

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2012 (27.12.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/175532 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 7/08 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/061780

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juni 2012 (20.06.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 118 029.3 20. Juni 2011 (20.06.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): UNIVERSITÄT LEIPZIG [DE/DE]; Ritterstr.
26, 04109 Leipzig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFFMANN, Ralf
[DE/DE]; Gartenstraße 18, 04463 Großpösna (DE).
BERTHOLD, Nicole [DE/DE]; Nibelungenring 49, 04279
Leipzig (DE). NOLLMANN, Friederike [DE/DE];
Kirchhainer Straße 48, 60433 Frankfurt am Main (DE).

(74) Anwalt: STÖTTER, Gerd; Bamberger Straße 49, 01187
Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: MODIFIED ANTIBIOTIC PEPTIDES HAVING VARIABLE SYSTEMIC RELEASE

(54) Bezeichnung : MODIFIZIERTE ANTIBIOTISCHE PEPTIDE MIT VARIABLER SYSTEMISCHER FREISETZUNG

(57) Abstract: The invention relates to modified antibiotic peptides, in particular derivatives of apidaecin and oncocin, preferably having increased stability, reduced immunoreaction, and improved pharmacokinetics. In the invention, the peptide antibiotics are reversibly protected by means of a linker having the polymer polyethylene glycol (PEG). The peptide linker contains a recognition sequence for trypsin-like serum proteases. In the apidaecin derivatives, the linker and the PEG are bonded to a side chain. In the serum, the linker is cut by serum proteases and PEG is separated off. The released peptide still contains remnants of the linker, which are still bonded to the amino group in the side chain. Astonishingly, said remaining remnants of the linker impair the activity of the antimicrobial peptide only a little or not at all.

(57) Zusammenfassung: Diese Erfindung betrifft modifizierte antibiotische Peptide, insbesondere Derivate des Apidaecins und Oncocins, vorzugsweise mit gesteigerter Stabilität, verminderter Immunreaktion und verbesserter Pharmakokinetik. In der Erfindung werden die Peptidantibiotika reversibel über einen Linker mit dem Polymer Polyethylenglykol (PEG) geschützt. Der Peptidlinker enthält eine Erkennungssequenz für trypsinähnliche Serumproteasen. Der Peptidlinker enthält eine Erkennungssequenz für trypsinähnliche Serumproteasen. Bei den Apidaecinderivaten erfolgt die Anbindung des Linkers und des PEG an einer Seitenkette. Im Serum wird der Linker durch Serumproteasen geschnitten und PEG abgespalten. Das freigesetzte Peptid enthält noch Reste des Linkers, die weiterhin an die Aminogruppe in der Seitenkette gebunden sind. Erstaunlicherweise beeinträchtigen diese verbleibenden Reste des Linkers nicht oder nur kaum die Aktivität des antimikrobiellen Peptids.



WO 2012/175532 A1

Modifizierte antibiotische Peptide mit variabler systemischer Freisetzung

Diese Erfindung betrifft modifizierte antibiotische Peptide insbesondere für die Verwendung in der Medizin. Weiterhin bezieht sich die Erfindung auf Zusammensetzungen und Methoden zum Abtöten von Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren oder Pilze, und Methoden zur Behandlung mikrobieller Infektionen.

Das Auftreten ernsthafter Bakterien- und Pilzinfektionen ist ein steigendes Problem trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Antibiotikatherapie. Jedes Jahr gibt es mehr als 40 Millionen Krankenhausaufenthalte in den Vereinigten Staaten von Amerika und mehr als 2 Millionen dieser Patienten infizieren sich im Krankenhaus. In 50-60% dieser Fälle sind Antibiotika-resistente Bakterien involviert. Diese im Krankenhaus erworbenen Krankheiten führen zu schätzungsweise 60.000-70.000 Todesfällen in den USA und bis zu 10.000 Todesfällen in Deutschland.

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der weiteren Suche nach neuen Antibiotika. Induzierbare antibakterielle Peptide repräsentieren ein Forschungsfeld, in dem die heutige Biochemie, Immunologie und Wirkstoffforschung zusammentreffen. Peptidantibiotika, mit einer Größe von 13 bis zu mehr als hundert Aminosäuren, wurden aus Pflanzen, Tieren und Mikroben isoliert (Boman, H.G. 1995 Annu. Rev. Immunol. 13: 61-92).

Ein einzelnes Tier besitzt ca. 6-10 antimikrobielle Peptide, wobei jedes Peptid oft ein komplett anderes Aktivitätsspektrum zeigt (Barra, Det al. 1998. FEBS Lett. 430: 130-134). Es ist bekannt, dass die überwältigende Anzahl an antibakteriellen Peptiden einschließlich den gut untersuchten Defensinen, Cecropinen und Magaininen, durch einen "lytischen/ionischen" Mechanismus wirken. Als gemeinsamen Wirkmechanismus dieser "lytischen" Peptide wird ein permeabilisierender Effekt auf die bakterielle Zytoplasmamembran diskutiert. Eine kationische, amphipathische Struktur, die hydrophile Ionen- (Protonen-) Kanäle in einer Lipiddoppelschicht ausbildet, ist Grundlage dieser Aktivität. Durch das Austreten von Ionen wird das für viele grundlegende Lebensprozesse notwendige Membranpotential zerstört und so die Zelle abgetötet. Diese lytischen Peptide wirken oft in höheren Konzentrationen toxisch auf Säugetiermembranen, was ihre Eignung als mögliche Arzneimittel einschränkt. Wird Prolin in die Sequenz der α -helikalen antimikrobiellen Peptide eingefügt, so sinkt, in Abhängigkeit von der Anzahl der Prolin-Reste, die Fähigkeit der Peptide die Cytoplasmamembran von *E. coli* zu permeabilisieren. Bei dieser Betrachtung ist es verblüffend, dass einige der aktivsten, nativen antibakteriellen Peptide, zumindest in Bezug auf einige Gram-negative Pathogene, zu der Familie der Prolin-reichen Peptide gehören (Otvos, L. et al. 2000. Protein Sci. 9: 742-749).

Die oben beschriebenen Nebeneffekte könnten durch antimikrobielle Peptide (AMP) überwunden werden, die ein bakterielles Protein oder andere intra- oder extrazelluläre Komponenten spezifisch erkennen, ohne eine Kreuzreaktivität mit Säugetieranaloga zu zeigen. Dies scheint auf Prolin-reiche antimikrobielle Peptide, einschließlich Apidaecine, Drosocin und Pyrrhocoricin die ursprünglich aus Insekten isoliert wurden, zuzutreffen. Mit der enormen Variation in der Größe und in den biochemischen Eigenschaften, ist es nicht überraschend, dass die Struktur-Wirkungs- und Konformations-Wirkungs-Beziehungen der Fokus der antibakteriellen Peptidforschung ist. Eine komplette Untersuchung des natürlichen, antibakteriellen Peptidrepertoires auf die biologische Stärke ist nicht nur für generelle biochemische Fragestellungen wichtig, sondern auch für die pharmazeutische Industrie von anhaltendem Interesse. Trotz der Probleme von *in vitro* Tests mit Peptid-basierenden Antibiotika, haben einige natürliche, kationische antibakterielle Peptide schon die klinische Testphase erreicht (Boman, H.G. 1995 ebd.). Während einige dieser Peptide als topische (örtlich) Mittel in der frühen klinischen Testphase Wirkung zeigten, waren andere in der systemischen Therapie aktiv. Zum Beispiel hat das kationische Protein rBPI 21, das zur parentalen Behandlung von Meningococcaemia eingesetzt wird, die dritte Phase der klinischen Prüfung abgeschlossen (Boman, H.G. 1995 ebd.).

Die Familie der Prolin-reichen Peptide (z.B. Apidaecin, Drosocin und Pyrrhocoricin) töten Bakterien nicht durch Permeabilisierung ihrer Membran, sondern binden stereospezifisch an ein oder mehrere Zielproteine. Diese möglichen Interaktionspartner, bisher wurde das Hitzeschock Protein DnaK gut untersucht (u. a. Boman, H.G. 1995), werden durch die Prolin-reichen Peptide inhibiert und vermutlich die korrekte Proteinfaltung verhindert, was letztendlich zum Zelltod führt. Zudem scheinen Prolin-reiche Peptide, im starken Gegensatz zu AMPs mit definierter Sekundärstruktur wie Melittin oder Gramicidin, *in vitro* weder hämolytisch noch toxisch auf eukaryotische Zellen zu wirken. Entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung neuer peptidbasierter Antibiotika hat neben der antimikrobiellen Aktivität vor allem die Stabilität in Säugetierserum (25%). So wird beispielsweise Drosocin innerhalb einer Stunde abgebaut, während Pyrrhocoricin mit Halbwertszeiten von 120 Minuten erheblich stabiler gegenüber Proteasen ist. Dabei werden vermutlich nicht nur die N- und C-Termini durch Amino- und Carboxypeptidasen abgespalten, sondern die Peptide auch durch Endoproteasen verdaut. Die dabei entstehenden Metaboliten sind teilweise stabil gegenüber weiterem Abbau, verlieren allerdings meist die antimikrobielle Aktivität (MHK-Werten $\geq 64 \mu\text{g/mL}$).

In Experimenten von Schneider M. und Dorn A. (2001. J Invertebr Pathol. 78: 135-40) wurden Nymphen und Puppen der Milchkrutwanze *Oncopeltus fasciatus* aus der Familie der *Lygaeidae* mit zwei verschiedenen gram-negativen *Pseudomonas* Spezies infiziert und deren Immunantwort analysiert. Während eine Infektion der Nymphen von *O. fasciatus* mit dem humanen Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, nach 48 h den Tod aller Individuen zur Folge hatte, überlebten 71% der mit weniger pathogenen *Pseudomonas putida* infizierten Individuen mindestens 96 h. Wurden die Nymphen der Milchkrutwanze nun zuerst mit *P. putida* und nach 24 h mit *P. aeruginosa* infiziert, stieg hier die

Überlebensrate der doppelt infizierten Individuen innerhalb der ersten 24 h signifikant auf 73%. Die wahrscheinliche Induzierung der Synthese von antibakteriellen Peptiden, durch die sich Insekten im Rahmen ihres angeborenen Immunsystems gegen eindringende Mikroorganismen wehren, wurde anschließend untersucht. Vier Peptide (Oncopeltus antibakterielles Peptid 1-4) wurden mit Molekulargewichten von 15, 8, 5 bzw. 2 kDa identifiziert und für die antibakterielle Wirkung verantwortlich gemacht. Die Sequenzanalyse nach Edman ergab neben einer 34 Aminosäure langen Teilsequenz für Peptid 1 (15 kDa) auch die unvollständige Sequenz des Prolin-reichen 2 kDa Peptids 4. Es war nicht möglich die Aminosäuren an Positionen 11 und die C-terminale Sequenz ab Position 19 eindeutig zu identifizieren. Das genaue Molekulargewicht ist unbekannt.

