

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-244

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.04.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.11.2016**
(Věstník č. 45/2016)

(71) Přihlašovatel:
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4 Krč, CZ

(72) Původce:
RNDr. Václav Čeřovský, CSc., Rostoky, CZ
Mgr. Ondřej Nešuta, Opava, CZ
Ing. Vlasta Dudková, Ph.D., Praha 8, CZ
RNDr. Hana Sychrová, DrSc., Praha 4, CZ
RNDr. Marie Kodedová, Ph.D., Nehvizdy, CZ

(74) Zástupce:
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo
náměstí 2/542, 166 10 Praha 6

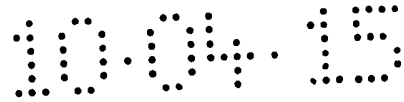
(54) Název přihlášky vynálezu:
**Antimikrobiální peptidy a jejich použití pro
léčbu topických infekcí**

(57) Anotace:
Předmětem řešení jsou syntetické analogy obecného vzorce (I-A), v nichž a je Gly, Lys, β-Ala; b je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Vla, Phe; c je Ser, Lys, Arg, Orn; d je Ser, Lys, Arg, Orn; e je Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe; f je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Vla, Phe; g je Leu, Nle, Ile, Trp; h je Lys, Arg, Orn, Ala; i je Lys, Arg, Orn, Ala; j je Ile, Leu, Nle, His; k je Lys, Arg, Orn, Ala; přičemž aminokyseliny ve všech uvedených polohách mohou být i v konfiguraci D, a jejich použití k léčení topických infekcí způsobených patogenními bakteriemi či kvasinkami.

a-Ile-b-c-d-e-f-Lys-Lys-g-h-i-j-Ile-k-Lys-NH₂

(I-A)

CZ 2015 - 244 A3



Antimikrobiální peptidy a jejich použití pro léčbu topických infekcí

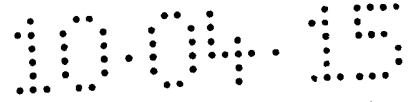
FV 2015-294

Oblast techniky

Vynález se týká peptidů obecného vzorce (I-A) a jejich použití k léčbě infekčních onemocnění způsobených různými patogenními bakteriemi a kvasinkami rodu *Candida*, a to především topických infekcí jako jsou obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznice, ale i infekce katetrů, kloubních náhrad a implantovaných materiálů, jejichž velmi častou příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

Dosavadní stav techniky

Infekce je závažnou komplikací hojení akutních i chronických ran. K následné chronicitě rané infekce přispívá tvorba biofilmu [Rulík a spol., 2011] vedoucí k chronické inflamaci spodiny rány zastavující hojení rány a napomáhající šíření infekce [Bjarnsholt, 2013]. Biofilm představuje strukturované společenství mikrobiálních kmenů přisedlých ke spodině rány nebo přisedlých na povrchích umělých implantátů jako jsou kloubní náhrady a osteosyntézy, materiálů jako jsou fixační tmely, nebo na katetrech zavedených do těla pacienta. Biofilm se vytváří i v souvislosti se zubním povlakem, močovými infekcemi, infekcemi očí a infekcemi zvukovodu či středního ucha. Celkově se biofilm podílí přibližně na 80 % všech infekcí ve zdravotnictví. Mikroorganismy žijící v biofilmech jsou obaleny matricí, která je tvořena extracelulárními polysacharidy, algináty a dalšími substancemi [Bjarnsholt a spol., 2013]. Díky této matrici jsou mikroorganismy chráněny před působením antibiotik, antiseptik a i proti imunitnímu systému organismu. Ve stádiu zralého biofilmu, kdy mikroorganismům hrozí vyčerpání živin, se biofilm začne řízeně rozpadat v menší celky, a mikroorganismy se z biofilmu uvolní a šíří se do blízkého i vzdáleného okolí, kde způsobují další závažné komplikace. Léčba topických infekcí jak chronických ran, tak i infekcí způsobených přisedlými biofilmy na umělých materiálech je velmi obtížná a následky jsou alarmující. Naše imunitní obrana vůči mikroorganismům v biofilmu není dostatečná a nevhodné použití topických antibiotik či antiseptik vede k tvorbě rezistentních kmenů, které přerůstají kmeny citlivé. Abychom dosáhli efektivní lokální terapie způsobené infekcí v biofilmu, je zapotřebí použít kombinaci mechanického debridementu a terapii účinným širokospektrým antiseptikem a dalšími látkami, které pronikají dovnitř biofilmu, kde zabíjejí bakterie či blokují tvorbu biofilmu. Jednou z možností je využití komerčně dostupných terapeutických

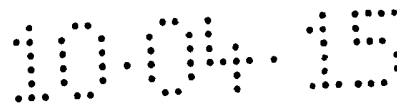


krytí založených na lokálním působení iontů stříbra (Aquacel Ag+Extra) nebo na polymerních práškových materiálech vytvářejících v ráně ideální vlhkost, která podporuje optimální činnost buněk a regeneraci postižené tkáně (Altrazeal).

Určitou možností jak zvýšit terapeutický potenciál lokální terapie infikované rány či zabránit usazení infekce na povrchu umělého materiálu je použití antimikrobiálních peptidů (AMP) [Zasloff, 2002]. Je známo, že AMP zabíjejí bakterie zcela odlišným mechanismem než tradiční antibiotika a při tom nevytvářejí bakteriální rezistenci [Zasloff, 2002], a proto jsou uvažovány jako doplněk tradičních antibiotik nebo jejich náhrada [Hancock a Sahl, 2006; Toke, 2005; Giuliani a spol., 2007; Zaiou, 2007; Oyston a spol., 2009; Baltzer a Brown, 2011; Yeung a spol., 2011; Čeřovský, 2014]. Nyní zde předkládané, nově objevené vysoce účinné AMP se nabízejí jako vhodné, synteticky dostupné látky k eradikaci infekce, případně k prevenci vzniku infekčního ložiska, a to v kombinaci s komerčně dostupnými materiály používanými pro krytí infikovaných ran, nebo ve směsi s nosiči používanými v ortopedii pro léčbu infekcí kostí, či ve směsi se syntetickými polymerními materiály používanými například v ortopedii jako tmely (polymetylmetakrylát) pro fixaci kloubních náhrad.

Antimikrobiální peptidy byly identifikovány prakticky v celém spektru živočišné a rostlinné říše. V říši hmyzu například představují právě takové peptidy hlavní prostředek obrany proti mikroorganismům [Čeřovský, 2014; Otvos, 2000]. Tyto peptidy jsou schopny velice rychle zabíjet bakterie a některé další mikroorganismy jako kvasinky a plísně, a to mechanismem zcela odlišným, než jaký je znám v případě běžně užívaných antibiotik. I když zmíněný mechanismus ještě není zcela objasněn, v podstatě spočívá v narušení buněčné membrány mikroorganismů tvorbou transmembránových pórů nebo iontových kanálů, či rozpadem celé mikrobiální obálky. Následný únik metabolitů a dalších nitrobuněčných komponent způsobí zánik mikroorganismu [Oren a Shai, 1998; Yeaman a Yount, 2003; Nguyen a spol., 2011]. Obecně je též známo, že antimikrobiální peptidy u bakterií nevyvolávají resistenci, která je známa u doposud používaných tradičních antibiotik. Zvláštní skupina peptidů s antimikrobiálním účinkem se nachází v jedu hmyzu řádu Hymenoptera [Kuhn-Nentwig, 2003].

V přírodě je antimikrobiální účinek peptidů izolovaných z jedu vos, včel, čmeláků a mravenců většinou sekundární, jejich hlavní úloha spočívá spíše v toxicitě či vyvolání bolesti a zánětu, jako třeba u peptidů patřících do skupiny mastoparanů [Čeřovský a spol., 2008]. Nicméně



antimikrobiální účinek peptidů izolovaných například z jedu primitivních včel je značný a vzhledem k tomu, že se jedná o peptidy synteticky snadno dostupné, lze uvažovat o využití takových peptidů i v praktické medicíně. V současné situaci, kdy překonávání resistance bakteriálních patogenů a kvasinek vůči tradičním antibiotikům či běžným antifungálním přípravkům vyžaduje hledání stále nových typů antimikrobiálních látek, jsou antimikrobiální peptidy velmi perspektivní.

