

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

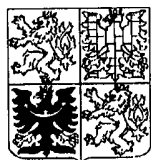
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1591-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.11.95,**
17.05.96, 01.08.96, 21.11.96

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/562346, 96/649811,**
96/690921, 96/752852

(33) Země priority: **US, US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 10. 98**
(Věstník č. 10/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/18544**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/18826**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

A 61 K	38/03
A 61 K	38/04
A 61 K	38/16
C 07 K	4/00
C 07 K	7/00
C 07 K	14/00
C 12 N	15/00
C 12 N	15/12
C 12 N	15/63

(71) Přihlášovatel:

INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS, INC.,
Sunnyvale, CA, US;
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, Oakland, CA, US;

(72) Původce:

Chang Conway C., San Francisco, CA, US;
Gu Chee Liang, Saratoga, CA, US;
Chen Jie, Belmont, CA, US;
Steinberg Deborah A., Saratoga, CA, US;
Lehrer Robert I., Santa Monica, CA, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Peptid s antimikrobiálním účinkem
a farmaceutický prostředek

(57) Anotace:

Antimikrobiální peptidy, které jsou příbuzné s
přirozeně se vyskytujícími protegrinovými
peptidy a způsoby použití těchto peptidů pro
různé účely, což zahrnuje léčbu a prevenci
infekcí.

CZ 1591-98 A3

Antimikrobiální peptid příbuzný protegrínům

Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti antimikrobiálních peptidů. Vynález zvláště zahrnuje krátké peptidy, které se označují jako "protegriny", což jsou peptidy vykazující široké rozmezí antimikrobiálních aktivit.

Dosavadní stav techniky

Jeden z obraných mechanismů při infekci, který se objevuje jak u zvířat tak i u rostlin, je produkce peptidů, které vykazují antimikrobiální a antivirovou aktivitu. Různé třídy těchto peptidů se izolovaly z tkání rostlin i zvířat. Příhláška PCT WO 95/03325 (publikována 2. února 1995) obsahuje přehled literatury, kde se popisuje tento problém. Mezi takové peptidy patří tachyplaziny, které obsahují 17 až 18 aminokyselin z toho čtyři neměnné cysteiny, defenziny, β -defenziny a insekticidové defenziny, které jsou o něco delší peptidy a jsou charakterizovány šesti neměnnými cysteiny, dále antifungicidní a antibakteriální peptidy a proteiny, které se našly v rostlinách.

Vynález popisuje novou třídu antimikrobiálních peptidů, označených jako "protegriny". Reprezentanti této třídy se izolovaly s prasečích leukocytů. Protegrinové peptidy, které jsou obecně v přírodě amfifilní, vykazují rozsáhlé spektrum antimikrobiální aktivity. Pak jsou tyto peptidy použitelné jako antibakteriální, antihoubové a antivirové činidla u rostlin a zvířat.

Izolace některých protegrinových peptidů podle vynálezu se zmiňuje publikace Kokryakov, V.N. et al., 1993, FEBS Lett 337: 231-236 (červencové číslo). Pozdější publikace této skupiny popisovala přítomnost nové protegrinové sekvence a sekvence jeho prekurzoru se odvodila z izolovaného klónu cDNA

(Zhao, C. et al., 1994, FEBS Lett 346: 285-288). Další článek (Mirgorodskaya, O.A. et al., 1993, FEBS Lett 330: 339-342) popisuje kationtové peptidy z prasečích neutrofilů. Publikace Storici et al., 1993, Biochem Biophys Res Comm 196: 1363-1367 popisuje izolaci sekvence DNA, která kóduje antimikrobiální peptid prasečích leukocytů prosekvencí, která je podobná kathelinu. Uvádí se, že tento peptid je jeden z protegrinů popsanych dále v textu. Další publikace, které se týkají protegrinů jsou Harwing, S.S.L., et al., 1995, J- Peptide Sci 3:207, Zhao, C. et al., 1995, FEBS Lett 376: 130-134; Zhao, C. et al., 1995, FEBS Lett 368: 197-202; Miyakawa, Y et al., 1996, Infect Immun 64: 926-932; Yasin, B et al., 1996, Infect Immun 64: 709-713; Qu, X-D et al., 1996, Infect Immun 64: 1240-1245; Aumels, A et al., 1996, Eur J. Biochem 237: 575-583; Mangoni, M.E. et al., 1996, FEBS Lett 383: 93-98; Steinberg et al., 1996, "Protegrins: Fast Acting Bacterial Peptides," předneseno na 8th Intl. Symposium on Staphylococci a Staphylococcal Infections,, Aix les Bains, France, červen 23 až 26, 1996; Steinberg et al., 1996, "Broad Spectrum Antimicrobial Activity of Protegrin Peptides," přednesené na 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy, New Orelans, LA, September 15-18, 1996; Kung et al., 1996, "Protegrins Protects Mice from Systemic Infection By Antibiotic-Resistant Pathogens," uveřejněno na 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy, New Orelans, LA, September 15-18, 1996; a Steinberg et al., 1996, "In Vitro Efficacy of Protegrins Against *Helicobacter Pylori*," uveřejněno na 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy, New Orelans, LA, September 15-18, 1996;

Zjistilo se, že protegriny se váží na endotoxiny, to je lipopolysacharidové kompozice (LPS) odvozené od gram negativních bakterií, které jsou pravděpodobně odpovědné za

gram-negativní sepsi. Protegriny jsou také účinné při inhibici růstu organismů, které jsou spojené s pohlavně přenosnými nemocemi, jako je *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae*.

Vynález popisuje novou sadu protegrinů, které nabízejí vlastnosti rychle působících mikrobicidů s širokým spektrem aktivity a s málo pravděpodobnou rezistencí. Třída protegrinů podle vynálezu nabízí možnost nastavení spektra aktivity s ohledem na nejúčinnější inhibici typu mikróba nebo viru a s ohledem na podmínky, při kterých tato inhibice probíhá. Protegriny se v tomto případě liší od protegrinů předchozích přihlášek buď delecí nejméně jedné ze čtyř aminokyselin N-konce nebo delecí jiných označených zbytků a/nebo nahrazením určitých aminokyselin aminokyselinami z jiných tříd.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje antimikrobiální peptidy obsahující přibližně 10 až 30 aminokyselinových zbytků, které jsou charakterizovány tím, že struktura core má dva hlavní elementy: reverzní ohyb uzavřený dvěma řetězci, které tvoří antiparalelní β -list (β -sheet). Obecně oblast β -listu molekuly je amfifilická, jeden povrch má charakter čistě hydrofóbní a druhý má charakter čistě hydrofilní. Peptidy obsahují v oblasti reverzního ohybu nejméně jeden bazický aminokyselinový zbytek a jejich náboj při hodnotě fyziologického pH je nejméně +1. N-konec antimikrobiálních peptidů může být acylován a/nebo C-konec peptidů může být amidován nebo esterifikován a může obsahovat žádný, jeden nebo dva disulfidové můstky.

V jednom názorném provedení vynálezu se popisují antimikrobiální peptidy, které obsahují přibližně 10 až 30 aminokyselinových zbytků a obsahují aminokyselinovou sekvenci:

(I) $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 C_6 X_7 C_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} C_{13} X_{14} C_{15} X_{16} X_{17} X_{18}$

nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu s acetylovaným N-koncem nebo amidovaným nebo estrifikovaným C-koncem, kde:

každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle podobný cysteinu, je bazický, malý, polární/velký nebo hydrofóbní;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle aminokyselina podobná cysteinu, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní;

každý z X_1 až X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, polární/velká nebo malá aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní nebo malá aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen;

X_9 až X_{12} dohromady jsou schopny vytvořit reverzní ohyb, jestliže jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci vzorce (I) a nejméně jeden z X_9 až X_{12} musí být bazická aminokyselina;

každý z X_{16} až X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

a kde nejméně okolo 15% až 50% aminokyselin, které jsou obsaženy v antimikrobiálním peptidu, je bazických, přičemž antimikrobiální peptid má při hodnotě fyziologického pH čistý náboj nejméně +1.

Peptidy podle vynálezu vykazují široké spektrum antimikrobiální aktivity. Působí jako biocid vůči velkému množství mikrobiálních cílů, mezi něž patří gram-pozitivní bakterie, gram-negativní bakterie, kvasinky, houby a protozoa. Peptidy v podstatě mají široký rozsah aplikace jako antibakteriální činidla. Peptidy se například mohou použít k

ochraně a dezinfekci řady materiálů, které zahrnují lékařské nástroje, potraviny, kosmetiku, roztoky pro kontaktní čočky, léky nebo jiné materiály, které obsahují nutrienty. Peptidy je možné také použít za účelem profylaxe nebo léčby mikrobiálních infekcí nebo onemocnění rostlin a zvířat.

Vynález dále popisuje rekombinantní materiály použitelné při produkci jistých peptidů podle vynálezu, podobně jsou použitelné při produkci rostlin nebo zvířat, které jsou modifikovány tak, že obsahují expresivní systémy vhodné pro produkci těchto peptidů.

Vynález dále uvádí farmaceutické kompozice a kompozice vhodné pro aplikaci na rostliny, které obsahují jako aktivní ingredience peptidy podle vynálezu, nebo kompozice, které obsahují expresivní systémy vhodné pro produkci peptidů nebo pro *in situ* expresi nukleotidové sekvence kódující tyto peptidy.

Vynález dále popisuje způsoby syntetické přípravy peptidů podle vynálezu, protilátky specifické k těmto peptidům a použití peptidů jako konzervačních činidel.

Vynález dále popisuje způsoby použití shora popsaných peptidů nebo jejich kompozic za účelem inhibice mikrobiálního růstu. Způsob obecně zahrnuje kontakt mikroba s antimikrobiálně účinným množstvím jednoho nebo více peptidů nebo kompozic podle vynálezu. V preferovaném provedení vynálezu je bakterie v kontaktu s bakteriocidně účinným množstvím peptidu nebo kompozice.

K takovým onemocněním nebo infekcím patří infekce očí, jako je zánět spojivek a keratitida, korneální vředy, žaludeční vředy, které se spojují s bakteriemi *H. pylori*, pohlavně přenosné nemoci (STD) a gram negativní sepe. Klinicky relevantní infekce, kterým se může předcházet nebo se mohou léčit peptidy podle vynálezu zahrnují systematické infekce, které jsou způsobeny patogeny rezistentními na

několik léků, jako jsou bakterie *Enterococcus faecium* s rezistencí na vankomycin, *Staphylococcus aureus* s rezistencí na methicilin a *Streptococcus pneumoniae* s rezistencí na penicilin.

Definice

Termín "sekundární struktura" znamená pravidelnou lokální strukturu segmentů polypeptidových řetězců. Zahrnuje, ale není omezena na dvoušroubovice, jako jsou α -helixy prodloužené řetězce, jako jsou β -řetězce a listy prodloužených řetězců, jako jsou β -listy.

Termín "antiparalelní β -list" znamená sekundární strukturu polypeptidového řetězce charakterizovanou intermolekulárním vodíkovým spojením hlavních antiparalelních řetězců peptidů. Antiparalelní β -list může obsahovat jedno nebo dva vnitrořetěžeťové disulfidové spojení.

Termín "amfifilický antiparalelní β -list" znamená antiparalelní β -list, kde jeden povrch má čistě hydrofóbní charakter a druhý povrch má čistě hydrofilní charakter.

Termín "reverzní ohyb" charakterizuje sekundární strukturu, kde jsou spojeny přilehlé řetězce antiparalelního β -listu. Reverzní ohyb je tvořen segmentem, který obsahuje dva až čtyři aminokyselinové zbytky a který obrací směr polypeptidového řetězce, což umožňuje jednotlivému polypeptidovému řetězci, aby přijmul antiparalelní konformaci β -listu. Takové peptidové segmenty jsou v oboru dobře známy a zahrnují například γ -ohyby tvořené třemi aminokyselinovými zbytky (Rose et al., 1985, Adv. Protein Chem. 37: 1-109; Wilmer-White et al., 1987, Trends Biochem. Sci. 12: 189-192; Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203: 221-232; Sibanda et al., 1989, J. Mol. Biol. 206: 759-777; Tramontano et al., 1989,

Proteins: Struct. Funct. Genet. 6: 382-394) a β -ohyby tvořené čtyřmi aminokyselinovými zbytky, jak se popisuje dále v textu.

Termín " β -ohyb" znamená podtřidu reverzních ohybů. β -ohyb je peptidový segment tvořený čtyřmi aminokyselinovými zbytky, který obrací směr polypeptidového řetězce tak, že umožňuje jednotlivému polypeptidovému řetězci přijmout sekundární strukturu β -listu. Dva vnitřní aminokyselinové zbytky β -ohybu nejsou zahrnuty do vodíkového spojení β -listu; Dva aminokyselinové zbytky na každé straně interních zbytků jsou zahrnuty do vodíkového spojení β -listu. Termín " β -ohyb" zahrnuje všechny typy peptidových β -ohybů, které jsou běžně známy v oboru např. typ-I, typ-II, typ-III, typ-I', typ-II' a typ-III' β -ohybů (Rose et al., 1985, Adv. Protein Chem. 37: 1-109; Wilmer-White et al., 1987, Trends Biochem. Sci. 12: 189-192; Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203: 221-232; Sibanda et al., 1989, J. Mol. Biol. 206: 759-777; Tramontano et al., 1989, Proteins: Struct. Funct. Genet. 6: 382-394).

Termín "antimikrobiálně účinné množství" znamená množství peptidu (nebo jeho kompozice), které působí biostaticky nebo biocidně proti cílovému mikrobu. Lépe řečeno Termín antimikrobiálně účinné množství peptidu znamená množství peptidu, které inhibuje růst cílového mikrobu nebo je pro něj smrtící.

Termín "terapeuticky účinné množství" znamená množství peptidu (nebo jeho kompozice), které je účinné pro zlepšení symptomů mikrobiální infekce nebo pro léčbu či prevenci mikrobiálních infekcí nebo onemocnění u rostlin i zvířat.

Termín "farmaceuticky přijatelná sůl" znamená ty sole, které v podstatě udržují antimikrobiální aktivitu volných bází a které se získaly reakcí s anorganickými kyselinami.

Popis preferovaných provedení vynálezu

Vynález popisuje protegrinové peptidy, které mají antimikrobiální aktivitu, kompozice, které obsahují tyto peptidy, způsoby použití peptidů (nebo jejich kompozic) při inhibici širokého škály mikrobiálních cílů nebo při jejich usmrcení, způsoby použití peptidů (nebo jejich kompozic) při léčbě nebo prevenci mikrobiálních infekcí a nemocí rostlin a zvířat.

Peptidy podle vynálezu vykazují široké spektrum antimikrobiální aktivity, působí biostaticky a biocidně proti širokému škále mikrobiálních cílů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na gram-pozitivní bakterie, jako jsou *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis* (zahrnujíc kmeny citlivé (VSEF) a rezistentní (VREF) na vankomycin), *E. faecium* (zahrnujíc kmeny citlivé (VSEF) a rezistentní (VREF) na vankomycin), *S. aureus* (zahrnujíc kmeny citlivé (MSSA) a rezistentní (MRSA) na methicilin), *S. epidermis* zahrnujíc kmeny citlivé (MSSE) a rezistentní (MRSE) na methicilin), *S. salivarius*, *C. minutissium*, *C. pseudodiphtheriate*, *C. stratum*, *Corynebacterium* skupina G1, *Corynebacterium* skupina G2, *S. pneumoniae* (zahrnujíc kmeny rezistentní (MRSA) na penicilín), *S. mitis* a *S. sanguis*; na gram-negativní bakterie zahrnujíc *A. calcoaceticus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *H. influenza*, *Moraxella* sp., *N. meningitidis*, *S. typhimurium*, *H. pylori*, *H. felis* a *C. jejuni*; na protozoa, kvasinky a jisté kmeny virů a retrovirů. V podstatě zde popsané peptidy působí biostaticky nebo biocidně na klinicky relevantní patogeny, které vykazují rezistenci na řadu léků. Mezi jinými do této skupiny patří na vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* nebo *faecium* ("VRE"), na penicilín rezistentní *Streptococcus pneumoniae*

("PRSP") a na methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ("MRSA").

Peptidy podle vynálezu (nebo jejich kompozice) se mohou použít jako biocidní nebo biostatická činidla při různých aplikacích. Například peptidy se mohou použít pro dezinfekci nebo prevenci různých materiálů které zahrnují lékařské nástroje, potraviny, kosmetiku, roztoky pro kontaktní čočky, léky nebo jiné materiály, které obsahují nutrienty. Peptidy podle vynálezu se mohou použít jako bakteriostatické nebo bakteriocidní činidla pro patogeny, které jsou rezistentní na řadu léků. Jsou to například VRE, MRSA a MSSE.

Peptidy podle vynálezu nebo jejich kompozice jsou také použitelné pro profylaxi nebo léčbu mikrobiálních infekcí a onemocnění u rostlin a zvířat. Taková onemocnění zahrnují, ale nejsou omezena na gram-negativní a gram-pozitivní bakteriální infekce, endokarditidy, pneumonie a jiné respirační infekce, infekce močových cest, systémová kandidóza, orální mukositida, atd.

Zde popsané peptidy vykazují podstatné výhody ve srovnání s tradičními antibiotiky a/nebo s jinými antimikrobiálními peptidy. Například zde popsané peptidy jsou příbuzné antimikrobiálním peptidům, které byly nalezeny u zvířat. Věřící se, že relativně vysoký výskyt rezistence na tradiční antibiotika nebude aktuální pro zde popsané peptidy.

Určitá výhoda některých protegrinů podle vynálezu, zvláště "mini-protegrinové" formy, které mají méně než 18 aminokyselin, je v jejich redukované velikosti. Jejich produkce je méně nákladná, očekává se, že budou lépe distribuovány tkání a jsou méně imonogenní.

Peptidy

Protegrinové peptidy podle vynálezu obecně zahrnují aminokyselinovou sekvenci:

(I) $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 C_6 X_7 C_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} C_{13} X_{14} C_{15} X_{16} X_{17} X_{18}$

a její definované modifikované formy. Tyto peptidy, které se mohou náhodně objevit v přírodě, musí být v čištěné a/nebo izolované formě nebo synteticky nebo rekombinantně připravené.

Označení X_n v každém případě znamená aminokyselinu se specifikovanou pozicí v peptidu. Podobně označení C_n znamená aminokyselinu se specifickovanou pozicí a dále reprezentuje tyto pozice v aminokyselinové sekvenci vzorce (I), která může obsahovat aminokyselinové zbytky schopné tvořit disulfidové vnitřní spojení.

Aminokyselinovými zbytky označenými X_n nebo C_n mohou být geneticky kódované L-aminokyseliny, přirozeně se vyskytující negeneticky kódované L-aminokyseliny, syntetické L-aminokyseliny nebo D-enantioméry všech shora uvedených aminokyselin. Označení dvaceti geneticky kódovaných L-aminokyselin a běžných nekódovaných aminokyslin je běžné a následuje:

Zkratky běžných aminokyselin

aminokyselina	jednopísmený symbol	běžně užívaná zkratka
alanin	A	Ala
arginin	R	Arg
asparagin	N	Asn
aspartová kyselina	D	Asp
cystein	C	Cys
glutamin	Q	Gln
glutamová kyselina	E	Glu
glycin	G	Gly
histidin	H	His
izoleucin	I	Ile
leucin	L	Leu
lyzin	K	Lys
metionin	M	Met
fenylalanin	F	Phe
prolin	P	Pro
serin	S	Ser
treonin	T	Thr
tryptofan	W	Trp
tyrozin	Y	Tyr
valin	V	Val
ornitin	O	Orn
β -alanin		bAla
2,3-diaminopropionová kyselina		Dpr
α -aminoizobutyrová kyselina		Aib
N-metylglycin (sarkozin)		MeGly
citrulin		Cit
t-butylalanin		t-BuA

t-butylglycin		t-BuG
N-metylizoleucin		MeIle
fenylglycin		Phg
cyklohexylalanin		Cha
norleucin		Nle
1-naftylalanin		1-Nal
2-naftylalanin		2-Nal
4-chlorofenylalanin		Phe (4-Cl)
2-fluorofenylalanin		Phe (2-F)
3-fluorofenylalanin		Phe (3-F)
4-fluorofenylalanin		Phe (4-F)
penicilamin		Pen
1,2,3,4-tetrahydroizoquinolin-3-karboxylová kyselina		Tic
β -2-tienylalanin		Thi
metioninsulfoxid		MSO
homoarginin		Har
N-acetyllyzin		AcLys
2,4-diaminobutyrová kyselina		Dbu
p-aminofenylalanin		Phe (pNH ₂)
N-metylvalin		MeVal
homocystein		hCys
homoserin		hSer
ϵ -aminohexanová kyselina		Aha
δ -aminovalerová kyselina		Ava
2,3-diaminobutyrová kyselina		Dab
hydroxyprolin		Hyp
parabenzylfenylalanin		Pba
homofenylalanin		hPhe
N-metylfenylalanin		MePhe

Látky podle vynálezu jsou peptidy, které jsou částečně definovány termínem aminokyselinové zbytky určených tříd.

Aminokyselinové zbytky se mohou obecně klasifikovat do hlavních podtříd:

Kyselé: zbytek má negativní náboj, což je způsobeno ztrátou iontu H^+ při hodnotě fyziologického pH a zbytek je přitahován vodným roztokem tak, že hledá povrchové pozice v konformaci peptidu, ve kterém je obsažen, jestliže peptid je ve vodném médiu při fyziologickém pH.

Bazické: zbytek má pozitivní náboj, což je způsobeno asociací s iontem H^+ při fyziologické hodnotě pH a zbytek je přitahován vodným roztokem tak, že hledá povrchové pozice v konformaci peptidu, ve kterém je obsažen, jestliže je peptid ve vodném médiu při fyziologickém pH.

Hydrofóbní: Zbytky nejsou při hodnotě fyziologického pH nabity a zbytek je odpuzován vodným roztokem tak, že hledá vnitřní pozice v konformaci peptidu, ve kterém je obsažen, jestliže je peptid ve vodném médiu.

Polární/velké: zbytky nejsou nabity při hodnotě fyziologického pH, ale zbytek není dostatečně odpuzován vodnými roztoky tak, že musí hledat vnitřní pozici v konformaci peptidu, ve kterém je obsažen, jestliže peptid je ve vodném médiu. V závislosti na podmínkách a zbývajících aminokyselinách v sekvenci zbytek může ležet ve vnitřním prostoru nebo na povrchu proteinu.

Podobné cysteinu: zbytky mají postranní řetězec, který je schopný participovat na disulfidickém spojení. Pak aminokyseliny podobné cysteinu mají obecně postranní řetězec, který obsahuje nejméně jednu thiolovou skupinu (SH), jako je cystein, homocystein, penicilinamin, atd, preferuje se cystein.

Malé: jisté neutrální aminokyseliny mají postranní řetězec, které nejsou dostatečně velké, dokonce jestliže chybí polární skupina, aby byly hydrofóbní. "Malé" aminokyseliny jsou ty, které obsahují čtyři nebo méně uhlíků

v případě, že postranní řetězec obsahuje nejméně jednu polární skupinu, a tři a méně uhlíků, jestliže polární skupiny nejsou přítomny.

Genem kódovaná sekundární aminokyselina prolin (stejně jako iminokyseliny podobné prolinu, jako jsou 3-hydroxyprolin a 4-hydroxyprolin), je známa, že působí na sekundární konformaci peptidových řetězců a není proto zahrnuta do skupiny.

Samozřejmě se rozumí, že ve statistické sbírce jednotlivých zbytků některé molekuly budou vykazovat náboj a některé tento náboj mít nebudou a budou v menším nebo větším rozsahu existovat přitažlivé nebo odpudivé síly vůči vodnému médiu. Pojem "nabitý" se definuje jako podstatné procento (nejméně okolo 25%) jednotlivých molekul, které nesou náboj ve fyziologickém pH. Stupeň přitahování a odpuzování je nutný pro klasifikaci polaritu a proto speciálně aminokyseliny, které jsou zahrnuty ve vynálezu se klasifikují jako polární nebo nepolární. Většina aminokyselin, které nejsou specificky pojmenovány, se mohou klasifikovat na základě chování.

Aminokyselinové zbytky se mohou dále rozdělovat do podskupin jako cyklické nebo necyklické a aromatické nebo nearomatické, samovysvětlující klasifikace s ohledem na substituční skupiny zbytků vedlejšího řetězce.

Jisté běžné aminokyseliny, které může obsahovat peptid podle vynálezu, nejsou geneticky kódovány. Mezi tyto aminokyseliny patří, ale nejsou na ně omezeny β -alanin (b-Ala) a jiné omega.aminokyseliny, jako 3-aminopropionová kyselina, 2,3-diaminopropionová kyselina (Dpr), 4-aminobutanová kyselina a další; α -aminoizobutylová kyselina (Aib); ϵ -aminohexanová kyselina (Aha); δ -aminovalerová kyselina (Ava); N-metylalaglycin nebo sarkozin (MeGly); ornitin (Orn); citrulin (Cit); t-butylalanin (t-BuA); t-butylglycin (t-BuG); N-metylizoleucin (MeIle); fenylglycin (Phg);

cyklohexylalanin (Cha); norleucin (Nle); 1-naftylalanin (1-Nal); 2-naftylalanin (2-Nal); 4-chlorofenylalanin (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenylalanin (Phe(2-F)); 3-fluorofenylalanin (Phe(3-F)); 4-fluorofenylalanin (Phe(4-F)); penicilamin (Pen); 1,2,3,4-tetrahydroizoquinolin-3-karboxylová kyselina (Tic); β -2-thienylalanin (Thi); sulfoxid methioninu (MSO); homoarginin (Har); N-acetyllyzin (AcLys); 2,3-diaminobutylová kyselina (Dab); 2,4-diaminobutylová kyselina (Dbu); p-aminofenylalanin (Phe(pNH₂)); N-metylvalín⁻ (MeVal); homocystein (hCys); hydroxyprolin (Hyp); parabenzylfenylalanin (Pba); Homofenylalanin (hPhe); N-metylfenylalanin (MePhe); a homoserin (hSer). Tyto aminokyseliny také spadají do shora definovaných kategorií.

Klasifikace shora popsaných geneticky kódovaných a nekódovaných aminokyselin je uvedena v tabulce č. 1 dále v textu. Rozumí se, že je zde uvedena pouze pro názornost a neznamená seznam vešech kyselin, které jsou obsaženy ve zde popsaných peptidech.

Tabulka č. 1

Klasifikace aminokyselin

klasifikace	geneticky kódované	nejsou geneticky kódované
hydrofóbní	T, V, I, L, M, F, W	Phg, 1-Nal, 2-Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), t-BuA, t-BuG, MeIle, Nle, MeVal, Cha, hPhe, MePhe, Pba Dpr, Orn, hArg,
kyselé	D, E	Phe(p-NH ₂), Dbu, Dab

bazické	H, K, R	Cit, AcLys, MSO
polární/velké	Q, N	bAla, MeGly, Aib,
malé	G, S, A, T	hSer
podobné cysteinu	C	Pen, hCys

V peptidu vzorce (I) symbol "-" mezi aminokyselinovými zbytky X_n a/nebo C_n obecně označuje interspojení hlavního řetězce. Symbol "-" obvykle značí amidové spojení ($-C(O)-NH$). Rozumí se, že ve všech peptidech podle vynálezu se může jeden nebo více amidových spojení nahradit spojením, které je jiné než amidové. Mezi taková spojení patří, ale nejsou omezena $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (cis a trans forma), $-C(O)CH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ a $-CH_2SO-$.

Peptidy mající takové spojení a způsoby přípravy takových peptidů jsou dobře známa v oboru (Spatola, 1983, Vega Data 1(3) (obecné review); Spatola, 1983, "Peptide Backbone Modifications" In: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids and Proteins (Weinstein, ed.), Marcel Dekker, New York, p. 267 (obecné review); Morley, 1980, Trends Pharm. Sci. 1: 463-468; Hudson et al., 1979, Int. J. Prot. Res. 14: 177-185 ($-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2-$); Spatola et al., 1986, Life Sci. 38: 1243-1249 ($-CH_2-S$); Hann, 1982, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1: 307-314 ($-CH=CH-$, cis a trans forma); Almgvist., et al., 1980, J. Med. Chem. 23: 1392-1398 ($-COCH_2-$); Jennings-White et al., Tetrahedron. Lett. 23: 2533 ($-COCH_2-$); European Patent Application EP 45665 (1982) CA:97: 39405 ($-CH(OH)CH_2-$); Holladay et al., 1983, Tetrahedron Lett. 24: 4401-4404 ($-C(OH)CH_2$); a Hruby, 1982, Life Sci. 31: 189-199 ($-CH_2-S$)).

