anàlegs sintetitzats va superar en activitat a la PxB, però tot i això alguns van donar bons resultats: els pèptids que van donar millor capacitat antimicrobiana en bacteris Gram-negatius, van ser els anàlegs 2 i 6 (sP-2Arg, i sP-2Arg(NO_2)), els anàlegs 3 i 1 (sP-2Dap i sP-B), seguit de l'anàleg conjugat 9 (sP-2Arg-G-espermina). Dels anàlegs retroenantio, només va donar certa activitat l'anàleg 8 (el retro sP-2Arg).

En canvi, l'anàleg 8 (retro sP-B), si que va mostrar activitat contra els bacteris Gram-positius que es van assajar, així com el seu anàleg sP-2Arg, i l'anàleg 9, (sP-2Arg-G-espermina).

Pel que fa als estudis biofísics, es va observar la mateixa tendència: no se supera quasi en cap cas l'activitat de la PxB, però alguns dels pèptids mostren comportament força similars.

Destaquem en primer lloc l'activitat de l'anàleg conjugat amb espermina, l'anàleg 9 (sP-2Arg-Gly-spermine), que és el que presenta més interacció amb els lípids del liposomes: després de la PxB, és el que presenta més capacitat d'induir agregació dels liposomes (figura 3.30), com també capacitat de produir intercanvi de lípids entre membranes (figura 3.32) i de permeabilitzar la membrana (figura 3.34) El fet de presentar més càrrega positiva probablement afavoreix les interaccions electrostàtiques amb els fosfats del POPG. En canvi, en l'experiment d'inserció a la monocapa de LPS és el que dóna pitjor resultat. S'hi insereix però en molta menor intensitat que la PxB i la resta d'anàlegs. Es pot suposar que en ser una molècula més voluminosa, l'impediment estèric

dificulti la seva inserció entre els grups del LPS que es troben fortament empaquetats. Això permetria explicar també perquè presenta certa activitat antibiòtica front a bacteris Gram-positius, ja que aquests en no presentar la paret de LPS, no es trobaria amb aquest impediment estèric. I com ja hem comentat, s'ha observat en altres anàlegs sintetitzats al grup[147], que un augment de càrrega positiva, amplia l'espectre d'acció dels anàlegs.

S'ha de tenir en compte que els models que s'utilitzen presenten limitacions, i tot i que ens van bé com a símil de membrana bacteriana, no podem oblidar que són models molt simplificats.

En primer lloc s'ha treballat amb liposomes simètrics de POPG, quan en la composició de les membranes bacterianes trobem que hi ha altres fosfolípids també importants com la cardiolipina i fosfatidiletanolamina. Sense oblidar la paret de peptidoglicà i les proteïnes de membrana.

I en segon lloc cal recordar que l'activitat de la polimixina es deu principalment a la seva acció sobre les membranes, però no és el seu mecanisme exclusiu, s'han descrit altres mecanismes alternatius que no tenen la membrana com a diana per a la seva acció.[70]

Si continuem analtitzant els resultats, seguidament trobem l'anàleg 2 (sP-2Arg), que presenta una inserció més forta que la PxB a la monocapa de LPS, i en els assajos d'agregació i intercanvi de lípids mostra una activitat lleugerament inferior a la PxB. Aquest fet correlaciona perfectament amb l'activitat biològica, lleugerament menor que la de la PxB en Gram-negatius i lleugerament major en Gram-positius.

Pel que fa a l'anàleg 3 (sP-2Dap), s'observa que presenta un comportament molt similar al de l'anàleg 2 (sP-2Arg) pel que fa a activitat antimicrobiana, i un comportament biofísic també similar, en menor ordre d'intensitat, però similar al del seu homòleg amb arginines.

També hi ha bona correlació entre activitat antibiòtica i biofísica en el cas dels anàlegs 6 (sP-2Arg(NO_2)) i 4 (sP-2His). No mostren una activitat antibiòtica especialment destacable, i mostren menys capacitat d'interacció amb els liposomes de POPG i amb la monocapa de LPS que la resta d'anàlegs. Són anàlegs que presenten menys caràcter catiònic que la resta d'anàlegs, cosa que explica una menor interacció electrostàtica amb la membrana bacteriana.

L'anàleg 5 (sP-2Asn) conté residus neutres d'asparagina, i és per tant el que presenta una menor càrrega positiva de tots els sintetitzats. En les proves microbiològiques, aquest anàleg ha mostrat una baixa activitat, amb una CMI de 32 o més de 32 μg/mL tant per bacteris Gram-negatius i Gram-positius. La interacció d'aquest anàleg liposomes està d'acord amb aquest resultat en bacteris i mostra una baixa capacitat desestabilitzadora de la membrana aniònica, corroborant així la importància del component electrostàtic en la interacció lípid-pèptid a nivell de membrana interna dels bacteris. El fet que sP-2Asn mostri un bon nivell d'inserció en la monocapa de LPS suggereix que el component hidrofòbic és important per assegurar la inserció sempre i quan el pèptid tingui un mínim de càrrega negativa per a assegurar la unió als grups fosfat. Tanmateix la penetració a la membrana externa no és suficient per presentar una bona activitat antimicrobiana com ja s'ha demostrat amb el nonapèptid de la polimixina (PxBN).

Fixant-nos en els anàlegs preparats a partir de la teoria retroenantio, on es volia estudiar la implicació de l'esquelet peptídic, cal destacar que tot i presentar una certa activitat, s'esperava que hi hagués més similitud amb els seus homòlegs retroenantiòmers. L'anàleg retro sP-B, 8, mostra menys activitat microbiològica que el sP-B, i tot al contrari, mostra més interacció amb els liposomes de POPG. En l'assaig d'inserció en la monocapa de LPS si que mostren un comportament similar, són els dos anàlegs que pitjor s'insereixen a la monocapa.

En canvi, l'anàleg retro sP-2Arg, 9, presenta un perfil més similar al del seu anàleg sP-2Arg, amb bona afinitat pels liposomes de POPG i per la monocapa de LPS. L'activitat antimicrobiana és similar també a la del seu anàleg.

Aquest comportament és l'esperat en el cas de molècules que no actuen en un receptor específic, com seria una proteïna de membrana, ja que en aquest cas l'anàleg retroenantiomèric no hauria de mostrar activitat. En canvi si la diana és la matriu lipídica, produint una desestabilització de la membrana, no s'ha de trobar diferències significatives entre el pèptid i el seu retroenantiòmer.

Amb els assajos realitzats, podem concloure que tots els anàlegs presenten un comportament similar a la PxB, encara que la majoria presenten menor intensitat en la interacció amb els models de membrana, tant liposomes com monocapa. Això es correlaciona amb la menor activitat antimicrobiana que han

presentat els anàlegs. Cal destacar que, respecte a la PxB, en alguns casos tot i rebaixar l'activitat front a Gram-negatius, s'ha millorat la activitat front a Gram-positius.

4. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi són:

- Els elements de disseny que es van plantejar per a simplificar la síntesi dels anàlegs de polimixina (la substitució de l'enllaç lactàmic que tanca l'anell de la polimixina, per un enllaç disulfur, amb les corresponents substitucions de la Thr-10 i el Dab-4 per dues cisteïnes, i la substitució de l'acid natural majoritari per l'àcid nonanoic) han resultat perfectament vàlids per a la síntesi dels anàlegs de polimixina que s'han proposat. D'aquesta manera s'han pogut sintetitzar satisfactòriament els 6 anàlegs per substitució del model canònic dissenyats, els 2 anàlegs retroenantiòmers, i finalment l'anàleg conjugat de polimixina i espermina.
- S'ha pogut avaluar l'activitat biològica d'aquests anàlegs, per assajos de concentració mínima inhibitòria, i s'ha pogut observar com, tot i no superar l'activitat antibacteriana de la PxB, en alguns casos s'ha aconseguit una activitat del mateix ordre, pel que fa a bacteris Gram-negatius, i en algun cas, s'ho aconseguit un certa activitat front a bacteris Gram-positius, el que es indicatiu d'una potencial ampliació de l'espectre d'activitat.
- S'ha pogut avaluar l'activitat biofísica dels compostos sintetitzats en models de membrana bacteriana, i s'han comparat amb la de la PxB com a patró. S'ha determinat que tots ells presenten un mecanisme d'acció similar a la PxB, tot i que la majoria ha mostrat interaccions més febles amb els models de membrana que s'han assajat: liposomes i monocapes lipídiques.

5. PART EXPERIMENTAL

5.1. MATERIALS I MÈTODES

5.1.1. Dissolvents i reactius

Dissolvents

Nom	Marca comercial
Acetona,	Scharlau
ACN, qualitat HPLC	VWR
CHCl3	Scharlau
CCl4	Scharlau
DCM	Scharlau
DCM, qualitat síntesi de pèptids	SDS
DMF*, qualitat síntesi de pèptids	SDS
Et_2O **	Scharlau
EtOH	Panreac
H_2O***	Milli-Q
MeOH, qualitat HPLC	VWR

* La DMF es guarda sobre tamís molecular de 4Å i es passa corrent de N_2 abans de la seva utilització per eliminar contaminants volàtils.

** L'Et_2O sec es conserva sobre Na i atmosfera de N_2

*** L' H_2O prèviament desionitzada, es filtra en un sistema Millipore MilliQ, 0.45mm.

Reactius-Síntesi Química

Nom	Marca comercial
Resines, aminoàcids i espaiadors bifuncionals	Novabiochem, Fluka, Polypetides
Àcid acètic, AcOH	Scharlau
Acid nonanoic	Fluka
Anhídrid acètic, Ac2O	Across organics
Anisole	Merck
Br_2 ?	Acros Organics
Cloranil	Fluka
DBU ?	Fluka
DIEA	Sigma-Aldrich
DIPCDI	Fluka
DMAP	Sigma-Aldrich
DMSO	Acros Organics
HBr, 33% en AcOH	Fluka
HCl, solució aquosa 37%	Scharlau
HOBT	Fluka
I_2	Fluka
N,N-dietilditiocarbamat de sodi	Sigma-Aldrich
Ninhidrina	Merck
Octilamina	Fluka
$Pd[(PPh_3)]_4$	Strem Chemicals
$PhSiH_3$	Fluka
Piperidina	Sigma-Aldrich
Piridina	Panreac
PyBOP	Novabiochem

TES	Fluka
TFA	Sigma-Aldrich
Tioanisole	Fluka
TIS	Sigma-Aldrich
$Tl(CF_3COO)_3$	Sigma-Aldrich
TMSCl	Fluka

Reactius assajos biològics

Nom	Marca comercial
Ditionit de sodi	Fluka
DOC	Sigma-Aldrich
LPS	Sigma-Aldrich
MHB	Oxoid
Na2CO3	Panreac
NBD-PEº	Avanti Polar Lipids, Inc.
POPG	Avanti Polar Lipids, Inc.
PxB	Sigma-Aldrich
pyr-PG	Avanti Polar Lipids, Inc.
TRIS	Sigma-Aldrich
Trypticase Soy Agar, TSA	Pronadisa
Trypticase Soy Broth, TSB	Pronadisa

5.1.2. Instrumentació

Instrument	Casa comercial, model
Agitador orbital	IKA, model Labortechnik KS250 basic
Balances	Mettler Toledo, models PJ360, AG245 i AB204-5

Bany d'ultrasons	J.P.Selecta, model Ultrasons Medi II
Centrífuga	Beckman, model GS-15R
Equip d'aigua Milli-Q	Millipore, Milli-Q Plus
Espectròmetre UV-Vis	Uvikon XS Secomam
Estufa	Jouan, model EU55 class 0.
Liofilitzador	Virtis Freezemobile, 12L
Pipetes automàtiques	Brand P1000, P250, P200, P10
	Mettler Toledo, P5000, P200
Rotavapors	Büchi R-200
	Heidolph, Laborota 4000
Fluorímetre	SLM-Aminco, AB-2 spectrofluorímetre
Balança de Langmuir	NIMA tecnhology
Espectropolarímetre UV-Vis	Jasco model J810
Sonicador de liposomes	Lab supplies, Hickesville, NY, Model G112SPIT

5.1.3. Mètodes en la síntesi de pèptids en fase sòlida

5.1.3.1.Consideracions generals

La síntesis en fase sòlida s'ha realitzat manualment en xeringues de polipropilè de diferents mides segons la quantitat de resina utilitzada, amb un filtre de polietilè porós. Els volums afegits de de reactius han de ser suficients per permetre la solvatació òptima de la resina. L'agitació manual es va realitzar amb una vareta de tefló, i l'agitació mecànica mitjançant un agitador orbital. Els excessos de reactius, dissolvents i subproductes s'eliminen per filtració.