Přírodní peptid nazvaný hylanin byl původně izolován z jedových váček volně žijících solitérních včel *Hylaeus signatus* a jeho sekvence byla stanovena následovně:



Na základě takto stanovené sekvence byl hylanin připraven metodou syntézy na pevné fázi a poté byla testována jeho antimikrobiální aktivita.

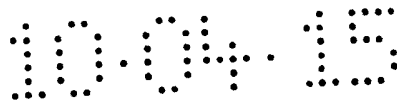
Synteticky připravený hylanin vykazoval vysokou aktivitu proti *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*, byl ovšem málo aktivní proti patogenním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, a vykazoval jen mírnou aktivitu proti kvasince *Candida albicans*. Současně však měl velmi nízkou hemolytickou aktivitu, která je mírou toxicity vůči eukaryotickým buňkám.

Primární funkce hylaninu v přírodě není známa, jedná se o peptid s dosud nepopsanými biologickými účinky. Je však obecně známo, že peptidy izolované z jedu hmyzu řádu Hymenoptera vykazují antimikrobiální a antifungální účinky, případně zabíjejí buňky protozoálních parazitů, nebo i některé rakovinné buňky.

Podstata vynálezu

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že cílenou obměnou aminokyselinového složení, která zahrnuje vícero aminokyselin v sekvenci, lze získat analogy hylaninu, mající silný účinek nejen proti patogenním stafylokokům, ale též proti Gram-negativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, a nadto i proti kvasince *Candida albicans*. Některé z těchto analogů mají dobrou účinnost i vůči dalším patogenním kvasinkám rodu *Candida*.

Významný antimikrobiální účinek předkládaných analogů byl prokázán též během jejich působení na mikrobiální biofilmy *in vitro*, tvořené *C. albicans*, *P. aeruginosa* nebo *S. aureus*.



V těchto případech byl účinek analogů sledován jako ztráta metabolické aktivity mikrobiálních buněk uvnitř biofilmu a to za využití sloučenin 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2*H*-tetrazolium-5-karbox anilid (XTT) nebo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2*H*-tetrazolium bromid (MTT). V případech použití některých analogů byl úbytek metabolické aktivity mikrobiálních buněk srovnatelný s poklesem, pozorovaným po aplikaci běžně používaných antifungálních látek či antibiotik a někdy ho dokonce převyšoval.

Předmětem vynálezu jsou antimikrobiální peptidy obecného vzorce

a-Ile-b-c-d-e-f-Lys-Lys-g-h-i-j-Ile-k-Lys-NH₂ (I-A),

v nichž

a je Gly, Lys, β-Ala

b je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe

c je Ser, Lys, Arg, Orn

d je Ser, Lys, Arg, Orn

e je Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe

f je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe

g je Leu, Nle, Ile, Trp

h je Lys, Arg, Orn, Ala

i je Lys, Arg, Orn, Ala

j je Ile, Leu, Nle, His

k je Lys, Arg, Orn, Ala

přičemž aminokyseliny v jakékoliv jedné poloze či ve více polohách, nebo ve všech uvedených polohách mohou být i v konfiguraci D.

Předmětem vynálezu jsou dále peptidy konkrétních vzorců I až XIX

H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (I),

H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (II),

H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (III),

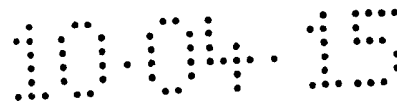
H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (IV),

H-Gly-Ile-Nle-Ser-Ser-Leu-Nle-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (V),

H-Lys-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (VI),

H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-NH₂ (VII),

H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-His-Ile-Lys-Lys-NH₂ (VIII),



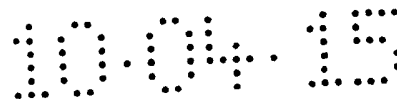
H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Lys-Lys-NH₂ (IX),
 H-Gly-Ile-Leu-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (X),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XI),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIII),
 H-Gly-Ile-Trp-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIV),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Trp-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XV),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Trp-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVI),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVIII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIX),
 kde kurzívou jsou vyznačeny aminokyseliny v konfiguraci D.

Předmětem vynálezu jsou také peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX pro použití k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující chronické či obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznic a infekční onemocnění kostí a okolních tkání, včetně těch infekcí, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

Předmětem vynálezu jsou rovněž peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX pro použití k prevenci infikace či k odstranění infekčního agens u katetrů, kloubních a kostních náhrad a tmelů a k prevenci infikace ortopedických implantátů.

Dalším předmětem vynálezu jsou peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX pro použití ke zvýšení účinku místně působících antibakteriálních léčiv a krycích materiálů používaných k léčení topických infekcí.

Předmětem vynálezu jsou také peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX pro použití k inkorporaci do lokálních nosičů používaných v ortopedii, zvolených ze skupiny, zahrnující fosforečnan vápenatý, síran vápenatý, bioaktivní sklo, apatit-wollastonitové keramické biosklo, hydrogel, kolagen, kostní štěpy, kostní cement nebo syntetické polymery zvolené z polymethylmetakrylátu, kopolymeru metylmetakrylátu a hydroxyethylmetakrylátu, polyanhydridu, polylaktidu, polyglykolidu, kopolymeru hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu, polyhydroxyalkanoátu, polykaprolaktonu či želatinové houby s glycerinem, nebo z kompozitů složených z polymerů a minerálních nosičů.



Předmětem vynálezu jsou i peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX pro výrobu léčiva k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznice a infekční onemocnění kostí a okolních tkání.

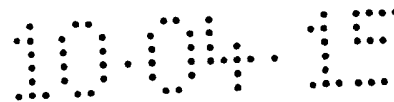
Předmětem vynálezu je také farmaceutický prostředek, který obsahuje terapeuticky účinné množství alespoň jednoho peptidu obecného vzorce I-A a/nebo vzorce I až XIX, případně i druhou aktivní složku, jíž je antibiotikum či antifungální agens a/nebo desinfekční činidlo, popřípadě také alespoň jeden farmaceuticky přijatelný krycí materiál, nosič, plnivo a/nebo ředidlo.

Předmětem vynálezu je také výše uvedený farmaceutický prostředek pro použití k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznice a infekční onemocnění kostí a okolních tkání, k prevenci infekčních komplikací po implantaci kloubních náhrad a po osteosyntézách a k léčení, vždy včetně komplikací, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

Předmětem vynálezu je i desinfekční prostředek, který obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I-A nebo peptid vzorce I až XIX.

Předkládaný vynález tedy zahrnuje peptidy obecného vzorce I-A nebo konkrétních vzorců I až XIX, použitelné k léčbě infekcí chronických ran, zejména bércových vředů, syndromu diabetické nohy a k léčbě infekcí kostí (osteomyelitidy), přičemž lokální použití antimikrobiálních peptidů zahrnuje i jejich případnou inkorporaci do lokálních nosičů používaných v ortopedii, dále k prevenci či odstranění infekčního agens z kloubních náhrad a tmelů a k prevenci infekčních pooperačních komplikací, vznikajících po implantaci kloubních náhrad a po osteosyntézách.

Dále mohou být tyto peptidy využity při léčení infekcí vnějšího zvukovodu (otitis externa), zánětu spojivkového vaku (conjunctivitis acuta, conjunctivitis chronica), v gynekologii jako prostředek proti vaginální infekci způsobené kvasinkami, dále při léčení infikovaných ran způsobených popáleninami nebo bojovými zraněními, a to především v případech, kdy tradičně používané antiseptické prostředky či antibiotika vzhledem k mikrobiální rezistenci selhávají. Takové infekce je obtížné léčit, neboť jsou ve většině případů komplikovány



výskytem biofilmů, uvnitř kterých jsou mikroorganismy ve srovnání s planktonickými buňkami k antimikrobiálním látkám až tisícinásobně rezistentní.

Výhodné se jeví i použití předkládaných peptidů v sanitárních a desinfekčních prostředcích.