Eine Auswahl bisher bekannter Sequenzen von antibiotischen Peptiden ist in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1:

Peptid	Species	Sequenz	SEQ ID Nr.
Apidaecin 1a	<i>Apis mellifera</i>	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	1
Apidaecin 1b	<i>Apis mellifera</i>	GNNRPVYIPQPRPPHPRL	2
Drosocin	<i>Drosophila melanogaster</i>	GKPRPYSPRPTSHPRPIRV	3
Formaecin 1	<i>Myrmecia gulosa</i>	GRPNPVNPKPTYPHL	4
Pyrrhocoricin	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN-NH ₂	5
Metalnikowin 1	<i>Palomena prasina</i>	VDKPDYRPRRPPNM	6
Oncopeltus antibakterielles Peptid 1	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	EVSLKGEKGSNKGFIQSGTKTLFQD DKTKLDGT	7
Oncopeltus antibakterielles Peptid 4	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	VDKPPYLPRP (X/P) PPRRIYN (NR)	8

Apidaecinderivate sind in WO2009013262A1 offenbart. Derivate des Oncopeltus antibakteriellen Peptid 4 sind in WO2010086401A1 offenbart.

In der Literatur werden unterschiedliche Ansätze beschrieben, um die pharmakokinetischen Eigenschaften von pharmakologischen Wirkstoffen zu beeinflussen. Dabei kommen auch organische Polymere (wie z. B. Polyethylenglykol) zur Anwendung.

Die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) in pharmazeutischen Darreichungsformen zur kontrollierten Freisetzung eines Wirkstoffes ist bekannt. Hierbei müssen zwei Formen unterschieden werden:

1. Das Einbringen des Wirkstoffes in ein vernetztes PEG-Hydrogel;
2. Die direkte Anbindung eines linearen oder verzweigten PEG-Moleküls an den Wirkstoff (sogenannte PEGylierung).

Beide Formen unterscheiden sich nicht nur in der Pharmakokinetik, sondern vor allem den möglichen Administrationsrouten. Das Hydrogel wird lokal verabreicht. Der PEGylierte Wirkstoff systemisch (in der Regel intravenös).

Hydrogele zur kontrollierten Freisetzung eines Wirkstoffes sind u. a. aus US 7,291,673, US 2008/0014149 A1 und Yang J et al. 2010 (Macromol. Biosci., 10, 445–454) bekannt.

Die PEGylierung von pharmazeutischen Wirkstoffen wird insbesondere verwendet, um einerseits eine kontrollierte Freisetzung über einen gewünschten Zeitraum (Retardeffekt) zu erreichen und andererseits die Ausscheidung des Wirkstoffes über die Niere zu verzögern.

Zur PEGylierung von Polypeptiden sei u. a. auf US 4,179,337, sowie die Übersichtsartikel Kodera, M et al. 1998 (Prog Polym Sci. 23: 1233–71) und Veronese FM, Harris JM 2002 (Adv Drug Deliv Rev 54: 453–456) verwiesen.

Da eine irreversible Anbindung von PEG die pharmakologische Wirkung des Wirkstoffes beeinträchtigt, existiert eine Vielzahl von bekannten Ansätzen zur reversiblen PEGylierung.

Veronese FM (2001. Biomaterials 22: 405–17) beschreibt in einem allgemeinen Übersichtsartikel die reversible PEGylierung u. a. enzymkatalysiert an Glutamin-Seitenketten durch das Enzym Transglutaminase. Auch in einem Übersichtsartikel von Roberts MJ et al. 2002 (Adv Drug Deliv Rev 54: 459-476) werden mehrere Techniken für eine reversible PEGylierung von Peptiden und Proteinen erwähnt, insbesondere hydrolysierbare Esterbrücken, reduzierbare Disulfidbrücken.

EP1897561A, WO9930727, US 6,180,095, US6,720,306, WO0243663 beschreiben die Verwendung von Linkern, der durch eine 1,4- bzw. 1,6-Benzyleliminierung gespalten wird. In mehreren Publikationen wird dieser Linker in einem so genannten Doppel-Prodrug-Approach mit einer enzymatisch abspaltbaren Gruppe oder einer hydrolysierbaren Estergruppe kombiniert (Greenwald RB et al. 1999. J. Med. Chem.

42: 3657-3667; Lee S et al. 2001 *Bioconjug Chem* 12, 163-169; Greenwald RB et al. 2003. *Bioconjug Chem*. 14(2): 395-403).

Ein anderer Ansatz zur reversiblen PEGylierung ist die Trimethyl-blockierte Laktonisierung (engl. trimethyl lock lactonization – TML), welche u. a. in US 5,965,119 und US 6,303,569 offenbart wird.

US 7,585,837 beschreibt einen Ansatz zur reversiblen PEGylierung durch Derivatisierung von funktionellen Gruppen mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder 2-Sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl (FMS), die leicht durch Basen abgespalten werden.

Guiotto et al. 2004 (*J. Med. Chem.* 47: 1280–9) beschreibt die Synthese, Charakterisierung und erste *in vivo* Tests von PEG-Konjugaten des Antitumormittels 10-Amino-7-ethylcamptothecin.

Eine Protease-basierte Prodrugstrategie basiert auf Peptidlinkern, die an klassische chemische Wirkstoffe („small molecules“) gebunden werden und Schnittstellen für Proteasen enthalten. Die zur Anwendung kommenden Proteasen sind hauptsächlich gewebespezifische Proteasen bzw. Proteasen, die bei der Gewebeumbildung (tissue remodeling) eine Rolle spielen (wie z. B. Cathepsin B, PSA (prostate specific antigen) und Matrixmetalloproteasen (MMP) aber auch die Serumproteasen Plasmin und Urokinase. Anwendungsgebiet der Wirkstoffe sind im Wesentlichen die Krebstherapie. Die Proteaseschnittstelle dient dem Tumortargeting. Hierzu sei auf den Übersichtartikel von Law B, Tung CH. 2009 (*Bioconjug Chem*. 20(9):1683-95) verwiesen. In der US 2004192769 wird der Ansatz erwähnt das Drugdelivery-System so zu gestalten, dass der Peptidlinker nicht von Serumproteasen, sondern erst nach Aufnahme in die Zielzelle abgespalten wird.

Li H et al. A 2010 (*Angew. Chem. Int. Ed.*. 49, 4930 –4933) wenden eine Protease-basierte Prodrug-Strategie auf Peptidwirkstoffe an. Therapeutisch wirksame Peptide werden über den Peptidlinker mit einer Albumin-bindungsstelle (albumin binding domain, ABD) gebunden. Im Blut bindet dieses Fusionspeptid zunächst an das Serumprotein Albumin und wird dann durch die Protease Thrombin (oder humaner Faktor Xa) abgespalten.

Nach wie vor besteht ein Bedarf an neuen Antibiotika.

Wünschenswerte Eigenschaften für Peptidantibiotika sind:

- (i) eine gesteigerte Halbwertszeit in Säugetierserum durch eine höhere Proteaseresistenz und

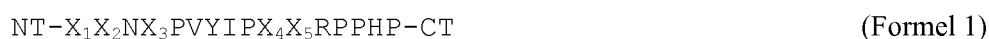
- (ii) unveränderte oder bevorzugt eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität gegen einen oder mehrere Bakterienstämme, besonders humane Pathogene, oder Pilze oder andere mikrobielle Infektionen,
- (iii) eine verminderte antigene Wirkung und dadurch reduzierte Immunreaktion und
- (iv) die Peptide sind nicht toxisch gegenüber humanen Zellen, einschließlich Erythrozyten.

Die Wirkung Prolin-reicher antimikrobielle Peptide ist sehr komplex, da sie die Zellmembran durchdringen und in das Zytoplasma eindringen müssen, um ein spezielles intrazelluläres bakterielles Zielmolekül zu inhibieren, ohne jedoch auf Säugetierzellen und Blutzellen toxisch zu wirken. Ein anderer wichtiger Punkt ist die Stabilität der Peptide oder Peptidderivate gegenüber dem Abbau durch Peptidasen oder Proteasen in Blut und den Bakterien. Daher hat das ideale Peptid eine hohe antibakterielle Aktivität (kleine MHK-Werte), keine Zelltoxizität, keine hämolytische Aktivität und eine Halbwertszeit von mehreren Stunden in Blut.

Eine Aufgabe der Erfindung ist es neue Peptidantibiotika bereitzustellen, vorzugsweise mit gesteigerter Stabilität, verminderter Immunreaktion und verbesserter Pharmakokinetik.

In der Erfindung werden Peptidantibiotika reversibel über eine enzymatisch spaltbare Peptidkette mit dem Polymer Polyethylenglykol (PEG) geschützt, um den Abbau des Wirkstoffs in Serum durch Proteasen und die Toxizität des Wirkstoffes zu reduzieren, sowie eine längere Verweildauer im Organismus zu erreichen (verbesserte Pharmakokinetik). Aus dieser chemisch definierten Verbindung werden die Wirkstoffe durch die Proteasen des Wirts (z.B. Patient, insbesondere Serumproteasen) oder der Bakterien freigesetzt. Die erfindungsgemäße Wahl des Polymers (Struktur, Länge) und des Peptidlinkers (Länge, Sequenz) ermöglichen die Kinetik der Wirkstofffreisetzung dem Wirkmechanismus des Wirkstoffs und dessen Metabolisierung oder Ausscheidung anzupassen. So kann durch eine geschickte Wahl der Struktur (Polymer, Linker) eine konstante Konzentration des Wirkstoffs während einer längeren Behandlungsdauer erreicht werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch ein modifiziertes Peptid, ein Apidaecinderivat, welches eine Sequenz gemäß der allgemeinen Formel 1, 2 oder 3 aufweist:



wobei X_1 ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt O (Ornithin),

wobei X_2 ein Aminosäurerest mit einer Aminogruppe in der Seitenkette ist,

wobei X_3 ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt R (Arginin),

wobei X_4 ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt R,

wobei X_5 Prolin oder ein Prolinderivat ist,

wobei CT der C-Terminus ist oder ein Peptid mit 1 bis 4 Aminosäureresten, bevorzugt ist ein Dipetid mit der Sequenz RL (Arg-Leu)

wobei NT der N-Terminus ist, der bevorzugt guanidiert ist.