5.1.3.2. Mètodes analítics

Assaig de ninhidrina qualitatiu (o test de Kaiser) [189]

L'assaig de ninhidrina permet detectar de forma qualitativa la presència de grups

amino primaris en una resina, controlant així que l'acoblament ha sigut satisfactori.

Es posa una punta d'espàtula de resina seca en un tub adient, i s'afegeixen 6 gotes del reactiu A i 2 gotes del reactiu B. S'escalfa la mescla a l'estufa 110ºC durant 3 minuts. Una coloració blau-verdosa de la resina o del sobrenedant indica la presència d'amines primàries (assaig positiu); una coloració groga indica l'absència d'amines primàries (assaig negatiu), és a dir, un percentatge d'acoblament superior al 99.5%. Paral·lelament es realitza una prova en blanc per confirmar l'absència de contaminació de reactius.

Reactiu A: es prepara una dissolució en calent de fenol (40g) en EtOH absolut (10 ml). Per una altra banda es prepara una dissolució de KCN (65 mg) en H2O (100 ml). Es dilueixen 2 ml d'aquesta dissolució en 100 ml de piridina acabada de destil·lar sobre ninhidrina. Aquestes dues dissolucions s'agiten per separat durant 45 minuts amb resina Amberlite MB-3 (4 g). Una vegada filtrades es mesclen.

Reactiu B: es prepara una dissolució de ninhidrina (2.5 g) en EtOH absolut (50 ml). Es manté protegida de la llum i preferentment sota atmosfera de N2.

Assaig de cloranil[190]

El test de cloranil s'utilitza per avaluar els acoblaments sobre amines secundàries. Es fa servir una dissolució saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranil) en toluè (0.75 g en 25 mL). Per a realitzar aquest assaig, es diposita en un tub de vidre una mostra seca de peptidil-resina (0.5-2 mg), s'hi afegeixen 20 gotes d'acetona i 5 gotes de cloranil i s'agita durant 5 minuts a temperatura ambient. Una coloració blau-verdosa de la resina indica la presència d'amines secundàries i , per tant, un acoblament incomplet. Aquest mètode no és tan sensible com el test de ninhidrina.

Test de fenols sobre resina

El test de fenols ens permet avaluar l'efectivitat dels acoblaments sobre un grup fenòlic. Per a realitzar aquest assaig, es diposita en un tub de vidre una mostra seca de peptidil-resina (0.5-2 mg), s'hi afegeixen 10 gotes d'una solució de FeCl3 0.5M en DCM i 5 gotes de piridina. Es deixa uns minuts a temperatura ambient. Una coloració verd fosc de la resina indica la presència de grups hidroxil fenòlics i per tant un acoblament incomplert.

Hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids

El contingut i la proporció de d'aminoàcids presents en una mostra peptídics es determinen per anàlisi cromatogràfic, prèvia hidròlisi de la mostra.

El protocol d'hidròlisi es lleguremanet diferent segons es tracti d'una peptidil-resina o d'un pèptid en solució.

Per a la hidròlisi de la peptidil-resina es pesen entre 2-10 mg de la peptidil-resina seca en un tub de vidre i s'afegeixen 200-400 mL de la mescla HCl (12N): propiònic (1:1, v/v). Es tanca el tub a la flama i s'escalfa a 155ºC durant 90 min. Posteriorment s'evaporen els àcids a pressió reduïda fins a sequedat. El residu es redissol en un volum conegut de d'àcid clorhídiric 20mM per tal que la concentració dels aminoàcids a analitzar sigui aproximadament 0,1mM, i es filtra amb un filtre de nylon de 0.45μm.

Les hidròlisis de pèptids lliures es realitzen amb HCl 6M. La reacció té lloc a 150ºC durant 60 minuts. Es continua de la mateixa manera que en el cas anterior.

Els aminoàcids es derivatitzen amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (ACQ) seguin el protocol de AccQ-Tag de Waters. I s'analitza per HPLC en un sistema que consisteix en un controlador Waters 600, una bomba Waters Delta 600, un detector d'absorció UV model Waters 2487 (dual absorbance detector) i un injector automàtic model Waters 717. La columna, (NovaPak 3,9 x 150mm, C18, 4 μm) es manté a 37ºC dins d'un forn de columnes amb termostat, model Waters temperature control module II.

Les mostres s'elueixen a un flux d'1mL/min emprant un gradient lineals dels eluents A i B, on A: solució amortidora comercial de fosfat i acetat (Waters) i B: ACN. La detecció es realitza a 254 nm.

Cromatografia líquida d'alta ressolució

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) s'ha realitzat en dos aparells diferents:

A escala analítica s'ha emprat un aparell Shimadzu de dos bombes model LC-20AD Prominence, un detector de fotodiode array model SPD-M20A i un controlador model CBML-20A.

La columna utilitzada ha estat una Nucleosil 120 C18 , d'acer inoxidable, de dimensions 25 x 0.4 cm i de mida de partícula de 5 μm.

Les condicions cromatogràfiques es poden resumir com: flux 1ml/min emprant gradients lineals o isocràtics dels eluents A i B, on A: H2O/ TFA 0.045% i B:ACN/TFA 0.036%. L'ACN és de qualitat HPLC i l'aigua és de qualitat Milli-Q.

La detecció es realitza per UV, en el rang de longituds d'ona desitjat.

A escala preparativa, per a la purificació dels diferents pèptids s'ha emprat un aparell Waters Delta Prep 3000, amb un controlador Waters model 600E i un detector de longitud d'ona variable Waters model 484.

La columna en aquest cas ha estat una Phenomenex C18 (250 x 10.0 mm) de mida de partícula de 5µm. Les mostres s'elueixen a un flux de 3mL/min emprant gradients lineals o isocràtics dels eluents A i B, on A: H2O /TFA 0.1% i B: ACN/TFA 0.1%. La detecció es realitza a 220 nm.

Espectrometria de masses

Espectrometria de masses MALDI-TOF

La massa molecular dels pèptids sintetitzats s'ha determinat per espectrometria de masses MALDI-TOF emprant un instrument Perspeptive Biosystems Voyager DE-RP. Es mescla 1μL de solució de pèptid (1-2 mg/mL) amb 1μL de matriu. La mescla resultant s'aplica sobre la placa de MALDI i es deixa assecar a temperatura ambient. La matriu que s'ha emprat normalment ha estat la d'àcid dihidroxibenzoic (DHB), preparada a una concentració de 10 mg/mL en una mescla MeCN:H2O 1:1 amb un 0.1% de TFA. La solució de matriu es pot guardar al congelador.

Cromatografia líquida d'alta eficàcia a escala analítica amb detector d'espectrometria de masses

S'ha utilitzat un equip Waters Alliance 2695 constituït per una bomba quaternària,amb detector d'UV/Vis de fotodíode array model Waters 2996, sistema d'ESI-MS model Micromass ZQ i programa de control Masslynx versió 4.0. La columna emprada ha estat la mateixa que el l'apartat anterior.

Les mostres s'elueixen a un flux d'1 mL/min emprant gradients lineals dels solvents A i B (A:H2O/àcid fòrmic 0.1% i B:ACN/ àcid fòrmic 0.07%). Les condicions per a la detecció amb ESI-MS (voltatge de con i rang de masses) han estat optimitzades per a cada mostra.

S'ha utilitzat aquest aparell també per a determinar masses moleculars de

manera directe (injecció directa) sense emprar columna ni detecció UV/Vis. En aquest cas s'injectaven de 10μL de la mostra, i s'eluia a un flux de 0.1-0.3 mL/min, en una mescla 1:1 dels mateixos eluents. Per a cada mostra s'optimitaza el voltatge de conus i el rang de masses.

5.1.3.3. Protocols de síntesi emprant l'estratègia de protecció Boc/Bzl

A continuació es resumeixen els protocols de les diferents etapes que tenen lloc durant la síntesis en fase sòlida quan s'utilitza l'estratègia Boc/Bzl. Les proporcions indicades en % estan expressades en v/v.

Acondicionament de la resina

En la següent taula s'indica el protocol d'acondicionament de la resina.

Taula 5.1. Protocol d'acondicionament de la resina MBHA.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DCM	rentat	5	30 s
2	40% TFA en DCM	pre-equilibrat	1	1 min
3	40% TFA en DCM	rentat i solvatació	2	10 min
4	DCM	rentat	5	30 s
5	5% DIEA en DCM	neutralització	3	2 min
6	DCM	rentat	5	30 s

Acoblament de l'aminoàcid de referència interna AARI , altres aminoàcids i grup espaiador bifuncional

S'incorpora a la resina un aminoàcid de referència que ens serveixi per a avaluar i quantificar l'eficàcia tant de la síntesi com de la escisció del peptid de la resina. Ha de ser un aminoàcid que no estigui present en la seqüència del pèptid, en aquesta tesi s'han emprat la glicina i l'alanina.

El protocol estàndard a seguir és el que es mostra a la taula 5.2:

Un cop finalitzat el cicle d'acoblament, es realitza el test de ninhidrina. Si surt postiu es repeteix l'acoblament una o més vegades. En els casos on després de diversos acoblaments segueix donant ninhidrina positiva es procedeix a l'acetilació de les amines lliures.

En el cas d'altres aminoàcids de la seqüència i també del grup espaiador bifuncional, es realitza el mateix protocol.

Taula 5.2. Protocol per a l'acoblament d'un aminoàcid estàndard.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	Boc-AA-OH/HOBt/DIPCDI 3:3:3 equivalents en DMF	acoblament	1	1 h
3	DMF	rentat	5	30 s
4	DCM	rentat	5	30s

Acoblament del primer aminoàcid mitjançant un enllaç de tipus èster.4

En el cas que l'enllaç amb el suport polimèric sigui de tipus ester, s'empra en l'acoblament la 4,4-dimetilamiopiridina (DMAP) com a catalaitzador. Es fan acoblaments de 45 minuts per a evitar la racemització. Per monitoritzar l'acoblament s'empra el test d'hidroxils (apartat 6.4.2.3).