Významem vynálezu je i to, že výše zmíněný farmaceutický prostředek je určen k léčení nebo prevenci infekcí, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

Syntetické peptidy vzorců (I) až (XIX) lze volně zahrnout mezi hylaniny, pojmenované podle přírodního peptidu hylaninu. Vhodnou záměnou aminokyselin v jeho sekvenci, již byla překvapivě nutná výměna více aminokyselin ve vhodné kombinaci, bylo neočekávaně dosaženo nejen podstatného zvýšení antimikrobiálního účinku vůči patogenním bakteriím a kvasinkám, ale zároveň i snížení jejich hemolytické aktivity. Předkládané peptidy se tak staly využitelnými i pro aplikace v přítomnosti eukaryontních buněk, což nově umožňuje jejich použití jako aktivní složky humánních či veterinárních léčiv. Sekvence takto získaných analogů a jejich molekulární hmotnosti jsou uvedeny v Tabulce 1. Antimikrobiální aktivity proti sérii bakterií vyjádřené hodnotami MIC (minimální inhibiční koncentrace), vyplývající z provedených záměn, jsou pak uvedeny v Tabulce 2. Tabulka 2 zároveň udává i hodnoty antifungální aktivity proti kvasince *Candida albicans* a rovněž i hodnoty hemolytické aktivity. Další hodnoty antifungálních aktivit proti sérii kvasinek rodu *Candida* jsou uvedeny v Tabulce 3.

Předkládané antimikrobiálně působící peptidy mohou být složkami, zvyšujícími účinek místně působících antibakteriálních léčiv a krycích materiálů používaných k léčení topických infekcí a navržena je i jejich inkorporace do lokálních nosičů používaných v ortopedii.

Další využití nových antimikrobiálních peptidů podle tohoto vynálezu zahrnuje kromě léčení povrchových ran a kožních defektů i léčení infekčních nemocí kostí (osteomyelitid), popřípadě prevenci či eradikaci infekčních komplikací kloubních náhrad a osteosyntéz a také jejich využití v sanitárních a desinfekčních prostředcích.

Antimikrobiální účinky předkládaných peptidů byly testovány jak na sérii mikroorganismů v planktonické formě, ale i vůči mikrobiálním biofilmům. Účinek peptidů proti mikroorganismům v planktonické formě je dále popsán v příkladech 2 a 4; získané výsledky

jsou shrnuty v Tabulkách 2 a 3. Účinky peptidů proti bakteriálním a kvasinkovým biofilmům jsou popsány v příkladech 5 a 6 a získané výsledky shrnuty v Tabulkách 4 a 5.

Vybrané peptidy byly též testovány v kombinaci s antibiotiky pro ověření jejich synergického účinku vůči planktonickým formám *P. aeruginosa* a *S. aureus*, což je popsáno v příkladu 7 a výsledek je shrnut v Tabulce 6.

Vybrané peptidy byly dále testovány i v modelech indukované osteomyelitidy, což je popsáno v příkladu 8. Studium antifungálního působení peptidů je popsáno v příkladu 9 a výsledek těchto pokusů je doložen obrázky 1 A, B.

Přehled obrázků na výkrese

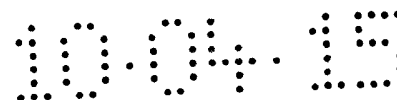
Obr. 1 (A) zobrazuje účinek subinhibičních koncentrací oktenidindyhydrochloridu (ODDC), peptidů II a VII samotných a kombinací těchto peptidů s ODDC na kvasinky *C. glabrata* ATCC 2001, změřený pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3). Šipka označuje okamžik přidání látek k buněčným suspenzím.

Obr. 1 (B) znázorňuje vliv patnáctiminutového působení ODDC, peptidů II a VII samotných a jejich kombinací na přežívání kvasinek *C. glabrata* ATCC 2001.

Příklady provedení vynálezu

Seznam zkratk:

Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
MBHA pryskyřice	4-methylbenzhydrylamínová pryskyřice
TFA	trifluoroctová kyselina
TIS	triisopropylsilan
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
BHI médium	médium z mozkosrdcové infuze
YPD médium	kvasnično-pepton-glukózové médium
LB médium	Luria Bertani médium
CFU	jednotky tvořící kolonie
ODDC	oktenidindyhydrochlorid



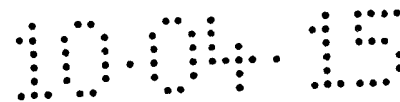
Příklad 1

Syntéza sloučenin vzorců (I) až (XIX)

Antimikrobiální peptidy vzorců I až XIX byly syntetizovány metodou syntézy peptidů na pevné fázi (SPPS). Syntéza byla provedena manuálně v 5 ml polypropylenových injekčních stříkačkách s polypropylenovým filtrem na dně stříkačky, za využití protokolu Fmoc-chemie [Fields a Noble, 1990]. Jako pevný nosič byla použita Rink Amide MBHA pryskyřice (IRIS Biotech GmbH, Germany) o substituci 0,7 mmol/g.

Tabulka 1. Sekvence analogů odvozených od peptidu hylaninu a jejich molekulové hmotnosti

	Sekvence peptidu	Molekulární hmotnost (Da)	
		Spočtená	Nalezená
I	Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1787,13	1786,8
II	Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1787,13	1787,1
III	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1751,21	1751,6
IV	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1751,21	1751,2
V	Gly-Ile-Nle-Ser-Ser-Leu-Nle-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1751,21	1751,6
VI	Lys-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1822,29	1822,2
VII	Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-NH ₂	1844,18	1843,9
VIII	Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-His-Ile-Lys-Lys-NH ₂	1754,04	1754,0
IX	Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Lys-Lys-NH ₂	1787,13	1787,2
X	Gly-Ile-Leu-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1792,28	1792,3
XI	Gly-Ile-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1792,28	1792,3
XII	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XIII	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XIV	Gly-Ile-Trp-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XV	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Trp-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XVI	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Trp-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XVII	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1897,20	1897,2
XVIII	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2
XIX	Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH ₂	1824,21	1824,2

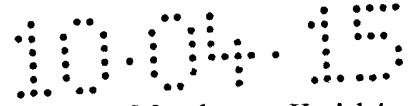


Aminokyseliny, jejichž aminová funkce byla chráněna pomocí Fmoc, byly kondenzovány ve 4-násobném molárním přebytku v dimethylformamidu a ke kondensaci byl použit N,N'-diisopropylkarbodiimid v přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu. Fmoc-chránící skupina byla po každém kondenzačním stupni odštěpena roztokem 20% piperidinu v dimethylformamidu. Surové peptidy (I-XIX) byly získány odštěpením z pryskyřice a současnou deprotekcí chránících skupin působením směsi TFA/1,2-ethandithiol/H₂O/thioanisol/TIS (90 : 2,5 : 2,5 : 3 : 2) po dobu 3,5 hod a následnou precipitací *tert*-butyl methyletherem. Pokud peptid neobsahoval methionin, byla ke štěpení použita jednodušší směs TFA/H₂O/TIS (95 : 2,5 : 2,5); uvedeny jsou objemové podíly. Tímto postupem bylo získáno 100-120 mg surových peptidů. Část tohoto materiálu (30 mg) byla v každém případě přečištěna preparativní HPLC na koloně Vydac C-18 (250 x 10 mm) při průtoku 3,0 ml/min a s využitím gradientu od 5% acetonitril/voda/0,1% TFA do 70% acetonitril/voda/0,1% TFA (zde uvedené procentní údaje jsou objemová procenta). Takto bylo získáno 10-15 mg HPLC čistých peptidů, jejichž identita byla ověřena hmotnostní spektrometrií, jak udává Tabulka 1.

Příklad 2

Stanovení antimikrobiální aktivity

Gram-positivní bakterie (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis*), Gram-negativní bakterie (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*) a kvasinky (*Candida albicans*) byly napěstované do exponenciální fáze růstu a naředěny do čerstvého média. BHI medium od firmy Oxoid, Velká Británie, bylo použito pro *Enterococcus faecalis*; YPD medium obsahující kvasniční extrakt, pepton a glukózu bylo použito pro *Candida albicans* a LB medium od firmy Sigma, Česká republika, bylo použito pro ostatní mikroorganismy. Poté byly mikroorganismy přidány k roztokům testovaných antimikrobiálních peptidů v LB médiu v inkubačních vícejamkových destičkách připravených dvojnásobným ředěním ze zásobního roztoku (1 mmol.l⁻¹) tak, že finální koncentrace peptidů v jamkách byla v rozmezí od 0,1 do 100 μmol.l⁻¹. Destičky byly vloženy do přístroje Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Helsinky, Finland), kde byly inkubovány při 37 °C po dobu 20 hodin za stálého třepání. Absorbance při 540 nm byla měřena každých 15 minut. Z takto získaných růstových křivek pro různé koncentrace peptidů byla stanovena antimikrobiální aktivita jako tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) (viz Tabulka 2). V experimentech bylo použito množství cca 10⁵ CFU bakterií nebo kvasinek na jamku. Jako standard byl použit tetracyklin v koncentraci od 0,1 do 100 μmol.l⁻¹.