Die restlichen Aminosäurereste haben jeweils die Bedeutung gemäß dem IUPAC-Einbuchstabencode.

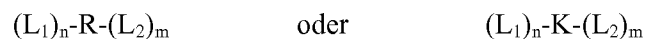
Modifizierte Peptide gemäß Formel 1 und 2 sind besonders bevorzugt.

Das erfindungsgemäß modifizierte Peptid kennzeichnet sich dadurch aus dass an die Aminogruppe in der Seitenkette von X_2 über einen Peptidlinker eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist und der Peptidlinker 3 bis 10 Aminosäurereste lang ist und mindestens ein Arginin oder Lysin enthält.

Bevorzugt ist X_2 ein L-Ornithin.

Der Peptidlinker enthält eine Erkennungssequenz für trypsinähnliche Serumproteasen und ist bevorzugt ausgewählt aus Linkern mit 4 bis 10 Aminosäureresten, die mindestens ein Arginin oder Lysin enthalten.

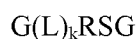
Bevorzugt hat der Linker folgende allgemeine Formel:



wobei n und m ganze Zahlen von 1 bis 8 sind und gilt $n + m$ 3 bis 9,

wobei die einzelnen L_1 und L_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Aminosäuren mit 2 bis 6 C-Atomen, bevorzugt 2 oder 3 C-Atomen, insbesondere Glycin, Alanin und Serin. Besonders bevorzugt gilt $m = 2$ oder 3. Bevorzugt ist $(L_2)_m = \text{SG}$.

Weiter bevorzugt hat der Linker folgende Formel:



mit L ausgewählt aus Alanin, Glycin und Serin und k ausgewählt ist aus ganzen Zahlen von 1 bis 6, bevorzugt 1, 2, 3 oder 4.

Besonders bevorzugte Linker sind ausgewählt aus den Peptiden GRSG, GARSG, GAARSG, GAAARSG und GAAAARSG (SEQ ID No. 61 bis 65). Die Polyethylenglykol-Polymerkette ist bevorzugt an die alpha-Aminogruppe des ersten Aminosäurerest des Linkers, bevorzugt ein Glycin, gebunden. Die Carboxylgruppe des letzten Aminosäurerest des Linkers ist an die Aminogruppe in der Seitenkette von X₂ (bevorzugt die delta-Aminogruppe eines L-Ornithinrest) gebunden. Trypsin und verwandte Serumproteasen schneiden jeweils nach dem R (oder K) im Peptidlinker, so dass das Peptid von der Polyethylenglykol-Polymerkette freigesetzt wird. Das freigesetzte Peptid enthält noch die Aminosäurenreste des Linkers, die ursprünglich rechts (C-terminal) des R (oder K) lagen, bevorzugt sind dies die Aminosäurenreste SG. Diese im freigesetzten Peptid verbleibenden Reste des Linkers sind weiterhin an die Aminogruppe in der Seitenkette von X₂ (bevorzugt die delta-Aminogruppe eines L-Ornithinrest) gebunden.

Erstaunlicherweise beeinträchtigen diese verbleibenden Reste des Linkers nicht oder nur kaum die Aktivität des antimikrobiellen Peptids (Apidaecinderivat).

Besonders bevorzugte modifizierte Peptide (Apidaecinderivate) weisen folgende Peptidsequenzen auf:

ONORPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 9) oder

OONRPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 10) mit O = L-Ornithin

wobei die alpha-Aminogruppe des ersten Ornithins guanidiert ist und an die delta-Aminogruppe des zweiten Ornithins über einen wie oben ausgewählten Peptidlinker, bevorzugt ausgewählt aus **GRSG**, **GARSG** und **GAARSG** (SEQ ID No. 61 bis 63), eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist.

Vorversuche zeigten, dass eine Modifikation des C-Terminus zu einem großen Aktivitätsverlust führt. Ein gewisser Aktivitätsverlust wird bei Einbau der Seitenkette an Position 1 (Formel 3, Orn-1 in SEQ ID No. 11) beobachtet, daher sind die Substitution von Asn-2 und Asn-3 gegen Orn (SEQ ID No. 9 und 10) besonders bevorzugt.

Etwas weniger bevorzugt modifizierte Peptide (Apidaecinderivate) weisen folgende Peptidsequenz auf:

OONRPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 11) mit O = L-Ornithin

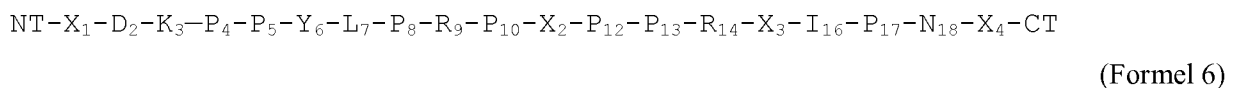
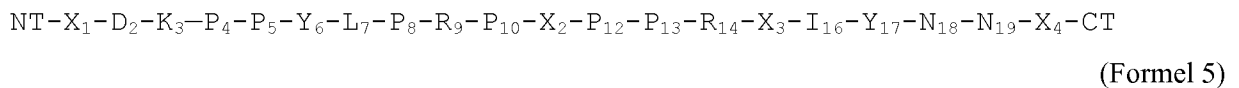
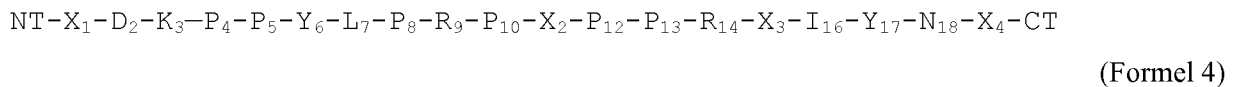
wobei die alpha-Aminogruppe des ersten Ornithins guanidiert ist und an die delta-Aminogruppe desselben Ornithins über einen Peptidlinker ausgewählt aus **GRSG**, **GARSG** und **GAARSG** (SEQ ID No. 61 bis 63) eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist.

Bevorzugte modifizierte Peptide haben folgende Strukturen:



wobei Linker für den Peptidlinker steht, der wie oben ausgewählt ist, besonders bevorzugt GRSG.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein modifiziertes Peptid, abgeleitet von Oncopeltus antibakterielles Peptid 4, welches eine Sequenz gemäß einer der allgemeinen Formeln 4 bis 6 aufweist:



X₁ ist ein Rest mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette oder ein Aminosäurerest, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette;

D₂ ist ein Asparaginsäure- oder Glutaminsäurerest,

K₃ ist ein Rest mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette, bevorzugt Lysin oder Arginin,

X₂ und X₄ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Resten mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette;

X₃ ist ein Rest mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette oder Prolin oder ein Prolinderivat;

L₇ und I₁₆ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Resten mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette, bevorzugt Leucin, Isoleucin, Valin und *tert.*-Leucin,

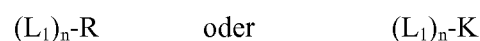
Y₆ und Y₁₇ sind jeweils Tyrosin, R₉ und R₁₄ sind jeweils Arginin, N₁₈ und N₁₉ sind jeweils Asparagin oder Glutamin, P₄, P₅, P₈, P₁₀, P₁₂, P₁₃ und P₁₇ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Prolin und Prolinderivaten oder Hydroxyprolin und Hydroxyprolinderivaten, wobei gegebenenfalls P₁₃ und R₁₄ vertauscht sind, und/oder gegebenenfalls ein oder zwei der Reste ausgewählt aus D₂, P₄, P₅, P₈, P₁₀, P₁₂, P₁₃, P₁₇ und Y₁₇ durch einen beliebigen Rest ersetzt sind,

NT ist der N-Terminus der Aminosäure X₁,

CT ist die freie C-terminale Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (-COOH) oder eine modifizierte C-terminale Carboxylgruppe.

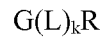
Dieses Peptid (Oncopeltus-Peptiderivat) zeichnet sich dadurch aus, dass an NT über einen Peptidlinker eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist, wobei der Peptidlinker 3 bis 10 Aminosäurereste lang ist und mindestens ein Arginin oder Lysin enthält.

Bevorzugt hat der Linker folgende allgemeine Formel:



wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 9 ist und die einzelnen L₁ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Aminosäuren mit 2 bis 6 C-Atomen, bevorzugt 2 oder 3 C-Atomen, insbesondere Glycin, Alanin und Serin. Besonders bevorzugt gilt n = 1 bis 3.

Weiter bevorzugt hat der Linker folgende Formel:

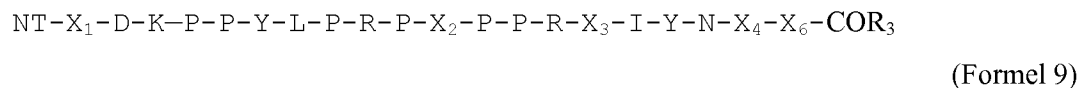
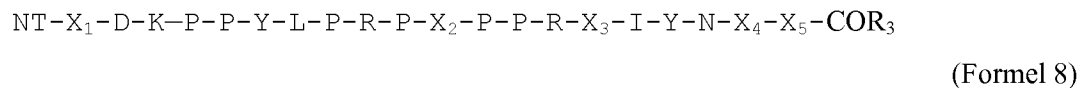
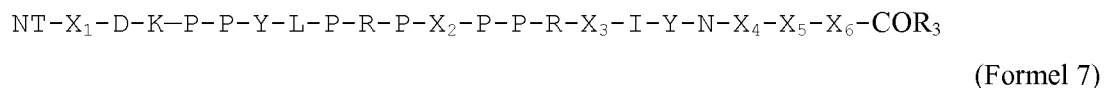


mit L ausgewählt aus Alanin, Glycin und Serin und k ausgewählt aus 1, 2 oder 3.