Taula 5.3. Protocol per a l'acoblament d'un aminoàcid sobre l'espaiador fenòlic.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	Boc-AA-OH/DIPCDI/DMAP 5:5:0.5 equivalents en DMF	acoblament	2	45 min
3	DMF	rentat	5	30 s

Acetilació del N-terminal (capping)

A la següent taula s'indica el protocol a seguir per a la acetilació de l'extrem N-terminal:

Taula 5.4. Protocol d'acetilació de l'extrem N-terminal.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	Ac2O/piridina 50:50 eq.	acoblament	1	30 min
3	DMF	rentat	5	30s

Eliminació grup protector Boc

Per a la eliminació del grup protector Boc se segueix el seguent protocol:

Taula 5.5. Protocol d'eliminació del grup Boc.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DCM	rentat	5	30 s
2	40% TFA en DCM	pre-equilibrat	1	1 min
3	40% TFA en DCM	rentat i solvatació	2	10 min
4	DCM	rentat	5	30 s
5	5% DIEA en DCM	neutralització	3	2 min
6	DCM	rentat	5	30 s

Acoblament d'aminoàcids emprant PyBOP amb neutralització in situ.

En determinats casos no s'ha neutralitzat la resina despres de l'elimiació del grup Boc, i en el moment de l'acoblament és quan es neutralitza. El protocol que se segueix és el que es mostra a la taula:

Taula 5.6. Protocol d'acetilació de l'extrem N-terminal.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	Boc-AA-OH/PyBOP/DIEA 3:3:9 equivalents en DMF	acoblament	1	1 h
4	DMF	rentat	5	30 s
3	DMC	rentat	5	30s

5.1.3.4. Protocols de síntesi emprant l'estratègia de protecció Fmoc/tBu

Acondicionament de la resina

Quan sigui possible, l'acondicionament de la resina es realitza de la mateixa manera que s'explica en la taula 5.1.

Acoblament del grup espaiador bifuncional linker

Es realitza l'acoblament d'aquest espaiador bifuncional en les mateixes condicions que si fos un aminoàcid, linker:HOBT:DIPCDI (3 eq. de cadascun) en

DMF, 1 hora. (taula 5.8). Per controlar l'eficàcia de l'acoblament es fa un test de ninhidrina.

Acoblament de l'octilamina sobre el BAL linker per aminació reductiva

Es dissol l'amina (10 eq) en una una solució de DMF al 1% d'àcid acètic i s'afegeix a la resina prèviament soltvatada amb DMF. A continuació s'afegeix el $NaBH_3CN$ (10eq.) i si és necessari, una mica mes de DMF per tenir una bona mobilitat de la resina. La mescla es deixa reaccionar tota la nit, amb agitació mecànica.

Taula 5.7. Protocol d'acoblament per aminació reductiva

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	solvatació	5	
2	. Octilamina 10 eq. en DMF al 1%AcOH . $NaBH_3CN$ 10 eq. en DMF	aminació reductiva	1	15 h
3	AcOH:DMF (1:99)	rentat	5	30 s
4	DMF	rentat	5	30 s
5	DIEA:DMF (5:95)	rentat	5	30 s
6	DMF	rentat	5	30 s
7	DCM	rentat	5	30 s

Acoblament d'aminoàcids

En la següent taula s'indica el protocol estàndard a seguir per a la incorporació dels aminoàcids:

Taula 5.8. Protocol d'acoblament d'aminoàcids en l'estratègia Fmoc/tBu.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	Fmoc-AA-OH/HOBt/DIPCDI 3:3:3 equivalents	acoblament	1	1 h
3	DMF	rentat	5	30 s

Eliminació del grup Fmoc

En la següent taula s'indica el protocol estàndard a seguir per a l'eliminació del grup Fmoc:

Taula 5.9. Protocol d'eliminació del grup Fmoc.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	20%piperidina en DMF	Pre-tractament	1	1 min
3	20%piperidina en DMF	desprotecció	2	10 min
4	DMF	rentat	5	30 s
5	DCM	rentat	5	30 s

Quantificació del grup Fmoc

Es tracta una petitat part, o bé la totalitat de la peptidil-resina amb una de les mescles descrites a l'apartat anterior per a eliminar el grup Fmoc. Es recullen els filtrats en un matràs aforat. S'enrassa fins volum indicat amb DCM, i es fan les dilucions adients de manera que la absorbància teòrica sigui entre 0.5 i 1. Paral·lelament es prepara un blanc en les mateixes condicions que la mostra.

Es mesura l'absorbància a 301 nm i es calcula la funcionalització aplicant la fòrmula següent:

$F= A \cdot X / \varepsilon \cdot l \cdot p$

on

A: absorbància

X: factor de dilucio (volum final dilució x volum inicial de la solució mare/aliquota que se'n treu per a fer la dilució), mL

ε: coeficient d'absorció molar = 7800 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

p: pes de resina (g)

l: longitud de la cubeta (cm)

F: funcionalització de la resina (mmol/g)

Ciclació del pèptid per formació d'un pont disulfur.

Per a la ciclació dels pèptids s'han utilitzat dos mètodes. S'han fet proves amb 10 mg de peptidil resina, i s'ha fet el tractament final amb el que ha donat millor resultat.

Oxidació amb iode

Es dissolen 4 eq. de iode en DMF:anisol (95:5) i la solució s'addiciona sobre la peptidil-resina. Es deixa reaccionar 2 hores a temperatura ambient. Seguidament es renta amb DMF fins a la total eliminació del iode (fins que la DMF de rentar sigui transparent).

Taula 5.10. Protocol d'eliminació del grup Fmoc.

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	I_2 (4 eq) en DMF:anisol (95:5)	Oxidació	1	2 h
3	DMF	rentat	5	30 s

Oxidació amb tal·li

Es dissolen 2.4 eq. de TlTf3 en DMF:anisol (95:5) i la solució s'addiciona sobre la peptidil-resina. Es deixa reaccionar 2 hores a temperatura ambient. Seguidament es renta amb DMF (8x5mL), i a continuació es renta amb una solució de dietilditiocarbamat de sodi 0.5M en DMF per a elimminar el tal·li. Finalment es renta amb DMF 8x5mL.

Taula 5.11. Protocol per a realitzar la oxidació amb $Tl(CF_3COO)_3$

Etapa	Reactiu	Operació	Tractaments	Temps
1	DMF	rentat	5	30 s
2	$TlTf_3$ (2.4eq) en DMF:anisol (95:5)	Oxidació	1	2h
3	DMF	rentat	5	30 s
4	Dietilditiocarbamat de sodi en DMF	rentat	2	5 min
5	DMF	rentat	5	30 s
6	DCM	rentat	5	30 s

Escissió del pèptid de la resina

S'han utilitzat diferents mètodes per a alliberar el pèptid de la resina, segons el tipus d'enllaç existent entre el pèptid i el suport polimèric:

Acidolisi en condicions estàndard

Es disposa la resina en una xeringa provista de filtre. A continuació s'afegeix la mescla d'acidòlisi TFA:TIS:H2O (95:3:2, v/v/v). Es deixa a temperatura ambient durant 90 minuts amb agitació manual esporàdica. Es filtra i s'evapora el dissolvent del filtrat amb corrent de N2. Es fa precipitar el pèptid amb Et_2O sec i per decantació s'elimina el dissolvent (3 vegades).

En alguns casos s'ha substutuït el triisopropilsilà, TIS, per trietilsilà, TES.

Acidòlisi en condicions enèrgiques

A) Es disposa la resina en un vial de vidre i s'hi afegeix la mescla d'acidòlisi TFA:TMSCl:TES (69,25:25,57:5; v/v/v). Es deixa reaccionar 2h a 35 ºC amb agitació manual esporàdica. Es filtra i s'evapora el dissolvent del filtrat amb corrent de N2. Es fa precipitar el pèptid amb Et2O sec i per decantació s'elimina el dissolvent (3 vegades).

B) Es disposa la resina en un vial de vidre i s'hi afegeix la mescla d'acidòlisi TFA:TMSCl:TES:HBr (33% en AcOH) (64.1:25:8.5:5, v/v/v/v). Es deixa reaccionar 2h a 35 ºC amb agitació manual esporàdica. Es filtra i s'evapora el dissolvent del filtrat amb corrent de N2. Es fa precipitar el pèptid amb Et2O sec i per decantació s'elimina el dissolvent (3 vegades).

C) Es disposa la resina en un vial de vidre i s'hi afegeix la mescla d'acidòlisi TFA:HBr:Tioanisole (90:5:5,v:v:v). Es deixa reaccionar 2h a 35 ºC amb agitació manual esporàdica. Es filtra i s'evapora el dissolvent del filtrat amb corrent de N2. Es fa precipitar el pèptid amb Et2O sec i per decantació s'elimina el dissolvent (3 vegades).

En alguns casos es va utilitzar anisole per substituir el tioanisole.

Aminòlisis: espermina o octilamina

En els pèptids ens els que s'ha utilitzat el linker de tipus fenòlic, l'alliberament del pèptid es du aterme per atac nucleòfil amb l'amina escollida (espermina o

octilamina). Es dissol l'amina en qüestió en la mínima quantitat de DMF i s'addiciona sobre la peptidil-resina. Es deixa reaccionar 12hores amb agitació orbital. Seguidament es filtra, i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequetat i es realitzen coevaporacions amb acetonitril fins a obtenir un sòlid blanc.

En el cas de l'octilamina, en ser una amina volàtil es poden utilitzar excessos, 5 o 10 equivalents. Per a l'espermina, en ser un sòlid, s'ajusten més les quantitats, i amb 1.5 equivalents ja s'obté un desancorament quantitatiu.

Purificació dels pèptids

Els crus peptídics es purifiquen per cromatografia líquida d'alta eficàcia a escala semipreparativa, en unes condicions cromatogràfiques prèviament optimitzades a escala analítica. Una vegada purificat i es localitzen les fraccions pures, analitzant-les per HPLC i MALDI-TOF, es junten, i es liofilitzen.

5.1.7 Avaluació de l'activitat biològica: determinació de la concentració mínima inhibitòria (CMI)

En plaques estèrils de 96 pouets (Stero-Wel microtiter-plates, Sterilin) es disposen alíquotes de 200 μL de dilució de pèptid (preparades segons el mètode de les dilucions seriades)[191] -a cada columna una dilució diferent- i a continuació s'afegeixen 10μL d'una suspensió de bacteris ajustada a McFarland 0.5, per a obtenir una concentració final de 10^5 unitats formadores de colònies·mL $^{-1}$ (UFC/mL) en medi de cultiu Mueller Hinton. Es preparen 2 plaques per a cada pèptid que es vol assajar.

La inhibició del creixement bacterià es va determinar *de visu* després d'una incubació a 37ºC durant 18-20 hores. L'activitat antibacteriana s'expressa com CMI (concentració mínima inhibitòria), concentració a la qual no es detecta creixement després de les 18-20 hores d'incubació. Es va comparar l'activitat antibiòtica dels pèptids sintètics amb l'activitat de la Polimixina B comercial

Els microorganismes que es van utilitzar van ser: Gram negatius: Salmonella tiphymurium ATCC 14028, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Escherichia coli ATCC 8739. Gram positius: Enterococcus hirae ATCC 10541, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Micrococcus luteus ATCC 9341, Mycobacterium phlei ATCC 41423.