Klinické izoláty bakterií byly získány z Fakultní nemocnice v Praze Motole a z Krajské nemocnice v Liberci. Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) 6271 a *Pseudomonas aeruginosa* 5482 byly získány ze Státního zdravotního ústavu v Praze, ostatní bakterie z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně a *Candida albicans* z Lékařské fakulty Palackého university v Olomouci.

Příklad 3

Stanovení hemolytické aktivity

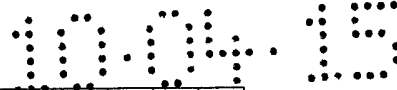
Peptidy v koncentraci 2-400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byly inkubovány s 5% (obj./obj.) suspenzí lidských červených krvinek v 0,2 ml fyziologického roztoku po dobu 1 hodiny při 37 °C. Poté byly vzorky odstředovány 5 minut při 250 g. Absorbance supernatantu byla stanovena při 540 nm. Jako kontrola pro 100% hemolýzu byl místo peptidu použit 0,2% (obj./obj.) roztok Tritonu X100. Výsledky testování jsou uvedeny v Tabulce 2. Hemolytická aktivita je vyjádřena jako koncentrace peptidu způsobující 50% rozpad červených krvinek (hodnoty LC_{50}).

Tabulka 2. Antimikrobiální a hemolytické aktivity peptidů (I) až (XIX) a tetracyklinu.

Peptid	Antimikrobiální aktivita MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)														Hemolytická aktivita LC ₅₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)
	M.l.	B.s.	S.a. Liberec	S.a. 6271	S.a. Motol	S.e. Motol	E.f. Motol	E.c.	P.a. Liberec	P.a. 5482	C.a. Olomouc				
I	1,9	5,7	7,6	32,0	23,0	1,9	100,0	9,0	7,4	5,0	5,2	>400			
II	1,3	2,2	7,5	12,7	16,2	2,2	44,3	6,3	8,5	3,2	8,0	>400			
III	1,6	2,0	3,8	16,0	5,0	1,8	59,3	8,0	7,5	5,0	10,0	284,2			
IV	1,8	1,8	2,6	5,7	6,3	3,2	6,7	4,5	9,7	4,5	9,0	332,9			
V	1,6	3,5	4,0	12,7	6,7	2,5	54,0	10,0	7,9	4,0	10,0	373,4			
VI	1,0	1,3	5,5	32,0	10,0	1,4	32,5	16,0	16,0	5,0	25,3	363,7			
VII	1,9	2,5	18,0	54,0	64,7	1,7	>100	22,0	9,9	7,1	6,3	>400			
VIII	1,6	2,8	76,7	85,3	90,0	11,3	>100	20,0	46,0	23,0	5,0	>400			
IX	1,3	2,5	8,8	35,0	18,3	3,1	98,0	16,0	10,6	5,4	8,0	>400			
X	1,4	1,5	4,3	16,5	10,0	2,2	76,7	10,0	8,9	5,0	24,0	>400			
XI	1,6	1,4	5,9	22,7	10,0	1,8	72,7	17,5	8,5	4,5	45,3	>400			
XII	0,8	1,1	2,1	5,3	5,0	2,0	25,3	3,4	8,8	5,3	10,7	196,6			
XIII	1,6	1,6	3,1	6,3	3,2	1,7	3,4	5,0	8,8	6,7	8,0	190,7			
XIV	0,8	0,8	4,6	20,0	5,3	1,5	46,0	1,6	21,0	6,3	16,0	165,4			
XV	1,6	1,6	6,6	16,0	16,2	2,0	73,3	11,0	5,9	4,0	16,7	>400			
XVI	2,0	1,6	8,8	20,0	20,3	2,7	100,0	7,5	7,1	5,0	10,5	>400			
XVII	n.t.	1,3	1,6	2,5	2,0	1,6	10,0	2,5	24,1	12,7	12,7	57,2			
XVIII	n.t.	1,3	2,5	8,0	4,0	1,6	25,3	4,0	20,7	8,0	16,0	159,6			
XIX	n.t.	2,0	3,2	6,3	3,2	1,6	6,5	13,0	8,5	6,3	26,0	>200			
Tetracyklin	0,8	16,0	1,1	0,9	2,0	>100	40,0	2,7	70,4	28,7	n.t.	>200			

M.l., *Micrococcus luteus*; B.s., *Bacillus subtilis*; S.a., *Staphylococcus aureus*; S.e., *Staphylococcus epidermidis*; E.f., *Enterococcus faecalis*; E.c., *Escherichia coli*; P.a.,

Pseudomonas aeruginosa; C.a., *Candida albicans*; n.t. = netestováno



Příklad 4

Stanovení antifungální aktivity vůči vybrané sérii kvasinek

Kvasinky *Candida albicans* (Olomouc) a ATCC MYA-2876, *Candida glabrata* ATCC 2001 a DSY 565, *Candida dubliniensis* ATCC MYA-646, *Candida krusei* ATCC 6258 a *Candida tropicalis* ATCC 750 byly sterilně rozčárkovány ze zásobní kultury na Sabouradův agar, složený z 40 g glukózy (Penta, CZ), 10 g peptonu (OXOID, UK) a 17 g agaru (OXOID, UK), rozpuštěných v 1 l destilované vody a kultivovány 24 hod při 35 °C.

Zásobní kultury kvasinek jsou kryogenicky uchovávány při teplotě -80 °C ve směsi tvořené 50 % glycerolem a kulturou kvasinek narostlých v YPD mediu, složeném z 10 g kvasničného extraktu (DIFCO, USA), 20 g peptonu (OXOID, UK) a 20 g glukózy (Penta, CZ), rozpuštěných v 1 l destilované vody v poměru 1:1.

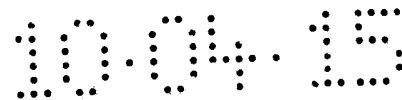
Pět dobře definovaných kolonií každé kvasinky bylo sterilní očkovací kličkou přeneseno do 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Následně byla optická densita upravena na hodnotu 0,18 při 600 nm. Kultura o požadované densitě byla následně ředěna 1:100 do RPMI média s L-glutaminem bez NaHCO₃ (BioSera, FR), s 0,165 mol.l⁻¹ MOPS (Duchefa, NL) – dále jen RPMI médium. Inokulum kvasinek bylo připraveno ředěním 1:20 do RPMI média.

Do 96 jamkových destiček byly dvojkovým ředěním v RPMI mediu připraveny antimikrobiální peptidy v koncentracích 0,625 až 160 μmol.l⁻¹. K antimikrobiálním peptidům o požadované koncentraci bylo následně přidáno inokulum v poměru 1:1. Finální koncentrace kvasinek v testovaných jamkách odpovídala hodnotám 5×10² až 2,5×10³ CFU/ml. Destičky byly inkubovány staticky při teplotě 35 °C po dobu 48 hod.

Jako negativní kontrola sloužily neinokulované jamky; jako pozitivní kontrola sloužily jamky, k nimž nebyl přidán antimikrobiální peptid; a jako kontrola kvality sloužily jamky, k nimž byl přidán amfotericin B namísto antimikrobiálního peptidu.

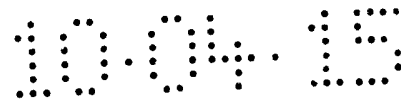
Následně byly destičky vizuálně vyhodnoceny a jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly označeny jamky, ve kterých nebyl pozorován žádný nárůst kvasinek.

Všechny kvasinkové izoláty byly získány z Fyziologického ústavu AV ČR. Izolát *Candida albicans* (Olomouc) byl z Lékařské fakulty Palackého university v Olomouci.