Peptidy podle vynálezu obsahují okolo 10 až 30 aminokyselinových zbytků. Rozumí se, že ačkoli vzorec (I)

znázorňuje 18 specifikovaných pozic aminokyselin obsahující peptidovou strukturu "core", peptidy podle vynálezu mohou obsahovat více nebo méně aminokyselin bez působení delece a v některých případech to dokonce zesiluje antimikrobiální nebo jiné použitelné vlastnosti peptidů. V případě peptidů, které obsahují méně než 18 aminokyselinových zbytků, se v peptidové sekvenci nenachází jisté specifikované aminokyseliny, jak se diskutuje detailněji dále v textu.

V případě peptidů, které obsahují více než 18 aminokyselinových zbytků, aminokyselinová skevence, která je zobrazena vzorcem (I), může obsahovat prodloužení na N- a/nebo C-konci o aminokyselinové zbytky nebo peptidové sekvence. Rozumí se, že takové přidané aminokyselinové zbytky nebo peptidové sekvence neinterferují v tom, že budou poškozovat antimikrobiální aktivitu peptidu, což se srovnává s přirozeně se vyskytujícími protegriny.

Peptidy podle vynálezu jsou charakterizovány strukturou "core", která obsahuje dva hlavní elementy nebo motivy: oblast reverzní smyčky, která je vymezena dvěma řetězci, které tvoří antiparalelní β -list. Věřící se, že antimikrobiální aktivita látek vzorce (I) je částečně spojena s takovou jadernou strukturou.

Oblast β -listu peptidů obsahuje N-řetězec (zbytky X_1 až C_8) a C-řetězec (zbytky C_{13} až X_{18}). Řetězce N a C jsou navzájem uspořádány antiparalelně jsou k sobě spojeny kovalentně přes vodíkové můstky hlavních řetězců (v publikaci Creighton, 1993, Protein Structures and Molecular Properties, W.H. Freeman and Co., NY a v jiné zde citované literatuře se detailně popisuje struktura β -listů). Věřící se, že většina důležitých zbytků, které jsou obsaženy v oblasti β -listu jsou zbytky X_5 až C_8 a X_{13} až C_{16} .

Oblast β -listu peptidů je přednostně amfifilická, to znamená na povrchu β -listu má čistě hydrofóbní charakter a jiný povrch má čistě hydrofóbní charakter. S odvoláním na strukturu β -listu zobrazeného na obrázku č. 6 vedlejší řetězce L-aminokyselinových zbytků, které leží jeden těsně vedle druhého (zbytky n , $n+1$, $n+2$, atd) uvnitř řetězce v opačných směrech tak, že jsou umístěny na opačných površích β -listu. Boční řetězce L-aminokyselinových zbytků, které leží uvnitř řetězce jeden vedle druhého (zbytky n a c , $n+1$ a $c+1$, atd) ve stejném směru tak, že se nacházejí na stejném povrchu β -listu. Používajíc tento obecný strukturální motiv amfifilického antiparalelního β -listu se získalo selekcí aminokyselin v každé pozici zbytku, což vede k β -listu, který má hydrofóbní vedlejší řetězce umístěny na jednom povrchu listu a hydrofilní boční řetězce jsou umístěné na druhém povrchu listu.

Samozřejmě je vhodné, aby povrchy amfifilické antiparalelní oblasti β -listu měly pouze čistě hydrofóbní nebo čistě hydrofilní charakter, každý vedlejší řetězec obsahující určitý povrch nepotřebuje být hydrofóbní nebo hydrofilní. Povrchy mohou obsahovat vedlejší řetězce, které podstatně nemění charakter povrchu. Například hydrofóbní nebo hydrofilní povrchy mohou obsahovat malé aminokyselinové boční řetězce, přičemž tyto vedlejší řetězce podstatně neovlivňují charakter povrchu.

Oblast β -listu peptidů vzorce (I) může obsahovat od jednoho do čtyř aminokyselin podobných cysteinu, které jsou označeny C_6 , C_8 , C_{13} a C_{15} , které se mohou podílet disulfidických vazbách mezi řetězcí. Peptidy podle vynálezu obsahují nejméně dva aminokyselinové zbytky podobné cysteinu, které mohou být ve formě rovného řetězce nebo ve formě kruhu v závislosti na rozsahu formace disulfidických vazeb.

Cyklické formy jsou výsledkem formace disulfidických spojení mezi všemi nebo několika ze čtyř variant aminokyselin podobných cysteinu. Cyklické formy podle vynálezu zahrnují všechny možné permutace formací disulfidových vazeb. Formy přímého řetězce mohou přejít na cyklickou formu a obráceně. Způsoby tvorby disulfidových můstků za účelem vytvoření cyklických forem jsou dobře známy v oboru stejně jako způsoby redukce disulfidů za účelem vytvoření lineárních látek.

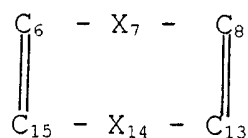
Přirozeně se vyskytující protegriny (PG-1 až PG-5) obsahují dvě disulfidové vazby; jedna je mezi cysteiny C₆-C₁₅ a další je mezi cysteiny C₈-C₁₃ (Harwing et al., 1995, J. Peptide Sci. 3: 207). V tomto provedení vynálezu, které má dva disulfidové můstky, se preferuje forma cysteiny C₆-C₁₅ a C₈-C₁₃. Takové peptidy se označují jako nativní formy. Zjistilo se však, že formy protegrinů obsahující pouze jednu disulfidovou vazbu jsou aktivní a jednoduše se připravují. Preferovaná provedení mají pouze jednu disulfidickou vazbu a jsou to ta, která jsou reprezentována samotným C₆-C₁₅ a samotným C₈-C₁₃.

Formy obsahující disulfid C₆-C₁₅, jako jediné disulfidické spojení jsou obecně označeny "bullet" formy protegrinů; ty formy, kde jediný disulfid je C₈-C₁₃ jsou označeny jako "kite" formy. Formy "bullet" a "kite" se většinou běžně připravují záměnou každého aminokyselinového zbytku podobnému cysteinu v pozicích, které nejsou zahrnuty v disulfidickém spojení s aminokyselinami, které se nepodílí na disulfidických vazbách, přednostně s malými aminokyselinami, jako je glycin, serin, alanin nebo treonin. V jiném případě nemusí být přítomen C₈ a/nebo C₁₃.

Jako linearizované nebo "snake" formy nativních peptidů mají významné aktivity peptidy podle vynálezu, které zahrnují linearizované formy, přičemž sulfhydrylové skupiny (SH) jsou chemicky stabilizovány vhodnými činidly. Termín "SH-

stabilizované" formy peptidů podle vynálezu obsahují sulfhydrylové skupiny, které reagují se standardními činidly za účelem prevence znovu vytvoření disulfidových vazeb nebo jsou to formy, kde aminokyselinové zbytky podobné cysteinu jsou nahrazeny jinými aminokyselinami, jak se uvádí shora v textu. Preferuje se, aby se všechny čtyři aminokyselinové zbytky podobné cysteinu nahradily nebo se SH-stabilizovaly za účelem minimalizace pravděpodobnosti tvoření intermolekulárních disulfidových spojení.

Atomy síry, které se podílejí na vnitrořetězcovém disulfidovém můstku v β -listu nejsou umístěny v rovině, kterou definují vnitrořetězcové vodíkové vazby; atomy síry svírají úhel s ohledem na β -uhlíky spojených aminokyselinových zbytků tak, že jsou umístěny na povrchu β -listu. Atomy síry disulfidového spojení přizpívá k hydrifilicitě povrchu β -listu. Rozumí se, že v peptidech vzorce I oblast β -listu, která je definována následujícím vzorcem, spadá do definice zde popsaného amfifilického anti-paralelního listu:



kde C_6 , C_8 , C_{13} a C_{15} jsou každý nezávisle aminokyselina podobná cysteinu, X_7 a X_{14} jsou každý nezávisle hydrofóbní nebo malá aminokyselina a // disulfidická vazba. Ve zvláště preferovaném provedení C_6 , C_8 , C_{13} a C_{15} jsou každý cystein a X_7 a X_{14} jsou každý nezávisle hydrofóbní aminokyseliny.

Sekundární struktura β -listu zobrazená na obrázku č. 6 je celá tvořena L-aminokyselinami. Odborníci dokáží rozeznat, že substituce L-aminokyseliny s jejím odpovídajícím D-

enantiomérem ve specifické pozici zbytku může poškodit stabilitu struktury nebo amfifilicitu amfifilické antiparalelní oblasti β -listu. Stupeň poškození strukturální stability nebo amfifilicity substitucí určitými enantioméry částečně závisí na velikosti aminokyselinového vedlejšího řetězce a pozici zbytku v β -listu. Upřednostňuje se, aby oblast β -listu peptidů vzorce I obsahovala směsy L- a D-aminokyselin, které neovlivňují podstatně stabilitu a amfifilicitu oblasti β -listu, což se srovnává s peptidy, které obsahují odpovídající všechny D- nebo všechny L-enantiomérové formy listu. Odborníkovi jsou zřejmě enantiomérové substituce, které neovlivňují podstatně stabilitu nebo amfifilicitu oblasti β -listu.

V preferovaném provedení vynálezu hydrofóbní, bazické, polární/velké a cysteinu podobné aminokyseliny, které obsahují oblast β -listu jsou buď všechny L-enantioméry nebo všechny jsou D-enantioméry. Malé aminokyseliny obsahující oblast β -listu mohou být buď L-enantioméry nebo D-enantioméry.

Oblast reverzního ohybu peptidů vzorce I (zbytky X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} berou-li se v úvahu dohromady) váží řetězce antiparalelního β -listu. Oblast reverzního ohybu obsahuje strukturu, která obrací směr polypeptidového řetězce tak, že umožňuje oblasti peptidu přijmout antiparalelní sekundární strukturu β -listu.

Oblast reverzního ohybu molekuly obecně obsahuje dvě, tři nebo čtyři aminokyselinové zbytky (zbytek X_9 a/nebo X_{12} nemusí být přítomny). Důležitý rys peptidů podle vynálezu je přítomnost pozitivního náboje v oblasti ohybu molekuly. Pak jeden z X_9 - X_{12} a přednostně X_9 - X_{12} , musí být bazická aminokyselina. Takové dva, tři a čtyři aminokyselinové

segmenty schopné působit ohyb v peptidu jsou dobře známy a jsou odborníkovi zřejmé.

V preferovaném provedení vynálezu reverzní ohyb je γ -ohyb, který obsahuje tři aminokyselinové zbytky. Ve skutečnosti libovolná sekvence γ -ohybu je známá v oboru a může se použít v peptidech podle vynálezu. Mezi tyto sekvence patří ty, které se popisují v publikacích Rose et al., 1985, Adv. Protein Chem. 37: 1-109; Wilmer-White et al., 1987, Trends Biochem. Sci. 12: 189-192; Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203: 221-232; Sibanda et al., 1989, J.Mol.Biol. 206: 759-777; Tramontano et al., 1989, Proteins: Struct. Funct. Genet. 6: 382-394.

V jiném preferovaném provedení podle vynálezu reverzní ohyb je β -ohyb, který je tvořen čtyřmi aminokyselinovými zbytky. V takových strukturách nejsou dva vnitřní aminokyselinové zbytky ohybu obvykle zahrnuty do vodíkových vazeb anti-paralelního β -listu ; dva aminokyselinové zbytky na každé straně vnitřních zbytků jsou obvykle zahrnuty do vodíkových vazeb β -listu. Věří se, že takové vodíkové vazby pomáhají stabilizovat oblast β -listu molekuly.

Konformace a sekvence mnoha peptidů β -ohybů jsou v oboru dobře popsány a zahrnují například tytp-I, typ-I', typ-II, typ-II', typ-III, typ-III', typ-IV, typ V, typ-V', typ-Via, typ-Vib, typ-VII a typ-VIII (Richardson, 1981, Adv. Protein Chem. 34: 167-339; Rose et al., 1985, Adv. Protein Chem. 37: 1-109; Wilmer-White et al., 1987, Trends Biochem. Sci. 12: 189-192; Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203: 221-232; Sibanda et al., 1989, J.Mol.Biol. 206: 759-777; Tramontano et al., 1989, Proteins: Struct. Funct. Genet. 6: 382-394). Všechny tyto typy peptidové struktury β -ohybu a jejich odpovídající sekvence stejně jako později objevené peptidové

struktury β -ohybu a sekvence jsou specificky popsány ve vynálezu.

Specifické konformace krátkých peptidových ohybů, jako jsou β -ohyby, primárně závisí na polohách jistých aminokyselinových zbytků v ohybu (obvykle Gly, Asn nebo Pro). Obecně β -ohyb typ-I je kompatibilní s libovolným aminokyselinovým zbytkem v polohách X_9 až X_{12} , mimo skutečnost, že Pro se nemůže vyskytovat v poloze X_{11} . U obou typů ohybů typ-I a typ-II převládá výskyt Gly v poloze X_{12} a Pro převládá v poloze X_{10} . Zbytky Asp, Asn, Ser a Cys se často vyskytují v poloze X_9 , kde jejich vedlejší řetězec často tvoří vodíkovou vazbu s NH zbytku X_{11} .

V ohybu typu-II se Gly a Asn objevuje více často v poloze X_{11} , jak daleko jednodušeji přijímají úhly hlavního řetězce. V ideálním případě ohyb typ-I má Gly v poloze X_{10} a X_{11} a ohyby typ-II mají Gly v pozici X_{10} . Ohyby typu-III obecně mohou mít většinu aminokyselinových zbytků, ale ohyby typ-III obvykle požaduje, aby Gly bylo v polohách X_{10} a X_{11} .

Ohyby typ-Via a Vib obecně mají vázaný cis peptid a Pro jako vnitřní zbytek. V publikaci Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203: 221-232 je uveden přehled různých typů a sekvencí β -ohybů v proteinech a v peptidech.

Preferované sekvence β -ohybu jsou následující (uvedené v pořadí X_9 až X_{12}): ZZZG, ZZZF, ZZSG, ZZAL, ZGZL, ZFZL, ZPZV, ZPZF, ZGZY, IZGY, LZZF, YZGZ, YZGZ, kde každé Z je nazávisle L- nebo D-enantiomér R, K, Dbu nebo Orn.

Preferované β -ohyby zahrnují ty, kde v pozici X_{10} a/nebo X_{11} jsou Tic nebo Hyp. Je známo, že tyto zbytky ovlivňují nebo indukují v peptidech nebo proteinech strukturu β -ohybu.

Peptidy podle vynálezu jsou obecně bazické, to znamená, že mají čistě pozitivní náboj ve fyziologickém pH. Věří se, že přítomnost pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků

zvláště oblasti ohybu v molekule je důležitá v případě antimikrobiální aktivity.

Rozumí se, že statisticky hodnoceném celku jsou některé jednotlivé aminokyselinové zbytky ve struktuře takového peptidu pozitivně nabitě, jiné jsou negativně nabitě a některé nenesou žádný náboj. Pak některé peptidy budou vykazovat náboj a některý budou bez náboje. Aby se vyhovělo definici "zásaditá" většina aminokyselinových zbytků v molekule peptidu je pozitivně nabitá ve fyziologickém pH. Pk přibližně 15%, ale ne více než okolo 50% aminokyselin musí být bazických a látky musí mít čistý náboj nejméně +1 při fyziologickém pH. Upřednostňuje se, aby peptidy podle vynálezu měly ve fyziologickém pH čistý náboj nejméně +3.

V případě provedení vynálezu, které obsahuje 10 aminokyselin, zde může existovat pouze jeden bazický aminokyselinový zbytek ; avšak dokonce i v tak krátkém řetězci se preferuje přítomnost nejméně dvou bazických zbytků. Jestliže protegrinový peptid obsahuje 15 aminokyselinových zbytků, jsou nutné dva bazické zbytky. Preferuje se, aby nejméně 20% aminokyselin v sekvenci bylo bazických, zvláště se preferuje, aby v sekvenci bylo 30% bazických aminokyselin.

N-konec peptidů podle vynálezu může být ve volné amino formě nebo může být acylován skupinou vzorce RCO-, kde R je hydrokarbylová skupina 1-25C, s výhodou 1-10C, nejvýhodnější je 1-8C. Hydrokarbylová skupina se může být satureovaná nebo nesatureovaná, s přímým řetězcem, větvená nebo cyklická a je to například metyl, etyl, izopropyl, t-butyl, n-pentyl, cyklohexyl, cyklohexane-2-yl, hexene-3-yl, hexyne-4-yl, oktyl, decyl, eikanosyl a podobně, přičemž se preferuje oktyl.

V jiném případě N-konec může obsahovat aromatické skupiny, jako je naphatlen atd. Takové skupiny se mohou běžně začlenit do peptidů podle vynálezu za použití aminokyselin,

jako jsou 1-naftylalanin nebo 2-naftylalanin jako aminokyselinový zbytek N-konce.

N-konec peptidů může také být substituován a za použití specifických transmembránových tunelů může vstupovat do bakteriální periplazmy. Například N-konec může být běžně modifikován katecholem za použití esteru aktivovaného katecholem NHS.

C-konec peptidu podle vynálezu může být ve formě nederivatizované karboxylové skupiny, buď jako volná kyselina nebo přijatelná sůl, jako je draslík, sodík, vápník, hořčík nebo jiné sole anorganického iontu nebo organického iontu, jako je kofein. V některých provedeních vynálezu je obtížné připravit sole, protože zbytek molekuly nese pozitivní náboj, který může odpuzovat relevantní kationt. Karboxylový konec může také být derivatizován tvorbou esteru s alkoholem vzorce ROH nebo může být amidován aminem vzorce NH_3 nebo RNH_2 nebo R_2NH , kde každé R je nezávisle hydrokarbyl s 1-25C, jak se definuje v předchozím provedení vynálezu. Preferují se amidované formy peptidů, kde C-konec má vzorec CONH_2 .

Adice lipofilických skupin na C- a/nebo N-konec umožňuje průchod peptidu membránou cílového mikrobu a penetraci do míst infekce. Volba optimální substituce je určena hodnocením s ohledem na obsah lipidů cílového mikroba.

Pak v jednom názorném provedení vynálezu se popisují antimikrobiální peptidy, které obsahují okolo 10 až 30 aminokyselinových zbytků a aminokyselinovou sekvenci:

(I) $\text{X}_1 \text{ X}_2 \text{ X}_3 \text{ X}_4 \text{ X}_5 \text{ C}_6 \text{ X}_7 \text{ C}_8 \text{ X}_9 \text{ X}_{10} \text{ X}_{11} \text{ X}_{12} \text{ C}_{13} \text{ X}_{14} \text{ C}_{15} \text{ X}_{16} \text{ X}_{17} \text{ X}_{18}$

nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu s acylovaným N-koncem nebo amidovaným C-koncem nebo jejich esterifikovanou formu,

kde každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle podobný cysteinu, je bazický, malý, polární/velký nebo hydrofóbní;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle aminokyselina podobná cysteinu, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní;

každý z X_1 - X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, polární/velká nebo malá aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní nebo malá aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen;

X_9 - X_{12} dohromady jsou schopny vytvořit reverzní ohyb, jestliže jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci vzorce (I) a nejméně jeden z X_9 - X_{12} musí být bazická aminokyselina;

každý z X_{16} - X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

a kde nejméně okolo 15% až 50% aminokyselin, které jsou obsaženy v antimikrobiálním peptidu, je bazických, přičemž antimikrobiální peptid má při hodnotě fyziologického pH čistý náboj nejméně +1.

V jedné zde popsané třídě protegrinů jsou buď hydrofóbní aminokyseliny nalezené vpřirozeně se vyskytujících protegrinech v X_5 jsou nahrazeny bazickou aminokyselinou a/nebo nejméně jedna X_1 - X_4 je hydrofóbní a/nebo nejméně jedna a s výhodou všechny čtyři aminokyseliny X_1 a X_4 nalezené v nativních formách jsou deletovány; a/nebo jedna nebo více X_5 , C_8 , X_9 , X_{12} , C_{13} a X_{16} jsou nepřítomny. Vhodnou manipulací těchto a jiných rysů rozmezí podmínek, při kterých třída protegrinů podle venálezu je účinná, se může

měnit. Spektrum mikrobů, proti kterým působí, se může také modifikovat.

V jiné třídě peptidů podle vynálezu je obsaženo 10 až 14 aminokyselinových zbytků a každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle aminokyselina malá, polární/velká nebo hydrofóbní nebo cystein;

každý z X_1 až X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina a libovelné dvě z X_1 až X_5 mohou být hydrofóbní aminokyselinou;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{10} je bazická, hydrofóbní nebo malá aminokyselina nebo prolin.

X_{16} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je bazická, hydrofóbní, nebo malá aminokyselina;

každý z X_{17} a X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina;

každý z X_{16} až X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, malá, hydrofóbní nebo polární/velká aminokyselina;

Peptidy v jiné třídě obsahují přibližně 10 až 18 aminokyselinových zbytků a každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z X_1 až X_4 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina a jedna libovolná z X_1 - X_4 může být hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_5 a X_{16} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní aminokyselina;

X_9 je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{10} je bazická nebo malá aminokyselina nebo prolin;

X_{11} je bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{12} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je hydrofóbní aminokyselina;

X_{17} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je nezávisle malá aminokyselina; a

X_{18} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je nezávisle bazická aminokyselina;

Peptidy podle vynálezu se mohou dále zobrazovat způsobem preferovaných provedení vynálezu. V jednom preferovaném provedení vynálezu všechny aminokyselinové zbytky podobné cysteinu v polohách C_6 , C_8 , C_{13} , C_{15} jsou přítomny, jestliže se vyskytují X_9 a X_{12} .

V jiném preferovaném provedení vynálezu všechny X_1 - X_4 nejsou přítomny. V dalších preferovaných provedeních vynálezu nejméně jedno nebo s výhodou dva z X_1 - X_4 je hydrofóbní aminokyselina, upřednostňuje se I, V, L, Y, F nebo W.

V jiných preferovaných provedeních vynálezu X_9 - X_{12} obsahuje nejméně jeden hydrofóbní aminokyselinový zbytek, s výhodou Phe, Tyr nebo Trp.

Jiná preferovaná provedení vynálezu zahrnují tyto peptidy, kde každý X_1 a X_9 je nezávisle vybrán ze skupiny obsahující R, K, Orn, Dab a Har nebo hydrofóbní aminokyselinu; s výhodou X_1 je R, K, Har a X_9 je R, K, Har nebo hydrofóbní aminokyselina, zvláště I, V, L, W, F nebo Y. Avšak každé X_1 a X_9 nemusí být přítomno.

V jiné třídě preferovaných provedení každé X_2 a X_3 je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující G, A, S, T, I, V, L, F, Y a W; upřednostňuje se, aby X_2 a X_3 byly G, W, F, Y, L nebo V; avšak X_2 a/nebo X_3 nemusí být přítomny.

V jiném preferovaném provedení vynálezu je X_4 vybráno ze skupiny obsahující R, K, H, Orn, Har, Dab, G, A, S, T, F, Y a W; X_4 je s výhodou R, K, Orn, Dab, G nebo W; avšak X_4 nemusí být přítomen.

V jiném preferovaném provedení vynálezu každý X_5 a X_{16} je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující I, V, Nle, W, Y a F; upřednostňuje se I, V, L, W, F a Y; avšak X_5 a/nebo X_{16} nemusí být přítomen.

V jiném preferovaném provedení vynálezu každý X_7 a X_{14} je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující I, V, L, W, Y a F; upřednostňuje se, aby X_7 bylo I, F, Y nebo W a X_{14} bylo I, V, L, W, Y nebo F.

V jiném preferovaném provedení vynálezu X_9 je R, K, H, Orn, Har, Dab, I, V, L, Nle, W, Y a F; X_{12} je I, V, L, W, F nebo Y; více se upřednostňují aromatické aminokyseliny, jako jsou Y, W nebo F.

V jiném preferovaném provedení vynálezu X_{10} je R, Orn, Dab, G, W nebo P.

V jiném preferovaném provedení vynálezu X_{11} je R, K, Orn, Dab, G, W nebo P.

V jiném preferovaném provedení vynálezu X_{17} není s výhodou přítomen, ale jestliže je přítomen pak je s výhodou G, A, S nebo T;

V jiném preferovaném provedení vynálezu X_{18} není s výhodou přítomen, ale jestliže je přítomen pak je s výhodou R, K, H, Orn, Har nebo Dab.

Také se upřednostňuje, jestliže čtyři aminokyseliny X_1 - X_4 jsou přítomny, X_1 a X_4 jsou přednostně bazické aminokyseliny a X_2 a X_3 jsou malé nebo hydrofóbní aminokyseliny. Preferovaná provedení X_1 - X_4 zahrnují R-G-G-R, R-G-W-R, R-L-L-R a podobně.

V prferovaném provedení vynálezu se preferují tyto bazické aminokyseliny vhodné pro záměnu zbytků podobných cysteinu: R, K, H, Orn, Dab a Har, více se upřednostňují R, K, nebo Orn. Preferované malé aminokyseliny vhodné pro záměnu zbytků podobných cysteinu jsou G, A, S a T, více se upřednostňují A a T.

Zvláště preferované peptidy podle vynálezu zahrnují nativní formy, formy "kite", "bullet" a/nebo "snake" následujících peptidů:

Forma-21:

```
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
      R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
      L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
      R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
      L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
```

Forma-22

```
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-V
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-V
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-R
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-R
      R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-V
      L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-R
```

R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-R
L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-I-Z-V

Forma-23

R-G-G-G-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-G-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-G-L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
R-G-G-G-R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V
L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
R-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-R
L-Z-Y-Z-R-R-R-F-Z-V-Z-V

Forma-24

R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-V
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-V
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-R
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-R
R-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-V
L-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-R
R-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-R
L-Z-Y-Z-R-G-W-I-Z-F-Z-V

Forma-25

R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-V
R-G-G-R-L-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-R
R-G-G-R-R-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-R
R-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-V
L-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-R
R-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-R
L-Z-Y-Z-R-P-R-F-Z-V-Z-V

a jejich N-acetylované a/nebo C-amidované nebo esterifikované formy, kde každé Z je nezávisle hydrofóbní, malá nebo bazická aminokyselina nebo cystein, stejně jako

předcházející formy, kde X_7 je W a/nebo X_{12} je W a /nebo kde X_{14} je W a/nebo X_{16} je W a/nebo X_{17} je G a X_{16} je R; a/nebo kde nejméně jedno z X_5 , X_9 , X_{12} a X_{16} není přítomno. Ve všech těchto provedeních se upřednostňuje, aby Z bylo S, A, T nebo G, více se upřednostňuje A nebo T.

Předcházející peptidy, protegrin forma 21 obsahuje látky, které jsou charakteristické pro uvedenou třídu, ale které jsou jinak podobné protegrinu (PG-1); forma 22 obsahuje charakteristiky uvedené třídy, ale je jinak podobná protegrinu-2 (PG-2); formy 23 až 25 jsou podobně příbuzné protegrinům -3, -4 a -5 (PG-3, PG-4 a PG-5) (Obr. č. 5).