Besonders bevorzugte Linker sind ausgewählt aus den Peptiden GR, GAR und GAAR (SEQ ID No. 66).

X₅ und X₆ sind optional zusätzliche Reste. In dem Fall, dass X₅ und X₆ abwesend sind, hat das letzte Arginin (Arg) in der oben erwähnten Sequenz eine freie C-terminale Carboxylgruppe oder ist mit CT verbunden.

In dem Fall, in dem mindestens ein Rest X₅ und X₆ vorhanden ist, hat das Peptid beispielsweise eine Sequenz gemäß einer der allgemeinen Formeln 7 bis 9:



X₅ ist aus Prolin, Prolinderivaten oder einem neutralen Rest mit einer polaren Seitenkette (wie Asparagin, Glutamin) ausgewählt. Bevorzugte Reste X₅ sind aus den Gruppen ausgewählt, die Prolin, cis-4-Hydroxyprolin, trans-4-Hydroxyprolin, cis-3-Hydroxyprolin, trans-3-Hydroxyprolin, β-Cyclohexylalanin, 3,4-cis-Methanoprolin, 3,4-Dehydroprolin, Homoprolin, Pseudoprolin ebenso wie Asparagin, Glutamin, Citrullin, N-Methylserin, N-Methylglycin, Dihydroxyphenylalanin, N-Ethylasparagin, N-Ethylglycin, Homoserin, Penicillamin, Tetrahydropyranylglycin, allo-Threonin und 3,5-Dinitrotyrosin enthalten.

X₆ ist aus Prolin, Prolinderivaten, einem polaren Rest (wie Serin) oder einen hydrophoben Rest ausgewählt. Bevorzugte Reste X₆ sind aus den Gruppen ausgewählt, die Prolin, cis-4-Hydroxyprolin, trans-4-Hydroxyprolin, cis-3-Hydroxyprolin, trans-3-Hydroxyprolin, β-Cyclohexylalanin, 3,4-cis-Methanoprolin, 3,4-Dehydroprolin, Homoprolin oder Pseudoprolin, Serin, Threonin, δ-Hydroxylysin, Citrullin, Homoserin oder allo-Threonin ebenso Phenylalanin, N-Methylleucin, Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin, *tert.*-Butylglycin, Cyclohexylalanin, Alanin, β-Alanin, 1-Aminocyclohexylcarbonsäure, N-Methylisoleucin, Norleucin, Norvalin, N-Methylvalin enthält oder es ist eine kurze Peptidsequenz mit

vorzugsweise einem bis drei Resten, die bevorzugt ausgewählt sind aus Prolin, Isoleucin oder einem der zuvor erwähnten Reste.

Alternativ ist X_6 ein verzweigter Linker, der mehrere Peptideinheiten enthält. Dieser wird durch den Rest einer Aminosäure, die mehrere Aminogruppen enthält, wie z. B. Lysin, Hydroxylysin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, 2,3-Diaminopropionsäure, 2,2'-Diaminopimelinsäure, Desmosin, Isodesmosin gebildet.

Die C-terminale Aminosäure ist zum Beispiel X_4 in der Formel 1, X_5 (in Formel 3) oder X_6 (in Formel 2 und 4).

Besonders bevorzugte modifizierte Peptide (Oncopeltus-Peptiderivate) weisen folgende Peptidsequenzen auf:

VDKPPYLPFRPRPPROIYNO-NH₂ (SEQ ID No. 12) oder

VDKPPYLPFRPRPHypRHypTleYNO-NH₂ (SEQ ID No. 13)

mit O = L-Ornithin,

Hyp = L-4-Hydroxyprolin und

Tle = L-tertiär-Leucin (L-tertiär-Butylglycin),

wobei an die N-terminale Aminogruppe (alpha-Aminogruppe des ersten Aminorests V) über den Peptidlinker, bevorzugt GAR, eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist. Der C-Terminus (CT) ist hier ein Carbonsäureamid (d. h. die Carboxylgruppe des letzten Ornithins ist zum Amid umgesetzt).

Die nachfolgend Ausführungen und erwähnten Vorzugsvarianten gelten allgemein für alle erfindungsgemäß modifizierten Peptide (Apidaecinderivate und Oncopeltus-Peptiderivate):

Die erfindungsgemäßen modifizierten Peptide enthalten bevorzugt mindestens 18 Aminosäurereste, bevorzugt bis zu 50 Aminosäurereste.

Für alle erfindungsgemäß modifizierten Peptide (Apidaecinderivate und Oncopeltus-Peptiderivate) gilt, dass die Polyethylenglykol-Polymerkette bevorzugt ein Molekulargewicht von 500 bis 40000 Da, besonders bevorzugt mindestens 5000 Da, aufweist. Die Polyethylenglykol-Polymerkette ist jeweils kovalent an den Peptidlinker gebunden, bevorzugt an die die N-terminale-Aminogruppe des Linkers, besonders bevorzugt die alpha-Aminogruppe des Glycins. Die Kopplung an den Peptidlinker erfolgt entweder direkt (z. B. mit einem NHS-Ester aktivierten Polyethylenglykol an die Aminogruppe) oder

mittels eines kurzen organischen Linkers (bevorzugt C1 bis C10) und/oder durch Ausbildung einer Thioetherbindung (z. B. durch Derivatisierung der N-terminalen-Aminogruppe des Linkers, besonders bevorzugt die alpha-Aminogruppe des Glycins mit Iodessigsäure und Reaktion mit einem Thiol-modifizierten Polyethylenglykol). Die Polyethylenglykol-Polymerkette ist bevorzugt linear.

In allen erfindungsgemäßen Peptiden ist die tryptische Schnittstelle unmittelbar zwischen dem Polymer und dem antimikrobiellen Peptid eingefügt. Eine zusätzliche spaltbare Gruppe, die z. B. durch 1,6-Eliminierung entfernt wird, ist nicht enthalten.

Reste mit einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette sind bevorzugt ausgewählt aus Arginin, Lysin, δ -Hydroxylysin, Homoarginin, 2,4-Diaminobuttersäure, β -Homoarginin, D-Arginin, Arginal (-COOH in Arginin ist ersetzt durch -CHO), 2-Amino-3-guanidinopropionsäure, Nitroarginin (bevorzugt N(G)-Nitroarginin), Nitrosoarginine (bevorzugt N(G)-Nitrosoarginin), Methylarginin (bevorzugt N-Methyl-Arginin), ϵ -N-Methyllysin, allo-Hydroxylysin, 2,3-Diaminopropionsäure, 2,2'-Diaminopimelinsäure, Ornithin, sym-Dimethylarginin, asym-Dimethylarginin, 2,6-Diaminohexinsäure, p-Aminobenzoessäure und 3-Aminotyrosin und weniger bevorzugt Histidin, 1-Methylhistidin und 3-Methylhistidin. X₁, X₂ und X₃ sind bevorzugt unabhängig voneinander aus dieser Liste ausgewählt.

Der Begriff Prolinderivat steht für einen von Prolin abgeleiteten Aminosäurenrest, der aus Prolin bevorzugt durch strukturelle Veränderung einer funktionellen Gruppe erhalten wird. Bevorzugte Prolinderivate sind ausgewählt aus, β -Cyclohexylalanin, 3,4-cis-Methanoprolin, 3,4-Dehydroprolin, Homoprolin oder Pseudoprolin. Der Begriff Hydroxyprolin schließt unter anderem cis-4-Hydroxyprolin, trans-4-Hydroxyprolin, cis-3-Hydroxyprolin und trans-3-Hydroxyprolin mit ein. Der Begriff Hydroxyprolinderivat steht entsprechend für einen von Hydroxyprolin abgeleiteten Aminosäurenrest, der aus Hydroxyprolin bevorzugt durch strukturelle Veränderung einer funktionellen Gruppe erhalten wird. Bevorzugte Hydroxyprolinderivate sind ausgewählt aus Hydroxy- β -Cyclohexylalanin und den oben genannten Prolinderivaten, die mit einer Hydroxylgruppe substituiert sind.

Ein neutraler Rest ist ein Rest mit einer unter physiologischen Bedingungen ungeladenen Seitenkette.

Ein polarer Rest weist bevorzugt mindestens eine polare Gruppe in der Seitenkette auf. Diese sind bevorzugt ausgewählt aus Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Amin-, Amid- oder Estergruppen oder anderen Gruppen, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erlauben.

Bevorzugte neutrale polare Reste sind ausgewählt aus Asparagin, Cystein, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Citrullin, N-Methylserin, Homoserin, allo-Threonin und 3,5-Dinitrotyrosin und β -Homoserin,

Die Reste mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette sind unter physiologischen Bedingungen ungeladene Reste, bevorzugt mit einem Hydrophathie-Index über 0, besonders bevorzugt über 3. Bevorzugte unpolare, hydrophoben Seitenketten sind ausgewählt aus Alkyl-, Alkylen- Alkoxy-, Alkenoxy-, Alkylsulfanyl- und Alkenylsulfanylresten mit 1 bis 10, bevorzugt 2 bis 6 C-Atomen, oder Arylresten mit 5 bis 12 C-Atomen. Bevorzugte Reste mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette sind ausgewählt aus Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin, Alanin, Phenylalanin, *N*-Methytleucin, *tert.*-Butylglycin, Cyclohexylalanin, β -Alanin, 1-Aminocyclohexylcarbonsäure, *N*-Methylisoleucin, Norleucin, Norvalin und *N*-Methylvalin.

Unter physiologischen Bedingungen sind ein pH-Wert von pH 6 bis 8 und eine Temperatur von 30°C bis 40°C zu verstehen, bevorzugt eine Temperatur von 37°C, ein pH-Wert von 7,4 und ein osmotischer Druck von 300 mosmol/kg.

NT ist der freie N-Terminus von X_1 oder eine modifizierte N-terminale Aminogruppe. CT ist die freie C-terminale Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (-COOH) oder eine modifizierte C-terminale Carboxylgruppe. „Modifizierte N-terminale Aminogruppe“ und „modifizierte C-terminale Carboxylgruppe“ bedeutet, dass die Aminogruppe bzw. Carboxylgruppe verändert ist (z. B. reduziert oder substituiert).