Tabulka 3. Antifungální aktivita peptidů (I) až (XVIII) a antifungálních látek

Peptid	Antifungální aktivita MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)						
	<i>C. albicans</i> Olomouc	<i>C. albicans</i> ATCC MYA- 2876	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA- 646	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>C. glabrata</i> DSY 565
I	17,0	22,0	10,0	0,8	40,0	40,0	88,9
II	15,5	15,5	7,8	0,7	34,0	15,5	32,2
III	13,0	18,0	5,0	0,9	20,0	24,0	44,0
IV	11,0	11,0	4,3	0,6	12,0	10,0	20,0
V	12,0	19,0	5,0	1,0	26,0	24,0	44,0
VI	12,0	20,0	4,8	0,9	12,0	28,0	71,1
VII	17,0	22,0	10,0	1,1	20,0	40,0	97,8
VIII	17,0	20,0	10,0	1,1	36,0	26,0	66,7
IX	16,0	18,0	12,0	1,1	42,0	20,0	44,4
X	10,5	17,0	5,0	1,0	14,0	34,0	71,1
XI	12,0	20,0	5,0	1,0	10,5	26,0	40,0
XII	8,5	10,0	4,3	1,0	9,5	10,0	21,0
XIII	10,0	11,0	5,0	1,1	9,5	6,0	18,0
XIV	8,2	10,0	5,2	1,2	9,0	19,1	48,0
XV	21,0	17,0	8,0	1,2	22,0	40,0	88,9
XVI	18,0	26,0	10,0	1,0	40,0	40,0	231,1
XVII	4,5	5,5	3,3	0,8	5,0	5,5	11,0
XVIII	8,5	10,0	7,8	1,2	10,0	8,5	24,0
Flukonazol	2,0	2,2	515,6	49,3	1,8	266,7	950
Clotrimazol	0,4	0,3	1,0	4,6	1,4	14,2	35,0



Příklad 5

Stanovení antimikrobiální aktivity na modelových bakteriálních biofilmech

Inokulum *S. aureus* (Liberec) nebo *P. aeruginosa* (Liberec) napěstované přes noc v BHI médiu bylo naředěno do čerstvého BHI média s přídavkem 1% glukózy na koncentraci cca 10^8 CFU/ml, rozděleno po 100 μ l do 96-jamkové polystyrénové destičky a rotačně mícháno (300 otáček/min) při 37 °C po dobu 24 h. Médium v jamkách bez bakterií sloužilo jako negativní kontrola (blank). Z každé jamky byl následně odsát supernatant a narostlý biofilm na dně a stěnách jamek byl 3x opatrně promyt 300 μ l sterilního fyziologického roztoku. Peptidy byly testovány v koncentracích 1 - 128 μ mol.l⁻¹, které byly připraveny dvojnásobným ředěním zásobních roztoků (1 mmol.l⁻¹) v čerstvém BHI médiu a naneseny po 100 μ l do jednotlivých jamek na vytvořené biofilmy. Následovala inkubace za podmínek popsaných výše po dobu 20 hodin. Samotné BHI médium navrstvené na biofilm bylo použito jako kontrola. Poté byly obsahy jamek odsáty a 2x promyty sterilním fyziologickým roztokem.

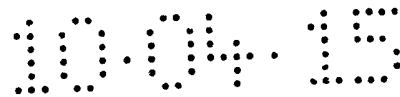
Pro stanovení metabolické aktivity biofilmu (stanovení množství životaschopných bakterií) bylo použito barvení pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium bromid). Destičky byly inkubovány se 100 μ l BHI media a 10 μ l MTT (5 mg/ml) na jamku po dobu 40 min při 37 °C. Poté bylo médium s MTT odsáto a vzniklé formazanové krystaly vytvořené redukcí MTT uvnitř biofilmu byly rozpuštěny přidáním 100 μ l DMSO a intenzita zabarvení v jednotlivých jamkách byla odečtena jako absorbance při 540 nm na přístroji Tecan infinite M200 PRO reader (Tecan Austria GmbH). Zbytková metabolická aktivita přeživších buněk uvnitř biofilmu byla pro každou jamku vyjádřena v % podle vztahu:

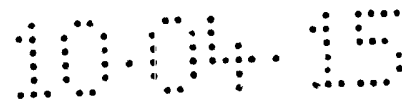
$$\% = \frac{A - A_{BL}}{A_K - A_{BL}} * 100,$$

kde A je absorbance v případě testované látky, A_{BL} je absorbance negativní kontroly a A_K je absorbance kontrolního biofilmu. Hodnoty zbytkové metabolické aktivity jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4. Účinek vybraných peptidů na bakteriální biofilmy tvořené *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (vyjádřené zbytkovou metabolickou aktivitou mikrobiálních buněk v (%) při dané koncentraci peptidu (n.t., netestováno).

Peptid	Metabolická aktivita (%) <i>S. aureus</i> (Liberec)					Metabolická aktivita (%) <i>P. aeruginosa</i> (Liberec)				
	Koncentrace peptidu					Koncentrace peptidu				
	8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	32 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	64 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	128 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	32 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	64 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	128 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
I	111,6	103,3	111,2	101,9	11,4	86,4	87,7	89,6	62,9	43,4
II	143,1	138,8	107,5	29,9	7,7	94,2	100,5	79,1	33,0	26,7
III	87,8	89,6	78,4	15,9	2,4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
IV	65,5	34,2	7,1	3,0	0,0	56,5	69,5	56,0	59,6	21,7
V	83,0	71,0	49,5	26,0	0,0	65,5	59,8	64,9	61,4	49,3
VI	55,6	34,0	15,1	4,4	0,1	79,0	74,1	75,7	89,2	56,8
VII	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	77,3	76,5	71,3	53,3	33,8
IX	79,1	53,6	54,0	30,5	23,6	73,6	76,8	85,3	83,8	34,2
X	66,7	59,1	30,0	22,3	2,3	78,9	67,3	67,8	93,9	45,9
XI	75,2	68,4	51,0	24,0	0,0	79,4	60,9	82,9	83,1	49,1
XII	52,2	31,5	18,9	14,7	1,0	77,3	69,3	66,9	44,4	57,9
XIII	71,6	33,8	21,5	20,4	5,3	71,2	65,8	61,2	73,6	23,0
XIV	55,1	52,2	16,3	14,5	4,4	67,2	54,9	54,8	65,6	31,1
XV	71,5	60,5	40,6	38,0	6,9	64,1	70,3	57,6	63,2	32,2
XVI	58,0	60,6	64,6	18,4	8,7	74,1	66,2	57,6	47,5	31,9
XVII	72,1	12,3	2,6	5,4	7,7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
XVIII	68,7	46,7	19,5	10,5	3,6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
XIX	72,8	2,8	2,3	2,3	1,7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Vankomycin	52,8	15,9	9,7	8,5	6,3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Amikacin	95,4	102,4	108,7	82,4	104,0	80,0	62,9	40,4	20,3	11,8





Příklad 6

Stanovení antimikrobiální aktivity na modelových biofilmech kvasinek *C. albicans*

Kvasinka *Candida albicans* (Olomouc) byla předpěstována přes noc v YPD médiu (10 g kvasničný extrakt (DIFCO, USA), 20 g pepton (OXOID, UK), 20 g glukosa (Penta, CZ) rozpuštěné v 1 l destilované vody) za stálého třepání (100 otáček/minutu) při 37 °C. Druhý den ráno byla kultura naředěna v poměru 1:100 do nového YPD média a kultivována za stálého třepání (200 otáček/minutu) při 37 °C do té doby, než bylo dosaženo střední oblasti exponenciální fáze růstu. Následně byla kultura odstředována (5000 otáček/minutu) po dobu 5 min a následně dvakrát promyta fyziologickým roztokem (9 g/l NaCl (Penta, CZ)). Kvasinky byly suspendovány ve fyziologickém roztoku a byla změřena optická densita této suspenze při 600 nm.

Kvasinkové inokulum bylo připraveno tak, aby optická densita buněk odpovídala hodnotě 0,17 (cca 10^6 CFU/ml) v RPMI s L-glutaminem (BioSera, FR), NaHCO_3 (2 g/l; Penta, CZ) a 0,165 mol.l⁻¹ MOPS (Duchefa, NL) – dále jen RPMI médium 1. Inokulum bylo následně nanášeno do 96-jamkových destiček (TPP, SW) a staticky inkubováno při 37 °C po dobu 2 hodin. Následně byly jamky sterilně dvakrát promyty dvojnásobným objemem PBS pufru (1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , 0,2 g KCl a 8 g NaCl v 1 l destilované vody, pH = 7; Penta, CZ). Do jamek bylo následně přidáno čerstvé RPMI médium 1 a destičky byly přikryty víčkem a utěsněny parafilmem a inkubovány staticky po dobu 48 hod a teplotě 37 °C.