Manteniment dels microorganismes i preparació de l'inòcul:

Les soques, que es mantenen congelades en crioboles a -80ºC (EAS laboratoire), es recuperen sembrant-les sobre Trypticase Soy Broth, TSB, incubant-los a 37ºC fins observar creixement bacterià. A continuació, es sembren en Tryptcase Soy Agar, TSA (s'incuben a 37ºC fins observar la formació de colònies. El dia anterior a la realització de l'assaig es sembren els microorganismes en medi MH, i el dia de l'assaig es fa una resembra també en medi MH per a obtenir un cultiu en fase de creixement exponencial, el qual s'ajusta a McFarland 0.5 per a poder-lo inocular.

Preparació de les dilucions seriades dels pèptids: Es preparar una dissolució inicial de pèptid en aigua (636 mg/mlL), prèviament quantificada per anàlisi d'aminoàcids, i es preparen dilucions seriades d'aquest, de manera que cada concentració sigui la meitat de l'anterior (figura XX). A continuació es traspassen a tubs de vidre Pyrex que contenen 5ml de medi MH estèril de manera que la concentració final sigui 32, 16, 8,....fins a 0.0625 μg/mL.

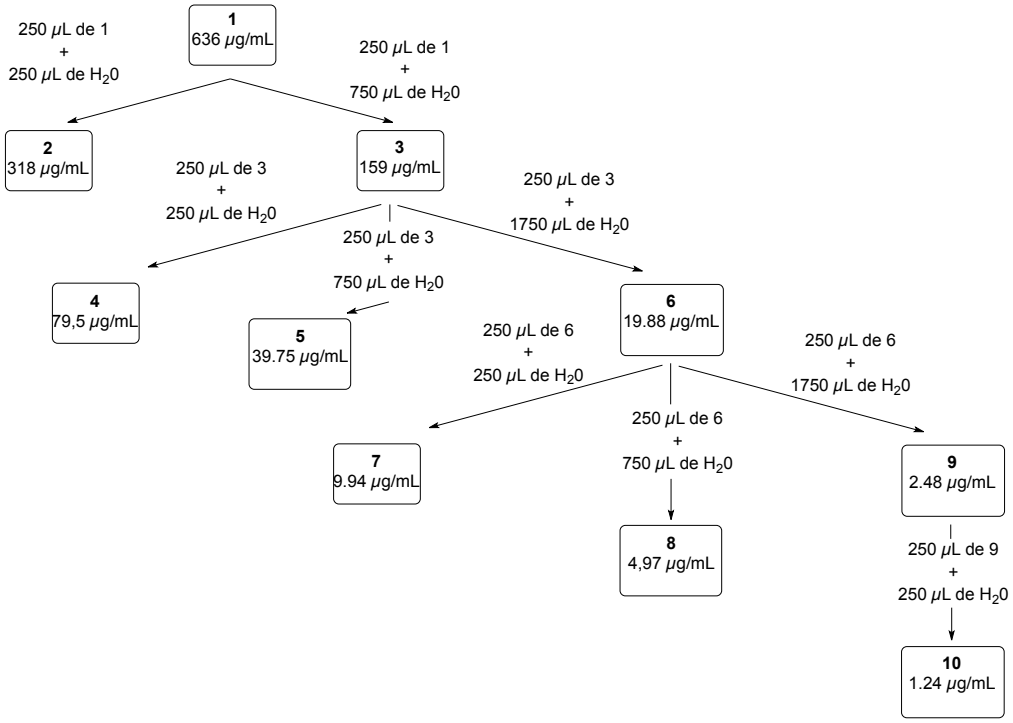


Figura 5.1. Arbre de dilucions dels pèptids en aigua. La solució mare, 1, es quantifica prèviament per anàlisi d'aminoàcids.

Preparació del medi de cultiu: El medi de cultiu es prepara segons les indicacions del proveidor (en aquest cas 21.5 g/L) i es disposa en tubs de vidre Pyrex de

14*110 mm i s'esterilitza en autoclau (15 min a 120ºC i 1 atmosfera de pressió).

Es preparen 10 tubs per a cada pèptid, 7 tubs per als microorganismes, i uns 10-15 tubs en excés, per si fan falta.

5.1.8 Estudi biofísic

5.1.8.1. Preparació del tampó TRIS, 1M pH8.0

En tota aquesta sèrie d'experiments biofísics, es treballa amb tampó TRIS. Es dissolen 121.1mg en H_2O milliQ, ajustant el pH si és necessari a 8.0. Es trasvassa la dissolució a un matràs aforat d'1L, s'enrassa amb aigua milli-Q i es filtra la dissolució al buit amb un filtre de membrana de 0,22 μm. A partir daquesta solució mare es prepara el tampó 10mM agafant una alíquota de 5mL i es porta a un volum de 500mL. Es filtra la nova solució de la mateixa manera.

Per preparar la solució tampó TRIS 50mM s'agafa una alíquota de 25 mL de la solució tampó 1M i es porta a un volum de 500mL. Es filtra novament amb al buit a través d'un filtre de membrana de 0,22 μm.

5.1.8.2. Preparació dels liposomes

Preparació dels liposomes de POPG

Es pesa i es resuspèn el POPG amb la quantitat corresponent de tampó TRIS 10mM pH8 per a obtenir una concentració de 10mM. Es sonica en un bany d'ultrasons d'alta potencia seguint el cicle 2min sonicació+2min repòs, repetint aquest procés 4 vegades. Després de l'última tanda de sonicació es deixen reposar els liposomes un mínim de 10 minuts abans de la seva utilització. La solució ha de ser transparent.

Preparació dels liposomes POPG-30%PyPG

Es preparen separadament dissolucions d'ambdós lípids, POPG i PyPG en $CHCl_3$ (1mg/mL) i se n'agafen les alíquotes corresponents (135 μL POPG i 64.2 μL PyPG) per a preparar la barreja al 30% de PyPG, 0.25mM. S'evapora el $CHCl_3$ amb corrent de N_2 i es deixa unes hores en un dessecador per a assegurar la total eliminació del dissolvent. L'oli format s'hidrata amb 1mL de tampó TRIS 10mM, a pH8, i es sonica per a formar els liposomes, tal com s'ha descrit anteriorment, fins a obtenir una solució transparent.

Preparació dels liposomes POPG-2.5%NBD-PE

Es preparen separadament dissolucions d'ambdós lípids POPG i NBD-PE a una concentració d'1mg/mL i se n'agafen les alíquotes corresponents (75 μL POPG i 113.6 μL de NBD-PE) per a preparar la barreja al 2.5% de NBD-PE. S'evapora el $CHCl_3$ amb corrent de N_2 i es deixa unes hores en un dessecador per a assegurar la total eliminació del dissolvent. L'oli format s'hidrata amb 0.5 mL de tampó TRIS 10mM, a pH8, i es sonica per a formar els liposomes, tal com s'ha descrit anteriorment, fins a obtenir una solució transparent.

5.1.8.3. Determinació de l'agregació de vesícules per dispersió de la llum a 90º

El canvi en la terbolesa de la mostra es mesurar com el canvi en la llum dispersada a 90º, a una longitud d'ona de 360 nm. A una cubeta de quars (3 mL x 1 cm), termostatitzada a 25ºC i amb agitació constant, s'afegeixen 1.5mL de tampó TRIS 10mM pH8, i una alíquota (20μL) de la solució de liposomes POPG, prèviament preparada. A continuació es van afegint volums determinats del pèptid, d'una dissolució de concentració coneguda (0,5mM) ambuna xeringa Hamilton. Es va mesurant el canvi en la llum dispersada, a 90º, a mida que augmenta la concentració del pèptid.

Es representa la diferència d'intensitats (I-Io, essent Io i I les intensitats en absència i presència de pèptid respectivament), en funció de la relació molar entre el pèptid afegit i el lípid.

Paràmetres: λ excitació: 360 nm; λ emissió: 360 nm; sensibilitat: 600 V; resolució: 1 s; amplada de banda: 4 nm.

5.1.8.4. Determinació de la mescla de lípids entre membranes per fluorescència del pirè

A una cubeta de quars termostatitzada a 25ºC i amb agitació constant, s'afegeixen 1.5mL de tampó TRIS 10mM pH8, 5μL de la solució de liposomes 30%PyPG en POPG i 16μL de la solució de liposomes de POPG, prèviament preparades. A continuació es va afegint volums determinats d'una dissolució de concentració coneguda del pèptid, amb una xeringa Hamilton: d'1 en 1μL fins a 10μL, i a partir de 10, de 2 en 2μL. Un cop addicionat el pèptid, es deixa

estabilitzar la llectura durant 2 min i passat aquest temps es registra l'espectre d'emissió de fluorescència en el rang de 355 a 550 nm, anotant les fluorescències d'emissió del monòmer a 395nm i la fluorescència d'emissió de l'excímer a 480nm.

Es representa la diferència d'intensitats de fluorescència mesurades a 395 nm (F-Fo, essent Fo i F les fluorescències en absència i presència de pèptid respectivament), en funció de la relació molar entre el pèptid afegit i el lípid.

Paràmetres: λ excitació: 346 nm; λ emissió: 395 nm; sensibilitat: 650V; ressolució 1.0; espectre d'emissió: 355-550nm, velocitat d'escombratge 4nm/s.

5.1.8.5. Determinació de l'accessibilitat dels fosfolípids per fluorescencia en liposomes marcats amb el grup NBD

Preparació de la solució de ditionit de sodi

S'ha de preparar una dissolució de ditionit 1.44M en tampó carbonat 0.5M a pH11. En primer lloc es prepara el tampó pesant la quantitat necessària de Na_2CO_3, dissolent en H_2O milliQ, ajustant el pH si és necessari, i finalment filtrant la solució. S'ha de desgassar durant una bona estona amb bombolleig de corrent de N_2 just abans de la seva utliltzació.

La solució de ditionit es guarda en gel, i s'utilitza en l'hora següent a la seva preparació. És convenient tenir preparats diferent vials amb la quantitat ja pesada de ditionit (25 mg aprox.) i en el moment de la realització de l'experiment, es dissolen amb el tampó (100 μL aprox.)

Mesures de fluorescència

En una cubeta de quars termostatitzada a 25ºC i amb agitació magnètica constant, s'afegeixen 1.5mL de tampó TRIS 10mM pH8, prèviament desgassat per bombolleig amb corrent de N_2. A continuació s'afegeix una alíquota (1μL) de la solució de liposomes 2.5 %NBD-PE en POPG prèviament preparada, i tot seguit una alíquota de solució de pèptid (XμL) amb una xeribga Hamilton. Un cop tenim una lectura estable de fluorescència, s'afegeixen 10μL de la solució 1.44 M de ditionit i s'observa com la fluorescència disminueix fins a assolir un valor estable. En aquest moment s'afegeix un detergent, DOC 100μL o tritó 10uL, i s'observa que la fluorescència cau fins a valors propers a zero.

De la gràfica obtinguda on es representa la fluorescència en funció del temps, s'extreuen els valors de Io (intensitat de fluorescència inicial, en presència de pèptid), I (intensitat de fluorescència un cop s'han reduït els grups NBD accessibles per la presència del ditionit), i I_f (intensitat final, quan s'ha afegit el detergent).

Es realitza aquest assaig a diferents relacions molars peptid:lípid=0.05, 0.1 i 0.2).

Es representa el % de NBD que s'ha reduït per l'efecte del ditionit, per a cada concentració diferent).

$$\%NBD\text{-}PE = \left[1 - \frac{F-F_t}{F_0-F_t} \right] \times 100$$

Paràmetres: λ excitació: 460 nm; λ emissió: 535 nm; sensibilitat: 720-750V *; resolució:1; amplada de banda: 4nm.