NT stellt somit den freien N-Terminus der Aminosäure X_1 oder eine Modifikation der N-terminalen Aminogruppe (welche die N-terminale Aminogruppe der Aminosäure X_1 durch NT ersetzt) mit der generellen Formel NR_1R_2 , dar. $NT = NR_1R_2$, wobei R_1 und R_2 unabhängig voneinander sind und bevorzugt aus Wasserstoff oder aus folgenden Gruppen ausgewählt werden:

- (i) einer geradkettigen, verzweigten, zyklischen oder heterozyklischen Alkylgruppe, wie z. B. Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl oder Cyclohexyl;
- (ii) einer geradkettigen, verzweigten, zyklischen oder heterozyklischen Alkanoylgruppe, wie z. B. Acetyl oder Methanoyl (Formyl), Propionyl, n-Butyryl, Isobutyryl, Pentanoyl, Hexanoyl oder Cyclohexanoyl;
- (iii) eine Reportergruppe, bevorzugt ein Fluoreszenzfarbstoff (wie z. B. Fluorescein, Alexa488) oder Biotin;
- (iv) zusammen mit COR_3 (siehe unten) einen Linker zwischen N- und C-Terminus um ein zyklisches Peptid zu erhalten, z. B. basierend auf Guanidin, Ethyleneglycololigomere, 2,4-Diaminobuttersäure, 2,3-Diaminopropionsäure, 2,2'-Diaminopimelinsäure, Desmosin oder Isodesmosine.
- (v) einen Linker zur Kopplung eines weiteren Peptids oder Peptidderivats (Y_1) über eine spezifische chemische oder enzymatische Reaktion, z.B. basierend auf Iod-, Brom- oder

Chloralkansäuren (z.B. Iodessigsäure) oder Maleimid zur Kopplung an ein Thiol-haltiges Peptid oder auch einer anderen reaktiven Gruppe (z.B. Aminogruppe, Thiolgruppe) zur Kopplung eines zweiten Peptids oder Peptidderivats (z.B. als Aktivester, Aldehyd oder Thioester) als Träger- oder Carrierprotein.

- (vi) einen wie in (v) genannten Linker, an den ein weiteres Peptid oder Peptidderivat Y_1 gekoppelt ist.

Beispiele für N-terminale Modifikationen sind acetylierte, formylierte und bevorzugt guanidierte N-Termini.

Bevorzugt ist über NT ein weiteres Peptid oder Peptidderivat Y_1 gekoppelt. Y_1 ist vorzugsweise ein Biopolymer (z.B. Peptid), welches das antimikrobielle Peptid nach Formel 1 in Bakterien einschleust und damit die Aktivität des antimikrobiellen Peptids gegenüber diesem Bakterium erhöht und/oder in Säugerzellen einschleust und damit die Behandlung von Bakterien ermöglicht, die sich in Säugerzellen verstecken. Y_1 ist über NT entweder permanent (z.B. Peptid- oder Amidbindung für $NT=NH_2$ oder Thioether für $NT=SH$, Iodacetat oder Maleimid) oder durch eine Verbindung, die unter bestimmten Bedingungen spaltbar ist (wie z. B. Disulfidbrücken oder säurelabile Linker), mit X_1 des Peptids verknüpft. Bevorzugte Sequenzen für Y_1 sind Zell-penetrierende Peptide (CPP, cell penetrating peptides), beispielsweise Penetratin, Tat-Peptide, amphipathische Modell-Peptide (model amphipathic peptides) und Transportans (Langel, U. in *Handbook of Cell-Penetrating Peptides* 5-28. CRC - Taylor & Francis Group, 2006).

Ein Linker ist eine Bezeichnung für Moleküle oder Molekülgruppen, die zum Verknüpfen von zwei Substanzen herangezogen werden, bevorzugte Linker enthalten zwei reaktive Gruppen (wie z. B. Iodacetat, Maleimid, Imido- oder NHS-Ester oder Hydrazid), die durch eine Molekülbrücke (z. B. Polyethylenglykol) mit bevorzugt 10 bis 20 C-Atomen verbunden sind.

CT ist die freie C-terminale Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (-COOH) oder eine modifizierte C-terminalen Carboxylgruppe, vorzugsweise mit der allgemeinen Formel COR_3 (R_3 ersetzt die Hydroxylgruppe der letzten Aminosäure), X_5-COR_3 oder X_6-COR_3 oder $X_5X_6-COR_3$.

COR_3 ist vorzugsweise aus der folgenden Gruppe ausgewählt:

- i. Carboxyl (R_3 ist eine freie Hydroxylgruppe), ein Ester (R_3 ist eine Alkoxygruppe), ein Amid (R_3 ist ein Amin) oder ein Imid;
- ii. ein Linker, der zusammen mit NT, die N- und C-Termini zu einem zyklischen Peptid verbrückt;

- iii. COR₃, worin R₃ entweder ein zusätzlicher Aminosäurerest ist, der aus der Gruppe die Pro, Ile, Leu, Arg und Gln enthält, ausgewählt ist, oder worin R₃ ein Peptid, mit bevorzugt zwei bis sechs Aminosäuren ist, wovon mindestens eine Aminosäure aus der Gruppe, die Pro, Ile, Leu, Arg oder Gln enthält, ausgewählt ist, wobei diese mit einem Mitglied aus der Gruppe mit Carboxyl (R₃ ist eine freie Hydroxylgruppe), einem Ester (R₃ ist ein Alkohol, wie Methanol, Ethanol, Propanol, iso-Propanol oder Butanol), einem Amid (R₃ ist ein Amid) oder ein Imid (R₃ ist ein Alkylamin oder Dialkylamin, wie Methylamin, Ethylamin, Dimethylamin oder Zyklohexylamin) substituiert ist.
- iv. COR₃ worin R₃ eine zusätzliche, verzweigte Aminosäure ist, um eine Dimer- oder Oligomerstruktur auszubilden, wie beispielsweise Lysin, Hydroxylysin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, 2,3-Diaminopropionsäure, 2,2'-Diaminopimelinsäure, Desmosin, Isodesmosin oder eine Kombination aus diesen verzweigten Aminosäuren.
- v. ein Linker zur Kopplung eines weiteren Peptids oder Peptidderivats (Y₁) über eine spezifische chemische oder enzymatische Reaktion, z.B. basierend auf Iod-, Brom- oder Chloralkansäuren (z.B. Iodessigsäure) oder Maleimid zur Kopplung an ein Thiol-haltiges Peptid oder auch einer anderen reaktiven Gruppe (z.B. Aminogruppe, Thiolgruppe) zur Kopplung eines zweiten Peptids oder Peptidderivats (z.B. als Aktivester, Aldehyd oder Thioester) als Träger- oder Carrierprotein.
- vi. einen wie in (v) genannten Linker, an den ein weiteres Peptid oder Peptidderivat Y₁ gekoppelt ist

Auf diesem Weg können C-terminale Peptidderivate als Ester (R₃ = Alkoxy), Amid (R₃ = Amin, z. B. -NH₂ oder Imin, z. B. -NHC₃H₇) oder Imid oder ein Peptid, das um weitere Aminosäuren verlängert wurde, die aus der Gruppe, die Pro, Ile, Arg und Val enthält, ausgewählt wurde und ebenfalls wieder am C-Terminus als Ester, Amid oder Imid modifiziert sind, erhalten werden. Weitere Peptidderivate können durch Modifikationen der N-terminalen oder C-terminalen Enden der Peptide gebildet werden. Diese Änderungen können beispielsweise eine zusätzliche Alkyl- oder Alkanoylgruppe (entweder mit einer geraden Kette oder verzweigt, zyklisch oder heterozyklisch) oder eine zusätzliche Guanidinogruppe oder ein zusätzliches Makromolekül oder ein Reporterrest sein, der entweder permanent oder durch eine Verbindung, die unter bestimmten Bedingungen spaltbar ist (wie Disulfidbrücken oder säurelabile Linker), verknüpft ist.

Bevorzugt erfolgt eine Modifikation des C-Terminus mittels Thioestersynthese und anschließender Substitution mit primären Aminen.

Alle natürlichen Aminosäuren, unnatürlichen Aminosäuren oder Aminosäurederivate (wie z.B. Iminosäuren), welche die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate bilden, können entweder in der L- oder D-Konformation vorliegen. Wenn nicht anders spezifiziert sind die Bausteine in den Sequenzen jedoch bevorzugt in der L-Konformation.

Die Modifikationen der N- und C-Termini erlauben das Koppeln der Peptide an andere Gruppen, wie zum Beispiel andere Aminosäuresequenzen (dabei werden eventuell multimerer Peptide oder Proteine geschaffen) oder andere Biomoleküle, welche die Funktion eines Carriers oder Labels haben, beispielsweise von Y_1 über NT. In einer speziellen Ausführungsform fungiert das Molekül als Träger um die bakterielle Infektion in Säugerzellen zu bekämpfen oder das antibakterielle Peptid und Peptidderivat in Bakterien zu transportieren, in die das antibakterielle Peptid nicht allein eindringen kann (z.B. Gram-positive Bakterien). Beispiele für solche Zell-penetrierenden Peptide (CPP) sind beispielsweise Penetratinen, Tat-Peptide, amphipathischen Modell-Peptiden (model amphipathic peptides) und Transportans. Zudem kann der Ort der Infektion durch die gekoppelte Struktur (Target-Molekül) erkannt werden und dadurch die antibiotische Substanz in die Nähe der (Bakterien-) Zelle gebracht werden, um diese bekämpfen. Solche Target-Moleküle sind z.B. Moleküle, die bekanntermaßen an Lipopolysaccharid (LPS)-Moleküle binden, welche die Außenseite der Gram-negativen Bakterien bilden. Bekannte Verbindungen für diese Anwendung sind beispielsweise Ankerpeptide, wie das AcmA-Motiv aus *Lactobacillus* oder ein gegen Lipopolysaccharid gerichteter Antikörper. Die letztere Variante ist bevorzugt, da sie auch einen intrinsischen antibiotischen Effekt hat und deshalb zur Steigerung der Aktivität der erfindungsgemäßen Peptide genutzt werden kann.