Jiné preferované látky zahrnují nativní formy, formy "kite", "bullet" a/nebo "snake" následujících peptidů:

kód	sekvence
-----	----------

PG-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:1)
	WLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:2)
	FLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:3)
	WYCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:4)
	WXCFCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:5)
	WLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:6)
	WXCYCRRRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:7)
	RLRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:8)
	RGGRLCYCRRRFCXCVCGR (X=MeVal)	(SEQ ID NO:9)
	RGVCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:10)
	RGVCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:11)

kód	sekvence
	VCVCFRRRCYCLW (SEQ ID NO:12)
	FCVCFRRRCFCLF (SEQ ID NO:13)
	RGVCVCFRRRCYCRGGR (SEQ ID NO:14)
	RGVCVCFRRRCYCLRGGR (all D) (SEQ ID NO:15)
	RGVCVCFRRRCYCLW (SEQ ID NO:16)
	RGVCVCYRXRCYCLW (X=MeGly) (SEQ ID NO:17)
	WLCYCRXZYCVCVGR (X=MeGly) (SEQ ID NO:18)
	(Z=D-Arg)
	RGFCVCFRRVCYCLW (SEQ ID NO:19)
	WLCYCRRRFCVCVGR (SEQ ID NO:20)
	WLCYCRRXFCVCVR (X=D-Arg) (SEQ ID NO:21)
	WLCYCKKKFCVCVGK (SEQ ID NO:22)
Octyl-	WLCYCRRRFCVCVGR (SEQ ID NO:23)
	XLCYCRRRFCVCV (X=1-Nal) (SEQ ID NO:24)
	WLC RGRF CVR (SEQ ID NO:25)
	WLC RGRF CFR (SEQ ID NO:26)
	WLCY RR VCVR (SEQ ID NO:27)
	WLCYCOOOFVCV (SEQ ID NO:28)
	WLCYCXXXFCVCV (X=Dab) (SEQ ID NO:29)
	WLCYCRRRFCVCV (all D) (SEQ ID NO:30)
	HWRLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:31)
	KWRLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:32)
	OWRLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:33)
	XWRLCYCRPKFCVCV (X=Dbu) (SEQ ID NO:34)
	RWHLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:35)
	RWKLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:36)
	RWOLCYCRPKFCVCV (SEQ ID NO:37)
	RWXLCYCRPKFCVCV (X=Dbu) (SEQ ID NO:38)
	WLCYCKXXFCVCVGR (X=Tic) (SEQ ID NO:39)
	FCYCKXXFCYCV (X=Hyp) (SEQ ID NO:40)
	WLXYXRRRFVXV (X=hCys) (SEQ ID NO:41)
	WOLCYCOXOFCVCVO (X=Tic) (SEQ ID NO:42)
	OFCVCVOXOFCVCVO (X=Tic) (SEQ ID NO:43)
	OWOLCYCOXOFCVCV (X=Tic) (SEQ ID NO:44)
	OFCVCXOLCYCFO (X=Tic) (SEQ ID NO:45)

kód	sekvence	
	WLCYCKKKFCVCV	(SEQ ID NO:46)
	OWOLCYCOXOFCVCV (X=Hyp)	(SEQ ID NO:47)
	WLCYCOXOFCVCVO (X=Pba)	(SEQ ID NO:48)
	WLCYCOOFCVCV (all D)	(SEQ ID NO:49)
	XFCYCLRXFCVCVR (X=D-Arg)	(SEQ ID NO:50)
	WLCYCRRXFCVCVZX	(SEQ ID NO:51)
	(X=D-Arg)	
	(Z=MeGly)	
PC11	LCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:52)
PC12	RCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:53)
PC15	RGGRLCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:54)
PC16	RCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:55)
PC17	LCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:56)
PC18	LCYARRRFAVCV	(SEQ ID NO:57)
PC19	RCYARRRFAVCR	(SEQ ID NO:58)
PC20	LAYCRRRFCVAV	(SEQ ID NO:59)
PC21	RAYCRRRFCVAR	(SEQ ID NO:60)
PC22	RGGRLCY RR VCV	(SEQ ID NO:61)
PC31	GGRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:62)
PC32	RGRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:63)
PC33	GRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:64)
PC34	RRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:65)
PC35	RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:66)
PC36	RRCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:67)
PC37	CYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:68)
PC44	RGGRLCYCRRRFCVC	(SEQ ID NO:69)
PC47	RGGRLCY RRRF VCV	(SEQ ID NO:70)
PC48	RGWRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:71)
PC37a	CYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:72)
PC45	RGGRLCYCRRRFCV	(SEQ ID NO:73)
PC72	LCYCRRRFCVC	(SEQ ID NO:74)
PC64	LCYTRRRFTVCV	(SEQ ID NO:75)
PC64a	LYCRRRFCVTV	(SEQ ID NO:76)
PC31a	GGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:77)
PC32a	RGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:78)

kód	sekvence	
PC33a	GRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:79)
PC34a	RRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:80)
PC35a	RLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:81)
PC36a	RRCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:82)
PC44a	RGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:83)
PC47a	RGRLCY RRRF VCVGR	(SEQ ID NO:84)
PC48a	RGWRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:85)
PC54	RGWRLAYCRRRFCVAVGR	(SEQ ID NO:86)
PC61	RCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:87)
PC62	LCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:88)
PC63	VCYCFRRFCYCV	(SEQ ID NO:89)
PC65	LCYTRPRFTVCV	(SEQ ID NO:90)
PC66	LCYTRGRFTVCV	(SEQ ID NO:91)
PC67	LCYFRRRFIVCV	(SEQ ID NO:92)
PC68	LCYFRPRFIVCV	(SEQ ID NO:93)
PC69	LCYTFRPRFVCV	(SEQ ID NO:94)
PC70	LCYTFRGRFVCV	(SEQ ID NO:95)
PC74	CYCFRRFCVC	(SEQ ID NO:96)
PC77	LCYCRRRRCVCV	(SEQ ID NO:97)
PC78	LCYCFRRRCVCV	(SEQ ID NO:98)
PC79	LCYCFRRRCVCV	(SEQ ID NO:99)
PC80	LCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:100)
PC81	LCYCRRFFCVCV	(SEQ ID NO:101)
PC82	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:102)
PC83	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:103)
PC84	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:104)
PC85	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:105)
PC86	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:106)
PC87	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:107)
PC88	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:108)
PC89	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:109)
PC90	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:100)
	RGRLCY RR VCVGR	(SEQ ID NO:111)
PC91	YCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:112)

kód	sekvence	
PC95	ICYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:113)
PC96	FCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:114)
PC97	WCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:115)
PC99	RCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:116)
PC109	RLCYTRGRFTVCV	(SEQ ID NO:117)
PC110	LCYTRGRFTVCVR	(SEQ ID NO:118)
PC111	RLCYTRGRFTVCVR	(SEQ ID NO:119)
PC112	LCYCHHHFCVCV	(SEQ ID NO:120)
PC113	LCYTHHHFTVCV	(SEQ ID NO:121)
	RGGLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:122)
	RGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:123)
	RGGGLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:124)
	RGGGLCYCRRGFCVCFGR	(SEQ ID NO:125)
	RGGGLCYCRPFVCVGR	(SEQ ID NO:126)
	RGGGLCYCRPRFCVGR	(SEQ ID NO:127)
	RGRLCYCRXRFVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:128)
	RGGLCYCRGRFCVGR	(SEQ ID NO:129)
	RGRLCYCXGRFCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:130)
	XGRLCYCRGRFCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:131)
	RGGRVCYCRGRFCVGR	(SEQ ID NO:132)
	RGGGLCYCFPKFCVGR	(SEQ ID NO:133)
	RGWGLCYCRPRFCVGR	(SEQ ID NO:134)
	RGWRLCYCRXRFVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:135)
	RGWRLCYCRGRFCVGR	(SEQ ID NO:136)
	RGWRLCYCXPRFCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:137)
	RWRLCYCRPRFCVGR	(SEQ ID NO:138)
	RGWRLCYCRPRFCVGR	(SEQ ID NO:139)
	RGWRACYCRPRFCACVGR	(SEQ ID NO:140)
	GWRLCYCRPRFCVGR	(SEQ ID NO:141)
	RWRLCYCKGKFCVGR	(SEQ ID NO:142)
	RGWRLCYCRXRFVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:143)
	GGWRLCYCRGRFCVGR	(SEQ ID NO:144)
	RGGWLCYCRGRFCVGR	(SEQ ID NO:145)
	RLRLCYCRXRFVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:146)

kód	sekvence
RLLRACYCRXRFCVCVGR	(X=MeGly) (SEQ ID NO:147)
RLLRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:148)
RGLRXCYCGRRFCVCVGR	(X=Cha) (SEQ ID NO:149)
RGGRLCYCRXRZCVCWGR	(X=MeGly) (SEQ ID NO:150)
	(Z=Cha)
RGGRWCVCXRZCYCVGR	(X=MeGly) (SEQ ID NO:151)
	(Z=Cha)
RGLRXCYCGRRFCVCVGR	(X=Cha) (SEQ ID NO:152)
RGGRWCVCGRXCVCVGR	(X=Cha) (SEQ ID NO:153)
RGGRLCYCRRRFCXCVGR	(X=MeVal) (SEQ ID NO:154)
LCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:155)
LCYCRRFCVCV	(SEQ ID NO:156)
LCYCRRRFCVCF	(SEQ ID NO:157)
LCACRRRACVCV	(SEQ ID NO:158)
LCYCRXRFCVCV	(X=D-Arg) (SEQ ID NO:159)
LCWCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:160)
WCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:161)
LCYCRRRXVCV	(X=hPhe) (SEQ ID NO:162)
LCYCRRRXVCV	(X=Phe(4-cl)) (SEQ ID NO:163)
XCYCRRRFCVCV	(X=Cha) (SEQ ID NO:164)
LCYCRRRFCXCV	(X=D-His) (SEQ ID NO:165)
LCYCRRRXVCV	(X=MeGly) (SEQ ID NO:166)
LCYCRRRXVCV	(X=MePhe) (SEQ ID NO:167)
LCYCRRRFCXCV	(X=MeVal) (SEQ ID NO:168)
LCXCRRRXVCV	(X=Cha) (SEQ ID NO:169)
LCGCRRRGVCV	(SEQ ID NO:170)
LCACRGRACVCV	(SEQ ID NO:171)
RACYCRPRFCACV	(SEQ ID NO:172)
RLCYCRPRFCVCF	(SEQ ID NO:173)
RLCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:174)
KLCYCKPKFCVCV	(SEQ ID NO:175)
RLCACRGRACVCV	(SEQ ID NO:176)
RLCYCRXRFCVCV	(X=MeGly) (SEQ ID NO:177)
RXCFCRPRFCVCV	(X=Cha) (SEQ ID NO:178)
RWCFCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:179)

kód	sekvence
	WLCYCRRRFCVCV (SEQ ID NO:180)
	WLCFCRRRFCVCV (SEQ ID NO:181)
	FLCFCRRRFCVCV (SEQ ID NO:182)
	WLCFCRRRXCVCV (X=MePhe) (SEQ ID NO:183)
	WYCICRRRFCVCV (SEQ ID NO:184)
	WXCICRRRFCVCV (X=Cha) (SEQ ID NO:185)
	RXCFCRGRZCVCV (X=Cha) (SEQ ID NO:186)
	(Z=MePhe)
	XLCFCRRRZCVCV (X=Cha) (SEQ ID NO:187)
	(Z=MePhe)
	RLCYCRPRFCVCVGR (SEQ ID NO:188)
	WLCYCRRRFCVCVGR (SEQ ID NO:189)
	WXCICRRRFCVCVGR (X=Cha) (SEQ ID NO:190)
	RLCYCRGPFCVCR (SEQ ID NO:191)
	RRWCFVCYAGFCYRCR (SEQ ID NO:192)
	RRCYCRGRFCGCVGR (SEQ ID NO:193)
	RWRCYCGRRFCGCVGR (SEQ ID NO:194)
	RARCYCGRRFCGCVGR (SEQ ID NO:195)
	GWRCYCRGRFCGC (SEQ ID NO:196)
	RGWACYCRGRFCVC (SEQ ID NO:197)
	RRCYGRRRFGVCVGR (SEQ ID NO:198)
	RGWRLCYGRGRFKVC (SEQ ID NO:199)
	RGWRLCYCRGRFCVC (SEQ ID NO:200)
	CYCRRRFCVCF (SEQ ID NO:201)
	RGWRLCYCRXRFCVC (X=MeGly) (SEQ ID NO:202)
	RGWRGCYCRXRFCGC (X=MeGly) (SEQ ID NO:203)
	LCYCRPRFCVCVGR (SEQ ID NO:204)
	LCYCKPKFCVCVGR (SEQ ID NO:205)
	LCYCRGRFCVCVGR (SEQ ID NO:206)
	LCYCRPRFCVCVGRGR (SEQ ID NO:207)
	RRWCYCRPRFCVCVR (SEQ ID NO:208)
	WRLCYCRPRFCVCVGR (SEQ ID NO:209)
	GWLCYCRGRFCVCVGR (SEQ ID NO:210)
	RWLCYCRGRFCVCVGR (SEQ ID NO:211)
	RLLCYCRGRFCVCVGR (SEQ ID NO:212)

kód

sekvence

RWRLCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:213)
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:214)
(Z=MeGly)	
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:215)
RGGRVCYCRGRFCVCV	(SEQ ID NO:216)
LCYCRXRFCVCV (X=D-Ala)	(SEQ ID NO:217)
LCYCKPKFCVCV	(SEQ ID NO:218)
VCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:219)
LCYCRPRFCVCW	(SEQ ID NO:220)
LCYRRPRFRVCV	(SEQ ID NO:221)
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:222)
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:223)
(Z=MeGly)	
RXRLCYCRGRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:224)
RGGGLCYARGWIAFCVGR	(SEQ ID NO:225)
RGGGLCYARGFIAVCFGR	(SEQ ID NO:226)
RGGGLCYARPRFAVCVGR	(SEQ ID NO:227)
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	(SEQ ID NO:228)
RGGGLCYARKGFAVCVGR	(SEQ ID NO:229)
RGGRLCYARRRFAVCVGR	(SEQ ID NO:230)
RGGGLCYKRGFIKVCVGR	(SEQ ID NO:231)
RGGGLCYKRGWIKFCVGR	(SEQ ID NO:232)
RGGGLCYRLPKFRVCVGR	(SEQ ID NO:233)
RGGGLCYRLPGFRVCVGR	(SEQ ID NO:234)
RGWRGICYKRGRFKGCVGR	(SEQ ID NO:235)
LCYKRGRFKVCV	(SEQ ID NO:236)
ICYRPRFVCVGR	(SEQ ID NO:237)
WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:238)
RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:240)
RGRVCLRYCRGRFCVRLCFR	(SEQ ID NO:241)
RRRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:242)

a jejich N-acetylované a/nebo C-amidované nebo esterifikované formy.

Příprava látek

Látky podle vynálezu, které se zde často označují jako protegriny, jsou v podstatě peptidové hlavní řetězce, které se mohou modifikovat na N- nebo C-konci a také mohou obsahovat jeden nebo dva disulfidové můstky. Peptidy se mohou nejdříve syntetizovat v necyklických formách. Tyto peptidy se pak mohou přeměnit na cyklické peptidy, jestliže standardní způsob vyžaduje tvorbu disulfidového můstku. Termín "cyklické formy" zde znamená ty formy, které obsahují cyklické části na základě tvoření disulfidických můstků mezi aminokyselinovými zbytky, které jsou podobné cysteinu, v peptidu. Jestliže se preferují necyklické formy, je výhodné v případě peptidů podle vynálezu, které obsahují dva nebo více zbytků, které jsou podobné cysteinu, stabilizovat sulfohydrylové skupiny.

Standardní způsoby syntézy peptidů, které mají zde popsanou velikost, jsou známy v oboru. V současné době nejběžněji používané metody jsou syntéza pevné fáze; přičemž se používají přístroje pro systematickou konstrukci peptidových řetězců, což je výhodné při produkci ve velkém měřítku. Jestliže k syntéze dochází za použití standardních metod, mohou se použít aminokyseliny, které nejsou kódované genem, nebo D-enantioméry. Jeden velmi praktický způsob získání látek podle vynálezu je použití těchto standardních chemických syntetických metod.

Za účelem získání peptidového hlavního řetězce se může N-konec a/nebo C-konec derivatizovat opět použitím běžných chemických metod. Látky podle vynálezu mohou obsahovat acylovou skupinu na aminokonci. Způsoby acetylace nebo obecněji acylace volné amino skupiny na N-konci jsou v oboru

obecně známy; navíc aminokyselina N-konce se může účastnit syntézy v acetylované formě.

Na C-konci může být samozřejmě přítomna karboxylová skupina ve formě soli; v případě farmaceutických kompozic to bude farmaceuticky přijatelná sůl. Mezi vhodné sole patří ty, které se tvoří s anorganickými ionty, jako jsou NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} a podobně, stejně jako sole tvořené organickými kationty, jako jsou ty vytvořené s kofeinem a s jinými vysoce substituovanými aminy. Avšak, jestliže látka vzorce (I) obsahuje řadu bazických zbytků, tvorba solí může být obtížná nebo nemožná. Karboxylový konec se může také esterifikovat použitím alkoholů vzorce ROH , kde R je hydrokarbyl, jak se definuje dříve v textu. Podobně C-konec se může amidovat tak, že má vzorec $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONHR}$ nebo $-\text{CONHR}_2$, kde každé R je nezávisle hydrokarbyl. Metody esterifikace a amidace stejně jako neutralizace za přítomnosti báze pro tvorbu solí jsou standardní organické chemické metody.

Jestliže peptidy podle vynálezu se připravily za fyziologických podmínek, pak aminoskupiny vedlejšího řetězce bazických aminokyselin jsou ve formě relevantních kyselých adičních solí.

Při syntéze lineárního peptidu s amidem na C-konci se peptidová sekvence běžně syntetizuje na Fmoc Rink amidové pevné pryskyřici (Bachem) za použití Fmoc chemie na automatizovaném peptidovém syntetizéru ABI 433 (ABD, Perkin Elmer, Foster City, CA) podle standardního protokolu doporučeného výrobcem. Štěpení probíhá ve směsi thioanizol/EDTA/TFA (v poměru 1/1/9) v objemu 10 ml po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Produkt štěpení se precipituje s t-butylmetylerem, filtruje se a suší se.

Tvorba disulfidických můstků se provádí v přítomnosti slabě oxidačních činidel. Mohou se použít chemická oxidační činidla nebo se mohou látky jednoduše vystavit působení

kyslíku ve vzduchu, čímž se ovlivní tyto můstky. V oboru jsou známy různé metody. Proces použitelný pro vznik disulfidické vazby je popsán v publikacích Tam, J.P et al., Synthesis (1979) 955-957; Stewart, J.M. et al., Solid Phase Peptid Synthesis, 2d Ed. Pierce Chemical Company Rockford, IL (1984); Ahmed A.K. et al., J. Biol Chem (1975) 250: 8477-8482 a Pennington M.W. et al., Peptides 1990, E. Giralt et al., ESCOM Leiden, The Netherlands (1991) 164-166. Další alternativy se popisují v publikaci Kamber, B. et al, Helv Chim Acta (1980) 63: 899-915. Způsob, který využívá pevné podpory, je popsán v publikaci Albericio, Int. J Pept Protein Res (1985) 26: 92-97.

Zvláště preferovaným způsobem je oxidace v roztoku za použití molekulového kyslíku. Tato metoda se používá při znovu zabalení syntetického PG-1, PG-3 v jeho amidové nebo kyselé formě, enantio PG-1 a dvou unidisulfidových látek (C_6 - C_{15} a C_8 - C_{13}). Získá se 65 až 90% látky.

Při použití této preferované metody za účelem tvorby disulfidových můstků se surový peptid rozpustí v DMSO a přidá se 20mM pufr acetát amonný pH7. Konečná koncentrace peptidu v roztoku je mezi 1 až 8 mg/ml, rozmezí pH je 7,0 až 7,2 a rozmezí koncentrace DMSO je 5 až 20%. Peptidový roztok se míchá přes noc při teplotě místnosti.

pH roztoku je upraveno koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 5 a vzorek se čistí na Prep LC. Po nanesení je kolona promyta 10% acetonitrilem ve vodě (0,1% TFA) až hodnota UV absorbance dosáhne základní linie. Pak je spuštěn gradient.

Kolona: Vydac Cat#218TP101522, 2,2x25 cm, peptidy a proteiny s 18 uhlíky; UV λ : 235 nm; rychlost vymývání: 10ml/min.

Rozpouštědlo A je 100% 0,1% TFA/H₂O; Rozpouštědlo B je 100% 0,08% TFA/CAN. Gradient je následující.

T (min)	%B (lineární gradient)
0	10
10	18
80	32
95	95

Frakce se analyzují analytickou HPLC a hromadí se ta, co obsahuje požadovaný peptid. Acetonitril je stripován a výsledný vodný roztok se lyofilizuje. Výsledný amid obsahující sulfidové vazby se potvrdil ve hmotnostním spektru.

Jestliže peptidový hlavní řetězec obsahuje celkově genem kódované aminokyseliny nebo jestliže některá jeho část je také setavena, peptid nebo jeho relevantní část se může také syntetizovat metodami rekombinace DNA. Samotná DNA kódující peptidy podle vynálezu se může syntetizovat za použití komerčně dostupného zařízení; volba kodónu se může začlenit do syntézy v závislosti na původu hostitele.

Rekombinantně produkované formy protegrinů mohou za účelem modifikace N- a/nebo C-konce a v závislosti na metodě izolace, za účelem tvoření disulfidových můstků, jak se popisuje dříve v textu, vyžadovat podstatnou derivatizaci. V závislosti na hostitelském organismu, který se užívá při rekombinantní produkci, a v závislosti na zdroji zvířete, ze kterého se protein izoloval, se mohou ovlivnit některé nebo všechny tyto konverze.

Při rekombinantní produkci je DNA kódující protegriny podle vynálezu zahrnuta do expresního systému, kde jsou tyto kódující sekvence řízeny vhodným promotorem a jinými kontrolními sekvencemi, které jsou kompatibilní s hostitelskou buňkou. Do vhodných typů hostitelských buněk spadá celý rozsah rostlin a zvířat. Tak se protegriny podle vynálezu mohou produkovat v bakteriích nebo v kvasinkách

(mohou se produkovat v netoxické nebo refraktilové formě nebo se využívají rezistentní kmeny), ve zvířecích buňkách, v hmyzích buňkách a v rostlinných buňkách. Modifikované rostlinné buňky se mohou využívat při regeneraci rostlin, které obsahují relevantní expresivní systémy tak, že výsledná transgenní rostlina je schopna se sama ochránit před infekčními činidly.

Protegriny podle vynálezu mohou vznikat ve formě, která bude výsledkem sekrece hostitelské buňky na základě fúze DNA kódující protegriny a DNA kódující vhodný signální peptid nebo může být produkována intracelulárně. Mohou také vznikat jako fúzní proteiny s aminokyselinovou sekvencí, která může nebo nemusí být odstraněna před použitím těchto látek proti bakteriím a virům.

Protegriny podle vynálezu se mohou produkovat v různých modalitách zahrnující chemickou syntézu a rekombinantní produkci nebo některé kombinace těchto metod.

Libovolní členi třídy protegrinů, kteří se vyskytují v přírodě se získávají v čištěných a/nebo izolovaných formách. Termín "čištěná a/nebo izolovaná forma" znamená formu zbavenou prostředí, ve kterém se peptid normálně vyskytuje (v případě takovým přirozeně se vyskytujícími peptidy) a je to forma, která se může prakticky použít. Termín "čištěná a/nebo izolovaná forma" znamená, že peptid je v podstatě čistý, to je čistý z více jak 90%, upřednostňuje se čistota vyšší jak 95% a ještě výhodnější je čistota vyšší jak 99% a nebo v zcela odlišném kontextu jde o čistotu farmaceutických přípravků.

Protilátky

Protilátky proti protegrinům podle vynálezu se mohou také produkovat použitím standardních imunologických metod vhodných pro produkci polyklonálního antiséra a jestliže je to nutné, používá se způsob imortalizace buněk imunizovaného

hostitele, které produkují monoklonální protilátky. V oboru jsou dobře známy způsoby produkce protilátek proti libovolné substanci. Může být nezbytné zvýšit imunogenicitu substance zvláště tam, kde materiálem je pouze krátký peptid, spojením haptenu s nosičem. Vhodnými nosiči pro tento účel jsou látky, které sami v savcích nevyvolávají imunní odezvu a aplikují se jako konjugát haptenu-nosič. Mezi běžně užívané nosiče patří hemocyanin kuželnatky (KLH), toxoid difterie, sérumalbumin a virový obalový protein rotaviru VP6. Spojování haptenu s nosičem se provádí použitím standardní metody, jako je kontakt nosiče s peptidem za přítomnosti dehydratačního činidla, jako je dicyklohexylkarbodiimid nebo použitím linkerů, jako jsou ty dostupné u firmy Pierce Chemical Company, Chicago, IL.

Protegriny v imunogenní formě podle vynálezu jsou pak zavedeny injekcí do vhodného savčího hostitele a monitorují se titry protilátek. Je nutné poznamenat, že některé formy protegrinů než vyvolají tvorbu protilátek je nutné modifikovat, což způsobuje jejich rezistence vůči zpracování antigenu. Například nativní forma PG-1, která obsahuje dva sulfidové můstky není imunogenní v případě, že se aplikuje bez připojení k většímu nosiči je velmi málo imunogenní dokonce v přítomnosti silného adjuvans a když je spojena pomocí glutaraldehydu nebo k KLH. Věřící se, že tato skutečnost je způsobena rezistencí k leukocytové serinové proteáze (lidská PMN elastáza a cathepsin G) stejně jako rezistencí k působení aspartové proteázy (pepsin), která je podobná několika makrofágovým kathepsinům. Chybějící imunogenecita může proto vést od rezistence ke zpracování lineární formy, která může zapadat do "antigenové kapsy" na buňkách. Imunogenecita těchto forem protegrinů se může zvýšit štěpením disulfidových vazeb. Avšak imunogenecita se může zvýšit

použitím metody MAPS, která se popisuje v publikaci Huang, W et al., Mol Immunol (1994) 15: 1191-1199.

Polyklonální antiséra se mohou získávat, jestliže titry jsou dostatečně vysoké. V jiném případě se mohou získat a imortalizovat buňky hostitele produkující protilátky, jako jsou buňky sleziny nebo periferní krevní lymfocyty. Imortalizované buňky se pak klónují jako jednotlivé kolonie a testuje se produkce požadovaných monoklonálních protilátek.

Při produkci protilátek je také možné použít metody rekombinace a tak protilátky podle vynálezu zahrnují ty protilátky, které se mohou připravovat genovým inženýrstvím. Standardními metodami se mohou tvořit například jednořetězcové formy, jako jsou formy F_v, chimerické protilátky a protilátky, které se modifikují tak, aby napodobovaly ty z určitých druhů, jako jsou lidské. Protilátky podle vynálezu se mohou připravovat izolací nebo modifikací genů kódujících požadované protilátky a tyto geny se mohou exprimovat v rekombinantních hostitelských buňkách, jako jsou CHO buňky.

Protilátky podle vynálezu jsou samoyřejmě použitelné v imunotestech vhodných pro určení množství nebo přítomnosti protegrinů. Takové testy jsou podstatné při kontrole kvality produkce kompozic, které obsahují protegriny podle vynálezu. Protilátky se mohou použít při odhadu účinnosti rekombinantní produkce protegrinů, stejně jako pro testování přítomnosti genů, které kódují protegrin, v expresivních knihovnách.

Protilátky podle vynálezu jsou samozřejmě použitelné v imunotestech, které určují množství nebo přítomnost protegrinů. Takové testy jsou podstatné při kontrole kvality produkce protegrinů podle vynálezu. Navíc protilátky se mohou využívat k odhadu účinnosti rekombinantní produkce protegrinů, stejně jako při testování expresivních knihoven, zda jsou přítomny geny kódující protegriny.

Kompozice obsahující protegriny a metody použití

Protegriny podle vynálezu jsou účinné při inaktivaci velkého rozmezí mikrobiálních a virových cílů, které zahrnují gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, kvasinky, protozoa a jisté kmeny virů. Vzhledem k jejich širokému spektru aktivit protegriny podle vynálezu se mohou použít jako konzerveční činidla, dále při léčbě nebo z profylaktických důvodů.

Působí bakteriocidně proti gram-pozitivním bakteriím, které zahrnují hlavní patogeny, jako je *Staphylococcus aureus*, zahrnující MRSA (verzi rezistentní na methicilin) a MSSA (verzi citlivou na methicilin) a *Enterococcus faecium* a *E. faecalis* (zahrnující VREF nebo *E. faecalis* rezistentní na vankomycin) a VSEF nebo *E. faecalis* citlivý na vankomycin). Z lékařského hlediska toto jsou velmi běžné patogeny. Jiné gram-pozitivní bakterie, které jsou také vhodnými cíly, zahrnují *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumonia* (zahrnující formu rezistentní na penicilin), *S. mitis*, *S. sanguis*, *Staphylococcus epidermis* (zahrnující MSSE kmen citlivý na meticilin), *S. salivarius*, *Corynebacterium minutissium*, *C. pseudodiphtheriae*, *C. striatum*, *Corynebacterium* skupiny G1 a G2 a *Bacillus subtilis*. PRSP je také světově rozšířená životu nebezpečná bakterie.