* la senyal augmenta considerablement en afegir el pèptid, de manera que s'ha d'ajustar el voltatge per a que no se surti d'escala, reduint-lo fins i tot en alguns casos. És recomenable fer cada sèrie d'experiments de les tres concentracions diferents amb el mateix voltatge.

5.1.8.6. Cinètiques d'inserció dels pèptids en monocapes de lps

En primer lloc s'han de rentar la cubeta cilíndrica de tefló, la làmina de Wilhemy de platí, i el nucli magnètic amb aigua milliQ calenta (>75ºC) per a evitar contaminacions amb restes de lipid i/o pèptid.

S'omple la cubeta cilíndrica de tefló (Ø:5 cm, A:19,6 cm^2) amb 30 mL de tampó TRIS 10mM pH8, i s'hi col·loca la làmina de platí de manera que quedi submergit 1/3 de la làmina en el tampó. S'ha d'observar la formació d'un menisc quan el líquid entra en contacte amb la làmina.

A continuació es diposita la monocapa de LPS: es prepara una dissolució del lípid LPS en $CHCl_3$:MeOH (9:1) (1mg/mL) i s'hi afegeix, amb agitació constant, gota a gota a la superfície del TRIS fins assolir la pressió superficial desitjada 32mN/m.

Un cop la lectura de pressió és estable, s'afegeix per l'orifici lateral, amb una xeringa Hamilton, i sense provocar cap distorsió en el sistema, una alíquota de solució de pèptid (30μL de concentració 0.05mM). S'enregistra la variació

(augment) de la pressió superficial amb el temps.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Síntesi d'anàlegs per substitució de polimixina (anàlegs 1-5)

La síntesi d'aquests pèptids s'ha realitzat de forma manual, amb un esquema de protecció Fmoc/^{t}Bu. S'ha treballat amb la resina MBHA de funcionalització 0.98 mmol/g, acoblant directament sobre ella el primer aminoàcid Fmoc-Cys(Acm)-OH. Els aminoàcids de la seqüència es van introduir seguint el protocol descrit a la taula 5.8 de materials i mètodes(apartat 5.1.3.3), utilitzant HOBt i DIPCDI. L'eficiència dels acoblaments es va comprovar mitjançant un test de ninhidrina despres de cada acoblament. En cas que fos necessari es repeteix l'acoblament. Després de l'elongació de la cadena peptídica, s'elimina el grup Fmoc amb una solució al 20% de piperidina en DMF (taula 5.9). A continuació es realitza la ciclació del pèptid en resina. Es fan proves a petita escala per observar quin mètode funciona millor i proporciona un cru de major puresa, i a continuació es realitza l'oxidació de tota la peptidil-resina. (taules 5.10 i 5.11). Per finalitzar, es realitza el tractament acidolític per a alliberar el pèptid de la resina, i eliminar els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids segons es descriu a les taules El protocol específic aplicat a cada pèptid es descriu en l'apartat corresponent a cada producte.

S'analitza el cru per HPLC i espectrometria de masses MALDI-TOF, i finalment es purifica per HPLC a escala semi-preparativa i es liofilitzen les fraccions més pures.

Síntesi de l'anàleg 1, sp-B: nonanoïl-Dab-Thr-Dab-*cyclo*(*S*-*S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Cys]

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Dap(Boc)-OH.

Resina inicial: 114 mg, f= 0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació $Tl(CF_3COO)_3$, 2.4 eq en DMF:anisol (95:5, 4mL)

Acidòlisi: TFA:TMSCl:TES:HBr (33% en AcOH) (64.1:25:8.5:5, v/v/v/v)

MW= 1194.63 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 133 mg de producte cru (rendiment de desancoratge 95%, puresa cru peptídic 80%)

Rendiment global: 17 %, 24 mg de producte purificat

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 20-35 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >95 %.

RP-HPLC (t_R)= 20.6 min (gradient lineal del 20 al 35 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Thr 1.05 (1), Leu: 1.09 (1), Phe: 1.27 (1), Thr: 1.1 (1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1223,94, $[M+Na]^+$= 1245.93; $[M+K]^+$=1261.90

Síntesi de l'anàleg 2, sp-2Arg: nonanoïl-Arg-Thr-Dab-cyclo(S-S)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg-Dab-Cys]

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 144 mg MBHA, f=0.98 mmol/g,

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb $Tl(CF_3COO)_3$. 2.4 eq en DMF:anisol (95:5, 4mL)

Acidòlisi: TFA:TMSCl:TES:HBr (33% en AcOH) (64.1:25:8.5:5, v/v/v/v)

MW= 1334.74 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 208 mg de producte cru (rendiment desancoratge 100%), pèptid pur 32mg

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 20-35 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Rendiment global: 15 %.

Puresa: >90 %.

RP-HPLC (t_R)= 22,5 min (gradient lineal del 20 a 35 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Thr 1.18 (1), Leu: 1.02 (1), Phe: 1.16 (1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1336.01, $[M+Na]^+$=1358.00; $[M+K]^+$= 1373.98

Síntesi anàleg 3: sp-2Dap, nonanoil-Dap-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Dap-Dab-Cys]

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Dap(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 200 mg MBHA, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb $Tl(CF_3COO)_3$, 2.4 eq en DMF:anisol (95:5, 4mL)

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1194.63 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 335,8 mg de producte cru (rendiment desancoratge: quantitatiu, puresa cru 85%), 54,5 mg de producte purificat

Rendiment global: 23 %.

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 24-34 % de B durant 30 min a un

flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 21.6 min (gradient lineal de 20 a 35 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Leu: 1.01 (1), Phe: 0.98 (1), Thr: 1.01 (1).

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1196.27, $[M+Na]^+$=1218.41; $[M+K]^+$= 1234.35

ESI (10V) m/z: $[M+2]^+/2$ = 598.53, $[M+3]^+/3$ = 399.29, $[M+4]^+/4$ = 299.71

Síntesi anàleg 4, sp-2His : nonanoil-His-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-His-Dab-Cys]

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 200 mg MBHA, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb $Tl(CF_3COO)_3$, 2.4 eq en DMF:anisol (95:5, 4mL)

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1296.65 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 305 mg de producte cru (rendiment desancoratge: quantitatiu, puresa 75%), 49 mg de producte purificat

Rendiment global: 18 %.

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 23-32 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 19.08 min (gradient lineal de 22 a 32 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: His: 1.95 (2), Leu: 1.10 (1), Phe:

1.0 (1), Thr: 0.95(1).

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1297.59, $[M+Na]^+$=1319.57; $[M+K]^+$= 1335.49

ESI (10V) m/z: $[M+2]^+/2$ = 649.58, $[M+3]^+/3$ = 433.35, $[M+4]^+/4$ = 325.25

Síntesi anàleg 5, sp-2Asn : nonanoil-Asn-Thr-Dab-*cyclo*(*S-S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Asn-Dab-Cys]

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 200 mg MBHA, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb $Tl(CF_3COO)_3$, 2.4 eq en DMF:anisol (95:5, 4mL)

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1250.62 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 278 mg de producte cru (rendiment desancoratge: quantitatiu, puresa: 64%) , 25 mg de producte purificat

Rendiment global: 10 %.

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 28-35 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >95 %.

RP-HPLC (t_R)= 19.1 min (gradient lineal de 26 a 36 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Asn: 2.02 (2), Leu: 1.06 (1), Phe: 0.95 (1), Thr:0.97(1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$= 1251.66, $[M+Na]^+$=1273.64; $[M+K]^+$= 1289.0

ESI (10V) m/z: $[M+2]^+/2$ = 626.55, $[M+3]^+/3$ = 417.93

Síntesi de l'anàleg 6, sp-2Arg(NO_2): nonanoil-Arg(NO_2)-Thr-Dab-*cyclo*(*S*-*S*)[Cys-Dab-DPhe-Leu-Arg(NO_2)-Dab-Cys]

Aquest anàleg. Com ja s'ha comentat en l'apartat de resultats i discussió, es va realitzar seguint un protocol diferent ja que va ser dels que es van sintetitzar al principi del projecte. Es va dur a terme la síntesis seguint una estratègia Fmoc/tBu, sobre una resina MBHA a la que se lo incorporava l'espaiador bifuncional de tipus Rink. Es va sintetitzar la seqüència peptídica de manera estàndard, realitzant els acoblaments amb HOBt i DICPDI, i seguint l'eficàcia de les reaccions d'acoblament mitjançant el test de ninhidrina.

Un cop finalitzada la seqüència peptídica, s'elimina el grup Fmoc i s'acobla l'àcid nonanoic.

Es va realitzar la ciclació en resina per oxidació amb iode, i es va a dur una acidòlisi estàndard per a escindir el pèptid de la resina i eliminar els grups protectors de les cadenes laterals. Es va evaporar la mescla acidolítica amb corrent de nitrogen, i l'oli resultant es va fer precipitar amb èter etílic sec. El peèptid resultant es va analitzar per HPLC i EM, i posteriorment es va purificar i lioiflitzar.

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(NO_2)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 209 mg MBHA, f=0.98 mmol/g, a la qual se li incorpora el grup espaiador bifuncional Rink, seguint el protocol d'acoblament estàndard d'aminoàcids

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb iode, 4eq en DMF

Acidòlisi: TFA:TES:H_2O (95:3:2, v:v:v)

MW= 1424.71 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 245 mg de producte cru (rendiment desancoratge: 84%, puresa 85%), 64 mg pèptid pur

Rendiment global: 22 %.

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 25-35 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 14.8 min (gradient lineal del 10 al 50 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Leu: 1.02 (1), Phe: 1.01 (1), Thr 0.97 (1)

ESI+: m/z 476.5 $[M+3H]^{3+}$ /3; m/z 714.0 $[M+2H]^{2+}$ /2

Síntesi d'anàlegs retroenantiòmers de polimixina: atac nucleòfil amb octilamina

La síntesi d'aquests pèptids s'ha realitzat de forma manual, amb un esquema de protecció Boc/Bzl, emprant el protocol de PyBOP amb neutralització in situ, sobre la resina MBHA de funcionalització 0.98 mmol/g. En primer lloc es realitza l'acoblament d'un aminoàcid de referència, Fmoc-Gly-OH, protocol 6.4.4.2. S'elimina el grup protector Fmoc per tractament amb 20% de piperidina en DMF (taula 5.9) i sobre aquest s'incorpora el grup espaiador bifuncional, l'àcid 3-(4-hidroxifenil)propiònic. A continuació s'hi acobla mitjançant un enllaç ester el primer aminoàcid, Boc-D-Arg (Z_2)-OH, segons el protocol descrit a la taula 5.3. Seguidament s'incorporen tots els aminoàcids de la seqüència peptídica.

Es cicla el pèptid per formació de l'enllaç disulfur seguint el protocol 5.10. i seguidament el tractament d'aminòlisi amb l'octilamina per a escindir el pèptid de la resina. Per acabar es realitza el tractament acidolític per eliminar els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids en TFA:HBr(33% en AcOH) durant 3 hores a 35ºC.

S'analitza el cru per HPLC i espectrometria de masses MALDI-TOF, i finalment es purifica i es liofilitzen les fraccions mes pures.