Vytvořený biofilm byl poté sterilně třikrát promyt dvojnásobným objemem PBS pufru. Do jamek bylo následně pipetováno RPMI médium 1 a testovaný antimikrobiální peptid. Antimikrobiální peptid byl dvojkově ředěn přímo v destičce s vytvořeným biofilmem. Testované koncentrace peptidů jsou v rozmezí 0,39 – 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Destičky byly opět přikryty víčkem a utěsněny parafilmem a staticky inkubovány po dobu 20 hodin při teplotě 37 °C.

U ovlivňovaného biofilmu byla následně stanovena zbytková metabolická aktivita (stanovení metabolicky aktivních kvasinek) pomocí XTT testu. Zásobní roztok PMS (fenazin methosulfát; 7,5 g/l; SIGMA, CZ) skladovaný při -20 °C byl naředěn 1:100 do PBS pufru. Naředěné PMS bylo smícháno v poměru 2:25 s XTT (XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid; 0,5 g/l; Alchimica, SK)), rozpuštěným v PBS pufru a RPMI médiu 1 v poměru 1:1. K biofilmu byl přidán shodný objem směsi XTT/PMS a směs byla inkubována staticky po dobu 90 min při 37 °C. Následně byla změřena intenzita

vzniklého zbarvení při 540 nm na přístroji Tecan infinite M200 PRO reader (Tecan, AU).

Metabolická aktivita byla vyjádřena v procentech kontrolního biofilmu podle vztahu:

$$\% = \frac{A - A_{BL}}{A_K - A_{BL}} * 100$$

kde A je absorbance v případě testované látky, A_{BL} je absorbance negativní kontroly a A_K je absorbance kontrolního biofilmu.

Jako negativní kontrola sloužily neinokulované jamky; jako pozitivní kontrola sloužily jamky, k nimž nebyl přidán antimikrobiální peptid; a jako kontrola kvality sloužily jamky, k nimž byl přidán amfotericin B namísto antimikrobiálního peptidu. Hodnoty zbytkové metabolické aktivity kvasinek jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Účinek vybraných peptidů na bakteriální biofilmy tvořené *Candida albicans* (Olomouc) vyjádřené zbytkovou metabolickou aktivitou mikrobiálních buněk v (%) při dané koncentraci peptidu.

Peptid	Metabolická aktivita <i>C. albicans</i> (%)					
	Koncentrace peptidu					
	6,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	12,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
I	100,4	108,0	130,7	57,5	28,2	8,1
II	105,3	114,2	35,2	1,0	0,0	0,0
III	104,7	113,6	87,2	31,1	28,4	0,0
IV	106,9	37,2	6,0	2,3	2,1	0,5
V	106,4	89,5	45,0	6,9	2,4	0,4
VI	98,8	111,2	110,5	28,3	0,4	0,0
VII	104,6	116,0	120,7	31,5	22,0	0,0
VIII	99,4	99,1	105,6	112,2	106,8	53,0
IX	93,2	54,3	2,3	1,5	1,3	0,8
X	100,8	109,3	65,3	16,8	7,0	3,3
XI	97,7	70,3	79,3	32,8	7,6	6,1
XII	86,8	80,3	94,8	63,6	6,2	3,2
XIII	78,3	56,9	37,2	10,9	5,8	4,9
XIV	84,6	80,9	91,1	14,2	7,4	4,2
XV	94,9	92,8	73,8	65,2	9,4	3,4
XVI	97,3	103,2	68,5	68,1	44,9	11,4
XVII	2,4	1,0	0,9	1,3	2,3	1,5
XVIII	11,5	2,5	3,2	3,2	3,1	2,6
Flukonazol	33,5	30,8	31,7	30,7	32,4	29,2
Clotrimazol	39,7	37,6	34,2	28,4	21,8	22,2

Příklad 7

Synergismus účinku peptidů s běžně užívanými antibiotiky proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*

Pro stanovení hodnot MIC pro různé kombinace dvojnásobných ředění peptidů a antibiotik, přípravu inokula a kultivaci byla použita shodná metodika jako v případě stanovení antimikrobiální aktivity (Příklad 2). Pro určení výsledného efektu bylo použito výpočtu tzv. FIC (frakční inhibiční koncentrace) indexu podle vztahu:

$$FIC = \frac{MIC_{PC}}{MIC_P} + \frac{MIC_{AC}}{MIC_A},$$

kde MIC_{PC} a MIC_{AC} jsou MIC peptidu a antibiotika v kombinaci, v tomto pořadí, a MIC_P a MIC_A jsou MIC samotného peptidu a samotného antibiotika, v tomto pořadí. Hodnoty $FIC < 0,5$ byly považovány za synergismus, $0,5 \leq FIC \leq 2$ za aditivní efekt a hodnoty $FIC > 2$ za antagonismus. Příklady synergických účinků kombinací vybraných peptidů s tetracyklinem (TET) a rifampicinem (RIF) vůči *P. aeruginosa* (Liberec) a s amoxicilinem (AMX) vůči *S. aureus* (Liberec) uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6. FIC indexy kombinací vybraných peptidů s antibiotiky oproti *S. aureus* (Liberec) a *P. aeruginosa* (Liberec).

Peptid	FIC (frakční inhibiční koncentrace) indexy		
	kombinace s TET proti <i>P. aeruginosa</i>	kombinace s RIF proti <i>P. aeruginosa</i>	kombinace s AMX proti <i>S. aureus</i>
I	0,646	0,427	0,333
II	0,667	0,323	n.t.
III	0,542	0,385	0,688
IV	0,750	0,302	n.t.
VI	0,708	0,260	0,292
VII	0,625	0,365	0,167
IX	0,542	0,417	n.t.
X	0,521	0,333	0,542
XI	0,646	0,344	0,333
XII	0,646	0,438	n.t.
XIII	0,583	0,292	n.t.
XIV	0,354	0,271	0,396
XV	0,646	0,396	0,375
XVI	0,583	0,417	n.t.
XVII	0,417	0,292	n.t.
XVIII	0,625	0,271	n.t.

n.t. - netestováno; **FIC < 0,5 = synergismus**, $0,5 \leq FIC \leq 2$ = aditivní efekt, $FIC > 2$ = *antagonismus*. Uvedené hodnoty jsou průměry z minimálně tří nezávislých experimentů.

Příklad 8

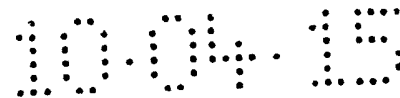
Působení peptidů XII a XIII na infikované ložisko v kosti v modelu indukované osteomyelitidy

Do dvou rozmražených hlavic kostí stehenních byly za sterilních podmínek vytvořeny chirurgickou lžičkou 3 návrtky do spongiózní části kosti (v místě resekcce) o průměru cca 5 mm a hloubky do 10 mm. Takto připravené kostní štěpy byly vloženy do kádinek a obloženy sterilními čtverci gázy, která byla navlhčena sterilním fyziologickým roztokem, aby nedocházelo k vysychání kostí. Poté byla do připravených otvorů v jednom kostním štěpu postupně aplikována suspenze namnožených bakterií *S. aureus* (Motol) v LB mediu (50 - 100 μ l) o koncentraci v řádu 10^9 CFU/ml, a do druhého ve stejném objemu suspenze bakterií *S. epidermidis* (10^9 CFU/ml). Kádinky byly překryty sterilní Petriho miskou a kosti inkubovány po dobu 24 hodin. V průběhu experimentu byly tyto modely indukované osteomyelitidy ponechány bez přístupu světla při teplotě místnosti.

Po proběhlé inkubaci byl pro kontrolu infikace odebrán stěr z jednoho z otvorů z každé kosti pomocí sterilní navlhčené vatičky. Vatička byla vyextrahována 400 μ l fyziologickým roztokem, provedlo se ředění extraktu v desítkové řadě, a jednotlivě naředěné suspenze byly kultivovány na LB agaru v Petriho miskách. Následný den se vyhodnotil bakteriální nárůst na Petriho miskách. Další infikovaný otvor v kosti byl vyplněn směsí lokálního nosiče a směsí peptidu vzorců XII a XIII. Zbývající třetí otvor byl pro srovnání vyplněn lokálním nosičem bez peptidu. Jako nosič byl použit komerčně dostupný dvousložkový materiál dodávaný firmou Synthes pod názvem ChronOS Inject. Jeho pevná složka obsahuje fosforečnan vápenatý a aditiva, kapalnou složkou je 0,5% (obj./obj.) roztok kyseliny hyaluronové. Pro přípravu pasty pro vyplnění otvorů bylo použito 200 mg pevné složky nosiče, do něhož bylo vmícháno 8 mg peptidu XII a 4 mg peptidu XIII a poté se do této směsi vmíchala kapalná složka v množství 70 μ l a vše bylo důkladně promícháno (pasta bez peptidu pro srovnávací experiment byla připravena stejným postupem).