Durch die Ankopplung einer Zell-penetrierenden Peptidsequenz, wie Penetratin, kann einerseits die Aktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien gesteigert bzw. das Wirkungsspektrum auf andere Gram-positive und Gram-negative Bakterien erweitert werden und andererseits die antimikrobiellen Peptide in Säugerzellen eingeschleust werden, so dass auch in diesen Zellen verborgene Bakterien, Pilze oder Viren erreicht werden können. Bestandteil der Erfindung ist die Kopplung des Penetratins über eine Thioetherbrücke. Dabei wurde der C-Terminus des Penetratins um ein Cystein verlängert und an das N-terminal mit Iodessigsäure markierte antimikrobielle Peptid gekoppelt.

Der Ausdruck „Peptid“, wie hier verwendet, steht für eine Sequenz von Aminosäuren, die über eine Peptidbindung verknüpft sind, wobei die Aminosäuren bevorzugt aus den zwanzig proteinogenen Aminosäuren ausgewählt sind und worin die Aminosäuren in der L-Konfiguration oder D-Konfiguration, oder im Fall von Isoleucin und Threonin auch in der D-allo-Konfiguration vorliegen können (nur Inversion eines der beiden chiralen Zentren). Umfasst sind zudem Peptide, die durch Substitutionen und/oder Modifikationen von einem oder mehreren Aminosäureresten durch chemische Gruppen verändert wurden, wobei diese chemischen Gruppen andere als die natürlichen Protein-bildenden Aminosäurereste sind, wie z.B. nicht-proteinogene α -Aminosäuren, β -Aminosäuren oder Peptide mit verändertem Rückgrat. Der Begriff „verändertes Rückgrat“ bedeutet, dass mindestens eine Peptidbindung

chemisch modifiziert ist, d. h. ersetzt ist durch eine unter physiologischen Bedingungen nicht spaltbare Bindung, die nicht durch Endoproteasen geschnitten werden kann.

Bevorzugt ist die nicht spaltbare Bindung eine modifizierte Peptidbindung wie z. B. eine reduzierte Peptidbindung, eine alkylierte Amidbindung oder eine Thioamidbindung. Eine reduzierte Amidbindung ist eine Peptidbindung in der die Carbonylgruppe (C=O) zu einer Hydroxylgruppe (HCOH) oder einer Methylengruppe (CH₂) reduziert ist. Eine alkylierte Amidbindung ist eine entweder am Stickstoff (N-alpha) oder Kohlenstoffatom (C-alpha) alkylierte Peptidbindung. Der Alkylrest hat bevorzugt 1 bis 3 C-Atome. Ein Beispiel ist die N-Methylierung.

Außerdem umfasst der Begriff verändertes Rückgrat andere Gruppen, die geeignet sind, eine kovalente Bindung sowohl mit der COOH-Gruppe des vorangegangenen Aminosäurerestes als auch der NH₂-Gruppe des folgenden Aminosäurerestes zu bilden, und die daher nicht notwendigerweise die Peptidrückgrat-Struktur aufrecht erhalten, wie z. B. Zuckeramino-säure-Dipeptid-Isostere, Azapeptide, 6-Homopolymere, gamma-Peptide, Depsipeptide (Esterbrücken im Rückgrat), Y-Lactam-Analoga, Oligo(phenylenethylen)e, vinyloge Sulfonpeptide, poly-N-substituierte Glycine oder Oligocarbamate. Modifikationen des Rückgrats sind an Positionen bevorzugt, die anfällig für enzymatischen Abbau sind, besonders an den sechs C-terminalen Resten der Peptide gemäß Formel 4 bis 9 (Oncocin- bzw. Oncopeltuspeptidderivate), besonders bevorzugt Positionen 14 bis 19, R-X₃-I₁₆-Y₁₇-N₁₈-X₄). Daher ist vorzugsweise mindestens eine der Bindungen zwischen X₃-I₁₆ (z.B. Arg-Ile), N₁₈-X₄ (z.B. Asn-Arg), X₄-NH₂ (z.B. Arg-NH₂), X₆-X₇ (z.B. Arg-Leu oder Arg-Ile) eine für Proteasen nicht spaltbare Bindung. Diese nicht spaltbare Bindung ist vorzugsweise aus der Gruppe der reduzierten Amidbindungen, alkylierten Amidbindungen oder Thioamidbindungen ausgewählt.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind bevorzugt linear. Alternativ sind die Peptide, insbesondere die Apidaecinderivate, auch zyklisch, d. h. bevorzugt die erste (N-Terminus) und die letzte Aminosäure (C-Terminus) sind über eine Peptidbindung oder einen Linker verknüpft. Umfasst sind jedoch auch Zyklisierungen zwischen einer Seitenkette (z. B. Lysin) und C-Terminus, einer Seitenkette (z. B. Glutaminsäure oder Asparaginsäure) und N-Terminus oder zwischen zwei Seitenketten (z. B. Lysin und Glutaminsäure oder Asparaginsäure).

Weitere Bestandteile dieser Erfindung sind die Methoden zur Herstellung der oben erwähnten neuartigen antibiotisch wirksamen Verbindungen.

Die Peptide oder Peptidderivate dieser Erfindung können entweder synthetisch oder, wo anwendbar, rekombinant mit konventionellen Methoden hergestellt werden. Vorzugsweise werden die Peptide oder Peptidderivate dieser Erfindung konventionell mit den bekannten Synthesetechniken hergestellt, wie beispielsweise von Merrifield beschrieben. Alternativ werden die in dieser Erfindung beschriebenen Peptide durch rekombinante Techniken hergestellt, indem man ein DNA-Fragment, welches eine

Nukleinsäuresequenz enthält, die für eines der oben beschriebenen Peptide kodiert, kloniert, und z. B. in einem Mikroorganismus oder einer Wirtszelle exprimiert. Die kodierenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt werden oder durch seitenspezifische Mutagenese einer existierenden Nukleinsäuresequenz (z.B. Sequenz die das Wildtyp-Oncopeltus 4 kodiert) gewonnen werden. Die so hergestellte kodierende Sequenz kann von der RNA (oder DNA) mit entsprechend hergestellten Primern in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit bekannten Techniken amplifiziert werden. Nach Reinigung, beispielsweise mittels Agarose-Gelelektrophorese, wird das PCR-Produkt in einen Vektor ligiert und letztlich die Wirtszelle mit dem entsprechenden rekombinanten Plasmid transformiert. Rekombinante Techniken sind für unterschiedliche Wirtszellen bekannt, beispielsweise *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, Säugerzellen (z.B. CHO (Chinese hamster ovary) oder COS-1 Zellen), Hefezellen (z.B. *Saccharomyces*, *Schizopyllum*), Insektenzellen oder virale Expressionssysteme (z.B. Baculovirus System). Nach konventioneller rekombinanter Herstellung können die Peptide dieser Erfindung aus den Wirtszellen isoliert werden, entweder mit klassischen Zellaufschlusstechniken oder vom Zellmedium mit konventionellen Methoden, z.B. Flüssigchromatographie, insbesondere der Affinitätschromatographie. Das antimikrobielle Peptid kann als einzelnes Peptid oder als Oligomer exprimiert werden. Dabei können die Oligomere mehrere Peptidsequenzen enthalten, die über den N- oder C-Terminus verknüpft sind, oder gar einen N- oder C-terminalen Tag enthalten, der die einfachere Reinigung der rekombinanten Peptide oder Proteinkonstrukte erlaubt. Konventionelle molekularbiologische Techniken und seitenspezifische Mutagenese können eingesetzt werden, um die Sequenz weiter zu verändern und so die gewünschten nicht-nativen Peptidsequenzen zu erhalten. Diese rekombinanten Techniken wurden bereits für viele antimikrobielle Peptide einschließlich Apidaecin (s. z. B. Maeno M et al. 1993. Biosci Biotechnol Biochem **57**:1206-7) angewandt.

Es ist auch möglich nicht natürlich vorkommende Aminosäuren gentechnisch in die Peptide einzubringen (Noren C et al. 1989. Science 244: 182-8; Ellman J et al. 1991 Methods Enzymol. 202: 301-36).

Anschließend können die Peptide aus der Wirtszellkultur oder dem *in vitro*- Translationssystem isoliert werden. Dies kann mit den üblichen Techniken zur Proteinreinigung und -isolierung erreicht werden, die Stand der Technik sind. Solche Techniken können beispielsweise die Immunadsorption oder Affinitätschromatographie beinhalten. Es ist außerdem möglich, die Peptide während der Synthese mit einem Tag zu versehen (z.B. Histidin-Tag), der eine schnelle Bindung und Reinigung gestattet. Der Tag kann nachträglich enzymatisch abgespalten werden, um die aktive Peptidsequenz zu erhalten.

Falls das Peptid selbst nicht kodiert oder exprimiert werden kann, aber sehr ähnlich zu einem kodierbaren oder exprimierbaren Peptid ist, kann die Methode zunächst auf das ähnliche Peptid angewandt werden, um dieses nachträglich in einem oder mehreren Schritten chemisch oder enzymatisch in das gewünschte Peptid oder Peptidomimetika zu überführen.

Die erfindungsgemäßen modifizierten Peptide können einzeln, in Kombination, als Multimere oder als verzweigte Multimere eingesetzt werden. Sinnvolle Kombinationen der erfindungsgemäßen Peptide umfassen Konkatomere, in denen die erfindungsgemäßen Peptide seriell miteinander oder über Spacer miteinander verknüpft sind, z. B. in der Form eines Peptidimers oder eines Peptidtrimers usw., indem die einzelnen Peptide aneinander gereiht sind. Dieses Multimer kann aus Peptiden oder Peptidderivaten mit identischen Sequenzen oder verschiedenen Sequenzen gemäß Formel 1 zusammengesetzt sein.

Die modifizierten Peptide können zusätzlich an ein biokompatibles Protein gekoppelt werden, beispielsweise humanes Serumalbumin, humanisierte Antikörper, Liposomen, Mizellen, synthetische Polymere, Nanopartikel und Phagen. Alternativ können Multimere, in denen die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate individuell kombiniert sind, in der Form von Dendrimeren oder Clustern hergestellt werden, wobei drei oder mehr Peptide an ein Zentrum gebunden sind.