Síntesi de l'anàleg 7, retro-sP-B: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DThr-DDab-octilamida pel mètode 1

Síntesi

Aminoàcids protegits: Boc-DCys(Acm)-OH, Boc-DDab(Z)-OH, Boc-DLeu-OH, Boc-Phe-OH, Boc-DThr(Bzl)-OH. Fmoc-Gly-OH com a aminoàcid de referència.

Resina inicial: 200 mg, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb iode, 4eq en DMF

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1194.67 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 190 mg de cru (rendiment desancoratge: 60%, puresa 50%), 8 mg de producte purificat

Rendiment global: 3.3 %

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 20-35 % de B durant 30 min a un flux de 3mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >95 %.

RP-HPLC (t_R)= 13.4 min (gradient lineal del 20 al 60 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Leu: 1.02 (1), Phe: 1.05 (1), Thr: 0.97 (1).

MALDI-TOF: $[M+H]^+$= 1195,58, $[M+Na]^+$=1217.60

Síntesi de l'anàleg 8, sPB-retroenantio 2ARG: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe-DDab-DCys]-DThr- DArg- octilamida pel mètode 1

Síntesi

Aminoàcids protegits: Boc-D-Arg(Z_2)-OH, Boc-D-Cys(Acm)-OH, Boc-D-Dab(Z)-OH, Boc-D-Leu-OH, Boc-Phe-OH, Boc-DThr(Bzl)-OH. Fmoc-Gly-OH com a aminoàcid de referència.

Resina inicial: 200 mg, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb tal·li,

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1306.74 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 90 mg de cru (rendiment desancoratge: 50%, puresa: 40%), 10 mg de producte purificat

Rendiment global: 3%

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 22-30 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 22.3 min (gradient lineal del 20 al 50 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Arg: 2.09 (2), Leu: 0.91 (1), Phe: 0.96 (1), Thr:1.04(1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1308.15, $[M+Na]^+$=1330,14

Síntesi d'anàlegs retroenantiòmers de polimixina: síntesi sobre bal linker i resina am.

La síntesi d'aquests pèptids s'ha realitzat de forma manual, amb un esquema de protecció Fmoc/^{t}Bu. S'ha treballat amb la resina aminometil, a la qual se li ha incorporat l'espaiador funcional BAL linker sobre el qual, per aminació reductiva, s'hi acobla l'octilamina (protocols descrits en l'apartat 5.1.3.4).

A continuació es procedeix a la incorporació del primer aminoàcid i es verifica la funcionalització de la peptidil-resina per quantificació del grup Fmoc alliberat després del tractament amb piperidina. Després de l'elongació de la cadena peptídica , s'ha realitzat la ciclació del pèptid per formació de l'enllaç disulfur seguint el protocol i finalment, per acidòlisi amb TFA:TIS:H_2O, protocol, s'obté el cru peptídic que s'analitza per HPLC i espectrometria de masses MALDI-TOF. Posteriorment es purifica, i es liofilitza.

Síntesi de l'anàleg 7, retro sP-B: *cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DDab-DLeu-Phe-DDab-DCys] DThr- DDab- octilamida pel mètode 2

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-D-Cys(Acm)-OH, Fmoc-D-Dab(Boc)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Thr(tBu)-OH.

Resina inicial: 216 mg, f=0.88 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb iode, 4eq en DMF:anisol (95:5).

Acidòlisi: TFA:TIS:H_2O (95:3:2, v:v:v)

MW= 1194.67 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 52 mg de producte cru (rendiment desancoratge: 34% puresa 40%), 7,7 mg de producte purificat

Rendiment global: 5 %.

Condiciones de purificació: gradient lineal de 25-35 % de B durant 35 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 11.9 min (gradient lineal de 25 a 35 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Leu: 0.98 (1), Phe:1.06 (1), Thr: 0.96 (1).

ESI m/z: $[M+2]^+/2$ = 598.53, $[M+3]^+/3$ = 399.42, $[M+4]^+/4$ = 299.77

Síntesi de l'anàleg 8, retro sP-*2Arg: cyclo*(*S-S*)[DCys-DDab-DArg-DLeu-Phe-DDab-DCys] DThr- DArg- octilamida pel mètode 2

Síntesi

Aminoàcids protegits: Fmoc-DArg(Pbf)-OH, Fmoc-DCys(Acm)-OH, Fmoc-DDab(Boc)-OH, Fmoc-DArg(Pbf)-OH, Fmoc-DLeu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-DThr(tBu)-OH.

Resina inicial: 216 mg, f=0.88 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb iode

Acidòlisi: : TFA:TIS:H_2O (95:3:2, v:v:v)

MW= 1306.74 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 32 mg de producte cru (rendiment desancoratge: 28% puresa 50%), 6 mg de producte purificat

Rendiment global: 4 %.

Condiciones de purificació: gradient lineal de 23-33 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 14.26 min (gradient lineal de 25 a 35 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Arg+Thr: 3.06 (3), Leu: 0.98 (1), Phe: 0.96 (1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$= 1307.74

Síntesi de l'anàleg 9, conjugat de polimixina i espermina, sP-2Arg-G-espermida

La síntesi d'aquest pèptid s'ha realitzat de la mateixa manera que els anàlegs retroenantio de la PxB1, descrits anteriorment, utilitzant en aquest cas els aminoàcids natural, L, excepte la fenilalanina. L'aminòlisi en aquest cas s'ha realitzat amb 1.5 equivalents d'espermina.

Síntesi

Aminoàcids protegits: Boc-Arg(Z_2)-OH, Boc-Cys(Acm)-OH, Boc-Dab(Z)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-D-Phe-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH i Boc-Gly-OH. Fmoc-Ala-OH com a aminoàcid de referència.

Resina inicial: 113 mg, f=0.98 mmol/g

Formació enllaç disulfur en resina: oxidació amb iode, 4eq en DMF

Acidòlisi: TFA:HBr:anisol (90:5:5, v:v:v)

MW= 1576.96 g/mol

Resultats

Quantitat obtinguda: 191 mg de producte cru (rendiment síntesis: quantitatiu, puresa 50%), 7 mg de producte purificat

Rendiment global: 4%

Condiciones de purificació: Gradient lineal de 22-32 % de B durant 30 min a un flux de 3 mL/min; detecció por UV a 220 nm.

Puresa: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 15.25 min (gradient lineal del 20 al 50 % de B en 30 min; flux 1 mL/min; detecció por UV a 220 nm).

Anàlisis de aminoàcids [experimental (calculat)]: Arg+Thr: 2.98 (3), Gly: 1.06 (1), Leu: 1.01 (1), Phe:0.95 (1), Ala: 0.94 (1)

MALDI-TOF: $[M+H]^+$=1577.92, $[M+Na]^+$=1599.86

6. BIBLIOGRAFIA

1. Straus, S. K. & Hancock, R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1758, 1215–1223 (2006).

2. Lopez-Otin, C. & Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. Nat Rev Cancer 7, 800–808 (2007).

3. Uhlig, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. EuPA Open Proteomics 4, 58–69 (2014).

4. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154 (1963).

5. Peptide Therapeutics Market- Global Industry Analysis, Size, Growth and Forecast 2014 - 2020. at <http://www.transparencymarketresearch.com/peptide-therapeutics-market.html>

6. Kaspar, A. A. & Reichert, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. Drug Discov. Today 18, 807–17 (2013).

7. da Costa, J. P., Cova, M., Ferreira, R. & Vitorino, R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2023–2040 (2015).

8. Butler, M. S., Blaskovich, M. A. & Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. J Antibiot 66, 571–591 (2013).

9. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. Nat. Rev. Drug Discov. 11, 37–51 (2011).

10. Hancock, R. E. W. & Sahl, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol. 24, 1551–7 (2006).

11. Waksman, S. A. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? Mycologia 39, 565–569 CR – Copyright © 1947 Mycological So (1947).

12. Van Epps, H. L. René Dubos: unearthing antibiotics. J. Exp. Med. 203, 259 (2006).

13. HODGKIN, D. C. The X-ray analysis of the structure of penicillin. Adv. Sci. 6, 85–9 (1949).

14. Levy, S. B. The Antibiotic Paradox. (2002). at <https://books.google.com/books?hl=ca&lr=&id=4-ZPn3tteZsC&pgis=1>

15. Fauci, A. S. Infectious diseases: considerations for the 21st century. Clin. Infect. Dis. 32, 675–85 (2001).

16. Morel, C. M. & Mossialos, E. Stoking the antibiotic pipeline. BMJ 340, (2010).

17. Spellberg, B. et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. Clin. Infect. Dis. 52 Suppl 5, S397–428

(2011).

18. Mossialos, E. et al. Policies and Incentives for Promoting Innovation in Antibiotic Research. (2009). at <http://www.lse.ac.uk/LSEHealthAndSocialCare/impacts/LSEHealthNews/News Attachments/Policies and incentives report.pdf.>
19. CDC, C. for D. C. and P. Threat report 2013. (2014). at <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>
20. Smith, R. & Coast, J. The true cost of antimicrobial resistance. BMJ 346, f1493 (2013).
21. Walsh, C. T. & Wencewicz, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. J Antibiot 67, 7–22 (2014).
22. Worlg Health Organization. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. at <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
23. Woolhouse, M. & Farrar, J. An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. Nature 509, (2014).
24. A three-step plan for antibiotics. Nature 509, 533–533 (2014).
25. Boucher, H. W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 48 , 1–12 (2009).
26. Rice, L. B. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. Clin. Infect. Dis. 43 Suppl 2, S100–5 (2006).
27. Boucher, H. W. et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 56 , 1685–1694 (2013).
28. Reardon, S. Antibiotic resistance sweeping developing world. Nature 509, 141–142 (2014).
29. Rex, J. H. ND4BB: addressing the antimicrobial resistance crisis. Nat. Rev. Microbiol. 12, 231–232 (2014).
30. Fox, J. L. Antimicrobial peptides stage a comeback. Nat. Biotechnol. 31, 379–382 (2013).
31. Afacan, N., Janot, L. & Hancock, R. W. in Antimicrobial Peptides and Innate Immunity SE - 13 (eds. Hiemstra, P. S. & Zaat, S. A. J.) 321–358 (Springer Basel, 2013). doi:10.1007/978-3-0348-0541-4_13
32. Brown, K. L. & Hancock, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Curr. Opin. Immunol. 18, 24–30 (2006).
33. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389–395 (2002).
34. Schauber, J. & Gallo, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. J. Allergy Clin. Immunol. 122, 261–6 (2008).

35. Ma, Y. et al. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, Rana nigrovittata. Genomics 95, 66–71 (2010).

36. Brogden, K. a. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microbiol. 3, 238–250 (2005).

37. Debono, M. et al. Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: the synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). J. Antibiot. (Tokyo). 41, 1093–105 (1988).

38. Baltz, R. H., Miao, V. & Wrigley, S. K. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. Nat. Prod. Rep. 22, 717–41 (2005).

39. Schittek, B. et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. Nat. Immunol. 2, 1133–7 (2001).

40. Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S. & Kim, S. C. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 8245–50 (2000).

41. Kavanagh, K. & Dowd, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. J. Pharm. Pharmacol. 56, 285–9 (2004).

42. Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. 13, 61–92 (1995).

43. Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A. & Letellier, L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in Micrococcus luteus. J. Biol. Chem. 268, 19239–45 (1993).

44. Ganz, T. & Lehrer, R. I. Defensins. Pharmacol. Ther. 66, 191–205 (1995).

45. Mygind, P. H. et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature 437, 975–80 (2005).

46. Hancock, R. E. W., Brown, K. L. & Mookherjee, N. Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. Immunobiology 211, 315–322 (2006).