Mezi gram-negativní organizmy, proti kterým jsou protegriny účinné, patří *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter calocoaceticus*, *C. pneumoniae* a *Neisseria meningitidis*, a jiné shora popsané rody. Například *Neisseria gonorrhoeae* je spojená s pohlavně přenosnými nemocemi (STD), jako je *Chlamydia trachomatis*. Mezi gram-negativní organizmy jsou

také patogeny trávicího ústrojí *Helicobacter pylori*, *H. felis* a *Campylobacter jejuni*.

Vedle gram-pozitivních a gram-negativních bakterií protegriny podle vynálezu také účinně působí na růst a infekci mykobakterií, jako jsou *M. tuberculosis* a *M. avium* (zahrnujíc MAC); houby, jako je *Candida albicans* a příbuzné patogeny, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*, stejně jako *Aspergillus niger*. Mezi na protegriny citlivé viry patří *Herpes simplex I* a *II* a HIV.

Shora uvedený seznam organismů není úplný, jde pouze o seznam reprezentantů.

Jak se uvádí shora v textu, protegriny se také používají jako dezinfekční činidla a jako konzervační činidla v případě materiálů, jako jsou potraviny, kosmetika, léky nebo jiné materiály, které obsahují nutrienty vhodné pro organizmy. V případě použití za těmito účely se protegriny aplikují buď jako jednotlivý protegrin, ve směsi více protegrinů nebo ve směsi s několika dalšími antimikrobiálními činidly. Jestliže se protegriny používají jako konzervační činidla, obvykle jsou přítomny v relativně nízkém množství, méně než 5% váhy celkové kompozice, upřednostňuje se méně než 1%, výhodněji méně než 0,1%.

Peptidy podle vynálezu se také používají jako standardy v antimikrobiálních testech a v testech při určení schopnosti testovací látky vázat endotoxiny, jako jsou lipopolysacharidy.

Jestliže se uvedené látky použijí proti mikrobům nebo virům při léčbě zvířat, protegriny podle vynálezu se mohou připravit ve formě léku nebo jako veterinářské kompozice. V závislosti na objektu, který se léčí, způsob požadované aplikace např. prevence, profylaxe, terapie; jsou protegriny připravovány způsoby v souladu s těmito parametry. Shrnutí takových metod přípravy je uvedeno v publikaci Remington's

Pharmaceutical Sciences, poslední vydání, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Protegriny se mohou použít na zvířatech jak pro terapeutické tak i profylaktické účely. Termín "léčba" infekce znamená buď prevenci před nákazou nebo utlumení symptomů, inhibici růstu mikróbů v léčeném objektu a jiné negativné působení na mikróba, což je přínosem pro léčený subjekt. Takové "léčení" nebo "léčba" má profylaktické a terapeutické aspekty.

Protegriny jsou zvláště vhodné jako aktivní látky do farmaceutických kompozic, které jsou použitelné při léčbě pohlavně přenosných nemocí, mezi něž patří ty, které způsobují *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes simplex* typ 2 a HIV. Preferují se povrchové formulace, které zahrnují krémy, masti, oleje, pudry, gely a podobně. Vhodné povrchové excipienty jsou v oboru dobře známy a mohou se přispůsobit pro určité použití.

Při profylaxi nebo léčbě STD se mohou protegriny podle vynálezu použít samotné nebo v kombinaci s jinými antibiotiky, jako jsou erytromycin, tetracyklín, makrolidy např. azitromycin a cefalosporiny. V závislosti na způsobu aplikace se protegriny připravují ve formě vhodných kompozic, což umožňuje zavedení do oblastí působení.

Protegriny se mohou použít ve formách, obsahujících jeden nebo dva sulfidové můstky a nebo mohou být v lineární formě. Použití forem enantiomérů, které obsahují všechny D-aminokyseliny, přináší výhody, jako je rezistence na proteázy např. trypsin a chymotrypsin, na které jsou protegriny obsahující L-aminokyseliny méně rezistentní.

Protegriny podle vynálezu se mohou aplikovat samostatně nebo ve směsích několika protegrinů nebo v kombinaci s jinými farmaceuticky aktivními komponenty. Formulace se mohou

připravovat způsobem vhodným pro systémovou aplikaci nebo povrchovou nebo lokální aplikaci. Systémové formulace zahrnují ty, které se mohou použít jako injekce (např. intramuskulární, intravenózní, intraperitonální nebo podkožní) nebo se mohou připravovat pro transdermální, transmukozální nebo orální aplikaci. Formulace bude obecně zahrnovat ředidlo, v některých případech adjuvans, pufry, konzervační činidla a podobně. Protegriny se mohou také aplikovat v kompozicích s lipozómy nebo jako mikroemulze.

Jestliže se aplikace provede orálně, protegriny podle vynálezu by se měly chránit proti degradaci v trávicím ústrojí použitím vhodných potahů. Tomuto působení se může částečně předejít použitím aminokyselin v D-konfiguraci, které vykazují rezistenci na proteázy. Protegriny jsou relativně stabilní vůči kyselému prostředí, ale vyžaduje se určitý stupeň potažení.

Protegriny podle vynálezu si udržují svou antimikrobiální aktivitu i v borátových roztocích, které se běžně používají v produktech vhodných pro ošetření očí. Také se zjistilo, že když se testovala antimikrobiální aktivita proti *E. coli* v přítomnosti a při absenci lysozymu ve fyziologickém roztoku pufrovaném boráty, že přítomnost lysozymu zvyšuje účinnost PG-3. Tento účinek se zesílil, jestliže PG-3 se autoklávoval a podobný patern se získal pro formu bez kyselin a v případě amidu. Protegriny se mohou v podstatě v takových kompozicích používat jako konzervační činidla nebo jako antibakteriální přípravek pro léčbu očních infekcí, jako jsou konjunktivitidy a vředy na rohovce.

Je zvláště důležité, že protegriny si uchovávají svou aktivitu za fyziologických podmínek, což znamená relativně vysoký obsah solí a přítomnost séra. Protegriny jsou navíc daleko méně cytotoxické vůči buňkám vyšších organismů ve srovnání s toxicitou vůči mikróbům. Tyto vlastnosti popsané

dále v příkladech jim umožňují použití *in vivo* a terapeutické použití.

Jak ukazují příklady, u vhodně vybraného člena třídy protegrinů podle vynálezu lze uzpůsobit antimikrobiální aktivitu a tak dosáhnout maximální účinnosti s ohledem na určitý cílový mikrób. Termín "mikrób" nezahrnuje pouze kvasinky, bakterie a jiné jednobuněčné organizmy, ale také viry. Například PC-19 je za určitých podmínek zvláště účinný ve srovnání s PG-1. Určitý protegrin se také může s výhodou použít za určitých podmínek, jako je nízký obsah solí nebo fyziologický obsah solí, přítomnost lidského séra nebo podmínek, které napodobují podmínky v krvi a v tkáňových roztocích.

Protegriny podle vynálezu se mohou také aplikovat na rostliny nebo do prostředí, ve kterém rostou, za účelem prevence virových a bakteriálních onemocnění rostlin. Vhodné kompozice pro tyto účely typicky obsahují ředidlo, rozprašovací činidlo nebo jiné činidla, která jsou pro rostliny nebo prostředí, ve kterém rostou, výhodná.

Protegriny podle vynálezu se tak mohou použít tam, kde se vyžaduje jejich antimikrobiální a/nebo antivirový účinek. Mohou se použít zcela *in vitro* a nebo se peptidy mohou zavést do organismů.

Navíc antimikrobiální nebo antivirové aktivity se mohou generovat *in situ* aplikací expresivního systému vhodného pro produkci protegrinů podle vynálezu. Takové expresivní systémy se mohou aplikovat na rostliny a zvířata za použití známých metod. Například u zvířat se mohou využívat expresivní vektory založené na neštovicích při tvorbě peptidů *in situ*. Podobně rostlinné buňky se mohou transformovat expresivními vektory a pak se regeneruje celá rostlina, která je schopna sama produkovat peptidy.

Protegriny jsou schopny ve standardních testech inaktivovat endotoxiny získané z gram-negativních bakterií, jako jsou lipopolysacharidy (LPS). Protegriny se mohou v podstatě používat za jakýchkoliv okolností, kde se vyžadují deaktivace LPS. Jedna taková situace je při léčbě nebo zmírnění gram-negativních sepsí.

Podmínky relevantní pro antimikrobiální/antivirovou aktivitu.

Jak je shora uvedeno termín "antimikrobiální" aktivita znamená inhibici s ohledem na tradiční mikroorganismy a viry, ačkoli termíny "antimikrobiální" a "antivirový" jsou oba specificky označeny.

"Zvláště použitelnou vlastností protegrinů je jejich aktivita v přítomnosti séra. Podobně jako defenziny, protegriny jsou schopny uplatnit své antimikrobiální účinky v přítomnosti séra.

Pro testování antimikrobiální aktivity se mohou připravit média, která napodobují jisté specifické podmínky. Standardní pufrované médium, označené jako médium A, používá se s přelitým agarem a má následující složení: 0,3 mg/ml prášku tryptikázové sojové půdy, 1% (m/v) agarózy a 10 mM pufr fosforečnanu sodného (konečné pH je 7,4). Tato směs se označuje buď jako "médium A" nebo jako "standardní *in vitro* podmínky".

Všechny ostatní média obsahují stejné komponenty. Navíc však:

Druhé médium obsahuje 100 mM NaCl za účelem napodobovat koncentrace solí v krvi a tkáňových roztocích. Toto médium bude označené jako "médium B" nebo "slané médium".

Třetí médium je doplněno 2,5% normálním lidským sérem; avšak má nízkou iontovou sílu a tak nenahrazuje tělní tekutiny. Toto médium se označuje jako "médium C" nebo "médium obsahující sérum".

Čtvrté médium obsahuje 80% RPMI-1640, jde o standardní médium tkáňových kultur, které obsahuje základní ionty a aminokyseliny, které se nachází v krvi a v tělních tekutinách. Navíc obsahuje 2,5% normální lidské sérum. Toto médium se označilo jako "médium D" nebo "fyziologické médium".

Jiná média použitelná při testování antimikrobiálních vlastností se popisují v příkladech.

Specifická označení

Zjistilo se, že jisté protegriny podle vynálezu jsou částečně účinné při léčbě jistých indikací. Například při léčbě mikrobiálních infekcí, kde infekční agents je *Staphylococcus aureus*, zvláště kmen s rezistencí na meticilín, jsou amidy vzorců:

RGWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:139)
GWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:141)
XCYCRRRFCVCVGR (X = Cha)	(SEQ ID NO:164)
WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:180)

zvláště účinné. Preferuje se také forma volných kyselin WLCYCRRRFCVCV (SEQ ID NO:180).

Při léčbě infekcí způsobených bakteriemi *Pseudomonas* původci zjistily, že následující amidy jsou účinné:

RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:1)
RGGRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:239)
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	(SEQ ID NO:228)

Efektivní je také forma volné kyseliny peptidu RLCYCRRRFCVCV (SEQ ID NO:66).

Při léčbě infekcí způsobených bakteriemi *H. pylori* se zjistilo, že následující sloučeniny ve formě amidů jsou částečně účinné:

WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:180)
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:178)
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:1)
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:134)
RLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:138)
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:136)
RGRVCLRYCRGRFCVRLCFR	(SEQ ID NO:241)
RGLRXCYCGRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:149)
GWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:139)
RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:66)
WLCYCXXXFCVCV (X=Dab)	(SEQ ID NO:29)
OWRLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:33)
RWOLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:37)
RRCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:82)
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:164)

Účinné jsou také enantiomérové (všechny D-) formy formy volných kyselin peptidu RRRLCYCRRRFCVCVGR (SEQ ID NO: 240).

Účinné dávky

Peptidy podle vynálezu nebo jejich kompozice se obecně používaly v množství, které je účinné pro dosažení daného účelu. Samozřejmě je jasné, že použité množství závisí na určité aplikaci.

Jestliže se uvedené peptidy používají jako dezinfekce nebo konzervační činidlo, pak antimikrobiálně účinné množství peptidu nebo jeho kompozice se aplikuje nebo se přidá k materiálu, který se dezinfikuje nebo je chráněn. Antimikrobiálně účinné množství je množství peptidu nebo kompozice, které inhibuje růst nebo usmrcuje populaci mikrobů. Zatímco aktuální antimikrobiálně účinné množství závisí na určité aplikaci, při použití peptidu nebo jeho kompozice jako dezinfekční nebo konzervační činidlo se tyto látky obvykle přidávají k nebo se aplikují na materiál, který se má dezinfikovat nebo konzervovat v relativně malém množství. Je typické, že peptid obsahuje méně než 5% váhy dezinfekčního roztoku nebo chráněného materiálu, s výhodou obsahuje méně než 1% váhy a preferuje se méně než okolo 0,1% váhy. Odborník je schopen určit antimikrobiálně účinné

množství určitého peptidu pro určité použití bez nutnosti provedení experimentů za použití například *in vitro* testu, které se popisuje v příkladech.

Při použití k léčbě nebo prevenci mikrobiálních infekcí nebo onemocnění se peptidy nebo jejich kompozice aplikují v terapeuticky účinném množství. Terapeuticky účinné množství je množství, které účinně tlumí symptomy, léčí nebo zabraňuje mikrobiálním infekcím nebo onemocnění. Pro odborníka je stanovení terapeuticky účinného množství jednoduché.

V případě, že se peptidy použijí jako dezinfekční nebo konzervační činidlo pro povrchovou aplikaci při léčbě nebo prevenci bakteriálních, kvasinkových, plísňových nebo jiných infekcí, se terapeuticky účinná dávka stanoví například v *in vitro* testech, které se popisují v příkladech. Léčba se zavádí v případech, kdy infekce je zřejmá nebo dokonce v případech, kdy infekce není patrná. Odborník je schopen určit terapeuticky účinné množství pro léčbu povrchových infekcí bez experimentů.

Při systémové aplikaci terapeuticky účinná dávka se může odhadnout z *in vitro* testů. Například dávka se může určit ve zvířecích modelech za účelem dosažení rozmezí koncentrace cirkulujícího peptidu, které zahrnuje IC_{50} určené v buněčné kultuře (to je koncentrace testované látky, která je smrtelná pro 50% buněčné kultury), MIC určené v buněčné kultuře (to je minimální inhibiční koncentrace růstu) nebo IC_{100} určené v buněčné kultuře (to je koncentrace peptidu, která je smrtelná pro 100% buněčné kultury). Takové informace se mohou použít k upřesnění stanovení dávky vhodné pro aplikaci lidem.

Počáteční dávky se mohou také odhadnout z dat získaných *in vivo*, např. zvířecí modely, použité metody jsou dobře známy v oboru. Odborník může snadno optimalizovat dávku pro lidi na základě dat získaných na zvířatech.

Dávka a interval se může stanovit jednotlivě tak, aby se dosáhlo koncentrace aktivního peptidu, jako je v plazmě, která je dostatečná pro udržení terapeutického účinku. Obvykle dávka vhodná pro aplikaci injekcí kolísá od 0,1 do 5 mg/kg/den, s výhodou se pohybuje v rozmezí 0,5 až 1 mg/kg/den. Terapeuticky účinné koncentrace séra se dosáhne aplikací více dávek každý den.

V případě lokální aplikace nebo selektivního pohlcení nemůže být účinná lokální koncentrace peptidu spojena s koncentrací plazmy. Odborník je schopný optimalizovat terapeuticky účinné lokální dávky bez provedení experimentů.

Množství aplikovaného peptidu samozřejmě závisí na léčeném subjektu, na hmotnosti subjektu, na vážnosti onemocnění, na způsobu aplikace a úsudku lékaře.

Antimikrobiální terapie se může nesouvisle opakovat, zatímco infekce jsou detekovatelné nebo dokonce v případě, že nejsou zřejmé. Léčba probíhá pouze s uvedenými látkami nebo v kombinaci s jinými léky, jako jsou například antibiotika nebo jiné antimikrobiální peptidy.

Toxicita

Upřednostňuje se terapeuticky účinná dávka zde popsaných peptidů, která bude mít terapeutický účinek, aniž způsobí podstatnou toxicitu.

Toxicita zde popsaných peptidů se stanovila v buněčných kulturách standardními farmaceutickými postupy nebo experimenty na zvířatech, např. stanovením LD₅₀ (dávka smrtelná pro 50% populace) nebo LD₁₀₀ (dávka smrtelná pro 100% populace). Dávkový poměr mezi toxickým a terapeutickým účinkem je terapeutický index. Preferují se látky, které vykazují vysoké terapeutické indexy. Data získaná z uvedených testů na buněčných kulturách a na zvířatech se používají při stanovení rozmezí dávky, které není toxické pro lidi. Dávka

zde popsaných peptidů leží přednostně v rozmezí cirkulující koncentrace, která zahrnuje účinnou dávku s malou toxicitou nebo dávku, která není toxická. Dávka může kolísat v tomto rozmezí v závislosti na použité dávkové formě a použitém způsobu aplikace. Lékař vybírá skutečnou formulaci, způsob aplikace a dávku v závislosti na podmínkách pacienta (např. Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1, p.1).

Souhrn

Protegriny proto výlučně reprezentují třídu látek použitelných na základě následujících vlastností:

- 1) Mají antimikrobiální účinek s ohledem na široké spektrum cílových mikrobiálních systémů, které zahrnují viry, retroviry, bakterie, houby, kvasinky a protozoa.
- 2) Jejich antimikrobiální aktivita je účinná při fyziologických podmínkách, to znamená ve fyziologickém roztoku a v přítomnosti séra.
- 3) Jsou znatelně méně toxické k buňkám vyšších organismů ve srovnání s mikróby.
- 4) Mohou se připravovat v neimunogenních formách a tak se rozšiřuje množství živočišných druhů, kterým je možné je aplikovat.
- 5) Mohou se připravovat ve formách, které jsou rezistentní na jisté proteázy, což naznačuje, že mají antimikrobiální účinky dokonce v lysozymu.
- 6) Jejich aminokyselinová sekvence se může modifikovat, čímž se optimalizuje specifita s ohledem na cílový organismus.
- 7) Může se modifikovat jejich struktura vzhledem k akomodaci podmínek, při kterých vykazují svou antimikrobiální aktivitu.

Přehled obrázků na výkrese

Obrázek č. 1 zobrazuje nukleotidovou sekvenci a odvozenou aminokyselinovou sekvenci genomové DNA, která kóduje prekursor proteinu antimukrobiálních látek PG-1, PG3 a PG-5.

Obrázek č. 2 ukazuje organizaci genomové DNA protegrinů.

Obrázky č. 3a až 3c znázorňují antimikrobiální aktivitu synteticky připraveného PG-5 ve srovnání se synteticky připraveným PG-1.

Obrázek č. 4 je grafické znázornění účinku přenosu bakterií do média, které obsahuje antibiotikum, na vývoj rezistence u bakterií *Staphylococcus aureus* (MRSA) a *Pseudomonas aeruginosa* s rezistencí na methicilin.

Obrázek č. 5 znázorňuje sekvence protwegrinů PG-1 až PG-5; a

Obrázek č. 6 znázorňuje sekundární peptidovou strukturu β -listu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Izolace a aktivita PG-1, PG-2 a PG-3

Jak se popisuje v PCT/US94/08305 z prasečích leukocytů se izolují tři antimikrobiální peptidy, které mají aminokyselinové sekvence:

PG-1: RGGRLCYCRRRFCVVCVGR

PG-2: RGGRLCYCRRRFCICV

PG-3: RGGGLCYCRRRFCVVCVGR,

které jsou amidovány na C-konci.

U těchto určitých protegrinů se testovala antimikrobiální aktivita.

Zjistilo se, že PG-1 a PG-3 jsou účinnější proti *E.coli* ML-35P ve srovnání s lidským neutrofilním peptidem HNP-1 a pouze trochu méně účinné než králičí defenzin NP-1. PG-1 a PG-3 jsou také účinné proti *Listeria monocytogenes* kmen EGD a proti *Candida albicans*. Obecně lze říct, že tyto peptidy jsou přibližně stejně účinné jako králičí defenzin NP-1 na základě váhy a účinnější než HNP-1. Ve všech případech PG-2 byl také účinný na tři testované organizmy, ale nebyl tak aktivní jako druhé dva peptidy.

Zistilo se, že PG-1 přímo inhibuje růst *Staphylococcus aureus* a *K. pneumoneae* 270. HNP-1, který se používal jako kontrola, byl méně účinný v případě *Staphylococcus aureus* a skoro zcela neúčinný v případě *K. pneumoneae*.

Protegriny se také testovaly proti různým organizmům a vykazují široké spektrum aktivity. Navíc vedle jejich účinku při inhibici růstu nebo infekci organismů spojených s STD vykazují silnou aktivitu proti následujícím organizmům : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium avium-intracellulare* a *Mycobacterium tuberculosis*. Protegriny vykazují pouze nízkou aktivitu proti *Vibrio vulnificus* a nejsou aktivní proti *Vibrio cholerae* a *Borrelia burgdorferi*.

Shora popsané tři protegriny si uchovávají svou aktivitu v kontextu s různými reakčními podmínkami, které zahrnují přítomnost 100 mM NaCl a přítomnost 90% fetálního telecího séra.

Protegriny mají spektrum retence antimikrobiálních vlastností při fyziologických podmínkách, které zahrnují izotonické a borátové roztoky, které jsou vhodné pro použití v produktech pro ošetření očí.

PG-1 a PG-3 udržují svou aktivitu s ohledem na *C. albicans* a *E. coli* v přítomnosti 100 mM NaCl. Ani NP-1 ani

HNP-1 nemá tuto vlastnost. Ačkoli NP-1 a HNP-2 ztrácí svou schopnost inhibovat *C. albicans* v 90% fetálním telecím séru, PG-3 si udržel své inhibiční schopnosti.

Jestliže se mění reakční podmínky protegriny vykazují kolísavé paterny aktivity. Syntetický PG-1 se testoval v přítomnosti *E. coli* ML-35 (citlivý na sérum) v přelitém gelu, který obsahoval pouze 10 mM pufr fosforečnanu sodného pH 7,4 a triptikázovou sojovou půdu v ředění 1:100, v přítomnosti a za nepřítomnosti 2,5% normálního lidského séra. Uvedená koncentrace leží pod lytickou koncentrací, při které dochází k lyzi tohoto kmene. Jestliže sérum bylo přítomno, normální bakteriocidní koncentrace se redukovala z přibližné hodnoty 1,0 µg/ml na přibližnou hodnotu 0,1 µg/ml. Tento typ účinku se nepozoroval ani u lineárního fragmentu katepsinu G ani u defenzin HNP-1.

Podobně v případě, že se použil jako cílový organizmus *C. albicans*, se připravily přelitě půdy s 10mM fosforečnanem sodným a s nebo bez 10% normálního lidského séra. Minimální fungicidní koncentrace spadla s hodnoty okolo 1,3 µg/ml v nepřítomnosti séra na hodnoru 0,14 µg/ml za přítomnosti séra. Samotné sérum v této koncentraci nemá žádný účinek na *C. albicans*. Podobné výsledky se získaly při použití *L. monocytogenes* jako cílového organismu.

Protegriny PG-1 a PG-3 se inkubovaly 4 hodiny při pH 2,0 s pepsinem o koncentraci 0,5 µg/ml a pak se neutralizovaly. Odhadla se zbytková antimikrobiální aktivita proti na *C. albicans*, *E. coli* a *L. monocytogenes* a zjistilo se , že je plně zachována. Podobné experimenty ukazují, že tyto látky nejsou degradovány lidskou leukocytovou elastázou nebo lidským leukocytovým katepsinem G, dokonce když jsou vystaveny vysokým koncentracím těchto enzymů a při pH 7,0 až 8,0, což je pH optimální pro proteulytickou aktivitu.

Syntetický amid PG-3 a syntetická kyselina PG-3 se autoklavovaly a testovala se jejich antimikrobiální aktivita proti *E.coli*, *L. monocytogenes* a *C. albicans*. Zmíněné formy si uchovaly plnou antimikrobiální aktivitu ve všech případech. Je možné, že stabilita těchto látek vůči proteázové degradaci a vůči autoklávování je zesílena přítomností disulfidových můstků.

Dále se testovala schopnost protegrinů vázat lipidové polysacharidy (LPS) gram-negativních bakterií *E.coli* kmen 0.55B5.

Syntetické i nativní PG-1, PG-2 a PG-3 amidované a neamidované formy jsou schopny vázat LPS při koncentraci 2,5 µg/ml. nPG-1 a nPG-2 jsou účinné i při nižších koncentracích. Protegriny byly podstatně účinnější ve srovnání s NP nebo HNP látkami; nejúčinnější mezi těmito kontrolami byl NP-3a, což je peptid, jehož primární sekvence je nejbližší sekvenci protegrinů.

Inhibici gelatinizace se může předejít zvýšením koncentrace LPS, protože interakce s LPS je odpovědná za to, že ke gelatinizaci nedochází, spíše než interference s enzymovou kaskádou gelatinizace.

nPG-1 a nPG-3 se přeměnily na lineární formu za použití redukčního činidla, které přeměnilo disulfidové spojení na sulphydrylové skupiny, které se pak stabilizovaly alkylací s jodoacetamidem.

Linearizované formy protegrinů jsou v inhibici gelatinizace v endotoxinovém testu a ve schopnosti vázat endotoxin ekvivalentní cyklickým formám.

Linearizované a cyklické formy testovaných protegrinů vykazují antimikrobiální aktivitu, ačkoli účinnost antimikrobiálního působení těchto peptidů závisí na podstatě cílového organismu a na testovacích podmínkách.

Antimikrobiální aktivita cyklických a linearizovaných forem PG-1 a PG-3 v koncentračním rozmezí 20 µg/ml až 125 µg/ml s ohledem na kmen *E.coli* ML-35P se měřila za přítomnosti nebo bez 100 mM NaCl. Lineární forma byla trochu účinnější ve srovnání s cyklickou formou v přítomnosti samotného pufru; na druhé straně cyklická forma byla účinnější ve srovnání s lineární formou za izotonických podmínek.

V případě *L. monocytogenes* obě formy protegrinů, jak cyklická tak linearizovaná, vykazují silnou antimikrobiální aktivitu v nepřítomnosti solí a obě formy byly prakticky stejně účinné v testovaném rozmezí koncentrací (20 µg/ml až 125 µg/ml). Cyklická forma si v přítomnosti 100 mM NaCl si udržela v závislosti na slabě vyšší koncentraci silnou antimikrobiální aktivitu. Linearizace se projevila nižší aktivitou, ačkoli vysoké koncentrace stále vykazují antimikrobiální účinek.

Všechny formy těchto protegrinů přítomnosti samotného fosfátového pufru jsou účinné v případě *C. albicans* v závislosti na způsobu dávkování v daném koncentračním rozmezí, ačkoli linearizované peptidy vykazaly nižší účinnost. Zatímco cyklické formy udržují ve 100 mM NaCl přibližně stejnou úroveň antimikrobiálního účinku, aktivita linearizovaných forem se značně snížila tak, že při koncentraci protegrinu pod 100 µg/ml nebyl prakticky zjevný žádný antimikrobiální účinek.

Při koncentracích nad 130 µg/ml se pozoroval pozměněný antibakteriální účinek.

V závislosti na cílovém organismu a používaných podmínkách obě formy, jak cyklická tak linearizovaná, PG-1 a PG-3 mají antimikrobiální aktivitu.

Roztoky pro kontaktní čočky se typicky připravují z fyziologického roztoku pufrovaného boratem a mohou obsahovat EDTA. Protegriny ve formě syntetického PG-3 amidu a syntetické PG kyseliny se testovaly za podmínek, kdy přelité gely obsahovaly 25 mM boratového pufru pH 7,4, 1% (o/o) tryptokázové sojové půdy (0,3 µg/ml TBS prášku) a 1% agarózy. Navíc zahrnuje buď 100 mM NaCl, 1 mM EDTA nebo jejich kombinaci. Jiné testované látky, které se používaly jako kontroly, jsou defenzin NP-1 a lysozym. Stanovila se křivka odpovědi na dávku.