Po dvou dnech byly výplně pomocí chirurgické lžičky pečlivě odstraněny a prázdné otvory vytřeny sterilní navlhčenou vatičkou, která byla extrahována do 400 μ l fyziologického roztoku. Ten byl následně ředěn za použití desítkové řady pro kultivaci na agaru.

Výsledek pokusů byl vyhodnocen porovnáním počtu bakteriálních kolonií (CFU/ml) ze stěru z infikovaného otvoru, v nichž působily peptidy XII a XIII uvolněné z nosiče, oproti počtu



kolonií ze stěru z infikovaného otvoru, který byl vyplněn pouze nosičem bez peptidu. V případě kostního štěpu infikovaného *S. aureus* (Motol) byl v otvoru po působení peptidů CFU/ml = $1,7 \times 10^3$ zatímco v otvoru vyplněným pouze nosičem byl CFU/ml = $7,2 \times 10^7$. V případě druhého kostního štěpu infikovaného *S. epidermidis* byly tyto hodnoty pro otvor s peptidy 1×10^2 CFU/ml a pro otvor bez peptidů $3,7 \times 10^7$ CFU/ml. Použité hlavice kostí stehenních byly po deaktivaci infekce v autoklávu likvidovány jako biologický odpad na patologii Fakultní nemocnice Motol.

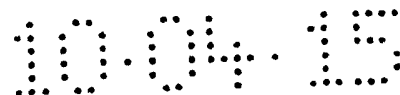
Příklad 9

Stanovení antifungálního účinku peptidů v kombinaci s běžně používaným biocidem ODDC vůči kvasinkám *Candida glabrata*

Kvasinky *C. glabrata* ATCC 2001 byly aerobně kultivovány přes noc při 30°C v YPD médiu (Formedium). Do čerstvého YPD média bylo přidáno takové množství inokula, aby výsledná koncentrace buněk byla $5 \cdot 10^6$ CFU/ml (odpovídající hodnota $OD_{600} = 0,2$). Kvasinky byly dále kultivovány po dobu 4 až 5 h při 30 °C (190 otáček/min), čímž byly získány buňky v rané exponenciální fázi růstu. Kvasinkové buňky byly dvakrát promyty destilovanou vodou (1,5 min, 3000 g) a resuspendovány v MES-TEA pufru (10 mmol.l^{-1} 4-morfolinethan-sulfonová kyselina, pH = 6,0 upravené trietanolaminem; Sigma) na $OD_{600} = 0,2$.

a) Stanovení okamžitého účinku peptidů na buňky kvasinek pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3)

Fluorescenční sonda diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiokarbocyanin jodid; Sigma) byla přidána k buněčným suspenzím (3 ml) v konečné koncentraci $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$. Emisní spektra byla měřena v plastových kyvetách (Kartell) na spektrofluorimetru ISS PC1. Fluorescence byla registrována v oblasti $\lambda_{em} = 560 - 590 \text{ nm}$ při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 531 \text{ nm}$. Rozptýlené záření bylo eliminováno oranžovým skleněným filtrem s mezní vlnovou délkou 540 nm. Antimikrobiální peptidy a ODDC (oktenidindihydrochlorid; Schülke & Mayr) byly přidány ke kvasinkovým suspenzím 10 až 20 minut po fluorescenční sondě. Optimalizace této fluorescenční metody, umožňující měření velkého množství vzorků současně v 96 jamkových destičkách, bude brzy publikována.



Rychlost a rozsah nahromadění sondy uvnitř buněk, tzv. barvicí křivka, popisuje závislost vlnové délky fluorescenčního emisního maxima λ_{\max} nebo intenzity I_{\max} na čase od přidání fluorescenční sondy k buněčné suspenzi [Gášková a spol., 1998].

Účinek testovaných látek byl stanoven na základě porovnání barvicích křivek kontrolních buněk, k nimž nebyla přidána žádná látka, a buněk ovlivněných danou látkou (peptidem či ODDC), viz obr. 1A. Zvýšené barvení buněk vystavených účinku látky vypovídalo o jejich větším poškození, a to ve velmi krátké době.

b) Stanovení letálního účinku peptidů na buňky kvasinek pomocí výsevového testu

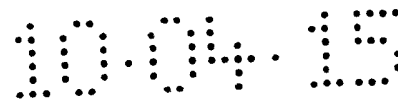
Kvasinky z exponenciální fáze růstu byly dvakrát sterilně promyty destilovanou vodou (1,5 min, 3000 g) a naředěny MES-TEA pufrem na $OD_{600} = 0,2$. Poté byla buněčná suspenze rozdělena po 1 ml do mikrozku mávek typu Eppendorf. Jeden vzorek sloužil jako kontrola, do ostatních vzorků byly přidány zkoumané látky (peptidy, ODDC) o zvolených koncentracích. Buňky byly za občasného míchání inkubovány s danými látkami 15 min, následně byly vzorky stokrát naředěny v destilované vodě a 15 μ l těchto buněčných suspenzí bylo rozetřeno na Petriho misky (průměr 9 cm) s 2 % YPD agarem (Formedium). Vzorky byly vysívány vždy na tři misky. Po 24 h kultivace při 30 °C byl stanoven počet kolonií. Poměr počtu přeživších buněk vystavených účinku testované látky v porovnání s kontrolním vzorkem (CFU) vyjádřený v % vypovídal o letálním účinku zkoumané látky na buňky (neschopnost tvořit kolonie). Výsledek výsevového testu, který je zobrazen na obr. 1B, dokazuje vysoký antifungální účinek peptidu II, jenž je dále zesílený v kombinaci s látkou ODDC.

Průmyslová využitelnost

Praktické použití antimikrobiálních peptidů odvozených od hylaninu bude výhodné především pro léčbu povrchových infekcí a to jak bakteriálních, tak i kvasinkových. Jejich uplatnění se předpokládá například v podiatrii pro léčbu ran, jakými je syndrom diabetické nohy a/nebo bér cové vředy, v ortopedii pro léčbu osteomyelitidy (infekčního onemocnění kostí), kde lokální použití antimikrobiálních peptidů zahrnuje i jejich inkorporaci do lokálních nosičů používaných v ortopedii a prevenci infekce ortopedických implantátů způsobené bakteriálními biofilmy. Dále mohou být tyto peptidy využity v gynekologii jako prostředek proti vaginální infekci způsobené kvasinkami, při léčení infekcí vnějšího zvukovodu (otitis

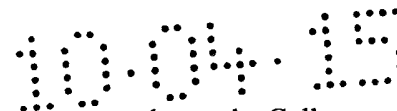


externa), zánětu spojivkového vaku (*conjunctivitis acuta*, *conjunctivitis chronica*), dále pak pro léčení chronických infikovaných ran způsobených popáleninami nebo bojovými zraněními, a to především v případech, kdy tradičně používaná antiseptické prostředky či antibiotika vzhledem k mikrobiální rezistenci selhávají. Tyto infekce je obtížné léčit, neboť jsou ve většině případů komplikovány výskytem biofilmů, uvnitř něhož jsou mikroorganismy v porovnání s planktonickými bakteriemi i kvasinkami až tisícinásobně rezistentní k antimikrobiálním látkám.