47. Hancock, R. E. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1317–23 (1999).

48. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 19, 491–511 (2006).

49. Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. 55, 27–55 (2003).

50. Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D. & Coulthard, K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 25, 11–25 (2005).

51. Li, J. et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet. Infect. Dis. 6, 589–601 (2006).

52. Poudyal, A. et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-

resistant Klebsiella pneumoniae. J. Antimicrob. Chemother. 62, 1311–8 (2008).

53. Li, J., Rayner, C. R. & Nation, R. L. Colistin-associated acute renal failure: revisited. South. Med. J. 98, 1229–30 (2005).

54. Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J. & Nation, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. J. Antimicrob. Chemother. 60, 1206–1215 (2007).

55. Hogardt, M., Schmoldt, S., Götzfried, M., Adler, K. & Heesemann, J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients. J. Antimicrob. Chemother. 54, 1057–1061 (2004).

56. Wisher, D. Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. J. Med. Libr. Assoc. 100, 75–76 (2012).

57. Gales, A. C., Reis, A. O., Jones, R. N. & Gales, a N. a C. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin : Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for P. 39, 183–190 (2001).

58. Conway, S. P. et al. Safety and Tolerability of Bolus Intravenous Colistin in Acute Respiratory Exacerbations in Adults with Cystic Fibrosis. Ann. Pharmacother. 34, 1238–1242 (2000).

59. Høiby, N., Frederiksen, B. & Pressler, T. Eradication of early Pseudomonas aeruginosa infection. J. Cyst. Fibros. 4 Suppl 2, 49–54 (2005).

60. Hancock, R. E. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends Microbiol. 5, 37–42 (1997).

61. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593–656 (2003).

62. Storm, D. R., Rosenthal, K. S. & Swanson, P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu. Rev. Biochem. 46, 723–63 (1977).

63. Nikaido, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 1831–6 (1989).

64. Coughlin, R. T., Tonsager, S. & McGroarty, E. J. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of Escherichia coli. Biochemistry 22, 2002–2007 (1983).

65. Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E. & Carson, J. Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOPLASMIC AND OUTER MEMBRANE. J. Biol. Chem. 247, 3962–3972 (1972).

66. Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J. B. Microbial Cell Walls and Membranes. (Springer Netherlands, 1980). doi:10.1007/978-94-011-6014-8

67. Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. & Krieg, N. R. Microbiology: Concepts and

Applications. (1993). at
<https://books.google.es/books/about/Microbiology.html?id=3x6dQgAACAAJ
&pgis=1>

68. Hancock, R. E. Peptide antibiotics. Lancet 349, 418–422 (1997).

69. Bruch, M. D., Cajal, Y., Koh, J. T. & Jain, M. K. Higher-Order Structure of Polymyxin B: The Functional Significance of Topological Flexibility. J. Am. Chem. Soc. 121, 11993–12004 (1999).

70. Deris, Z. Z. et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. J. Antibiot. (Tokyo). 67, 147–51 (2014).

71. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. Biochim. Biophys. Acta 1462, 55–70 (1999).

72. Cajal, Y., Berg, O. G. & Jain, M. K. Direct vesicle-vesicle exchange of phospholipids mediated by polymyxin B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 210, 746–52 (1995).

73. Cajal, Y., Rogers, J., Berg, O. G. & Jain, M. K. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. Biochemistry 35, 299–308 (1996).

74. Cajal, Y., Ghanta, J., Easwaran, K., Surolia, A. & Jain, M. K. Specificity for the exchange of phospholipids through polymyxin B mediated intermembrane molecular contacts. Biochemistry 35, 5684–95 (1996).

75. Velkov, T. et al. Teaching ‘old’ polymyxins new tricks: new-generation lipopeptides targeting gram-negative ‘superbugs’. ACS Chem. Biol. 9, 1172–7 (2014).

76. Pristovsek, P. & Kidric, J. The search for molecular determinants of LPS inhibition by proteins and peptides. Curr. Top. Med. Chem. 4, 1185–201 (2004).

77. Pristovsek, P. & Kidric, J. Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. J. Med. Chem. 42, 4604–13 (1999).

78. Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L. & Li, J. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. J. Med. Chem. 53, 1898–1916 (2010).

79. Mares, J., Kumaran, S., Gobbo, M. & Zerbe, O. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. J. Biol. Chem. 284, 11498–506 (2009).

80. Bhattacharjya, S., David, S. A., Mathan, V. I. & Balaram, P. Polymyxin B nonapeptide: Conformations in water and in the lipopolysaccharide-bound state determined by two-dimensional NMR and molecular dynamics. Biopolymers 41, 251–265 (1997).

81. Berglund, N. A. et al. Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1

with both membranes of E. coli: a molecular dynamics study. PLoS Comput. Biol. 11, e1004180 (2015).

82. Vogler, K., Studer, R. O., Lanz, P., Lergier, W. & Böhni, E. Total synthesis of the antibiotic polymyxin B-1. Experientia 20, 365–6 (1964).

83. Vogler, K., Studer, R. O., Lanz, P., Lergier, W. & Böhni, E. [Syntheses in the polymyxin series. 9. Synthesis of polymyxin B-1]. Helv. Chim. Acta 48, 1161–77 (1965).

84. VOGLER, K., STUDER, R. O., LANZ, P., LERGIER, W. & BOHNI, E. Total synthesis of two cyclodecapeptides exerting polymyxin-like activity. Experientia 17, 223–4 (1961).

85. Studer, R. O., Lergier, W. & Vogler, K. [Syntheses in the polymyxin series. 11. Synthesis of circulin A]. Helv. Chim. Acta 49, 974–85 (1966).

86. Vogler, K. & Studer, R. O. The chemistry of the polymyxin antibiotics. Experientia 22, 345–54 (1966).

87. Yamada, K., Urakawa, H., Oku, H. & Katakai, R. Facile synthesis of Nalpha-protected-L-alpha,gamma-diaminobutyric acids mediated by polymer-supported hypervalent iodine reagent in water. J. Pept. Res. 64, 43–50 (2004).

88. Sharma, S. K. et al. Solid-phase total synthesis of polymyxin B1. J. Pept. Res. 53, 501–506 (1999).

89. de Visser, P. C. et al. Solid-phase synthesis of polymyxin B1 and analogues via a safety-catch approach. J. Pept. Res. 61, 298–306 (2003).

90. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. & Fridkin, M. Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria. J. Med. Chem. 43, 3085–92 (2000).

91. Kanazawa, K. et al. Contribution of each amino acid residue in polymyxin B(3) to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 57, 240–244 (2009).

92. Wang, S. S. p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. J. Am. Chem. Soc. 95, 1328–33 (1973).

93. Vaara, M. et al. Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3229–3236 (2008).

94. de Visser, P. C. et al. Solid-phase synthesis of polymyxin B1 and analogues via a safety-catch approach. J. Pept. Res. 61, 298–306 (2003).

95. Xu, W.-L. et al. A new strategy for total solid-phase synthesis of polymyxins. Tetrahedron Lett. 56, 4796–4799 (2015).

96. Rustici, a et al. Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. Science 259, 361–365 (1993).

97. Clausell, A., Rabanal, F., Garcia-Subirats, M., Alsina, M. a. & Cajal, Y.

Synthesis and membrane action of polymyxin B analogues. Luminescence 20, 117–123 (2005).

98. Clausell, A., Rabanal, F., Garcia-Subirats, M., Alsina, M. a. & Cajal, Y. Membrane association and contact formation by a synthetic analogue of polymyxin B and its fluorescent derivatives. J. Phys. Chem. B 110, 4465–4471 (2006).

99. BARNETT, M., BUSHBY, S. R. & WILKINSON, S. SODIUM SULPHOMETHYL DERIVATIVES OF POLYMYXINS. Br. J. Pharmacol. Chemother. 23, 552–74 (1964).

100. Srinivasa, B. R. & Ramachandran, L. K. Chemical modification of peptide antibiotics : Part VII--Biological activity of derivatives of polymyxin B. Indian J. Biochem. Biophys. 15, 54–8 (1978).

101. Teuber, M. Preparation of biologically active mono-N-acetyl (14C)-derivatives of the membrane-specific polypeptide antibiotic polymyxin B. Z. Naturforsch. B. 25, 117 (1970).

102. Witzke, N. M. & Heding, H. Broad-spectrum derivatives of polymyxin B and colistin. J. Antibiot. (Tokyo). 29, 1349–50 (1976).

103. Schindler, P. R. & Teuber, M. Action of polymyxin B on bacterial membranes: morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of Salmonella typhimurium and Escherichia coli B. Antimicrob. Agents Chemother. 8, 95–104 (1975).

104. Weinstein, J., Afonso, A., Moss, E. & Miller, G. H. Selective chemical modifications of polymyxin B. Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 3391–6 (1998).

105. Kurihara, T., Takeda, H. & Ito, H. [Studies on the compounds related to colistin. V. Synthesis and pharmacological activity of colistin analogues]. Yakugaku Zasshi 92, 129–34 (1972).

106. Porro, M. Synthetic peptides for detoxification of bacterial endotoxins and treatment of septic shock. PCT Int. Appl. 44 pp. (1993).

107. Porro, M. Peptides for neutralizing the toxicity of lipid A. PCT Int. Appl. 24 pp. (1995).

108. Porro, M. & Varra, M. Compositions containing an antibiotic and a peptide potentiating this antibiotic. PCT Int. Appl. 37 pp. (1996).

109. Vaara, M. & Vaara, T. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. Nature 303, 526–8.

110. Vaara, M. The outer membrane permeability-increasing action of linear analogues of polymyxin B nonapeptide. Drugs Exp. Clin. Res. 17, 437–43 (1991).

111. Elverdam, I., Larsen, P. & Lund, E. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 218, 653–61 (1981).

112. Orwa, J. A. et al. Isolation and structural characterization of polymyxin B

components. J. Chromatogr. A 912, 369–73 (2001).

113. Orwa, J. A. et al. Isolation and structural characterization of colistin components. J. Antibiot. (Tokyo). 54, 595–9 (2001).

114. Sakura, N. et al. The contribution of the N-terminal structure of polymyxin B peptides to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity. Bull. Chem. Soc. Jpn. 77, 1915–1924 (2004).

115. Okimura, K., Ohki, K., Sato, Y., Ohnishi, K. & Sakura, N. Semi-synthesis of polymyxin B (2-10) and colistin (2-10) analogs employing the Trichloroethoxycarbonyl (Troc) group for side chain protection of alpha,gamma-diaminobutyric acid residues. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 55, 1724–30 (2007).

116. Chihara, S., Ito, A., Yahata, M., Tobita, T. & Koyama, Y. Colistin nonapeptide derivatives. III. Chemical synthesis and characterizations of n-fatty acyl monoaminoacyl derivatives of colistin nonapeptide. Agric. Biol. Chem. 38, 1767–1777 (1974).

117. CHIHARA, S., ITO, A., YAHATA, M., TOBITA, T. & KOYAMA, Y. Chemical Synthesis, Isolation and Characterization of α-N-Fattyacyl Colistin Nonapeptide with Special Reference to the Correlation between Antimicrobial Activity and Carbon Number of Fattyacyl Moiety. Agric. Biol. Chem. 38, 521–529 (1974).

118. Okimura, K. et al. Chemical conversion of natural polymyxin B and colistin to their N-terminal derivatives. Bull. Chem. Soc. Jpn. 80, 543–552 (2007).