Ačkoli tyto protegriny vykazují nižší aktivitu v 25 mM fyziologickém roztoku pufrovaném borátem ve srovnání s 25 mM fosfátovým pufrem, antimikrobiální aktivita se zvýší přidáním fyziologického roztoku a 1mM EDTA.

Testy provedené na *L. monocytogenes* a *C. albicans* indikují, že protegriny jsou schopny uplatnit své antimikrobiální účinky za podmínek, které jsou vhodné pro produkty pro ošetření očí.

Příklad 2: Získání klónů cDNA

Jak se popisuje v WO 95/03325, cDNA kódující PG-1, PG-2, PG-3 a PG-4 se připravily z prasečích leukocytů a sekvence DNA kódující tyto protegriny jsou uvedeny na obrázku č. 7 publikované přihlášky.

Příklad 3: Získání genomové DNA kódující PG-1, PG-3 a PG-5

Pomocí kitu "QIAGEN blood DNA" (QIAGEN, Chatsworth, CA) se izolovala z bílých krvinek vepřů genomová DNA o vysoké molekulové váze. Při amplifikaci protegrinových genů (PG) se používá PCR, kde jako templát slouží genomová DNA.

Sense primer se sekvencí 5'-GTCGGAATTCATGGAGACCCAGAG(A nebo G)GCCAG-3' odpovídá 5'oblastem PG cDNA příkladu 2 a poskytuje restriční místo EcoRI. Antisense primer se

sekvencí 5'-GTCGTCTAGA(C nebo G)GTTTCACAAGAATTTATTT-3' je komplementární s 3'konci PG cDNA a bezprostředně předchází poly(A) ocasu a poskytuje restrikční místo XbaI. Reakce proběhla v celkovém objemu 50 μ l, kde je obsaženo 200 ng čištěné prasečí genomové DNA, 25 pmolů každého primeru, 1 μ g 10 mM dNTP, 5 μ g 10x koncentrovaného PCR pufru (200 mM Tris-HCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2$, 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100, 0,1% BSA) a 2,5 jednotky Pfu DNA polymerázy (Stratagen, La Jolla, CA). Proběhlo 30 cyklů, každý zahrnoval 1 min denaturace při teplotě 94°C, 1 min pro navázání primerů při teplotě 55°C, 2 min extenze primerů při teplotě 72°C a konečný krok extenze při teplotě 72°C pod obu 10 min.

Amplifikovaný produkt PCR štěpený restrikčními enzymy EcoRI a XbaI, se izoloval z agarózového gelu, čistil se a ligoval se do vektoru pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, CA), který se štěpil restrikčními enzymy EcoRI a XbaI a pak se izoloval. Oba řetězce DNA se sekvenovaly dideoxy metodou za použití kitu Sequenase verze 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, OH), univerzálních primerů pro pBluescript a specifických oligomérových primerů založených na PG genomových a cDNA sekvencích. Počítačová analýza sekvencí DNA se uskutečnila za použití programu PG-Gen (Intelligenetics, Palo Alto, CA).

Hybridizací s oligonukleotidovou sondou specifickou pro protegriny, která je komplementární s úsekem nt. 403-429 protegrinových cDNA sekvencí, se potvrdilo, že produkt PCR o velikosti 1,85 kb je odvozený od protegrinu. Produkt PCR se pak subklonoval do vektoru pBluescript a izolovala se a sekvenovala se DNA rekombinantních plazmidů. Identifikovaly se genové sekvence třech různých protegrinů PG-1, PG-3 a PG-5. Nukleotidové sekvence a dedukované aminokyselinové sekvence jsou uvedeny na obrázku č. 1.

Srovnáním protegrinové cDNA a genů protegrinů naznačují, že kódující oblasti protegrinových genů obsahují čtyři exony a jsou přerušeny třemi introny (obrázek č. 2). První exon obsahuje 5' nekódující oblast a kodony prvních 66 aminokyselin protegrinového prepropeptidu, zahrnuje 29 zbytků signálního peptidu a prvních 37 zbytků katelinu. Exony I a II jsou relativně malé, velikost je 108 a 72 bp, a dohromady obsahují dalších 60 zbytků katelinu. Exon IV obsahuje dva katelinové zbytky a pak následují protegrinové sekvence. Sekvence místa sestřihu exonu a intronu jsou uvedeny v tabulce č. 1 a odpovídají umluveným pravidlům: všechny introny končí dvojicí AG, pak následuje protažení 8 až 12 bazí bohatých na T/C, zatímco všechny introny začínají na GT a po nich následuje sekvence, kde převažují A/G A/G G.

Tabulka č. 1

Struktura exon-intron genu PG-1

exon	velikost	5'sestřih donoru	intron	velikost	3'sestřih akceptoru
1	?+198	AAGGCCgtgagtcg	1	405	ttgaccagGACGAG
2	108	AACGGGgtgaggct	2	152	ccttccagCGGGTG
3	72	AATGAgtgagtgg	3	596	ggtcacagGTTCAA
4	313				

Vysoce konzervativní katelinová oblast exonů I až IV a exonu IV obsahuje úplnou sekvenci hotového protegrinového peptidu následovaného amidační sekvencí a 3' nepřekládanou oblastí a putativním polyadenylačním místem. Oblast tří intronů má rozsah 152 až 596 bp. Zjistilo se, že, jestliže protegrinové geny reprezentují geny podobné katelinovým genům, pak třetí intron peptidů spojených s katelinem odděluje oba poslední zbytky vysoce konzervativní oblasti katelinu od variabilních antimikrobiálních peptidů kódovaných

v exonu IV. To je vhodný rekombinantní mechanismus zahrnující asociaci diverzního exonu IV s prvními třemi exony, které specifikují katelin obsahující prepro-oblasti.

Rodina přirozeně se vyskytujících protegrinů pak obsahuje nejméně 5 členů. Obrázek č. 5 znázorňuje srovnání aminokyselinových sekvencí pěti protegrinů, které se nacházejí v prasečích leukocytech. Existuje úplná homologie v pozicích 1 až 3, 5 až 9, 13 a 15 až 16.

Srovnání protegrinových genů s EMBL/GenBank identifikoval nepodstatně homologní geny. Struktura genů a nukleotidové sekvence protegrinů jsou velmi odlišné od sekvencí defenzinů, které obsahují tři exony v genech myelodních defenzinů a dva exony v genech enterických defenzinů. Jak se očekávalo srovnání odhalilo velkou rodinu cDNA odpovídající s katelinem-asociovaných telecích, prasečích a králičích peptidů.

Za účelem zjištění genů příbuzných s protegriny se testovaly prasečí genomové knihovny přibližně $2,3 \times 10^5$ klónů v EMBL-3 SP6/T7 s ^{32}P -značenou protegrinovou cDNA a identifikovalo se 45 hybridizujících klónů.

Genomová knihovna prasečích jater ve fágách EMBL3 SP6/T7 se získala z Clontech (Palo Alto, CA). Kmen *E. coli* K803 se použil jako hostitel a DNA z fágových plaků se přenesla na nylonové membrány (DuPont, Boston, MA). Filtry se hybridizovaly s prasečí 691 PG-3 cDNA značenou ^{32}P . Filtry se několikrát promyly, poslední lázeň obsahovala 0,1x SSC a 0,1% SDS a proběhla při teplotě 60°C , pak se exponoval film pro x-záření při teplotě -70°C . Pozitivní klóny se podrobily plakovému čištění ve dvouch cyklech při nízké hustotě.

DNA izolovaná z hybridizujících klónů se štěpila různými restriktčními endonukleázami (New England Biolabs, Beverly, MA), rozdělila se na fragmenty na 0,8% agarózovém gelu a přenesla se na GeneScreen Plus membránu (DuPont, Boston, MA).

Hybridizační proby byly značeny pomocí ^{32}P a zahrnovaly cDNA prasečího PG-3 a protegrinový specifický oligonukleotid značený na 5'konci, který je komplementární s nt. 403 až 429 cDNA PG-1, 2 a 3. V případě cDNA sond hybridizace a promývání proběhlo stejně jako při testování knihovny. V případě oligonukleotidové sondy se membrány promývaly při teplotě 42°C v pufru obsahujícím 0,1x SSC a 0,1% SDS.

Analýza Southernovým přenosem proběhla hybridizací izolované DNA získané z pozitivních klónů s protegrinovou cDNA a s protegrinovým specifickým oligonukleotidem, který je komplementární s nt. 403 až 429 sekvence protegrinové cDNA. Ačkoli všechny klóny hybridizovaly s celou cDNA sondou, pouze přibližně polovina z nich hybridizovala s protegrinovou specifickou sondou. Specifická oligonukleotidová sonda pro prasečí propenin, což je další katelin-asociovaný antimikrobiální peptid získaný z prasečích leukocytů, hybridizovala z několika neprotegrinovými klóny. Tyto výsledky potvrzují a) že konzervovaná prooblast homologní s katelinem je přítomna ve stejném genu jako antimikrobiální peptidy a není přidána posttranskripčními kroky a b) že za protegrinové se považuje u prasat zhruba polovina genů příbuzných katelinu.

Syntetický peptid odpovídající aminokyselinové sekvenci PG-5 se připravil a testoval se s ohledem na antimikrobiální aktivitu proti *E.coli*, *L. monocytogenes* a *C. albicans*. Výsledky se porovnaly s těmi získanými se synteticky připraveným PG-1. Výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 3a až 3c. Jak je zobrazeno na grafickém znázornění výsledků, PG-5 má srovnatelnou antimikrobiální aktivitu proti všem třem testovaným organizmům s PG-1.

Příklad 4: Příprava enantio-PG-1

Za použití standardních metod pevné fáze se připravil protegrin, který má aminokyselinovou sekvenci PG-1, ale kde každá aminokyselina je v D-formě. Tato forma protegrinu se testovala proti *E.coli*, *L. monocytogenes* a *C. albicans* a proti jiným organismům za nepřítomnosti a přítomnosti proteázy a v jiném případě se prováděla radiodifúzní test v agarózových gelech, jak se popisuje v publikaci Lehrer, R.I. et al., J. Immunol. Meth (1991) 137: 167-173. Výsledky ukazují, že jak nativní PG-1 tak enantio-PG-1 v nepřítomnosti proteázy je stejně účinný v inhibici růstu *E.coli*. Ani trypsin nebo chymotrypsin neinhibují antibakteriální účinek enantio-PG-1. V přítomnosti těchto proteolytických enzymů schopnost nativního PG-1 inhibovat růst *L. monocytogenes* je negativně ovlivněna, ačkoli v přítomnosti těchto proteáz je PG-1 srovnatelně aktivní jako enantio-PG-1.

Za použití stejných metod se syntetizují enantio-formy PG-2, PG-3, PG-4 a PG-5. Podobně se připravují enantio-formy látek, které se popisují dříve v textu.

Příklad 5: Aktivita protegrinů proti STD patogenům

Jak se uvádí v WO 95/03325 PG-1 se testoval proti různým organismům, které odpovídají za infekce spojené s pohlavně přenosnými nemocemi (STD). PG-1 je vysoce aktivní proti HIV-1, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae* a je slabě aktivní proti *Trachimonas vaginalis* a Herpes simplex typ 2. PG-1 není aktivní proti Herpes simplex typ 1, avšak další protegriny např. amidová forma RGGLVYVRGRFCVCVGR je aktivní proti Herpes simplex typ 1.

Příklad 6: Antiretrovirová aktivita

Synttická a nativní PG-1 a nativní PG-2 vykazují antivirovou aktivitu proti různým kmenům HIV za použití

metody popsané v publikaci Miles, S.A. et al., Blood (1991) 78: 3200-3208, a jak se uvádí shora v textu v WO 95/03325.

Protegriny vykazují podobnou aktivitu s ohledem na jiné retroviry.

Příklad 7: Příprava modifikovaných protegrinů: formy "kite" a "bullet"

Formy "kite" a "bullet" PG-1, kde všechny Z jsou alanin, se syntetizovaly použitím běžně Fmoc chemie. Surový syntetický peptid se syntetizoval přidáním stejného váhového množství dithiotritolu (DTT) k syntetickému peptidu, který se rozpustil v koncentraci 10 mg peptidu v ml roztoku a který obsahoval 6M guanidin HCl, 0,5 M Tris pufr a 2 mM EDTA, pH 8,05 a inkuboval se po dobu dvou hodin při teplotě 52°C v atmosféře dusíku. Směs se filtrovala skrz filtr s póry o velikosti 0,45 µm, okyselil se 1/20 (o/o) kyseliny octové a izoloval se běžnou RP-HPLC na koloně C-18. Takto izolované redukované formy "kite" a "bullet" PG-1 se částečně koncentrovaly na vakuové centrifuze na zařízení "speed vac" a nechaly se zavinit po dobu 24 hodin při teplotě místnosti, v prostředí okolního vzduchu, v 0,1 M Tris pH 7,7 při nízké koncentraci (0,1 mg peptidu na ml), aby se minimalizovalo tvoření meziřetězových disulfidových můstků. Směs se pak koncentrovala a okyselila HOAc na konečnou koncentraci 5% a čistila se RP-HPLC.

Čistota konečného produktu forem "kite" a "bullet" PG-1 se ověřila AU-PAGE, analytickou HPLC a FAM hmotnostní spektroskopií. AU-PAGE v každém případě vykazuje jeden pruh pro konečný produkt. Pozorovaná hodnota MH^+ v obou případech byla 2093.

Příklad 8: Antimikrobiální aktivita forem "kite" a "bullet"

U látek forem "kite" a "bullet" PG-1 připravené podle příkladu 7 se testovala antimikrobiální aktivita za použití radiálního difúzního testu, jak se popisuje v publikaci Lehrer, R.I. et al., J Immunol Meth (1991) 137: 167-173 s výjimkou, že spodní agary obsahují 10mM pufr fosforečnanu sodného s konečným pH7,4. Jak se popisuje v příkladu 1, I v případě spodního agaru se použilo 0,3 mg/ml tryptikázové sojové půdy a 1% agaróza, V některých případech se do agaru přidal 100 mM NaCl nebo RPMI plus 2,5% normální lidské sérum (NHS).

V první sadě stanovení se testovala antimikrobiální aktivita forem "kite" a "bullet" PG-1 proti *L. monocytogenes*, *E. faecium* (VR) nebo *S. aureus* za uvedených podmínek.

Formy "kite" a "bullet" PG-1 jsou shruba stejně účinné proti uvedeným třem bakteriím za standardních podmínek testu. Když se do agaru přidalo 100 mM NaCl, formy "kite" jsou méně aktivní ve srovnání s formami "bullet", které vykazují za uvedených podmínek slabě zvýšenou antimikrobiální aktivitu proti všem třem kmenům mimo *S. aureus*. Podobně, když se přidá RPMI plus 2,5% NHS, formy "bullet" jsou opět účinnější než formy "kite". Aktivita formy "kite" proti *E. faecium* je za uvedených podmínek podstatně nižší.

Tyto formy PG-1 se také testovaly proti *E. coli*, *K. pneumoniae* a *P. aeruginosa*. Za standardních podmínek formy "kite" a "bullet" PG-1 inhibovaly všechny tři organizmy. Tato antimikrobiální aktivita se udržela také v přítomnosti 100 mM NaCl a RPMI plus NHS.

Příklad 9: Syntéza formy "snake" PG-1

Forma "snake" PG-1, kde všechny Z jsou alanin, se připravila za použití standardní metody podle Synpep Inc., Dublin, CA a hodnota MH+ na FAB hmotnostním spektroskopu je

2031,3, což se očekávalo. Forma "snake" PG-1 se čistila až do dosažení homogenity na RP-HPLC.

Příklad 10: Antimikrobiální aktivita formy "snake" PG-1

Forma "snake" PG-1 se testovala s použitím stejných šesti organismů a za stejných podmínek, jak se uvádí v příkladu 8, s ohledem na formy "kite" a "bullet" PG-1. V tomto případě se jako kontrola používala nativní dvou-disulfidová forma PG-1. Zatímco forma "snake" vykazuje silnou aktivitu proti *L. monocytogenes*, *E. faecium* a *Saureus* za standardních podmínek, musí se poznamenat, že je méně aktivní ve srovnání s nativní formou v přítomnosti buď 100 mM NaCl nebo RPMI plus NHS. Podle stejného paternu se postupuje, když testovanými organismy jsou *E. coli*, *K. pneumoniae* a *P. aeruginosa*.

Příklad 11: Příprava miniprotegrinů a protegrinů se zvýšenou bazicitou

Připravila se série protegrinů, která zahrnuje formy "kite" a "bullet", kde jeden nebo oba X_5 a X_{16} jsou bazické, jako protiklad hydrofóbní aminokyselině a/nebo X_1 - X_4 nejsou přítomny. Připravené peptidy jsou uvedeny v tabulce č. 2, kde se také porovnávají s aminokyselinovou sekvencí PG-1.

Tabulka č. 2

Sekvence vybraných miniprotegrinů

kód	sekvence	hmotnost
PG-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	2154,04
PC-11	LCYCRRRFCVCVGR	1730,11
PC-12	RCYCRRRFCVCVGR	1773,14
PC-13	RGGRLCYCRRRFCVCV	1943,35
PC-14	RGGRLCYCRRRFCICV	1957,38
PC-15	RGGRLCYCRRRFCVCR	2000,41

PC-16	RCYCRRRFCVCR	1616,96
PC-17	LCYCRRRFCVCV	1516,87
PC-18	LCYCRRRFAVCV	1454,77
PC-19	RCYARRRFAVCR	1554,85
PC-20	LAYCRRRFCVAV	1454,77
PC-21	RAYCRRRFCVAR	1554,85
PC-22	RGGRLCY RR VCVGR*	1648,97
PC-31a	GGRLCYCRRRFCVCVGR	1999,40
PC-32a	RGRLCYCRRRFCVCVGR	2098,54
PC-33a	GRLCYCRRRFCVCVGR	1942,35
PC-34a	RRLCYCRRRFCVCVGR	2041,49
PC-35a	RLCYCRRRFCVCVGR	1885,30
PC-36a	RRCYCRRRFCVCVGR	1928,33
PC-37a	CYCRRRFCVCVGR	1615,95
PC-44a	RGGRLCYCRRRFCVCR*	2000,41
PC-45	RGGRLCYCRRRFCVC	1843,22
PC-46	RGGRLCYCRRRFCVC*	1844,22
PC-47a	RGGRLCY RRRF VCVGR	1951,33
PC-48	RGWRLCYCRRRFCVCVGR	2284,75

Hvězdička (*) v tabulce č. 2 označuje volnou kyselinu C-konce; všechny další jsou amidy C-konce.

Napodobeniny protegrinů se testovaly za použití radiálního difúzního testu, v kterém se používají organizmy ve střední logaritmické fázi, mimo testů s *C. albicans*, kde se používá celonoční kultura. Jak se popisuje shora v textu všechny spodní agary obsahují 0,3 mg/ml tryptikázové sojové půdy na jeden mililitr, 1% hm/o agarózy, 10mM pufr fosforečnanu sodného pH7,4 a agary se inokulovaly 4×10^6 bakterií nebo fungálními CFU na 10ml. Standardní sodní agar, médium A, se popisuje shora v textu; Médium B je stejné mimo to, že také obsahuje 100 mM NaCl; médium C obsahuje

standardní médium plus 2,5% normální lidské sérum; a médium D obsahuje 80% RPMI-1640 plus 2,5% normální lidské sérum.

Testované peptidy se rozpustily v koncentraci 500 µg/ml v roztoku 0,01% kyseliny octové a připravilo se sériové ředění ve stejném rozpouštědle buď jako dvounásobné ředění nebo poloviční logaritmické ředění (poloviční logaritmické ředění jsou od 500 µg/ml, 250, 78, 25, 7,8, 2,5, 0,78, 0,25 a 0,078 µg/ml).

Ředění se připravovala denně v množství dostatečném pro experimenty provedené v tomto dni; testy se provedly tak, že 5 µg objemů roztoku se přidalo do vypíchnutých děr (o průměru 3mm) v bakteriálních spodních gelech. Přelité gely (2xkoncentrovaný běžný tryptikázový sojový agar) se nalil po třech hodinách. Velikosti zón se měřily nejbližší 0,1 mm po celonoční inkubaci. Velikosti zón vyjádřené v jednotkách vyčerení (10 jednotek = 1mm v průměru) se vynesl do grafu proti $\log_{10}$ koncentrace peptidu za použití programu pro sigma grafy. Úsek na ose X koresponduje s minimální mikrobicidní koncentrací a určil se regresní analýzou nejmenších středních řtverců. Do výpočtu se zahrnuly pouze nejvyšší koncentrace peptidu, které nevykazují vyčerení agaru.

Výsledky Výsledky poskytují minimální mikrobicidní koncentrace v µg/ml a relativní molekulární sílu, která je vsouladu s molekulovou váhou.

V počátečních experimentech se testovaly PC-11 a PC-12 a výsledky se srovnávaly s výsledky s PG-1. Výsledky se uvádí v tabulkách č. 3 a 4.

Tabulka č. 3

Minimální mikrobicidní koncentrace (µg/ml)

ředění série 1	10mM fosforečnanový pufr			10mM pufr + 100 mM NaCl		
organizmus	protegr	PC-11	PC-12	protegr	PC-11	PC-12

	PG-1			PG-1		
<i>E.coli</i> ML-35p	5,3	2,3	3,8	2,8	1,3	1,9
<i>L.mono</i> , EGD	5,8	4,8	5,1	3,6	3,7	5,5
<i>C.albicans</i> 820	6,1	7,1	4,3	7,9	11,6	20,5
<i>S.aureus</i> 930918-3	7,0±0,54	3,7	3,3	4,5±0,26	3,3	3,9
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	4,0±0,18	3,2	1,1
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	3,1±0,03	2,1	2,6

Tabulka č. 4

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

	10mM fosforečnanový pufr		pufr +100 mM NaCl	
organismus	PC-11	PC-12	PC-11	PC-12
<i>E.coli</i> ML-35p	1,85	1,15	1,73	1,65
<i>L.mono</i> , EGD	0,97	0,99	0,78	0,80
<i>C.albicans</i> 820	0,69	0,71	0,55	0,47
<i>S.aureus</i> 930918-3	1,52	1,75	1,09	0,95
MRSA 30371	n.t.	n.t.	1,00	1,06
MRSA 28841	n.t.	n.t.	1,19	0,98

Jak je uvedeno v tabulce č. 4 zkrácené formy protegrinů jsou trochu účinnější proti *E.coli* a *S.aureus* ve srovnání s PG-1 a srovnatelně účinné proti zbývajícím testovaným organismům s výjimkou *C.albicans*, kde účinnost se pohybuje ve stejném řádu.

Tabulky č. 5 a 6 ukazují minimální mikrobicidní koncentrace a relativní molární sílu provedení PC-15, de X₁₆ je bazická aminokyselina. PC-13 je identický s PG-1 s výjimkou, že neobsahuje X₁₇ a X₁₈. Jak je uvedeno v této tabulce záměna X₁₆ bazickou aminokyselinou zvyšuje sílu proti většině organismů, ale mění odezvu na přidané sole.

Tabulka č. 5

Minimální mikrobicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)

ředění série 1 organismus	10mM fosforečnanový pufr				10mM pufr + 100 mM NaCl			
	PG-1	PC-13	PG-2	PC-15	PG-1	PC-13	PG-2	PC-15
<i>E.coli</i> ML-35p	6,1	3,4	4,7	3,7	3,4	2,3	2,9	1,5
<i>L.mono</i> , EGD	6,5	4,6	5,2	2,8	4,0	2,7	3,2	2,4
<i>C.albicans</i> 820	5,5	4,0	4,8	2,6	7,5	10,2	10,1	8,8
<i>E.faecium</i> (klin. izolát)	10,7	6,6	10,8	4,3	2,6	3,4	4,0	6,2
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3,1	4,6	3,6	5,6
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3,0	2,0	2,3	0,8
<i>S.aureus</i> 930918-3	6,0	6,1	7,5	5,3	4,7	3,4	3,6	5,7
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	4,1	3,4	3,6	4,4
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3,2	2,6	2,1	2,3

Tabulka č. 6

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

organismus	10mM fosforečnanový pufr			pufr +100 mM NaCl		
	PC-13	PG-2	PC-15	PC-13	PG-2	PC-15
<i>E.coli</i> ML-35p	1,62	1,18	1,53	1,33	1,06	2,1
<i>L.mono</i> , EGD	1,27	1,14	2,15	1,33	1,14	1,55
<i>C.albicans</i> 820	1,24	1,04	1,96	0,66	0,67	0,79
<i>E.faecium</i> (klin. izolát)	0,89	0,90	2,31	0,69	0,59	0,39
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	0,61	0,78	0,51
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	1,35	1,18	3,48
<i>S.aureus</i> 930918-3	0,89	0,75	1,05	1,25	1,19	0,77
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	1,09	1,03	0,86
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	1,11	1,38	0,85

Tabulky 7 až 10 ukazují zýsledky PC-16 a PC-17, kde chybí X_1 - X_4 ; PC-16 také obsahuje bazické aminokyseliny v pozicích X_5 a X_{16} . Tabulky 8 a 10 se vztahují na minimální mikrobicidní koncentrace a liší se pouze v pozměněné metodě ředění. V tabulkách 8 a 9 se použilo dvojnásobné ředění a v tabulce č 10 až 11 se použilo poloviční logaritmické ředění. Data v těchto tabulkách ukazují, že účinnost ve srovnání s PG-1 kolísá v závislosti na cílovém organismu a na testovacích podmínkách. Jak ukazuje tabulka č. 9 například PC-17 (a PC-16) jsou většinou srovnatelně méně aktivní, než PG-1 v přítomnosti sole; Jak se ukázalo v tabulce č. 11 přítomnost séra je také problematická zvláště v případě PC-16.

Tabulka č. 7

Minimální mikrobicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)

ředění série 1	10mM fosforečnanový pufr			10mM pufr + 100 mM NaCl		
organismus	PG-1	PC-16	PC-17	PG-1	PC-16	PC-17
<i>E.coli</i> ML-35p	4,4	1,1	2,0	3,2	0,9	2,7
<i>L.mono</i> , EGD	4,0	1,1	2,2	2,6	4,1	5,0
<i>C.albicans</i> 820	5,2	1,9	5,5	8,0	29,3	32,6
<i>E.faecium</i>	6,6	3,4	4,8	3,3	3,8	5,7
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	4,1	16,7	6,4
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	3,3	1,2	3,7
<i>S.aureus</i> 930918-3	7,6	3,8	5,2	4,7	27,5*	6,4
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	4,3	12,3*	5,7
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	3,1	5,3*	4,0

Tabulka č. 8

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

ředění série 1	10mM fosforečnanový pufr		pufr +100 mM NaCl	
organismus	PC-16	PC-17	PC-16	PC-17
<i>E.coli</i> ML-35p	3,00	1,55	2,50	0,78
<i>L.mono</i> , EGD	2,73	1,28	0,48	0,37
<i>C.albicans</i> 820	2,05	0,67	0,20	0,17
<i>E.faecium</i>	1,46	0,97	0,65	0,41
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	0,18	0,45
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	2,06	0,63
<i>S.aureus</i> 930918-3			0,13*	0,13
MRSA 30371	n.t.	n.t.	0,26*	0,26
MRSA 28841	n.t.	n.t.	0,66*	0,55

Tabulka č. 9

Minimální mikrobicidní koncentrace (µg/ml)

ředění série 1	pufr + 100 mM NaCl			RPMI + 2,5% NHS		
organismus	PG-1	PC-16	PC-17	PG-1	PC-16	PC-17
<i>E.coli</i> ML-35p	1,4	0,59*	1,0	0,36	0,49	0,42
<i>L.mono</i> , EGD	0,7	1,5	0,7	0,35	0,61	0,42
<i>C.albicans</i> 820	8,6	25,5	10,5	7,1	24,1*	29,8*
<i>E.faecium</i>	1,2	10,0	0,63	0,42	31,1	0,40
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	1,5	11,3	1,6	0,5	28,4	0,90
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	0,67	0,44	0,56	0,37	8,8	0,39
<i>P.auriginosa</i> MR 2330	1,3	0,41	1,2	0,96	8,8	0,80
<i>P.auriginosa</i> SBI-N	1,4	1,2	1,1	0,81	2,8	0,83
<i>P.auriginosa</i> MR 3007	1,3	0,80	0,60	1,1	8,9	0,88
<i>P.auriginosa</i>	1,4	0,85	0,59	0,91	3,9	0,81

MR 2133						
<i>S. aureus</i> 930918-3	3,3	>250	3,9	0,44	0,82*	0,35
MRSA 30371	1,5	>250	1,6	0,32	0,1*	0,30
MRSA 28841	1,3	7,9*	1,6	0,6	2,5	0,20

Tabulka č. 10

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

ředění série 2	pufr + 100 mM NaCl		RPMI + 2,5% NHS	
organizmus	PC-16	PC-17	PC-16	PC-17
<i>E. coli</i> ML-35p	1,78	0,99	0,35	0,60
<i>L. mono</i> , EGD	0,35	0,70	0,43	0,59
<i>C. albicans</i> 820	0,25	0,58	0,22	0,17
<i>E. faecium</i>	0,09	1,34	0,01	0,74
VREF CDC21 (<i>E. faecalis</i>)	0,10	0,66	0,01	0,39
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	1,14	0,84	0,03	0,67
<i>P. aurginosa</i> MR 2330	2,38	0,76	0,08	0,85
<i>P. aurginosa</i> SBI-N	0,88	0,90	0,22	0,69
<i>P. aurginosa</i> MR 3007	1,22	1,53	0,09	0,88
<i>P. aurginosa</i> MR 2133	1,24	1,67	0,18	0,79
<i>S. aureus</i> 930918-3	<0,03	0,60	0,40	0,89
MRSA 30371	<0,03	0,66	0,24	0,75
MRSA 28841	0,12	0,57	0,05	2,11

Tabulka č. 11 až 14 ukazují výsledky pro formy protegrinů "kite" podle vynálezu. Opět je zřejmé, že spektrum cílových organizmů, které jsou citlivé a spektrum podmínek, za kterých je citlivost prokázána, jsou variabilní. Obecně

lze říci, že více kationická forma PC-19 je méně účinná ve srovnání s nemodifikovanou formou, která chybí zbytky X₁-X₄. PC-19 není při fyziologických podmínkách aktivní.

