

## 1. Synteza peptydów

Peptydy syntezowane są manualnie na nośniku stałym (żywica Rink amide, Wanga lub 2-chlorotrytylowa) z wykorzystaniem chemii Fmoc. Deprotekcja ugrupowania Fmoc chroniącego grupę aminową prowadzona jest w 20% (v/v) roztworze piperidyny w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF) przez 15 minut z wytrząsaniem. Acylowanie grupy aminowej za pomocą chronionej pochodnej aminokwasowej prowadzone jest przez 1,5 godziny w mieszaninie DMF/DCM (DCM – dichlorometan) w temperaturze pokojowej przy użyciu trzykrotnego molowego nadmiaru reagentów. W celu ustalenia obecności wolnych grup aminowych stosowany jest test chloranilowy. W razie pozytywnego wyniku testu etap acylowania jest powtarzany. Substancją stosowaną do sprzęgania oraz minimalizowania racemizacji jest odpowiednio *N,N'*-diizopropylkarbodiimid (DIC) oraz OxymaPure. Po zakończonej syntezie peptyd odszczepiany jest od żywicy przy użyciu mieszaniny kwasu trifluorooctowego, triizopropylsilanu oraz wody (95:2,5:2,5 v/v/v). Fenol dodawany jest w przypadku gdy peptyd zawiera reszty tryptofanu i/lub tyrozyny (2% v/v). Ponadto jeżeli w sekwencji znajdują się reszty metioniny i/lub cysteiny w skład mieszaniny wchodzi także 1,2-etanoditiol (EDT, 2% v/v). Na 1 gram peptydylo-żywicy przypada 10-15 mL mieszaniny. Odszczepianie peptydów prowadzone jest przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej z jednoczesnym mieszaniem. Następnie surowy peptyd wytrącany jest z mieszaniny za pomocą zimnego eteru dietylowego i liofilizowany. Produkt poddawany jest oczyszczaniu za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczonego w układzie faz odwróconych. Tożsamość związku potwierdzana jest przy użyciu spektrometru mas.

## 2. Badanie aktywności biologicznej

Badanie aktywności biologicznej opiera się na wyznaczeniu minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*), a prowadzone jest zgodnie z wytycznymi CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standard Institute*). W tym celu stosowana jest technika seryjnych mikrorozcieńczeń na polistyrenowej płytce 96-dołkowej. Zakres stężeń związku do wstępnej oceny aktywności wynosi od 1 do 512 µg/mL. Do określania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykorzystywane są szczepy referencyjne pochodzące z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (IITD PAN, Wrocław). Wielkość inokulum w każdym z dołków wynosi ok.  $5 \times 10^5$  CFU/mL (CFU, ang. *colony-forming unit*, jednostka tworząca kolonię). Szczepy bakteryjne hodowane są w pożywce płynnej (*Mueller Hinton Broth II*) w temperaturze 37°C. Odczyt dokonywany jest spektrofotometrycznie po upływie 16 godzin. Za wartość MIC uznaje się minimalne stężenie, przy którym nie obserwuje się wzrostu mikroorganizmów.