119. O'Dowd, H. et al. Preparation of tetra-Boc-protected polymyxin B nonapeptide. Tetrahedron Lett. 48, 2003–2005 (2007).

120. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. & Fridkin, M. N-terminal modifications of Polymyxin B nonapeptide and their effect on antibacterial activity. Peptides 22, 1675–81 (2001).

121. Kline, T., Holub, D., Therrien, J., Leung, T. & Ryckman, D. Synthesis and characterization of the colistin peptide polymyxin E1 and related antimicrobial peptides. J. Pept. Res. 57, 175–187 (2001).

122. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., Eisenstein, M. & Fridkin, M. Modulation of the hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. Mol. Pharmacol. 62, 1036–42 (2002).

123. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. & Fridkin, M. Structure activity relationship study of polymyxin B nonapeptide. Adv. Exp. Med. Biol. 479, 219–22 (2000).

124. Nakajima, K. Structure-activity relationship of colistins. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 15, 1219–24 (1967).

125. Shoji, J., Kato, T. & Hinoo, H. The structures of two new polymyxin group antibiotics. J. Antibiot. (Tokyo). 30, 427–9 (1977).

126. Shoji, J., Kato, T. & Hinoo, H. The structure of polymyxin S. (Studies on antibiotics from the genus Bacillus. XXI). J. Antibiot. (Tokyo). 30, 1035–41

(1977).

127. Shoji, J., Kato, T. & Hinoo, H. The structure of polymyxin T1. (Studies on antibiotics from the genus Bacillus. XXII). J. Antibiot. (Tokyo). 30, 1042–8 (1977).

128. Shoji, J. et al. Isolation of two new polymyxin group antibiotics. (Studies on antibiotics from the genus Bacillus. XX). J. Antibiot. (Tokyo). 30, 1029–34 (1977).

129. Katsuma, N. et al. Development of des-fatty acyl-polymyxin B decapeptide analogs with Pseudomonas aeruginosa-specific antimicrobial activity. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 57, 332–336 (2009).

130. Tsubery, H. et al. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3122–8 (2005).

131. J.H., G. & A.J.K., E. G. Multivalent polymyxin antibiotics. (2002). at <https://www.google.com/patents/US6380356>

132. Frecer, V., Ho, B. & Ding, J. L. De novo design of potent antimicrobial peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3349–57 (2004).

133. Sil, D. et al. Bound to shock: protection from lethal endotoxemic shock by a novel, nontoxic, alkylpolyamine lipopolysaccharide sequestrant. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2811–9 (2007).

134. Li, C. et al. Incremental Conversion of Outer-Membrane Permeabilizers into Potent Antibiotics for Gram-Negative Bacteria. J. Am. Chem. Soc. 121, 931–940 (1999).

135. Li, C. et al. Antimicrobial activities of amine- and guanidine-functionalized cholic acid derivatives. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1347–9 (1999).

136. Rustici, A. et al. Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. Science 259, 361–5 (1993).

137. Clark, D. P., Durell, S., Maloy, W. L. & Zasloff, M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (Rana catesbeiana) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. J. Biol. Chem. 269, 10849–55 (1994).

138. Abdelraouf, K., He, J., Ledesma, K. R., Hu, M. & Tam, V. H. Pharmacokinetics and renal disposition of polymyxin B in an animal model. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5724–7 (2012).

139. Abdelraouf, K., Chang, K.-T., Yin, T., Hu, M. & Tam, V. H. Uptake of polymyxin B into renal cells. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 4200–2 (2014).

140. Yang, J. J., Kularatne, S. A., Chen, X., Low, P. S. & Wang, E. Characterization of in vivo disulfide-reduction mediated drug release in mouse kidneys. Mol. Pharm. 9, 310–7 (2012).

141. Yang, J., Chen, H., Vlahov, I. R., Cheng, J.-X. & Low, P. S. Evaluation of

disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 13872–7 (2006).

142. Geng, Q., Sun, X., Gong, T. & Zhang, Z.-R. Peptide–Drug Conjugate Linked via a Disulfide Bond for Kidney Targeted Drug Delivery. Bioconjug. Chem. 23, 1200–1210 (2012).

143. Goodman, M. & Chorev, M. On the concept of linear modified retro-peptide structures. Acc. Chem. Res. 12, 1–7 (1979).

144. Kwon, D.-H. & Lu, C.-D. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2070–7 (2007).

145. Clausell, A. et al. Gram-negative outer and inner membrane models: Insertion of cyclic cationic lipopeptides. J. Phys. Chem. B 111, 551–563 (2007).

146. ALBERICIO, F. et al. Cyclization of disulfide-containing peptides in solid-phase synthesis†. Int. J. Pept. Protein Res. 37, 402–413 (1991).

147. Núñez, M. R. Disseny, síntesi i estudi de l'activitat biològica i biofísica d'antibiòtics lipopeptídics cíclics: tesi doctoral. (2011).

148. NOMIZU, M. et al. Two-step hard acid deprotection/cleavage procedure for solid phase peptide synthesis. Int. J. Pept. Protein Res. 37, 145–152 (1991).

149. Andreu, D. et al. in Peptide Synthesis Protocols SE - 7 (eds. Pennington, M. & Dunn, B.) 35, 91–169 (Humana Press, 1995).

150. Kamber, B. et al. The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation ofS-Trityl-cysteine andS-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. Helv. Chim. Acta 63, 899–915 (1980).

151. Rabanal, A. F., Cajal, V. Y., Garcia, S. M. & RODRÍGUEZ, N. M. Compuestos peptídicos antibacterianos. (2010). at <https://www.google.com.ar/patents/WO2010029196A1?cl=ru>

152. RABANAL ANGLADA, F., CAJAL VISA, Y., GARCIA SUBIRATS, M. & RODRÍGUEZ NÚÑEZ, M. PEPTIDE COMPOUNDS THAT CAN BE USED AS ANTIBACTERIAL AGENTS. (2011). at <http://www.freepatentsonline.com/WO2011110716.html>

153. Rivaille, P., Gautron, J. P., Castro, B. & Milhaud, G. Synthesis of LH-RH using a new phenolic polymer as solid support and 'BOP' reagent for fragment coupling. Tetrahedron 36, 3413–3419 (1980).

154. Rabanal, F. in The Power of Functional Resins in Organic Synthesis 417–436 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). doi:10.1002/9783527626175.ch15

155. Jensen, K. J. et al. Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides1,2,3. J. Am. Chem. Soc. 120, 5441–5452 (1998).

156. Jorgensen, J. H. et al. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion Methods. Manual of Clinical Microbiology.) Geo. F. (1999).

157. Zhang, L., Rozek, a & Hancock, R. E. Interaction of cationic antimicrobial

peptides with model membranes. J. Biol. Chem. 276, 35714–35722 (2001).

158. Verger, R. & Pattus, F. Lipid-protein interactions in monolayers. Chem. Phys. Lipids 30, 189–227 (1982).

159. Gidalevitz, D. et al. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6302–7 (2003).

160. Ishitsuka, Y., Pham, D. S., Waring, A. J., Lehrer, R. I. & Lee, K. Y. C. Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: effect of head group electrostatics and tail group packing. Biochim. Biophys. Acta 1758, 1450–60 (2006).

161. Tian, C., Tétreault, E., Huang, C. K. & Dahms, T. E. S. Electrostatic interactions of colicin E1 with the surface of Escherichia coli total lipid. Biochim. Biophys. Acta 1758, 693–701 (2006).

162. Zhao, H. & Kinnunen, P. K. J. Binding of the Antimicrobial Peptide Temporin L to Liposomes Assessed by Trp Fluorescence. J. Biol. Chem. 277 , 25170–25177 (2002).

163. Papo, N. & Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? Peptides 24, 1693–1703 (2003).

164. Thorén, P. E. G. et al. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. Biochemistry 43, 3471–3489 (2004).

165. Ambroggio, E. E., Separovic, F., Bowie, J. H., Fidelio, G. D. & Bagatolli, L. A. Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. Biophys. J. 89, 1874–81 (2005).

166. L, A., JR, R., S, L., R, W. & GN, T. Membrane activity of biomimetic facially amphiphilic antibiotics. J. Phys. Chem. B 110, 3527–3532 (2006).

167. Epand, R. F., Schmitt, M. A., Gellman, S. H. & Epand, R. M. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides. Biochim. Biophys. Acta 1758, 1343–50 (2006).

168. Ringstad, L., Andersson Nordahl, E., Schmidtchen, A. & Malmsten, M. Composition effect on peptide interaction with lipids and bacteria: variants of C3a peptide CNY21. Biophys. J. 92, 87–98 (2007).

169. HORNE, R. W., BANGHAM, A. D. & WHITTAKER, V. P. Negatively Stained Lipoprotein Membranes. Nature 200, 1340 (1963).

170. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 4194–8 (1978).

171. C, T. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. (Wiley-Interscience, 1980).

172. Lasic, D. D. The spontaneous formation of unilamellar vesiscles. J. Colloid Interface Sci. 124, 428–435 (1988).

173. Vance D.E & J.E., V. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes. (Elsevier Science, 1996).

174. Lasic, D. D. & Martin, F. J. Preparation and the Mechanism of Liposome Formation. J. Surf. Sci. Technol. Vol 7, No 4 (2015). at <http://www.i-scholar.in/index.php/JSSTISSST/article/view/73067>

175. G, G. Preparation of Liposomes. (CRC Boca Raton FL, 1984).

176. Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. & Papahadjopoulos, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 557, 9–23 (1979).

177. Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. Faraday Discuss. Chem. Soc. 81, 303–311 (1986).

178. Lasič, D. D. A general model of vesicle formation. J. Theor. Biol. 124, 35–41 (1987).

179. Maget-Dana, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1462, 109–140 (1999).

180. Schwarz, S. M., Lambert, A. S. & Medow, M. S. Ontogeny of proximal colon basolateral membrane lipid composition and fluidity in the rabbit. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1107, 70–76 (1992).

181. Maget-Dana, R., Lelièvre, D. & Brack, A. Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. Biopolymers 49, 415–423 (1999).

182. Gaines, G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. (Interscience Publishers, 1966). at <https://books.google.co.in/books?id=6zhRAAAAMAAJ>

183. Ambroggio, E. E., Separovic, F., Bowie, J. & Fidelio, G. D. Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin. Biochim. Biophys. Acta 1664, 31–7 (2004).

184. Cajal, Y., Ghanta, J., Easwaran, K., Surolia, A. & Jain, M. K. Specificity for the exchange of phospholipids through polymyxin B mediated intermembrane molecular contacts. Biochemistry 35, 5684–95 (1996).

185. Zimmerberg, J., Vogel, S. S. & Chernomordik, L. V. Mechanisms of membrane fusion. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 433–66 (1993).

186. Cajal, Y. & Jain, M. K. Synergism between mellitin and phospholipase A2 from bee venom: apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. Biochemistry 36, 3882–93 (1997).

187. McIntyre, J. C. & Sleight, R. G. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. Biochemistry 30, 11819–11827 (1991).

188. Roes, S., Seydel, U. & Gutsmann, T. Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial

peptide polymyxin B by atomic force microscopy. Langmuir 21, 6970–8 (2005).

189. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem. 34, 595–8 (1970).

190. Vojkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. Pept. Res. 8, 236–7 (1995).

191. Woods, G. L. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Man. Clin. Microbiol. 1327–1341 (1995).