Tabulka 11

Minimální mikrobicidní koncentrace (μg/ml)

ředění série 1 organismus	10mM fosforečnanový pufr			pufr + 100mM NaCl		
	PG-1	PC-18	PC-19	PG-1	PC-18	PC-19
<i>E.faecium</i>	7,7	1,7	17,7	4,2	2,9	>250
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	4,6	5,3	>250
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	3,6	1,4	5,6
<i>S.aureus</i> 930918-3	7,3	3,9	7,3	5,0	2,1	10,4
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	4,1	6,5	68,6
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	3,6	3,9	17,4

Tabulka č. 12

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

ředění série 2 organismus	10mM fosforečnanový pufr		pufr + 100mM NaCl	
	PC-18	PC-19	PC-18	PC-19
<i>E.faecium</i>	3,06	0,31	0,98	0,01
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	0,59	0,01
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	1,74	0,46
<i>S.aureus</i> 930918-3	1,26	0,72	1,61	0,35
MRSA 30371	n.t.	n.t.	0,43	0,04
MRSA 28841	n.t.	n.t.	0,62	0,15

Tabulka č. 13

Minimální mikrobicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)

ředění série 2 organismus	10mM pufr + 100 mM NaCl			RPMI + 2,5% NHS		
	PG-1	PC-18	PC-19	PG-1	PC-18	PC-19
<i>E. faecium</i>	1,5	3,2	>250		2,9	>250
VREF CDC21 (<i>E. faecalis</i>)	1,4	3,4	>250		10,0	>250
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	0,61	0,50	2,9	0,30	1,2	30,2
<i>P. aurginosa</i> MR 2330	1,3	1,1	3,0	0,7	3,0	29,2
<i>P. aurginosa</i> SBI-N	1,3	1,2	2,1	0,85	4,6	>250
<i>P. aurginosa</i> MR 3007	1,3	1,1	1,1	0,72	3,89	>250
<i>P. aurginosa</i> MR 2133	1,2	2,4	2,5	0,9	3,9	>250

Tabulka č. 14

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

ředění série 2 organismus	10mM pufr + 100 mM NaCl		RPMI + 2,5% NHS	
	PC-18	PC-19	PC-18	PC-19
<i>E. faecium</i>	0,32	<0,01	0,98	0,01
VREF CDC21 (<i>E. faecalis</i>)	0,28	<0,01	0,03	<0,01
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	0,81	0,15	0,17	<0,01
<i>P. aurginosa</i> MR 2330	0,8	0,31	0,16	0,02
<i>P. aurginosa</i> SBI-N	0,73	0,45	0,12	<0,01
<i>P. aurginosa</i> MR 3007	0,80	0,85	0,13	<0,01
<i>P. aurginosa</i> MR 2133	0,34	0,35	0,16	<0,01

Tabulky č. 15 a 16 ukazují výsledky získané pro formy protegrinů podle vynálezu. Více kationické formy jsou obecně za vysoké koncentrace solí nebo séra méně účinné ve srovnání s PG-1. Jsou však srovnatelně účinné proti *E.coli*.

Tabulka č. 15

Minimální mikrobicidní koncentrace (µg/ml)

ředění série 1	10mM fosfor. pufr			pufr + 100mM NaCl			pufr + 2,5% NHS		
organismus	PG-1	PC-20	PC-21	PG-1	PC-20	PC-21	PG-1	PC-20	PC-21
<i>E.coli</i> ML-35p	4,6	0,75	0,36	2,0	1,9	1,8	0,34	0,27	0,28
<i>L.mono</i> , EGD	4,8	3,3	1,4	3,4	21,7	36,3	1,3	5,5	5,6
<i>C.albicans</i> 820	6,1	5,3	8,5	6,8	67,5	>250	8,1	30,1	59,7
<i>E.faecium</i>	6,7	6,7	18,0	3,9	6,90	>250			
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	4,9	>250	>250			
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	3,3	28,3			
<i>S.aureus</i> 930918-3	10,3	5,8	7,2	5,1	30,3	64,6			
MRSA 30371	n.t.	n.t.	n.t.	4,2	29,9	64,6			
MRSA 28841	n.t.	n.t.	n.t.	3,3	8,4	8,4			

Tabulka č. 16

Relativní molární síla (PG-1=1,00)

ředění série 1	10mM fosfor. pufr		pufr + 100mM NaCl		pufr + 2,5% NHS	
organismus	PC-20	PC-21	PC-20	PC-21	PC-20	PC-21
<i>E.coli</i> ML-35p	4,14	9,21	0,71	0,8	4,50	0,88
<i>L.mono</i> , EGD	0,98	2,47	0,09	0,07	0,16	0,17
<i>C.albicans</i> 820	0,78	0,52	0,07	<0,02	0,18	0,10
<i>E.faecium</i>	0,68	0,27	0,03	0,01		
VREF CDC21 (<i>E.faecalis</i>)	n.t.	n.t.	0,01	0,01		
VREF 94.132 (<i>E. faecium</i>)	n.t.	n.t.	0,20	0,06		
<i>S.aureus</i> 930918-3	1,20	1,03	0,11	<0,06		

MRSA 30371	n.t.	n.t.	0,09	<0,05		
MRSA 28841	n.t.	n.t.	0,26	0,28		

Příklad 12: Minimální bioaktivní konformace PG-1 nezbytná pro aktivitu proti *Neisseria gonorrhoeae*

Citlivost *Neisseria gonorrhoeae* k různým variantám protegrinu PG-1 se určila za použití radiálního difúzního testu popsaného v publikaci Lehrer et al., 1991, J Immunol Methods 137:167. Nativní protegrin PG-1 se izoloval z prasečích leukocytů způsobem popsaném v publikaci Kokryakov V.N. et al., FEBS Lett (1993) 327: 231-236. Všechny jiné protegriny se připravily synteticky za použití F-moc chemie a čistily se HPLC s reverzními fázemi.

Testovaly se následující kmeny *Neisseria gonorrhoeae* FA19 (sac-1, sac-3; rezistentní na sérum (Sac^R), JS-1 (rezistentní na sérum; sac-1, sac-3; (Sac^R)) a F62 (sac-1*, sac-3; citlivé na sérum (Sac^S), které se popisují v publikaci Cannon et al., Infect Immun (1981) 32:547-552) a Judd, R.C. Infect Immun (1982) 37:632-641). Kmeny FA628 (sac-1*, sac-3) a FA899 (sac-1, sac-3*) jsou (Sac^S) transformanti kmene FA19 (Shafer, W.M. et al., Infect Immun (1982) 35:764-769). Kmeny FA5101 a WS1 jsou mutanti kmene FA19 rezistentní na pycin, které produkují zkrácený LOS (Lucas, C.E. et al., Molec Microbiol (1995) 16:1001-1009). Bakterie se rozetřely na NGTM médium, inkubovaly se přes noc při teplotě 37°C v atmosféře 5% CO₂/okolní vzduch a denně se pasážovaly. Bakterie z ploten se umístily do 25ml GC půdy a inkubovaly se při teplotě 37°C za stálého míchání po dobu 3 hodin až se získaly gonococci v mid-log fázi.

Spodní a přelité agary se připravily stejným způsobem jak popisuje v případě radiálního difúzního testu v publikaci Qu, X.D. et al.. Peptidy se rozpustily a sériově se naředily

v 0,01% kyselině octové a testovaly se 5ml alikvóty. Plotny se inkubovaly v inkubátoru s atmosférou CO₂ při teplotě 37°C po dobu 3 hodin, pak se přelily gelem, což umožňuje peptidům difúzí pronikat do spodních gelů. Po celonoční inkubaci se určily z úseku na ose X křivky minimální inhibiční koncentrace, jak popisuje Qu et al.. Každý kmen vykazuje citlivost na protegrin (tabulky 17 až 19).

Tabulka č. 17

Aktivita proti *Neisseria gonorrhoeae*

		aminokys.	minim. inhibič. Koncentrace		
			(μg/ml)		
protegrin	sekvence	n	F62	JS-1	FA19
PG-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	18	1.3±0.1	1.2±0.1	1.9±0.1
PC-13	RGGRLCYCRRRFCVCV--	16	0.6±0.2	1.4±0.04	2.3±0.8
PC-11	----LCYCRRRFCVCVGR	14	1.0±0.1	1.6±0.3	2.8±0.1
PC-17	----LCYCRRRFCVCV--	12	0.6±0.1	1.3±0.2	1.7±0.1
PC-37	-----CYCRRRFCVCVGR	13	4.2±1.1	1.8±0.2	10.7±0.5
PC-45	RGGRLCYCRRRFCVC---	15	1.1±0.3	2.9±0.03	7.6±2.1
PC-71	-----CYCRRRFCVCV--	11	4.5±0.8	4.7±1.0	16.1±0.9
PC-72	----LCYCRRRFCVC---	11	2.7±0.2	2.3±0.8	12.8±0.0
PC-73	-----CYCRRRFCVC---	10	29.8±1.5	48.3±22.5	104.4±7.4
PC-8	RGGRLAYARRRFAVAVGR	18	21.4±5.8	46.0±7.0	431±13
PC-9	RGGRLAYCRRRFCVAVGR	18	1.0±0.3	1.1±0.2	7.3±2.3
PC-10	RGGRLCYARRRFAVCVGR	18	0.7±0.1	0.8±0.1	1.6±0.0
PC-18	----LCYARRRFAVCV--	12	0.7±0.1	2.1±0.4	8.3±2.0
PC-64	----LCYTRRRFTVCV--	12	0.7±0.1	1.4±0.2	4.5±0.3
PC-20	----LAYCRRRFCVAV--	12	1.1±0.2	8.5±2.5	32.4±5.7
PC-64a	----LTYCRRRFCVTV--	12	0.7±0.1	0.7±0.1	2.1±0.1

Všechny peptidy uvedené v tabulce jsou amidy C-konce.

Protegriny PC-13, PC-11 a PC-17 ukazují, že aminokyselinové zbytky X₁ až X₄ a X₁₇ až X₁₈ mohou být z PG-1

deletovány, aniž dojde ke strátě inhibiční aktivity (tabulka č. 17). Určil se účinek dvou intramolekulových disulfidových vazeb PG-1 na inhibici *Neisseria gonorrhoeae*. Eliminace obou disulfidových vazeb (protegrin (C-8) redukuje inhibiční účinek na všechny tetsované kmeny (tabulka č. 17). Naopak protegrin PC-10, kterému chybí $\text{cys}_8:\text{cys}_{13}$ disulfidová vazba vykazuje zvýšenou aktivitu proti kmenům F62, JS-1 a FA19. Variantě PG-1, kterému chybí $\text{cys}_6:\text{cys}_{15}$ disulfidová vazba (PC-9), vykazuje úplnou aktivitu proti kmenům F62 a JS-1 a vykazuje 3,8 násobnou redukci aktivity proti kmenu FA19. Zkrácené 12-mérové varianty PG-1, které mají jednu disulfidovou vazbu, také vykazují silnou inhibiční aktivitu (protegriny PC-18, PC-64, PC-20 a PC-64a v tabulce č. 18).

Inhibiční aktivita protegrinových variant se také určila v případě kmenů citlivých na sérum FA628 (sac-1⁺) a FA899 (sac-1⁻), které se odvodily z kmene FA19 rezistentního na sérum. PG-1 vykazuje podobnou aktivitu proti divokému typu kmene FA19 rezistentního na sérum a na sérum citlivých kmenů odvozených od FA628 a FA899 (tabulka č. 18). Kmeny senzitivní na sérum byly dvakrát až čtyřikrát citlivější na PC-8 ve srovnání s kmenem, který je rezistentní na sérum. Varianty PC-9 a PC-10, které mají jednu disulfidovou vazbu vykazují silnou inhibiční aktivitu.

Tabulka č. 18

Účinek protegrinů proti kmenu *Neisseria gonorrhoeae* citlivému na sérum.

protegrin	Aminokyseliny	minimální inib. koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)		
	n	FA19	FA628	FA899
PG-1	18	2,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1
PC-8	18	420,8 $\pm$ 24,2	150,9 $\pm$ 14,0	263,5 $\pm$ 10,3
PC-9	18	11,2 $\pm$ 1,8	4,0 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,2
PC-10	18	1,7 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1

Protože zkrácení LOS zvyšuje citlivost gonokoků na antibakteriální proteiny lidského PMN (Shafer, W.M. et al., 1986, J Infect Dis 86:910-917), protegriny PG-1, PC-8, PC-9 a PC10 se testovaly proti LOS mutantům FA5101 WS1 kmeni divokého typu FA19 (tabulka č. 19). Zkrácení LOS vede ke zvýšení citlivosti *N. gonorrhoeae* na linearizovaný protegrin PC-8, ale má malý účinek v případě citlivosti na PG-1 nebo PC-10.

Tabulka č. 19

Účinek protegrinů proti LOS mutantům *Neisseria gonorrhoeae*.

	Aminokyseliny	minimální inib. koncentrace (μg/ml)		
protegrin	n	FA19	FA5101	WS1
PG-1	18	2,1±0,1	1,5±0,2	1,4±0,2
PC-8	18	420,8±24,2	23,1±9,3	29,7±12,8
PC-9	18	11,2±1,8	2,7±0,4	2,6±0,7
PC-10	18	1,7±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1

Příklad 13: Elektronová mikroskopie *Neisseria gonorrhoeae*, na něž se aplikovaly protegriny

Určil se účinek aplikace 50 μg/ml PG-1 nebo zkráceného derivátu PC-17 na *Neisseria gonorrhoeae*. Transmise elektronovou mikroskopií bakterií po 60 minutách aplikace PG-1 vykazuje centrální vakuolaci a s membránou asociované struktury s vysokou hustotou elektronů. Skenování bakterií po aplikaci Pg-1 nebo PC-17 elektronovou mikroskopií vykazuje léze na povrchu s průměrem přibližně 100nm.

Příklad 14: Účinek slin na antimikrobiální aktivitu

Použil se radiální difúzní test popsany v publikaci Lehrer et al., 1991, J. Immunol. Meth. 137: 167 s výjimkou, že médium ve spodním agaru obsahuje fosforečnanový pufr v koncentraci 10mM, pH6,5, 100mM NaCl, 1% TSB, 1% agaróza. Médium v přelitě vrstvě obsahuje 10mM fosforečnanový pufr, pH6,5, 100mM NaCl, 2x koncentrovaný TSB a 1% agarózu. Peptidy se ředily z 10x koncentrovaného zásobního roztoku v 0,01% kyselině octové (AA), buď 10mM acetátového pufru pH5 nebo se slinami.

Výsledky se vykazují jako minimální koncentrace pro produkci detekovatelné zóny vyčerení nebo MCZ, což je extrapolovaná hodnota k ose x, kdy koncentrace peptidu se vynese proti hodnotě průměru zóny. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.20.

Tabulka č. 20

Účinek ředění na MCZ ($\mu\text{g/ml}$) proti *E.coli* 004

sekvence	acetátový pufr	sliny
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	0,48	1,14
RGGRLCYARGWIAFCVGR	4,16	38,30
RGGRLCYKRGWIKFCVGR	2,71	0,56
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	0,39	12,6
RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	0,59	1,450
LCYCRRRFCVCF	4,14	6,11
RLCYCRPRFCVCV	3,36	6,83
LCYCRGRFCVCVGR	2,37	5,68
RLCYCRPRFCVCVGR	1,60	6,86
RWRLCYCRPRFCVCV	1,04	39,00
RGWRACYCRPRFCACVGR	0,71	1,84
GWRLCYCRPRFCVCVGR	0,86	47,50
RLCACRGRACVCV	13,70	9,76
WLCYCRRRFCVCV*	5,05	36,00
RLCYCRXRFCVCV (X=MeGly)	2,43	2,54

RLCYCRPRFCVCVGR*	3,65	12,80
RGGGLCYCRPRFCVCVGR*	3,51	11,90
RRCYCRRRFCVCVGR	3,02	8,07

Peptidy označené (*) jsou kyselé formy; všechny ostatní jsou amidové formy.

Velké množství testovaných peptidů vykazuje srovnatelnou nebo dokonce zdokonalenou aktivitu v přítomnosti slin.

Příklad 15: Antimikrobiální aktivita protegrinů

Následující příklad popisuje testy za účelem měření antimikrobiální aktivity, které se používají při testování protegrinů podle vynálezu popsanych dále v textu. Následující činidla, zásobní rozroky a kultury se používají v tetsech, které následují.

Mikroorganizmy:

Escherichia coli ML-35p a *Enterococcus faecium* rezistentní na vankomycin (VRE) se získaly od Dr. Roberta Lehrera (UCLA, Lehrer et al., 1988, J. Immunol. Methods 108:153) a Dr. Gary Schoolnik (Stanford), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 1023) a *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) se získaly z instituce American Type Culture Collection, Rockville, MD.

Mikroorganizmy z jiných zdrojů, jako jsou například klinické izoláty se mohou zaměňovat s mikroorganismy, které se popisují shora v textu.

Média a činidla:

tryptikázový sojový agar (TSA; Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, BBL #4311768): rozpustí se 40 g v 1 l deionizované vody, autoklavuje se při teplotě 121°C po dobu 20 minut.

tryptikázová sojová půda (TSB; Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, BBL #4311768): rozpustí se 30g v 1l deionizované vody, autoklávuje se při teplotě 121°C po dobu 20 minut a uchovává se při pokojové teplotě.

2x koncentrovaná tryptikázová sojová půda (2xTSB): rozpustí se 60g v 1l deionizované vody, autoklávuje se při teplotě 121°C po dobu 20 minut a uchovává se při pokojové teplotě.

Glycerol (20% o/o): smísí se 20 ml glycerolu s 80 ml deionizované vody, filtruje se sterilizací přws filtr s póry o velikosti 0,20 μ m a uchovává se při teplotě místnosti.

Monobazický fosforečnanový pufr (100mM): rozpustí se 13,7 g monobazického fosforečnanu sodného (Fisher #S368-500) v jednom litru deionizované vody. Sterilizuje se filtrací na filtru s póry o velikosti 0,20 μ a uchovává se při teplotě místnosti.

Dibazický fosforečnanový pufr (100 mM): rozpustí se 14,2g dibazického fosforečnanu sodného (Fisher #S374-500) v 1l deionizované vody. Sterilizuje se filtrací na filtru s póry o velikosti 0,45 μ a uchovává se při teplotě místnosti.

Fosforečnanem pufrovný fyziologický roztok (PBS; 10mM fosforečnan, 100mM NaCl, pH7,4): smísí se 15 ml dibazického fosforečnanového pufru (100mM), 4ml NaCl (5M) a 176ml deionizované vody. Jestliže je nezbytné upraví se pH, sterilizuje se filtrací na filtru s póry o velikosti 0,45 μ a uchovává se při teplotě místnosti.

Fosforečnanový pufr (100mM, pH6,5): smíchá se 40ml dibazického fosforečnanového pufru (100mM) s 160 ml monobazického fosforečnanového pufru (100mM). Jestliže je nezbytné upraví se pH, sterilizuje se filtrací na filtru s póry o velikosti 0,45 μ a uchovává se při teplotě místnosti.

Kapalné testovací médium (LTM): asepticky se smíchá následující sterilní činidla: 10ml fosforečnanového pufru (100mM, pH6,5), 1ml TSB, 2ml NaCl (5M) a 87ml deionizované vody. Uchovává se při teplotě místnosti.

Kyselina octová (0,01% o/o): smísí se 10 μ l kyseliny octové s 10 ml sterilní deionizované vody.

agaróza: smísí se 1g agarózy (Sigma #S6013) s 80ml deionizované vody, autoklávuje se při teplotě 121°C po dobu 20 minut.

Agarózové spodní médium: kombinuje se fosforečnanový pufr (100mM, pH6,5), 1ml TSB, 2ml NaCl (5M) a 7ml deionizované vody s 80ml temperované (50°C) agarózy.

2xTSB agarózové horní médium: rozpustí se 60g TSB a 10g agarózy v 1l deionizované vody, alikvót 100ml v jedné lahvi se autoklávuje při teplotě 121°C po dobu 20 minut a skalduje se při teplotě místnosti.

příprava šikmých agarů s mikroorganismy: Každý kmen se kultivoval na TSA. Izolované kolonie se přenesly na TSB (10ml do sterilní Erlenmeyerovy láhve) za použití sterilní kličky na jedno použití a inkubovaly se při teplotě 37°C (bakterie)

nebp 30°C kvasinky za stálého míchání (200 RPM) po dobu 16 až 18 hodin.

Kultury se naředily 1:1 20% sterilním glycerolem a uchovávaly se jako alikvóty o objemu 1ml při teplotě -80°C. Při inokulaci se kapalina přenesla z rozmrazené zkumavky za použití sterilní kličky a pak se rozetřela na povrch TSA šikmého agaru. Zkumavky se šroubovacím uzávěrem se inkubovaly přes noc a skladovaly se při teplotě 4°C po dobu až jeden měsíc.

Příprava inokula:

1. Ze zkumavky se odstranila zátka a sterilní klička se lehce dotkla silně porostlé oblasti TSA šikmého agaru.
2. Inokulovalo se 10ml TSB (v 50ml lahvi) a inkuboval se za stálého míchání ve vodní lázni po dobu 18 hodin (přes noc) při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) při 200 ot/min.
3. V kyvetě se naředilo 50 μ l celonoční kultury 1:20 s TSB a měřila se absorbance při vlnové délce 600nm (A_{600}) za použití TSB. A_{600} ředěné kultury by mělo být 0,1 až 0,4.
4. V Erlenmayerových lahvích o objemu 250ml se naředilo 50 μ l celonoční kultury 1:1000 s TSB (bakterie) nebo 1:100 s TSB (kvasinky).
5. Kultura se inkubuje ve vodní lázni za stálého míchání při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) při 200 ot/min. po dobu přibližně 2 až 3 hodiny až se dosáhne logaritmické fáze, to je až hodnota A_{600} kultury je mezi 0,200 a 0,400 bez dalšího ředění.
6. 25ml kultury v logaritmické fázi se přenesou do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugace při 2000 ot/min a při teplotě 4°C po dobu 10 minut.

Supernatant se vylíje a přidá se 25ml sterilního PBS a pelet se resuspenduje na vortexu.

7. Centrifugace suspenze při 2000 ot/min a při teplotě 4°C po dobu 10 minut. Supernatant se vylíje a pelet se resuspenduje v 5ml sterilního PBS.
8. Měří se A_{600} neředěné suspenze. Jestliže hodnota absorbance je okolo 0,5, pak se suspenze ředí sterilním PBS až absorbance dosáhne hodnoty mezi 0,1 a 0,5.
9. Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie na mililitr suspenze (CFU/ml) se provedlo připravením 10-ti násobného sériového ředění ve fyziologickém roztoku (0,87%) a nanesením 100 μ l 10^4 -, 10^5 - a 10^6 -ředění na plotny s TSA, vždy jedno ředění na jednu plotnu. Plotny se inkubovaly přes noc, zpočítal se počet kolonií a určil se počet CFU na jeden mililitr (přesné stanovení vyžaduje přibližně 30 až 300 kolonií na plotnu).

V případě uvedených kmenů počet CFU na mililitr suspenze, která má hodnotu $A_{600}=0,2$, je uvedený v tabulce níže v textu:

CFU/ml suspenze ($A_{600}=0,2$)

kmen	CFU/ml
<i>E.coli</i>	$8,0 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i>	$7,8 \times 10^7$
MRSA	$2,0 \times 10^7$
VRE	$3,8 \times 10^7$
<i>C. albicans</i>	$9,7 \times 10^5$

Příprava zásobních roztoků peptidu

1. Přibližně 1 mg každého testovaného peptidu se navážilo do cryo-zkumavky (1,8ml). Přidalo se

dostatek kyseliny octové (0,01%), aby se připravil zásobní roztok, který má koncentraci 1280 µg/ml. Zásobní roztok se rozdělil do několika zkumavek, 100 µl na jednu zkumavku a alikvóty se uchovávaly pevně uzavřeny při teplotě -80°C.

Radiální difúzní test (MCZ)

MCZ test se použil ke stanovení citlivosti mikroorganismů k různým antimikrobiálním látkám za použití minimálního množství testovaných materiálů. Buňky se kultivovaly přibližně do dosažení mid-logaritické fáze a resuspendovaly se v pufované agaróze s minimálním množstvím nutrientů. Za účelem zabránit elektrostatickým interakcím mezi antimikrobiálními peptidy a polyaniontovými komponenty standardního agarů se v tomto gelu použila agaróza (ne agar). Peptidy radiálně pronikají difúzí z malých prohlubní do gelů a průměr zóny inhibice růstu je úměrný koncentraci peptidu v roztoku (Lehrer et al., J. Immunol. Methods 108:153; Lehrer et al., 1991, J. Immunol. Methods 137:167).

Příprava ploten na MCZ test

1. Pro každou petriho misku, která se má nalít, se připraví do polypropylénové zkumavky (15ml) 10ml temperovaného (50°C) agarózového spodního média. Přidá se 4×10^6 CFU, dobře se třikrát promíchá. Bezprostředně se roztátá agaróza nalije na petriho misku.
2. Po té co agaróza ztuhne použije se sterilní kanyla k vytvoření 16 prohlubní v agaróze (průměr 3mm) (4x4). Agarózové zátky se odstraní pasterovou pipetou do lahve, která má postraní rameno připojeno na vakuu.
3. Ze zásobního roztoku peptidu se připraví dvounásobné ředění (od 128 µg/ml do 0,06 µg/ml) za použití

kyseliny octové (0,01%) jako ředidla nebo v případě, že koncentrace peptidu jsou nižší než 50µg/ml použije se jako ředidlo acetát sodný (10mM pH5), který obsahuje albumin lidského séra (HAS; 0,1% m/o).

4. 5µl každého sérového ředění se přenesse do agarózové jamky.
5. Samotné ředidlo se použije jako negativní kontrola a protegrin-1 (U.S. patent č. 5,464,823; v koncentraci 32µg/ml, 8µg/ml a 2µg/ml) se nanese do jamek jako pozitivní kontrola.
6. Plotny se inkubují při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dobu 3 hodin.
7. Na povrch každé plotny se nalije 2xTSB agarózového horního média (10ml) a agar se nechá ztuhnout a plotny se inkubují dnem vzhůru při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dobu 16 až 18 hodin.
8. Plotny se prohlédnou a změří se (v mm) průměr zóny inhibice růstu (oblast vyčerení okolo každé prohlubně).
9. Do grafu se vynese zóna inhibice růstu na osu Y a koncentrace peptidu v prohlubni (osa X) a za použití lineární regresní analýzy se získá čára nejvhodnější koncentrace. Úsek na ose x, který vymezuje přímka nejvhodnější koncentrace, je minimální koncentrace pro zónu inhibice růstu (MCZ) pro každou koncentraci peptidu.