Citovaná literatura

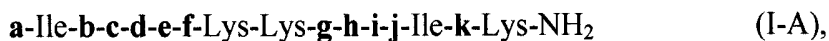
1. Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M. a kolektiv: Mikrobiální biofilmy. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2011
2. Bjarnsholt T.: The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* 121: 1-51 (2013)
3. Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M., Eickhardt-Sørensen S.R., Moser C., Kühl M., Jensen P. Ø., Høiby N.: The *in vivo* biofilm. *Trends Microb.* 21: 466-474 (2013)
4. Zasloff M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395 (2002)
5. Hancock R.E.W., Sahl H.-G.: Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Natur. Biotech.* 24, 1551-1557 (2006)
6. Toke O.: Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infection. *Biopolymers (Peptide Science)* 80, 717-735 (2005)
7. Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S.F.: Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Centr. Eur. J. Biol.* 2, 1-33 (2007)
8. Zaiou M.: Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.* 85, 317-329 (2007)
9. Oyston P.C.F, Fox M.A., Richards S.J., Clark G.C.: Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J. Med. Microb.* 58, 977-987 (2009)
10. Baltzer S.A, Brown M.H.: Antimicrobial peptides – promising alternatives to conventional antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20, 228-235 (2011)
11. Yeung A.T.Y., Gellatly S.L., Hancock R.E.W.: Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life. Sci.* 68, 2161-2176 (2011)
12. Čerovský V.: Antimikrobiální peptidy izolované z hmyzu. *Chem. Listy* 108, 344-353 (2014)
13. Otvos L. Jr.: Antimicrobial peptides isolated from insects. *J. Peptide Sci.* 6, 497-511 (2000)
14. Oren Z., Shai Y.: Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463 (1998)
15. Yeaman M.R., Yount N.Y.: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharm. Rev.* 55, 27-55 (2003)
16. Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J.: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotech.* 29, 464-471 (2011)



17. Kuhn-Nentwig L.: Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2651–2668 (2003)
18. Čeřovský V., Slaninová J., Fučík V., Hulačová H., Borovičková L., Ježek R., Bednářová L.: New potent antimicrobial peptides from the venom of *Polistinae* wasps and their analogs. *Peptides* 29, 992-1003 (2008)
19. Fields G.B, Noble R.L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acid. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 161-214 (1990)
20. Gášková D., Brodská B., Heřman P., Večeř J., Malínský J., Sigler K., Benada O., Plášek J.: Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C₃(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1189-1197 (1998)

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Antimikrobiální peptidy obecného vzorce



v nichž

a je Gly, Lys, β -Ala,

b je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe,

c je Ser, Lys, Arg, Orn,

d je Ser, Lys, Arg, Orn,

e je Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe,

f je Met, Leu, Nle, Ile, Trp, Val, Phe,

g je Leu, Nle, Ile, Trp,

h je Lys, Arg, Orn, Ala,

i je Lys, Arg, Orn, Ala,

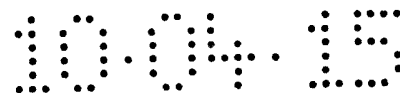
j je Ile, Leu, Nle, His,

k je Lys, Arg, Orn, Ala,

přičemž aminokyseliny v jakékoliv jedné poloze či ve více polohách, nebo ve všech uvedených polohách, mohou být rovněž v konfiguraci D.

2. Antimikrobiální peptidy obecného vzorce I-A podle nároku 1, kterými jsou:

- H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (I),
 H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (II),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (III),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (IV),
 H-Gly-Ile-Nle-Ser-Ser-Leu-Nle-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (V),
 H-Lys-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (VI),
 H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-NH₂ (VII),
 H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-His-Ile-Lys-Lys-NH₂ (VIII),
 H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Lys-Lys-NH₂ (IX),
 H-Gly-Ile-Leu-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (X),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XI),



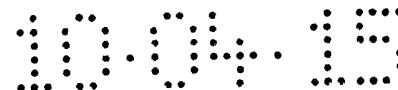
H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIII),
 H-Gly-Ile-Trp-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIV),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Trp-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XV),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Trp-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVI),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Trp-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XVIII),
 H-Gly-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Trp-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Lys-NH₂ (XIX),
 přičemž kurzívou jsou vyznačeny aminokyseliny v konfiguraci D.

3. Peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX podle nároků 1 a 2, pro použití k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznic a infekční onemocnění kostí a okolních tkání, včetně těch infekcí, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

4. Peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX podle nároků 1 a 2, pro použití k prevenci infekce či k odstranění infekčního agens u katetrů, kloubních a kostních náhrad a tmelů a k prevenci infekce ortopedických implantátů.

5. Peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX podle nároků 1 a 2, pro použití ke zvýšení účinku místně působících antibakteriálních léčiv a krycích materiálů používaných k léčení topických infekcí.

6. Peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX podle nároků 1 a 2, pro použití k inkorporaci do lokálních nosičů používaných v ortopedii, zvolených ze skupiny, zahrnující fosforečnan vápenatý, síran vápenatý, bioaktivní sklo, apatit-wollastonitové keramické biosklo, hydrogel, kolagen, kostní štěpy, kostní cement nebo syntetické polymery zvolené z polymethylmetakrylátu, kopolymeru metylmetakrylátu a hydroxyethylmetakrylátu, polyanhydridu, polylaktidu, polyglykolidu, kopolymeru hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu, polyhydroxyalkanoátu, polykaprolaktonu či želatinové houby s glycerinem, nebo z kompozitů složených z polymerů a minerálních nosičů.



7. Peptidy obecného vzorce I-A a vzorců I až XIX podle nároků 1 a 2, pro výrobu léčiva k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznice a infekční onemocnění kostí a okolních tkání.

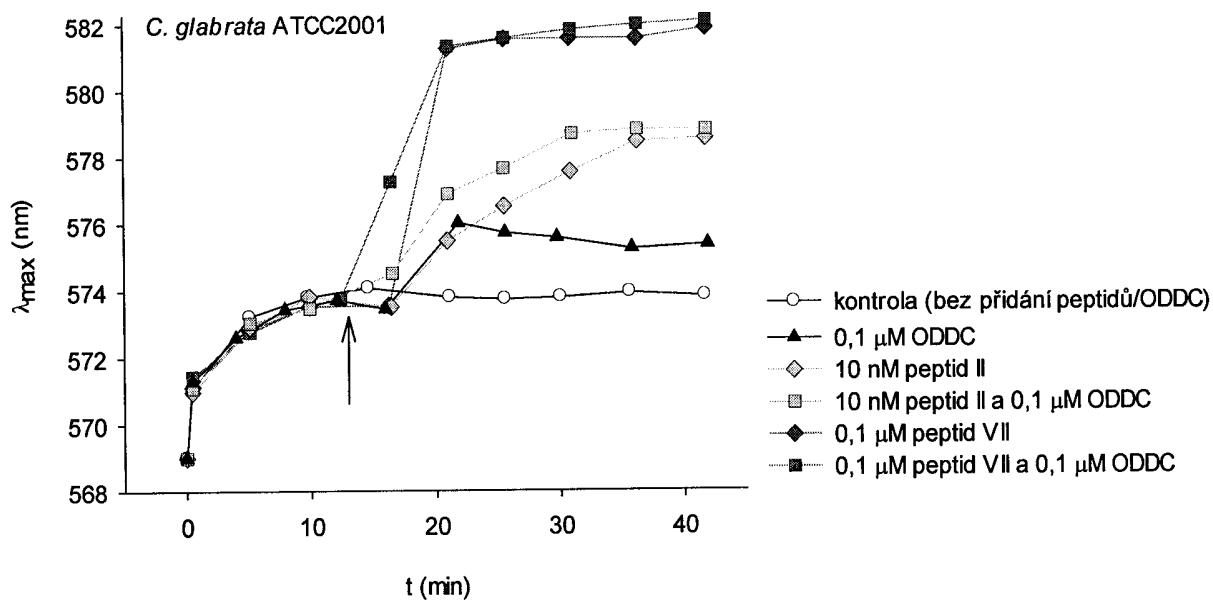
8. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje terapeuticky účinné množství alespoň jednoho peptidu obecného vzorce I-A a/nebo vzorce I až XIX podle nároků 1 a 2, případně druhou aktivní složku, již je antibiotikum či antifungální agens a/nebo desinfekční činidlo, popřípadě také alespoň jeden farmaceuticky přijatelný krycí materiál, nosič, plnivo a/nebo ředidlo.

9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8 pro použití k léčení nebo prevenci infekcí, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

10. Farmaceutický prostředek podle nároku 9, pro použití k léčení nebo prevenci topických infekcí zvolených ze skupiny, zahrnující obtížně se hojící rány a kožní defekty, infekce sliznice a infekční onemocnění kostí a okolních tkání, a k prevenci infekčních komplikací po implantaci kloubních náhrad a po osteosyntézách, včetně těch infekcí, jejichž příčinou je tvorba mikrobiálních biofilmů.

11. Desinfekční prostředek vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I-A podle nároku 1 nebo peptid vzorce I až XIX podle nároku 2.

Obr. 1A



Obr. 1B