In einer Ausführungsform können mehrere Peptide als multimeren Konstrukte oder Anordnung hergestellt werden. So können beispielsweise optional Aminosäuren (z.B. Gly-Ser-) oder andere Spacer basierend auf Aminosäuren oder anderen chemischen Verbindungen an den N- oder C-Terminus angehängt werden, um zwei oder mehr Peptide untereinander zu verknüpfen oder an einen Träger zu koppeln. Diese Anordnung kann die Form von einem oder mehreren der oben beschriebenen synthetischen Peptide gekoppelt an ein Trägerprotein annehmen. Alternativ enthält eine Anordnung mehrere Peptide, jedes als multiples antigenes Peptid exprimiert, optional an ein Trägerprotein gekoppelt. In einer weiteren Variante sind die ausgewählten Peptide sequentiell verknüpft und werden als rekombinantes Protein oder Polypeptid exprimiert. In einer Ausführungsform werden mehrere Peptide sequentiell, mit oder ohne Aminosäuren als Spacer dazwischen, verknüpft, um ein größeres rekombinantes Protein zu erhalten. Alternativ kann das rekombinante Protein an ein Trägerprotein fusioniert werden.

In einer anderen Ausführungsform enthalten die multimeren Konstrukte mindestens zwei Peptide, wobei ein Peptid über eine beliebige Aminosäure an die anderen Peptide gekoppelt wird. Eine beliebige Anzahl weiterer Peptide können an beliebige weitere Aminosäuren dieser Peptide angehängt werden. In einer weiteren Ausführungsform einer multimeren Anordnung, welches mindestens zwei Peptide enthält, ist das zweite oder sind die weiteren Peptide an ein verzweigtes Gerüst der anderen Peptide der Grundstruktur gekoppelt. Alternativ ist jedes weitere Peptid kovalent über die Gruppe NT oder CT an ein anderes Peptid der Anordnung verknüpft.

In einer anderen Ausführungsform eines multimeren Konstrukts oder einer Anordnung mit mindestens zwei Peptiden, sind mindestens eins oder mehrere Peptide an einen Träger gebunden. In einer anderen Ausführungsform sind ein oder mehrere der genannten Peptide ein synthetisches Peptid, das an ein Trägerprotein fusioniert ist. Weiterhin gibt es die Alternative mehrere der oben beschriebenen Peptide mit oder ohne flankierende Sequenzen sequentiell zu einem linearen Polypeptid zu kombinieren. Die Peptide

oder das Polypeptid sind entweder an den gleichen Träger gekoppelt oder unterschiedliche Peptide können individuell als Peptide an eins oder unterschiedliche immunologisch inerte Trägerproteine gekoppelt werden.

Geeignete Träger können die Stabilität, die Darreichung oder die Produktion verbessern, oder das Aktivitätsspektrum der Peptide verändern. Beispiele für Träger sind humanes Albumin, Polyethylenglykol oder andere Biopolymere bzw. andere natürlich oder nicht-natürlich vorkommende Polymere. In einer Ausführungsform, ist die Hauptkomponente vorzugsweise ein Protein oder anderes Molekül, das die Peptidstabilität erhöhen kann. Eine erfahrene Person kann einfach eine geeignete Kopplungseinheit auswählen.

In noch einer anderen Ausführungsform sind die Peptide in der Form eines multiplen Antigenpeptides (multiple antigenic peptide; MAP) angeordnet. Dieses System nutzt eine zentrale Einheit aus Lysinresten, an die mehrere Kopien des gleichen erfindungsgemäßen Peptids synthetisiert werden. Jedes MAP enthält mehrere Kopien eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen Peptide. Eine Ausführungsart eines MAP enthält mindestens drei, vorzugsweise aber vier oder mehr Peptide. Ein Fachmann kann einfach eine beliebige Anzahl multimerer Verbindungen gemäß den in obiger Formel identifizierten Peptiden herstellen. Alle derartigen multimeren Arrangements und Konstrukte sollen Bestandteil dieser Erfindung sein.

Weitere Kombinationen in der Form von Multimeren können an der Oberfläche von Partikeln hergestellt werden, wobei die Peptide oder Peptidomimetika an deren Oberfläche präsentiert werden. Der Partikel kann dann als Träger eines Peptids oder Peptidomimetikas fungieren und kann gleichzeitig als detektierbarer Marker wirken. Multimere können beispielsweise durch N-terminale Biotinylierung des N-terminalen Endes der Peptid- oder Peptidomimetika-Ketten und anschließende Komplexbildung mit Streptavidin erhalten werden. Da Streptavidin vier Biotinmoleküle oder -konjugate mit hoher Affinität binden kann, werden mit dieser Methode sehr stabile tetramere Peptidkomplexe erhalten. Multimere können aus identischen oder unterschiedlichen erfindungsgemäßen Peptiden oder Peptidomimetika hergestellt werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Multimere zwei oder mehr Peptid oder Peptidomimetika, in welcher jede Komponente einen gewissen Anteil zur bioziden Aktivität beiträgt (Zielerkennung, antimikrobielle Aktivität, Reinigung).

Ein anderer Gegenstand dieser Erfindung ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate in der Medizin oder Pharmazie, z.B. zur Therapie mit einem Antibiotikum oder in einer Zusammensetzung mit antimikrobieller (insbesondere bakteriozider) Aktivität.

Gegenstand der Erfindung sind auch die erfindungsgemäß modifizierten Peptide zur Verwendung in der Medizin, als Antibiotikum, in einem Desinfektions- oder Reinigungsmittel, als Konservierungsmittel oder

in einem Verpackungsmaterial. Besonders eignen sich die erfindungsgemäß modifizierten Peptid zur Behandlung von mikrobiellen, bakteriellen oder Pilz-Infektionen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäß modifizierten Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere eines Antibiotikums, insbesondere zur Behandlung von mikrobiellen Infektionen, z.B. durch Bakterien, Viren und Pilze.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein oder mehrere erfindungsgemäß modifizierte Peptide oder multimere Konstrukte unabhängig von der Anwesenheit anderer pharmazeutischer aktiver Verbindungen enthalten.

Bestandteil dieser Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide als Pharmazeutikum und/oder zur Herstellung eines Wirkstoffs, der als Antibiotikum eingesetzt werden kann.

Die modifizierten Peptide können auch einzeln in pharmazeutischen Produkten eingesetzt werden. Alternativ können ein oder mehrere modifizierte Peptide, wie oben beschrieben, an eine andere Verbindung fusioniert oder konjugiert werden, um die Pharmakokinetik oder Bioverfügbarkeit zu steigern, ohne dass eine Immunantwort ausgelöst wird. Eine beliebige Anzahl einzelner Peptide oder multimerer Konstrukte können miteinander gemischt werden, um eine einzelne Zusammensetzung herzustellen.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine therapeutisch wirksame Menge eines oder mehrerer modifizierter Peptide dieser Erfindung. Einmal zusammengestellt, kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung dem Subjekt direkt verabreicht werden, um mikrobielle (insbesondere bakterielle) Infektionen zu behandeln. Dazu wird dem zu behandelnden Subjekt eine therapeutisch wirksame Menge einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung verabreicht.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind dazu bestimmt Infektionen eines mit Bakterien oder Pilzen infizierten Säugetiers einschließlich des Menschen zu behandeln. Mindestens ein oder alternativ auch mehrere erfindungsgemäße Peptide oder multimere Konstrukte können zu einer antimikrobiell (insbesondere antibakteriell oder fungizid) wirksamen Zusammensetzung mit einem pharmakologisch vertretbaren Träger oder anderen Komponenten gemischt werden. Für den Gebrauch einer derartigen Zusammensetzung wird das ausgewählte Peptid vorzugsweise synthetisch oder auch rekombinant, wie oben beschrieben, hergestellt.

Die direkte Verabreichung dieser Zusammensetzung erfolgt lokal oder systemisch, bevorzugt oral, parenteral, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär, pulmonal oder interstitiell ins Gewebe.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann weiter geeignete und pharmazeutisch akzeptable Träger, Streckmittel oder Lösungsmittel enthalten und die Form einer Kapsel, Tablette, Pastille, Dragee, Pille, Tropfen, Zäpfchen, Puder, Spray, Impfstoff, Salbe, Paste, Creme, Inhalat, Pflaster, Aerosol oder ähnlichem aufweisen. Als pharmazeutisch akzeptable Trägerstoffe können Lösungsmittel, Streckmittel oder andere flüssige Bindemittel wie Dispersions- oder Suspensionshilfsmittel, oberflächenaktive Agenzien, isotonische Wirkstoffe, Dickungsmittel oder Emulgatoren, Konservierungsmittel, Umhüllungsmittel (encapsulating agent), feste Bindestoffe oder Gleitmittel eingesetzt werden, je nachdem was für die jeweilige Dosierung am Besten geeignet ist und zugleich mit dem Peptid, Peptidomimetika (Peptidderivat), Peptid-Konjugat oder Peptidmimetika-Konjugat kompatibel ist.

Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält daher vorzugsweise einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Der Begriff „pharmazeutisch akzeptabler Träger“ umfasst dabei auch einen Träger zur Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzung, wie beispielsweise Antikörper oder Polypeptide, Gene oder andere therapeutische Mittel. Der Begriff bezieht sich auf einen beliebigen pharmazeutischen Träger, der selbst nicht die Produktion von Antikörpern auslöst, die für das Individuum, dem die Rezeptur verabreicht wurde, gefährlich sein könnten, und der keine unangemessene Giftigkeit besitzen. Geeignete „pharmazeutisch akzeptable Träger“ können große, langsam abbaubare Makromoleküle, wie beispielsweise Proteine, Polysaccharide, Polylactonsäuren, Polyglykolsäuren, polymere Aminosäuren, Aminosäure-Kopolymere und inaktivierte Virusbestandteile sein. Solche Träger sind dem Fachmann wohlbekannt.