Test ředění mikropůdy

Metoda ředění mikropůdy akomoduje velký počet vzorků a ve srovnání s MCZ testem je přístupnější automatizaci a analýza dat je přímá a jednoduchá. Klíčovým krokem v tomto testu je kombinování mikroorganismů a peptidu v definovaném

systému pufru s minimem nutrientů, který minimalizuje interferenci biologické aktivity peptidu. Navíc přítomnost 0,1% (m/o) albuminu lidského séra (HSA) nebo albuminu boviního séra (BSA) v ředidle peptidu minimalizuje adsorpci peptidu na povrch nádoby.

Příprava ploten pro MCB test

1. Do každé prohlubně sterilní mikrotitrační destičky se přenese 100 μ l buněk v mid-logaritmické fázi v LTM (MCB-5 je 4×10^5 CFU/ml; MCB-3 je 4×10^3 CFU/ml).
2. Ze zásobního roztoku peptidu se připraví sériové dvounásobné ředění (od koncentrace 1280 μ g/ml do 0,625 μ g/ml) za použití kyseliny octové (0,01%) jako ředidla nebo v případě, že koncentrace peptidu je nižší než 50 μ g/ml se použije jako ředidlo acetát sodný (10mM, pH5), který obsahuje HAS nebo BSA (0,1% m/o).
3. Do třech prohlubní mikrotitračních destiček se nanese alikvót (11 μ l) každého sériového dvounásobného ředění.
4. Destičky se inkubují při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dobu 3 hodin.
5. Do každé prohlubně se přidá 100 μ l 2x koncentrovaného TSB, promýchá se a směs se inkubuje při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dalších 16 až 18 hodin.
6. Destičky se prohlédnou a v každé prohlubni se vyhodnotí turbidita (růst buněk). Kmen MRSA často tvoří pelet a usedá na dno prohlubně. MRSA se může hodnotit umístěním mikrotitrační destičky na oporu a dno prohlubni se hodnotí za použití nakloněného zrcadla.

7. Minimální koncentrace v médiu pro inhibici růstu (MCB) se definuje jako nejnižší koncentrace peptidu, která inhibuje všechen viditelný růst. Jestliže se MCB hodnoty u třech stejných vzorků liší, výsledná hodnota MCB se získá zprůměrováním výsledků tří vzorků.
8. Minimální koncentrace peptidu vykazující nejméně 99,9% biocidní aktivity (nejméně 3 log zvýšení z počátečního inokula) se určí inkubací 50 μ l alikvótu z každé prohlubně na TSA plotně po dobu 24 hodin při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) (v případě nanesení na plotnu 1,5ml TSA v každé prohlubni destičky se 24 prohlubněma minimalizuje křížovou kontaminaci).

Modifikovaný NCCLS test minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Institute National Committee of Clinical Standards (NCCLS) vyžaduje, aby se testované látky připravovaly jako zásobní roztoky v Mueller-Hiltonově půdě ("MHB") v koncentraci 512 μ g/ml. Zásobní roztoky se sériově ředí (dvojnásobné ředění) v médiu a každé sériové ředění přidané v poměru 1:1 do média, které obsahuje 1×10^6 CFU/ml bakterie (National Committee on Clinical Laboratory Standards, December 1994, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing," NCCLS Document M100-S5 Vol. 14, No. 16; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically, 3d Ed., Approved Standard M7-A3, National Committee for Clinical Standards, Villanova, PA).

Zjistilo se, že peptidy podle vynálezu precipitují v MHB při koncentraci vyšší než 128 μ g/ml. Jestliže se bude postupovat podle protokolu NCCLS, výsledkem bude sériové

dvounásobné ředění, které obsahuje méně peptidu, než se vypočítalo, což vede k vysoké hodnotě MIC.

K překonání tohoto problému je následující modifikovaný NCCLS test preferovanou metodou pro stanovení MIC peptidů podle vynálezu. Při této metodě se precipitaci předejde, jestliže se připraví koncentrované (10x) zásobní roztoky testovaného peptidu v pufru, který je vhodný pro peptid a který nevykazuje nežádoucí účinky na mikroorganismy (0,01% o/o kyseliny octové, 0,1% m/o HAS) a ředění zásobního roztoku 1:10 v MHB, který obsahuje mikroorganismy.

Příprava ploten pro MIC test

1. Připraví se celonoční čerstvá kultura testovacího organismu v Mueller-Hintonově půdě (MHB; Becton-Dickinson, Cockysville, MD, BB2#11443).
2. Kultura se naředila přibližně na koncentraci 4×10^5 CFU/ml čerstvým MHB a do každé prohlubně sterilní mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi se přenesly alikvóty o objemu 100 μ l.
3. Ze zásobního roztoku peptidu se připravila sériová dvojnásobná ředění (od 1280 μ g/ml do 0,625 μ g/ml), kde se použije jako ředidlo kyselina octová (0,01%) nebo jestliže jsou koncentrace peptidů nižší než 50 μ g/ml, pak se jako ředidlo použije acetát sodný (10mM pH5), který obsahuje albumin lidského séra (HSA); 0,1% m/o).
4. Do třech prohlubní mikrotitračních destiček se nanese alikvót (11 μ l) každého sériového dvounásobného ředění.
5. Destičky se inkubují při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dobu 3 hodin.

6. Do každé prohlubně se přidá 100 μ l 2x koncentrovaného TSB, promýchá se a směs se inkubuje při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dalších 16 až 18 hodin.
7. Destičky se prohlédnou a v každé prohlubni se vyhodnotí turbidita (růst buněk). Kmen MRSA často tvoří pelet a usedá na dno prohlubně. MRSA se může hodnotit umístěním mikrotitrační destičky na oporu a dno prohlubni se hodnotí za použití nakloněného zrcadla.
8. Minimální koncentrace v médiu pro inhibici růstu (MCB) se definuje jako nejnižší koncentrace peptidu, která inhibuje všechen viditelný růst. Jestliže se MCB hodnoty u třech stejných vzorků liší, výsledná hodnota MCB se získá zprůměrováním výsledků tří vzorků.
9. Minimální koncentrace peptidu vykazující nejméně 99,9% biocidní aktivity (nejméně 3 log zvýšení z počátečního inokula) se určí inkubací 50 μ l alikvótu z každé prohlubně na TSA plotně po dobu 24 hodin při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) (v případě nanesení na plotnu 1,5ml TSA v každé prohlubni destičky se 24 prohlubněma minimalizuje křížovou kontaminaci).

Kinetický baktericidní test

Následující test se používá při stanovení rychlosti, při které peptid usmrcuje cílový organismus a zároveň umožňuje stanovit, zda je peptid baktericidní nebo bakteriostatický.

Test

1. Do každé prohlubně mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi se přenese 200 μ l buněk v logaritmické fázi v LTM (4×10^5 CFU/ml).
2. V čase T=0 minut se přidá do prohlubně A1 22 μ l peptidu o koncentraci 1280 μ g/ml a směs se třikrát promýchá.
3. Počká se 30 vteřin a do prohlubně A2 se přidá 22 μ l druhé koncentrace peptidu a opět se se třikrát promýchá.
4. Postup se opakuje peptid se přidává v intervalu 30 vteřin až se přidaly všechny koncentrace peptidu. V typickém případě čtyřnásobné sériové ředění zásobního roztoku (to je 1280, 320, 80, 20 a 5 μ g/ml peptidu ředěného v poměru 1:10 do každé prohlubně) poskytuje dobře srovnatelné křivky usmrcení. Do jedné prohlubně se přidá 22 μ l 0,01% kyseliny octové, která slouží jako kontrola.
5. V čase T=15 minut prohlubeň A1 se třikrát promýchá a 20 μ l se přenese do sterilní prázdné petriho misky (100mm x 15mm).
6. Rychle se přidá 20ml temperovaného (50°C) TSA a lehce se promýchá.
7. Opakují se kroky 5 až 6, až se na plotny nanese všechny koncentrace.
8. V případě kontrolní prohlubně se vzorek naředí 1:100 s LTM a na plotnu se nanese 50 μ l ředění, aby se dosáhlo přesného stanovení CFU.
9. Po té, co došlo ke stuhnutí agaru, plotny se inkubovaly při teplotě 37°C (bakterie) nebo 30°C (kvasinky) po dobu 18 až 24 hodin.

10. Kroky 5 až 9 se opakuji pro všechny koncentrace peptidu a kontrolních vzorků v časech $T=30, 60, 120$ a 240 minut.
11. Pro každou plotnu se spočítal počet CFU na plotnu a pro každou koncentraci peptidu se odhadla redukce CFU. Zá účelem stanovení účinku použití tohoto testu peptid musí redukovat CFU nejméně jeden log (to je nejméně 800 CFU na plotnu). Ačkoli tato čísla jsou vyšší než doporučená (30 až 300 CFU/plotnu) změny v logaritmickém měřítku v obnovitelných CFU indikuje podstatnou bakteriocidní účinnost.
12. Za účelem získání srovnávacích křivek usmrcení se vynesly do grafu logaritmy zanedbatelného množství organismů, které přežily proti koncentraci peptidu.

Tabulka č. 21 ukazuje antimikrobiální aktivitu řady látek podle vynálezu proti různým cílovým organismům za použití MCB-3 testu popsaného shora v textu (to je při 10^3 CFU). Výsledky se uvádějí jako "minimální koncentrace pro inhibici růstu v půdě" (MCB), které jsou nejnižší koncentrace, jenž nevedou k viditelné turbiditě. "Minimální baktericidní koncentrace" (MBC) na TSA je ekvivalentní k MCB. Jednotkami koncentrace jsou $\mu\text{g/ml}$. Jak je uvedeno v tabulce č. 21v peptidovém řetězci se mohou provést různé substituce za účelem optimalizovat spektrum antimikrobiální aktivity. Hvězdička na C-konci indikuje, že peptid je ve formě volné kyseliny; jinak se v testu používala amidová forma.

Tabulka č. 21

Hodnocení antimikrobiálních peptidů v MCB-3 (μg/ml)

sekvence	MRSA	Psa	VREF	Candida	E.coli
RGGRLCYCRRRFCVVCVGR*	1.5	0.11		1.2	0.6
RGGGLCYCRRRFCVVCVGR*				3.29	0.4
RGGGLCYCRRGFCVCFGR	1.93	0.14		1.62	
RGGGLCYCRPFVCVVCVGR	3.1	0.06		7.69	0.15
RGGGLCYCRPFVCVVCVGR*				17.7	3.51
RGGRLCYCRXRFCVVCVGR* (X=MeGly)	5.33	2	1		
RGGRLCYCRXRFCVVCVGR (X=MeGly)	4	1.67	0.83		
RGGLCYCRGRFCVVCVGR	10.6	0.83			
RGGRLCYCXGRFCVVCVGR (X=Cit)					
XGGRLCYCRGRFCVVCVGR (X=Cit)					
RGGRVCYCRGRFCVVCVGR	8	1			
RGGRVCYCRGRFCVVCVGR*					
RGGGLCYCFPKFCVVCVGR	3.48	1.2		15.96	
RGWGLCYCRPRFCVVCVGR	1.55	0.27	0.09	5.68	0.1
RGWRLCYCRXRFCVVCVGR* (X=MeGly)	26.7	10.6			
RGWRLCYCRGRFCVVCVGR	5.3	0.5			
RGWRLCYCXPRFCVVCVGR (X=Cit)					
RWRLCYCRPRFCVVCVGR	4.7	3.3		1.7	
RGWRLCYCRPRFCVVCVGR	4.7	5.3		6.1	
RGWRACYCRPRFCACVGR	4.7	1.3	2	4.7	0.34
GWRLCYCRPRFCVVCVGR	4.7	4		2.7	0.86
RWRLCYCKGKFCVVCVGR					
RGWRLCYCRXRFCVVCVGR (X=MeGly)					
GGWRLCYCRGRFCVVCVGR	16	9.3			
RGGWLCYCRGRFCVVCVGR	32	5.3			
RLLRLCYCRXRFCVVCVGR (X=MeGly)	4	3.3			
RLLRACYCRXRFCVVCVGR (X=MeGly)	10.6	3			
RLLRLCYCRRRFCVVCVGR					
RGLRXCYCRGRFCVVCVGR (X=Cha)	6.7	2.3			
RGGRLCYCRXRZCVCWGR (X=MeGly)					
(Z=Cha)					
RGGRWCVCXRZCYCVGR (X=MeGly)					
(Z=Cha)					
RGLRXCYCRGRFCVVCVGR* (X=Cha)	16	8			
RGGRWCVCGRXCYCVGR (X=Cha)					
RGGRLCYCRRRFCXCVGR (X=MeVal)					
LCYCRRRFCVVCV	16	4		4	5.9
LCYCRRRFCVVCV*	32	8			1.9
LCYCRPCFCVVCV	64	5.3	3.33		>64
LCYCRRRFCVCF	4	2	2		3
LCACRRRACVVCV	>64	13.3			
LCYCRXRFCVVCV (X=D-Arg)	4	2	1.32	5.72	1.18
LCWCRRRFCVVCV	5.3	2	4	8.91	0.76
WCYCRRRFCVVCV	5.3	2.7	2	4.7	2.3
LCYCRRRXCVCV (X=hPhe)	8(64)	6.7	2.7		
LCYCRRRXCVCV (X=Phe(4-Cl))	4	2	1.3		
XCYCRRRFCVVCV (X=Cha)					
LCYCRRRFCXCV (X=D-His)					

LCYCRRRXCV CV (X=MeGly)	2.67	2.67	1.33		
LCYCRRRXCV CV (X=MePhe)	>64	10.7		>64	
LCYCRRRFCXCV (X=MeVal)	>64	13.3	42.7		
LCXCRRRXCV CV (X=Cha)	18.7	16	8	3.98	0.37
LCGCRRRGCV CV	>32	>16		>128	
LCACRGRACV CV	>32	6.7	21.3		
RLCYCRRRFCV CV	8	4			
RACYCRPRFCV CV	>64	2.7			
RLCYCRPRFCV CF					
RLCYCRPRFCV CV	5.3	2.7	2		
KLCYCKPKFCV CV	16	2	2.67		2.07
RLCACRGRACV CV	>32	2.7	10.7	9.51	3.93
RLCYCRXRFCV CV (X=MeGly)	5.3	2	2	6	2.54
RXCFCRPRFCV CV (X=Cha)	2.67	2.67	0.83		
RWCFCRPRFCV CV	3.3	2	2	5.2	2.2
WLCYCRRRFCV CV	5.3	1.3			
WLCFCRRRFCV CV					
FLCFCRRRFCV CV					
WLCFCRRRXCV CV (X=MePhe)					
WLCYCRRRFCV CV*	8	4	2	7.14	0.99
RLCYCRRRFCV CV*	8	1.67	2		
WYCICRRRFCV CV*					
WXCYCRRRFCV CV* (X=Cha)					
RXCFCRGRZCV CV (X=Cha)					
(Z=MePhe)					
XLFCRRRZCV CV (X=Cha)					
(Z=MePhe)					
RLCYCRPRFCV CVGR	0.65	0.1		0.89	0.05
RLCYCRPRFCV CVGR	3.3	0.7	1.3	3.3	0.98
RLCYCRPRFCV CVGR*	8	2.7	2	12.1	1.6
WLCYCRRRFCV CVGR*					
WXCYCRRRFCV CVGR* (X=Cha)					
RLCYCRGPFCV CR	16.6	1.1		7.73	
RRWCFVCYAGFCY RCR	64	8	4		
RGGRLCYCRRRFCV C	>32	1.6*	2.7		
RRCYCRRRFCV CVGR	>64	1.3	2		8.07
(32)					
RRCYCRGRFCGCV GR					
RWRCYCGRRFCGCV GR					
RARCYCGRRFCGCV GR					
GWRCYCRGRFCG C					
RGWACYCRGRFCV C					
RRCYGRRRFGV CVGR					
RGWRLCYGRGRFKV C					
RGWRLCYCRGRFCV C					
CYCRRRFCV CF	53.3	4	3.33	>64	
CYCRRRFCV CVGR	>64	2	21.3		
RGWRLCYCRXRFCV C (X=MeGly)					
RGWRGCYCRXRFCG C (X=MeGly)	>64	10.7			
LCYCRRRFCV CVGR	8	2	5.8		
LCYCRPRFCV CVGR	13.3	4			
LCYCKPKFCV CVGX	64	2			
LCYCRGRFCV CVGR	8	2	2		2.14

LCYCRPRFCVCVGRGR	8	2		
RRWCYCRPRFCVCVR	2.87	0.18	2.98	
WRLCYCRPRFCVCVGR	5.3	4	5	
GWLCYCRGRFCVCVGR	21	16		
RWLCYCRGRFCVCVGR	16	5.3		
RLLCYCRGRFCVCVGR	6.6	1.3		
RWRLCYCRPRFCVCV	8	4	5	
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha) (Z=MeGly)	16	5.3		
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	32	13.3		
RGGRVCYCRGRFCVCV	8	2		
RGGRVCYCRGRFCVCV*	64	1		
LCYCRXRFCVCV (X=D-Ala)	32	9.3	3.33	>64
LCYCKPKFCVCV	64	3	6.7	>64
VCYCRPRFCVCV	26.7	5.2		5.26
LCYCRPRFCVCW	53.3	42.3		
LCYRRRPRFVCV	>64	4	16	>64
RGWRLCYCRGRXCVCV* (X=Cha)	>32	>16		
RXRLCYCRZRFCVCV* (X=Cha) (Z=MeGly)	>32	21		
RXRLCYCRGRFCVCV (X=Cha)	2.1	0.59	32.6	0.81
RGGGLCYARGWIAFCVGR	19	14	65.8	3.27
RGGGLCYARGFIAVCFGR				
RGGGLCYARPRFAVCVGR	8.7	0.07	>128	1.53
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	>128	0.01	>128	2.65
RGGGLCYARKGFAVCVGR		0.05	1.6	0.4
RGGRLCYARRRFAVCVGR*		0.01	3	0.08
RGGRLCYARRRFAVCVGR			7.73	3.27
RGGGLCYKRGFIKVCFCGR	17	0.19	2.72	3.56
RGGGLCYKRGWIKFCVGR	2.07	0.15	15.09	0.56
RGGGLCYRLPKFRVCVGR	34.77	0.22	31.4	8.95
RGGGLCYRLPGFRVCVGR	30.76	0.53		
RGWRGICYKGRFKGCVGR	>64	9.3		
RGWRGICYKGRFKGCVGR*	>32	8*		
LCYARRRFAVCV	>64	2	10.7	
LCYTRRRFTVCV	>64	4	16	
LCYKRGFRKVCV				
ICYRPRFVCVGR	>128	6.9	>128	10.78

* označuje formu volné kyseliny; všechny další jsou amidové formy. MRSA je kmen *S.aureus* rezistentní na mticylin; Psa je *P.aeruginosa*; VREF je kmen *E.faecium* rezistentní na vankomycin

Tabulky 22 až 25 ukazují aktivitu ve shora popsáném kinetickém baktericidním testu. Výsledkem jsou logaritmické redukce CFU pro různé peptidy podle vynálezu proti MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* a endogenní floře ve slinách.

Tabulka č. 22

Snížení CFU MRSA (ATCC 33591) po působení peptidu (2 µg/ml)
po dobu 15 minut v LTM médiu při teplotě 37°C

sekvence	Log redukce CFU
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	2,44
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	1,83
RGGRLCYCRRRFAVCVGR*	0,29
RWRLCYCRRRFCVCV	1,41
RGWRLCYCRRRFCVCVGR	2,06
GWRLCYCRRRFCVCVGR	>3,19
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	1,32
LCXCRRRXCVCVGR (X=Cha)	>3,19
RLCYCRRRFCVCV*	<0,90
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha)	1,13
(Z=MeGly)	
RGLRXCYCRGRFCVCVGR (X=Cha)	2,48
RWLCYCRGRFCVCVGR	
GGWRLCYCRGRFCVCVGR	1,58
RLLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	2,47
RGGRLCYCRGRFCVCVGR*	1,66
RXRLCYCRZRFCVCWGR (X=Cha)	<0,90
(Z=MeGly)	1,38
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	
WLCYCRRRFCVCV	2,12
RLLRLCYCRRRFCVCVGR	3,16
RGGRLCYCRRRFCXCVGR (X=MeVal)	2,16
	<0,90

* Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní formy jsou amidy.
Počáteční inokulum je přibližně 4×10^5 CFU/ml

Tabulka č. 23

Log redukce CFU u *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) po 15 minutách působení peptidu (4 µg/ml) v LTM médiu při teplotě 37°C.

sekvence	Log redukce CFU
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	3,19
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	3,65
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	<1,2
RGGGLCYCRPRFTVCVGR	2,15
RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	3,98
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	2,81
RLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	<0,5
RLCYCRRRFCVCVGR*	3,29
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	1,78
RLCYCRRRFCVCV*	3,52
RGLRXCYCRGRFCVCVGR (X=Cha)	2,87
RGGLCYCRGRFCVCVGR	3,61
RLLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	2,70
RLLRACYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	2,71
RGGRLCYCRGRFCVCVGR*	2,66
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	2,54
RGGRVCYCRGRFCVCVGR	2,37
RGGRVCYCRGRFCVCV	2,18
RGGRVCYCRGRFCVCV*	1,55
WLCYCRGRFCVCVGR	1,27

* Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní formy jsou amidy.

Počáteční inokulum je přibližně 4×10^7 CFU/ml

Tabulka č. 24

Log redukce CFU u *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) po 15 minutách působení peptidu (0,12 µg/ml) v LTM médiu při teplotě 37°C.

sekvence	15 min	120 min
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	3,48	3,68
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	3,48	3,68

RGGGLCYTRPRFTVCVGR	0,75	3,68
RGGGLCYARKGFAVCVGR	1,20	3,68
GWRLCYCRPRFCVCVGR	2,70	2,21
RGGRLCYCRRRFCVC	2,25	>3,73
LCYCRRRFCVCV	1,35	2,13

Počáteční inokulum je přibližně 4×10^5 CFU/ml

Tabulka č. 25

Log redukce CFU endogenní flory ve slinách po 15 minutách působení peptidu (320 µg/ml) při teplotě 37°C.

sekvence	Log redukce CFU
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	1,80
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	2,04
RGGGLCYKRGWIKFCVGR	1,09
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	0,53
RLCYCRPRFCVCVGR	0,53
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	1,05
RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	1,25
LCYCRGRFCVCVGR	1,02
RWRLCYCRPRFCVCV	0,22
RGWRLCYCRPRFCVCVGR	0,38
RGWRACYCRPRFCACVGR	0,28
GWRLCYCRPRFCVCVGR	0,26
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	0,25
WLCYCRRRFCVCV*	0,16
RLCYCRXRFCVCV (X=MeGly)	3,43
RLCYCRPRFCVCVGR*	0,66
RGGGLCYCRPRFCVCVGR*	1,51
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	0,71
RWCFCRPRFCVCV	0,52
LCXCRRRXVCV (X=Cha)	0,23
RGGRLCYCRRRFCVC	0,86

LCYTRRRFTVCV	0,64
RRCYCRRRFCVCVGR	0,98
RLCYTRRRFCVCV*	0,21
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha)	<0,6
(X=MeGly)	
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	<0,6
RGLRXCYCRGRFCVCVGR (X=Cha)	1,65
RGWRGCYKRGRFKGCVGR	<0,97
RGWRGCYCRXRFCGC (X=MeGly)	<0,6
RGGLCYCRGRFCVCVGR	2,52
RLLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	0,65
RLLRACYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	2,11
RGGRLCYCRGRFCVCVGR*	2,16
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	1,89
RGGRLCYCRGRFCVCVGR	2,53
RGGRVCYCRGRFCVCVGR	2,37
RGGRVCYCRGRFCVCV	2,07
RGGRVCYCRGRFCVCV*	<0,97
WLCYCRRRFCVCV	1,87

* Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní formy jsou amidy.

Počáteční inokulum je přibližně 4×10^7 CFU/ml slin. Peptidy (3200 µg/ml) se rozpustí v 0,01% kyselině octové a ke slinám se přidá 1/10 objemu.

Kinetické experimenty také probíhají za použití *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), které zpravidla nerostou na TSA, ale přežijí několik hodin v LTM.

Na buňky v logaritmické fázi ($4,5 \times 10^5$ CFU/ml v LTM) se aplikoval peptid a pak se nanosly na plotny s čokoládovým agarem za účelem zjistit počet viditelných CFU. Všechny testované peptidy (kyselinové a amidové formy RGGRLCYCRRRFCVCVGR a amidová forma RGGLCYCRGRFCVCVGR) byly bakteriocidní proti *H.influenzae*. V čase 240 min se

nepozoroval opětný růst, jako v předchozím případě u *P.aeruginosa*.

Shora popsany test se uskutečnil za použití *H. pylori* jako cílového organismu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 26.

Tabulka č. 26

Účinek peptidu (32 µg/ml) na CFU *Helicobacter pylori* (ATCC 33591) v LTM po 15 minutách působení

sekvence	Log redukce CFU
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	2.90
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	3.43
RLCYCRPRFCVCVGR	1.34
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	<1.12
RGGGLCYARKGFAVCVGR	<1.2
RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	3.00
LCYCRGRFCVCVGR	<1.12
RGWRACYCRPRFCACVGR	<1.6
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	<1.70
WLCYCRRRFCVCV*	<1.6
RLCYCRXRFCVCV (X=MeGly)	1.57
RLCYCRPRFCVCVGR*	<1.6
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	>4.66
RGGRLCYCRRRFCVC	<1.2
LCYTRRRFTVCV	<1.28
RLCYCRRRFCVCV*	<1.2
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha) (Z=MeGly)	1.97
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	<1.47
RGLRXCICRGRFCVCVGR (X=Cha)	3.22
RGGLCYCRGRFCVCVGR	1.57
RLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	2.10
RLLRACYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	1.42
RGGRLCYCRGRFCVCVGR*	2.40
RGLRXCICRGRFCVCVGR* (X=Cha)	<1.47
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	>3.57
RGGRVCYCRGRFCVCV*	<1.47

WLCYCRRRFCVVCV	3.36
WLCFCRRRFCVVCV	1.97
FLCFCRRRFCVVCV	1.99
WYCFCRRRFCVVCV	<1.6
WXCFCRRRFCVVCV (X=Cha)	<1.6
WLCYCRRRFCVCVGR	<1.67
WXCFCRRRFCVCVGR (X=Cha)	<1.67
RLRLCYCRRRFCVCVGR	<1.67
RGGRLCYCRRRFCVCVGR (X=MeVal)	<1.67

Počáteční inokulum je přibližně 4×10^5 CFU/ml.

Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní jsou amidové formy.

Používají se také modifikované NCCLS testy, přičemž minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) se uvádí v tabulkách č. 28 a 29. Peptidy se připravovaly v 0,01% kyseliny octové v přítomnosti nebo bez (+HAS) nebo bez (-HAS) albuminu lidského séra v koncentraci 0,1%. Tabulka č. 28 ukazuje výsledky různých peptidů, které se testují proti různým organismům; V tabulce č. 29 se uvádějí výsledky v přítomnosti albuminu lidského séra. Obecně lze říci, že HSA snižuje hodnotu MIC, protože předchází absorpci na plastových površích.

Tabulka č. 28

Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) peptidů testovaných v modifikovaném NCCLS testech

sekvence	<i>P.aeruginosa</i>	MRSA	VREF
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	8,00	8,00	2,00
RGWGLCYCRRRFCVCVGR	16,00	16,00	

RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	8,00	16,00	2,00
WLCYCRRRFCVCVGR*	32,0	32,00	
RGGLCYCRRRFCVCVGR	4,00	8,00	2,00
RLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	16,00	16,00	
WLCYCRRRFCVCV	128,00	16,00	3,00
WYCICRRRFCVCV	32,0	64,00	
WLCYCRRRFCVCVGR	>64	64,00	
RLRLCYCRRRFCVCVGR	32,0	32,00	
RGGRLCYCRRRFCXCVCVGR (X=MeVal)	64,0	>128	

Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní jsou amidové formy.

Peptidy se připravily v 0,01% kyselině octové bez HSA.

Tabulka č. 29

MIC (μg/ml) v Mueller-Hintonově médiu

organismus	médium	RGGRLCYCRRRF CVCVGR		PG-1 (amid)		PG-1 kysel.
		-HSA	+HSA	-HSA	+HSA	-HAS
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	ne	4		4		4
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ne	13,3	2	16	5,3	16
<i>Enterococcus faecium</i> VREF	ne -hematin +hematin	2	0,33 1 8	1,3	0,25	2
<i>Bacillus subtilis</i>	ne	0,7		0,8		0,2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> *	-hematin +hematin		2 8			
<i>Streptococcus salivarius</i> * viridans	-hematin +hematin		0,12 0,5			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ne	4	1,33	5,3	0,33	9,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ne	5,3		4		4
<i>Serratia marcescens</i>	ne	16		16		21
<i>Escherichia coli</i>	ne -hematin +hematin	4	0,33 0,5 8	5,3	0,12	4
<i>Haemophilus influenzae</i> *	-hematin +hematin		neros 8			
<i>Acinetobacter</i> <i>calocoaceticus</i>	ne	2		3		4
<i>Neisseria meningitidis</i> *	-hematin +hematin		8 32			
<i>Candida albicans</i>	ne	8	4	16	8	16

Tabulka č. 30 uvádí hodnoty MIC různých peptidů proti různým organismům.

Tabulka č. 30
MIC různých peptidů

sekvence	MIC (µg/ml)			
	MRSA	Psa	VREF	Can.
RGGRLCYCRRRFCVCVGR	2-4	0.3-1.7	0.13	8, 16
WLCFCRRRFCVCV				
FLCFCRRRFCVCV	5.3	>32	0.5	128
WYCFCRRRFCVCV*	42.7	32	1	>128
WXCFCRRRFCVCV* (X=Cha)				
WLCFCRRRFCVCVGR*	27-32	32-53	0.25-0.5	>128
WXCFCRRRFCVCVGR* (X=Cha)				
RLLRCYCRRRFCVCVGR	32†	32†		
RGGRLCYCRRRFCXCVCVGR (X=MeVal)	>128†	64†		
RGVCVCFRRRCYCLW				
RGVCVCFRRRCYCLW	10.7	>32	0.5	32
VCVCFRRRCYCLW	16	>32	1	>128
FCVCFRRRCFCLF	16	>32	2	>128
RGVCVCFRRRCYCRGGR	8	8	0.25	16
RGVCVCFRRRCYCLRGGR (all D)	21	8	4	32
RGVCVCFRRRCYCLW*	53	>32	2	128
RGVCVCYRXRCYCLW (X=MeGly)	13	32	1	64
WLCYCRXZYCVCVGR (X=MeGly) (Z=D-Arg)				
RGFCVCFRRVCYCLW	>32	128	2	>128
WLCYCRRRFCVCVGR	11	48	0.21	128
WLCYCRRXFCVCVR (X=D-Arg)	5.3	32	0.25	64
WLCYCCKKFCVCVGK	6.7	4.3	0.21	32
Octyl-WLCYCRRRFCVCVGR				
XLICYRRRFCVCV (X=1-Nal)	4	128	0.5	>128
WLCRGRFCVR*	>128	>128	>32	>128
WLCRGRFCFR	>128	>128	16	>128
WLCYRRVCVR	64	32	16	16
WLCYCOCOCFCVCV	2	4	0.5	64
WLCYCXXXFCVCV (X=Dab)	2	2	0.5	32
WLCYCRRRFCVCV (all D)	1	8	0.5	128
HWRLCYCRPKFCVCV	13.3	32	1	>128
KWRLCYCRPKFCVCV	1	4	0.5	128

OWRLCYCRPKFCVCV	1	4	0.25	128
XWRLCYCRPKFCVCV (X=Dbu)	2.67	5.3	0.25	107
RWHLCYCRPKFCVCV	4.3	13.3	0.25	>128
RWKLCYCRPKFCVCV	2	13.3	0.5	107
RWOLCYCRPKFCVCV	1	2.7	0.25	43
RWXLCYCRPKFCVCV (X=Dbu)	2	2	0.5	64
WLCYCKXKFCVCVGR (X=Tic)				
FCYCKXKFCYCV (X-Hyp)				
WLXYXRRRFVXV (X=hCys)	16	64		
WOLCYCOXOFVCVVO (X=Tic)	1	2		
OFCVCVOXOFVCVVO (X=Tic)	16	85		
OWOLCYCOXOFVCV (X=Tic)	4	11		
OFCVCXOLCYCFO (X=Tic)	32	>128		
WLCYCKKKFCVCV	2	5.3		
OWOLCYCOXOFVCV (X=Hyp)	1	2.3		
WLCYCOXOFVCVVO (X=Pba)				
WLCYCOOOFVCV (all D)				
XFCYCLRXFCVCVR* (X=D-Arg)	8	48		
WLCYCRRXFCVCVZX* (X=D-Arg) (Z=MeGly)	64	48		

Peptidy označené hvězdičkou jsou kyselinové formy; všechny ostatní jsou amidové formy.

MRSA je kmen *S.aureus* rezistentní na meticilin

Psa je kmen *P.aeruginosa*

VREF je kmen *E.faecium* rezistentní na vankomycin

can je *C.albicans*

† označuje test bez přítomnosti HSA nebo BSA

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Antimikrobiální peptid, který obsahuje přibližně 10 až 30 aminokyselinových zbytků a obsahuje aminokyselinovou sekvenci:

(I) $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-C_6-X_7-C_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-C_{13}-X_{14}-C_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$
nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu acetylovanou na N-konci nebo amidovanou na C-konci nebo jejich esterifikovanou formu, kde

každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý nezávisle je cysteinu podobná, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle cysteinu podobná, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_1-X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní nebo malá aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen;

X_9-X_{12} dohromady jsou schopny vytvořit reverzní ohyb, v případě, že jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci vzorce (I) a nejméně jeden z X_9-X_{12} musí být bazická aminokyselina;

každý z $X_{16}-X_{18}$ je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

a kde nejméně okolo 15% až 50% aminokyselin, které jsou obsaženy v antimikrobiálním peptidu, je bazických, přičemž uvedený antimikrobiální peptid má při hodnotě fyziologického pH skutečný náboj nejméně +1;

pod podmínkou, že všechny X_1 - X_4 jsou přítomny a žádný z X_1 - X_4 není hydrofóbní aminokyselina, pak nejméně jeden z X_5 , C_8 , X_9 , X_{12} , C_{13} nebo X_{16} nesmí být přítomen nebo X_5 musí být bazický.

2. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který obsahuje dva disulfidové můstky a je v nativní formě.

3. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který obsahuje jeden disulfidový můstek a je ve formě "bullet" nebo "kite".

4. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který neobsahuje žádný disulfidový můstek a je ve formě "snake".

5. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který má při fyziologickém pH skutečný náboj nejméně okolo +3.

6. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který obsahuje okolo 10 až 24 aminokyselinových zbytků a kde:

každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle malá, hydrofóbní nebo polární/velká aminokyselina nebo cystein;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z X_1 - X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina a libovelné dva z X_1 - X_5 mohou být hydrofóbní aminokyselinou;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{10} je bazická, hydrofóbní nebo malá aminokyselina nebo prolin;

X_{16} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je bazická, hydrofóbní, nebo malá aminokyselina;

každý z X_{17} a X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina;

7. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který obsahuje přibližně 10 až 18 aminokyselinových zbytků a kde:

každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina nebo cystein;

každý z X_1 - X_4 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo malá aminokyselina a jeden libovolný z X_1 - X_4 může být hydrofóbní aminokyselinou;

každý z X_5 a X_{16} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní aminokyselina;

X_9 je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{10} je bazická nebo malá aminokyselina nebo prolin;

X_{11} je bazická nebo hydrofóbní aminokyselina;

X_{12} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je hydrofóbní aminokyselina;

X_{17} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je nezávisle malá aminokyselina; a

X_{18} je přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak je nezávisle bazická aminokyselina.

8. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde každý z C_6 , C_8 , C_{13} a C_{15} je cystein a každý z X_7 a X_{14} nezávisle jsou hydrofóbní aminokyseliny.

9. Antimikrobiální peptid podle nároku 8, kde X_7 a X_{14} jsou každý nezávisle I,V,L,W,Y nebo F.

10. Antimikrobiální peptid podle nároku 9, kde X_7 je I,F,Y nebo W a X_{14} je I,V,L,W,Y nebo F.

11. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_1 - X_4 nejsou přítomny.

12. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde nejméně jeden z X_1 - X_4 je hydrofóbní aminokyselina.

13. Antimikrobiální peptid podle nároku 12, kde uvedená hydrofóbní aminokyselina je I,V,L,W,F nebo Y.

14. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde nejméně jeden z X_9 - X_{12} je hydrofóbní aminokyselina.

15. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_1 a X_9 jsou každý nezávisle R,K,Orn, Dab, Har nebo hydrofóbní aminokyselina.

16. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_2 a X_3 jsou každý nezávisle G, A, S, T, I, V, L, F, Y nebo W.

17. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_4 je R, K, H, Orn, Dab, G, A, S, T, F, Y nebo W.

18. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_9 je R, K, H, Orn, Dab, Har, I, V, L, Nle, W, Y nebo F a X_{12} je I, L, V, W, F nebo Y.

19. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_9 - X_{12} dohromady jsou tři aminokyselinové zbytky γ -ohybu.

20. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde X_9 - X_{12} dohromady jsou čtyři aminokyselinové zbytky β -ohybu.

21. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde uvedený β -ohyb je ZZZG, ZZZF, ZZSG, ZZAL, ZGZL, ZFZL, ZPZV, ZPZF, ZGZY, IZGZ, LZZF nebo YZGZ, kde každé Z je nezávisle L- nebo D-enantiomér R, K, Dbu nebo Orn.

22. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, kde všechny aminokyseliny jsou D-enantioméry.

23. Antimikrobiální peptid podle nároku 1, který je vybrán ze skupiny, jenž zahrnuje

WLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:2);
FLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:3);
WYCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:4);
WXCYCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:5);
WLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:6);
WXCYCRRRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:7);
RLRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:8);
RGRLCYCRRRFCXCVGR (X=MeVal)	(SEQ ID NO:9);
RGVCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:10);
RGVCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:11);
VCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:12);
FCVCFRRRCFCLF	(SEQ ID NO:13);
RGVCVCFRRRCYCRGGR	(SEQ ID NO:14);
RGVCVCFRRRCYCLRGGR (all D)	(SEQ ID NO:15);
RGVCVCFRRRCYCLW	(SEQ ID NO:16);
RGVCVCYRXCYCLW (X=MeGly)	(SEQ ID NO:17);
WLCYCRXYZYCVVGR (X=MeGly) (Z=D-Arg)	(SEQ ID NO:18);
RGFCVCFRRVCYCLW	(SEQ ID NO:19);
WLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:20);
WLCYCRRXFCVCVR (X=D-Arg)	(SEQ ID NO:21);
WLCYCKKKFCVCVGK	(SEQ ID NO:22);
Octyl-WLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:23);
XLCYCRRRFCVCV (X=1-Nal)	(SEQ ID NO:24);
WLCRGRFCVR	(SEQ ID NO:25);
WLCRGRFCFR	(SEQ ID NO:26);
WLCYRRVCVR	(SEQ ID NO:27);
WLCYCOOOFVCV	(SEQ ID NO:28);

	WLCYCXXXFCVCV (X=Dab)	(SEQ ID NO:29);
	WLCYCRRRFCVCV (all D)	(SEQ ID NO:30);
	HWRLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:31);
	KWRLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:32);
	OWRLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:33);
	XWRLCYCRPKFCVCV (X=Dbu)	(SEQ ID NO:34);
	RWHLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:35);
	RWKLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:36);
	RWOLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:37);
	RWXLCYCRPKFCVCV (X=Dbu)	(SEQ ID NO:38);
	WLCYCKXKFCVCVGR (X=Tic)	(SEQ ID NO:39);
	FCYCKXKFCYCV (X=Hyp)	(SEQ ID NO:40);
	WLXYXRRRFVXV (X=hCys)	(SEQ ID NO:41);
	WOLCYCOXOFCVCVO (X=Tic)	(SEQ ID NO:42);
	OFCVCVOXOFCVCVO. (X=Tic)	(SEQ ID NO:43);
	OWOLCYCOXOFCVCV (X=Tic)	(SEQ ID NO:44);
	OFCVCXOLCYCFO (X=Tic)	(SEQ ID NO:45);
	WLCYCKKKFCVCV	(SEQ ID NO:46);
	OWOLCYCOXOFCVCV (X=Hyp)	(SEQ ID NO:47);
	WLCYCOXOFCVCVO (X=Pba)	(SEQ ID NO:48);
	WLCYCOOFCVCV (all D)	(SEQ ID NO:49);
	XFCYCLRXFCVCVR (X=D-Arg)	(SEQ ID NO:50);
	WLCYCRRXFCVCVZX	(SEQ ID NO:51);
	(X=D-Arg)	
	(Z=MeGly)	
PC11	LCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:52);
PC12	RCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:53);
PC15	RGGRLCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:54);
PC16	RCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:55);
PC17	LCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:56);
PC18	LCYARRRFAVCV	(SEQ ID NO:57);
PC19	RCYARRRFAVCR	(SEQ ID NO:58);
PC20	LAYCRRRFCVAV	(SEQ ID NO:59);
PC21	RAYCRRRFCVAR	(SEQ ID NO:60);
PC22	RGGRLCY RR VCV	(SEQ ID NO:61);
PC31	GGRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:62);

PC32	RGRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:63);
PC33	GRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:64);
PC34	RRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:65);
PC35	RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:66);
PC36	RRCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:67);
PC37	CYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:68);
PC44	RGGRLCYCRRRFCV	(SEQ ID NO:69);
PC47	RGGRLCY RRRF VCV	(SEQ ID NO:70);
PC48	RGWRLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:71);
PC37a	CYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:72);
PC45	RGGRLCYCRRRFCV	(SEQ ID NO:73);
PC72	LCYCRRRFCVC	(SEQ ID NO:74);
PC64	LCYTRRRFTVCV	(SEQ ID NO:75);
PC64a	LTYCRRRFCVTV	(SEQ ID NO:76);
PC31a	GGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:77);
PC32a	RGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:78);
PC33a	GRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:79);
PC34a	RRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:80);
PC35a	RLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:81);
PC36a	RRCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:82);
PC44a	RGGRLCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:83);
PC47a	RGGRLCY RRRF VCVGR	(SEQ ID NO:84);
PC48a	RGWRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:85);
PC54	RGWRLAYCRRRFCVAVGR	(SEQ ID NO:86);
PC61	RCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:87);
PC62	LCYCRRRFCVCR	(SEQ ID NO:88);
PC63	VCYCFRRFCYCV	(SEQ ID NO:89);
PC65	LCYTRPRFTVCV	(SEQ ID NO:90);
PC66	LCYTRGRFTVCV	(SEQ ID NO:91);
PC67	LCYFRRRFIVCV	(SEQ ID NO:92);
PC68	LCYFRPRFIVCV	(SEQ ID NO:93);
PC69	LCYTFRPRFVCV	(SEQ ID NO:94);
PC70	LCYTFRGRFVCV	(SEQ ID NO:95);
PC74	CYCFRRFCVC	(SEQ ID NO:96);
PC77	LCYCRRRRFCVCV	(SEQ ID NO:97);

PC78	LCYCFRRRCVCV	(SEQ ID NO:98);
PC79	LCYCFRRRCVCV	(SEQ ID NO:99);
PC80	LCYCRRFRCVCV	(SEQ ID NO:100);
PC81	LCYCRRFFCVCV	(SEQ ID NO:101);
PC82	LCYCRFFRCVCV	(SEQ ID NO:102);
PC83	LCYCFRRRCVCV	(SEQ ID NO:103);
PC84	LCYCFRRFCVCV	(SEQ ID NO:104);
PC85	LCYCFRFRVCVCV	(SEQ ID NO:105);
PC86	LCYCFRFRVCVCV	(SEQ ID NO:106);
PC87	LCYCFRFFCVCV	(SEQ ID NO:107);
PC88	LCYCFFRFCVCV	(SEQ ID NO:108);
PC89	LCYCFFFRVCVCV	(SEQ ID NO:109);
PC90	LCYCRFFFVCVCV	(SEQ ID NO:100);
	RGGRLCY RR VCVGR	(SEQ ID NO:111);
PC91	YCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:112);
PC95	ICYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:113);
PC96	FCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:114);
PC97	WCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:115);
PC99	RCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:116);
PC109	RLCYTRGRFTVCV	(SEQ ID NO:117);
PC110	LCYTRGRFTVCVR	(SEQ ID NO:118);
PC111	RLCYTRGRFTVCVR	(SEQ ID NO:119);
PC112	LCYCHHHFCVCV	(SEQ ID NO:120);
PC113	LCYTHHHFTVCV	(SEQ ID NO:121);
	RGGLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:122);
	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:123);
	RGGGLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:124);
	RGGGLCYCRRGFCVCFGR	(SEQ ID NO:125);
	RGGGLCYCRRPFCVCVGR	(SEQ ID NO:126);
	RGGGLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:127);
	RGGRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:128);
	RGGLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:129);
	RGGRLCYCXGRFCVCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:130);
	XGGRLCYCRGRFCVCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:131);
	RGGRVCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:132);

RGGGLCYCFPKFCVCVGR	(SEQ ID NO:133);
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:134);
RGWRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:135);
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:136);
RGWRLCYCXPRFCVCVGR (X=Cit)	(SEQ ID NO:137);
RWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:138);
RGWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:139);
RGWRACYCRPRFCACVGR	(SEQ ID NO:140);
GWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:141);
RWRLCYCKGKFCVCVGR	(SEQ ID NO:142);
RGWRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:143);
GGWRLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:144);
RGGWLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:145);
RLLRLCYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:146);
RLLRACYCRXRFCVCVGR (X=MeGly)	(SEQ ID NO:147);
RLLRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:148);
RGLRXCRCRGRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:149);
RGGRLCYCRXRZCVCWGR (X=MeGly) (Z=Cha)	(SEQ ID NO:150);
RGGRWCVCRXRZCYCVGR (X=MeGly) (Z=Cha)	(SEQ ID NO:151);
RGLRXCRCRGRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:152);
RGGRWCVCRGRXCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:153);
RGGRLCYCRRRFCXCVCVGR (X=MeVal)	(SEQ ID NO:154);
LCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:155);
LCYCRRFCVCV	(SEQ ID NO:156);
LCYCRRRFCVCF	(SEQ ID NO:157);
LCACRRRACVCV	(SEQ ID NO:158);
LCYCRXRFCVCV (X=D-Arg)	(SEQ ID NO:159);
LCWCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:160);
WCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:161);
LCYCRRRXVCV (X=hPhe)	(SEQ ID NO:162);
LCYCRRRXVCV (X=Phe(4-Cl))	(SEQ ID NO:163);
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:164);
LCYCRRRFCXCVCV (X=D-His)	(SEQ ID NO:165);
LCYCRRRXVCV (X=MeGly)	(SEQ ID NO:166);

LCYCRRRXCVCV (X=MePhe)	(SEQ ID NO:167);
LCYCRRRFCXCV (X=MeVal)	(SEQ ID NO:168);
LCXCRRRXCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:169);
LCGCRRRGVCV	(SEQ ID NO:170);
LCACRGRACVCV	(SEQ ID NO:171);
RACYCRPRFCACV	(SEQ ID NO:172);
RLCYCRPRFCVCF	(SEQ ID NO:173);
RLCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:174);
KLCYCKPKFCVCV	(SEQ ID NO:175);
RLCACRGRACVCV	(SEQ ID NO:176);
RLCYCRXRFCVCV (X=MeGly)	(SEQ ID NO:177);
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:178);
RWCFCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:179);
WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:180);
WLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:181);
FLCFCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:182);
WLCFCRRRXCVCV (X=MePhe)	(SEQ ID NO:183);
WYCICRRRFCVCV	(SEQ ID NO:184);
WXCICRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:185);
RXCFCRGRZCVCV (X=Cha) (Z=MePhe)	(SEQ ID NO:186);
XLFCRRRZCVCV (X=Cha) (Z=MePhe)	(SEQ ID NO:187);
RLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:188);
WLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:189);
WXCYCRRRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:190);
RLCYCRGPFCVCR	(SEQ ID NO:191);
RRWCFVCYAGFCYRCR	(SEQ ID NO:192);
RRCYCRGRFCGCVGR	(SEQ ID NO:193);
RWRICYGRRFCGCVGR	(SEQ ID NO:194);
RARICYGRRFCGCVGR	(SEQ ID NO:195);
GWRCYCRGRFCGC	(SEQ ID NO:196);
RGWACYCRGRFCVC	(SEQ ID NO:197);
RRCYGRRRFGVCVGR	(SEQ ID NO:198);
RGWRLCYGRGRFKVC	(SEQ ID NO:199);
RGWRLCYCRGRFCVC	(SEQ ID NO:200);

CYCRRRFCVCF	(SEQ ID NO:201);
RGWRLCYCRXRFCVC (X=MeGly)	(SEQ ID NO:202);
RGWRGCYCRXRFCGC (X=MeGly)	(SEQ ID NO:203);
LCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:204);
LCYCKPKFCVCVGK	(SEQ ID NO:205);
LCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:206);
LCYCRPRFCVCVGRGR	(SEQ ID NO:207);
RRWCYCRPRFCVCVR	(SEQ ID NO:208);
WRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:209);
GWLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:210);
RWLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:211);
RLLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:212);
RWRLCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:213);
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha) (Z=MeGly)	(SEQ ID NO:214);
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:215);
RGGVVCYCRGRFCVCV	(SEQ ID NO:216);
LCYCRXRFCVCV (X=D-Ala)	(SEQ ID NO:217);
LCYCKPKFCVCV	(SEQ ID NO:218);
VCYCRPRFCVCV	(SEQ ID NO:219);
LCYCRPRFCVCW	(SEQ ID NO:220);
LCYRRPRFRVCV	(SEQ ID NO:221);
RGWRLCYCRGRXCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:222);
RXRLCYCRZRFCVCV (X=Cha) (Z=MeGly)	(SEQ ID NO:223);
RXRLCYCRGRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:224);
RGGGLCYARGWIAFCVGR	(SEQ ID NO:225);
RGGGLCYARGFIAVCFGR	(SEQ ID NO:226);
RGGGLCYARPRFAVCVGR	(SEQ ID NO:227);
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	(SEQ ID NO:228);
RGGGLCYARKGFAVCVGR	(SEQ ID NO:229);
RGGRLCYARRRFAVCVGR	(SEQ ID NO:230);
RGGGLCYKRGFIKVCFCGR	(SEQ ID NO:231);
RGGGLCYKRGWIKFCVGR	(SEQ ID NO:232);
RGGGLCYRLPKFRVCVGR	(SEQ ID NO:233);
RGGGLCYRLPGFRVCVGR	(SEQ ID NO:234);

RGWRGCYKRGRFKGCVGR	(SEQ ID NO:235);
LCYKRGRFKVCV	(SEQ ID NO:236);
ICYRPRFVCVGR	(SEQ ID NO:237);
WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:238);
RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:240);
RGRVCLRYCRGRFCVRLCFR	(SEQ ID NO:241);
RRRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:242);

a jejich formy s acetylovaným N-koncem a amidovaným C-koncem nebo jejich esterifikované formy.

24. Rekombinantní expresivní systém pro produkci antimikrobiálního peptidu podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující uvedený peptid, která je operabilně spojena s kontrolními sekvencemi, což vede k dosažení exprese.

25. Rekombinantní hostitelská buňka nebo její potomstvo, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je modifikována, aby obsahovala expresivní systém podle nároku 25.

26. Způsob produkce antimikrobiálního peptidu nebo jeho meziprojektu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kultivaci modifikované hostitelské buňky nebo jejího potomstva podle nároku 24 za podmínek, kde dochází k produkci uvedeného peptidu; a získání antimikrobiálního peptidu z kultury.

27. Antimikrobiální farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje antimikrobiální peptid podle nároku 1 ve směsi s nejméně

jedním farmaceuticky přijatelným nosičem, ředidlem nebo excipientem.

28. Antimikrobiální kompozice týkající se prostředí určená pro aplikaci na rostliny v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje antimikrobiální peptid podle nároku 1 ve směsi s nejméně jedním nosičem, ředidlem nebo excipientem, který je přijatelný pro prostředí.

29. Způsob prevence růstu viru nebo mikrobu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt kompozice, která podporuje růst zmíněného viru nebo mikroba s množstvím antimikrobiálního peptidu podle nároku 1, který brání uvedenému růstu.

30. Způsob deaktivace endotoxinu gram-negativních bakterií, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt uvedeného endotoxinu s množstvím antimikrobiálního peptidu podle nároku 1, který deaktivuje uvedený endotoxin.

31. Protilátky, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e specificky reagují s antimikrobiálním peptidem podle nároku 1.

32. Způsob léčby nebo prevence mikrobiální nebo virové infekce subjektu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci terapeuticky účinného množství antimikrobiálního peptidu subjektu, který potřebuje takovou léčbu, přičemž uvedený peptid obsahuje přibližně 10 až 30 aminokyselinových zbytků a aminokyselinovou sekvenci:

(I) $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-C_6-X_7-C_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-C_{13}-X_{14}-C_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$

nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu acetylovanou na N-konci nebo amidovanou na C-konci nebo jejich esterifikovanou formu, kde

každý z C_8 a C_{13} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý nezávisle je cysteinu podobná, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z C_6 a C_{15} je nezávisle cysteinu podobná, bazická, malá, polární/velká nebo hydrofóbní aminokyselina;

každý z X_1 - X_5 je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

každý z X_7 a X_{14} je nezávisle hydrofóbní nebo malá aminokyselina;

každý z X_9 a X_{12} je nezávisle přítomen nebo není přítomen;

X_9 - X_{12} dohromady jsou schopny vytvořit reverzní ohyb, v případě, že jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci vzorce (I) a nejméně jeden z X_9 - X_{12} musí být bazická aminokyselina;

každý z X_{16} - X_{18} je nezávisle přítomen nebo není přítomen a jestliže je přítomen, pak každý je nezávisle bazická, hydrofóbní, polární/velká nebo malá aminokyselina;

a kde nejméně okolo 15% až 50% aminokyselin, které jsou obsaženy v antimikrobiálním peptidu, je bazických, přičemž uvedený antimikrobiální peptid má při hodnotě fyziologického pH skutečný náboj nejméně +1;

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e mikrobiální infekce je způsobena *Staphylococcus aureus*.

34. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antimikrobiální peptid je vybrán ze skupiny, kterou tvoří

RGWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO: 139)
GWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO: 141);
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO: 164; A
WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO: 180).

35. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antimikrobiální infekce je způsobena *Pseudomonas*.

36. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antimikrobiální peptid je vybrán ze skupiny, která zahrnuje

RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO.: 1);
RGGRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO.: 239);
RGGGLCYTRPRFTVCVGR	(SEQ ID NO.: 228); a
RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO: 66).

37. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antimikrobiální infekce je způsobena *H.pylori*.

38. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antimikrobiální peptid je vybrán ze skupiny zahrnující

WLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:180);
RXCFCRPRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:178);

RGGRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:1);
RGWGLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:134);
RLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:138);
RGWRLCYCRGRFCVCVGR	(SEQ ID NO:136);
RGRVCLRYCRGRFCVRLCFR	(SEQ ID NO:241);
RGLRXCYCGRGRFCVCVGR (X=Cha)	(SEQ ID NO:149);
GWRLCYCRPRFCVCVGR	(SEQ ID NO:139);
RLCYCRRRFCVCV	(SEQ ID NO:66);
WLCYCXXXFCVCV (X=Dab)	(SEQ ID NO:29);
OWRLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:33);
RWOLCYCRPKFCVCV	(SEQ ID NO:37);
RRCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:82);
XCYCRRRFCVCV (X=Cha)	(SEQ ID NO:164);
RRRLCYCRRRFCVCVGR	(SEQ ID NO:242);
RRRLCYCRRRFCVCVGR (all D)	(SEQ ID NO:243).