Salze der Peptide oder funktionell äquivalenter Verbindungen können mit bekannten Methoden hergestellt werden, was typischer Weise bedeutet, dass die Peptide, Peptidomimetika, Peptid-Konjugate oder Peptidomimetika-Konjugate mit einer pharmazeutisch akzeptablen Säure zu einem sauren Salz oder mit einer pharmazeutisch akzeptablen Base zu einem basischen Salz gemischt werden. Ob eine Säure oder eine Base pharmazeutisch akzeptabel sind, kann leicht von einem Fachmann in Kenntnis der Anwendung und der Rezeptur festgelegt werden. So sind beispielsweise nicht alle Säuren und Basen, die für *ex vivo* Anwendungen akzeptabel sind, auch auf therapeutische Rezepturen übertragbar. Abhängig von der jeweiligen Anwendung können pharmazeutisch akzeptable Säuren sowohl organischer als auch anorganischer Natur sein, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Glykolsäure, Oxalsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Zimtsäure, Schwefelsäure, Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Salpetersäure, Perchlorsäure, Phosphorsäure und Thiocyanensäure, die mit den freien Aminogruppen von Peptiden und funktionell äquivalenten Verbindungen Ammoniumsalze ausbilden. Pharmazeutisch akzeptable Basen, die mit freien Carbonsäuregruppen der Peptide und funktionell äquivalenten Verbindungen Carboxylate ausbilden, beinhalten Ethylamin, Methylamin, Dimethylamin, Triethylamin, Isopropylamin, Diisopropylamin und andere Mono-, Di- und Trialkylamine sowie Arylamine. Ferner sind pharmazeutisch akzeptable Lösungsmittel eingeschlossen.

Pharmazeutisch akzeptable Salze können darin zur Anwendung kommen, wie z. B. Salze von Mineralsäuren, wie Hydrochloride, Hydrobromide, Phosphate, Sulfate und vergleichbare; aber auch Salze organischer Säuren, wie Acetate, Propionate, Malonate, Benzoate und vergleichbare. Eine ausführliche Diskussion zur pharmazeutisch akzeptablen Inhaltsstoffen findet man in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J., 1991).

Pharmazeutisch akzeptable Träger in den therapeutischen Zusammensetzungen können Flüssigkeiten enthalten, beispielsweise Wasser, Salzwasser, Glycerol und Ethanol. Zusätzlich können Hilfsstoffe zugegeben werden, wie Befeuchtungsmittel oder Emulgatoren, pH puffernde Substanzen und ähnliche Verbindungen können in solchen Mitteln vorhanden sein. Typischer Weise werden die therapeutischen Zusammensetzungen entweder in flüssiger Form oder als Suspension zur Injektion zubereitet, feste Formen zum Auflösen oder Suspendieren in Trägerflüssigkeiten vor der Injektion sind ebenfalls möglich. Liposomen sind auch in der Definition eines „pharmazeutisch akzeptablen Trägers“ enthalten.

Zur therapeutischen Behandlung können modifizierte Peptide oder Peptid-Konjugate, wie oben beschrieben, produziert und einem Subjekt, das diese benötigt, verabreicht werden. Das Peptid oder Peptid-Konjugat kann einem Subjekt in beliebiger, geeigneter Form verabreicht werden, vorzugsweise als pharmazeutische Zusammensetzung, die der Darreichungsform angepasst ist und in einer für die angestrebte Behandlung angemessenen Dosierung vorliegt.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung können weitere aktive Verbindungen enthalten, beispielsweise konventionelle Antibiotika (z.B. Vancomycin, Streptomycin, Tetracyclin, Penicillin) oder andere antimikrobiell aktive Verbindungen, wie Fungizide, z.B. Intraconazol oder Myconazol. Auch andere Verbindungen, die mit der Infektion einhergehende Symptome wie Fieber (Salizylsäure) oder Hautausschlag lindern, können zugesetzt werden.

Neben der therapeutischen Verwendung zur Behandlung von Infektionen, oder auch bei der biologischen Kriegsführung, ist es weiter möglich, die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate in Desinfektions- oder Reinigungsmitteln (z. B. einer bakterioziden Zusammensetzung) einzusetzen, die zur Desinfektion oder Reinigung von Oberflächen oder Gegenständen verwendet werden können. Ein anderes Anwendungsgebiet sind Verpackungen, wo Peptide an Verpackungsmaterial gebunden oder darin eingebunden werden können, oder als Konservierungsmittel für andere Materialien, die leicht durch Mikroorganismen abgebaut werden können. Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate sind insbesondere zur Verpackung von Lebensmitteln geeignet, da sie weder beim Kontakt noch bei der Aufnahme toxisch wirken.

Ein anderer Bestandteil dieser Erfindung ist eine Methode zur Behandlung von Säugetieren, die mit Mikroben (insbesondere Bakterien oder Pilze) infiziert sind, einschließlich der Verabreichung einer effektiven, therapeutisch wirksamen Menge der pharmazeutisch wirksamen erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

Der hier verwendete Begriff „therapeutisch wirksame Menge“ bezeichnet die Menge eines Therapeutikums, d. h. eines erfindungsgemäßen Peptids, Peptidomimetikums, Peptid-Konjugats oder Peptidmimetika-Konjugats, welche die Vermehrung und Kolonienbildung der Bakterien zu reduzieren oder ganz zu verhindern oder einen messbaren therapeutischen bzw. prophylaktischen Erfolg zu erzielen vermag. Der Effekt kann beispielsweise für Biopsien in Kultur, durch Test der bakteriellen Aktivität oder mit einer anderen geeigneten Methode zur Beurteilung des Umfangs und des Grads einer bakteriellen Infektion bestimmt werden. Die genaue effektive Menge für ein Subjekt hängt von dessen Größe und Gesundheitszustand, der Art und dem Ausmaß der Erkrankung und den Therapeutika oder der Kombination mehrerer Therapeutika ab, die zur Behandlung ausgewählt wurden. Insbesondere die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können verwendet werden, um bakterielle Infektionen und/oder biologische oder physische Begleiterscheinungen (z.B. Fieber) zu reduzieren oder zu verhindern. Methoden zur Festlegung der Anfangsdosis durch einen Mediziner sind Stand der Technik. Die festgelegten Dosen müssen sicher und erfolgreich sein.

Die Menge eines erfindungsgemäßen Proteins, Peptids oder Nukleinsäure, die für eine antibakteriell effektive Dosis notwendig ist, kann unter Berücksichtigung des Pathogens, das die Infektion auslöst, der Schwere der Infektion, sowie vom Alter, Gewicht, Geschlecht, allgemeiner physischer Kondition usw. des Patienten festgelegt werden. Die notwendige Menge der aktiven Komponente, um effektiv antibakteriell und antimykotisch ohne nennenswerte Nebenwirkungen wirksam zu sein, hängt von der eingesetzten pharmazeutischen Rezeptur und der eventuellen Anwesenheit weiterer Bestandteile wie Antibiotika, Antimykotika usw. ab. Für die erfindungsgemäßen Einsatzgebiete kann eine effektive Dosis zwischen 0,01 nmol/kg und 50 nmol/kg liegen, vorzugsweise zwischen 0,2 nmol/kg und 10 nmol/kg des Peptids, Peptidomimetikas, Peptid-Konjugats oder Peptidomimetik-Konjugats in dem behandelten Individuum.

Anfangsdosen der erfindungsgemäßen Peptide, Peptidomimetika, Multimere, Peptid-Konjugate oder Peptidomimetika-Konjugate können optional durch wiederholte Verabreichung verfolgt werden. Die Häufigkeit der Dosierungen hängt von den oben identifizierten Faktoren ab und beträgt vorzugsweise zwischen ein und sechs Dosen pro Tag über einen Behandlungszeitraum von etwa drei Tagen bis maximal einer Woche.

In einer weiteren Ausführungsform werden die Verbindungen pulmonal in einer bestimmten Menge verabreicht, z.B. durch einen Inhalator, Zerstäuber, Aerosolspray oder einen Inhalator für trockenes

Pulver. Geeignete Formulierungen können durch bekannte Methoden und Techniken hergestellt werden. Eine transdermale oder rektale Zufuhr mag in einigen Fällen genau wie die Verabreichung in das Auge angebracht sein.

Es kann vorteilhaft sein, die erfindungsgemäßen Substanzen durch fortgeschrittene Formen der Arzneimittelgabe (advanced drug delivery or targeting methods) effektiver zu verabreichen. So kann, falls der Verdauungstrakt umgangen werden soll, die Darreichungsform eine beliebige Substanz oder Mischung enthalten, die die Bioverfügbarkeit steigert. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass der Abbau reduziert wird, z.B. durch einen Enzyminhibitor oder ein Antioxidans. Besser ist es, wenn die Bioverfügbarkeit der Verbindung durch eine Zunahme der Permeabilität der Absorptionsbarriere, meist die Schleimhaut, erzielt wird. Substanzen, die das Eindringen erleichtern, können auf verschiedene Arten wirken; einige erhöhen die Fluidität der Schleimhaut, während andere die Zwischenräume zwischen den Schleimhautzellen erweitern. Wiederum andere reduzieren die Viskosität des Schleims auf der Schleimhaut. Zu den bevorzugten Aufnahmebeschleunigern gehören amphiphile Substanzen wie Cholinsäurederivate, Phospholipide, Ethanol, Fettsäuren, Ölsäure, Fettsäurederivate, EDTA, Carbomere, Polycarbophil und Chitosan.

Indikationen, für welche die erfindungsgemäßen modifizierten Peptide, deren Konjugate oder Multimere eingesetzt werden können, sind bakterielle Infektionen mit sowohl Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien, beispielsweise *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia amylovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti*, *Haemophilus influenzae*.

Die Erfindung wird nachfolgend durch folgende Ausführungsbeispiele und Figuren erläutert, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken:

Fig. 1 zeigt die Serumstabilität von Api 300 (SG), Api 301 (SG) (links), Onc 72 und Onc110 (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (durchgezogene Linie) und die Abbauprodukte (gestrichelte Linie) sofern diese detektiert wurden.

Fig. 2 zeigt die Serumstabilität von Api 137 (sPEG⁷⁵⁰-GRSG) (links, durchgezogene Linie) und Api 137 (PEG⁷⁵⁰-GARSG) (rechts, durchgezogene Linie) in 25% wässrigem Mausserum (100 %). Der jeweils freigesetzte Wirkstoff Api 137 (SG) (gestrichelte Linie) und das daraus entstehende, am C-Terminus verkürzte Abbauprodukt Api 137 (SG) 1-16 (gepunktete Linie).

Fig. 3 zeigt die Serumstabilität von Api 300 (tPEG⁷⁵⁰-GRSG) (links) und Api 300 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GRSG) (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der

freigesetzte Wirkstoff Api 300 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api300 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 4 zeigt die Serumstabilität von Api 301 (tPEG⁷⁵⁰-GRSG) (links) und Api 301 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GRSG) (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der freigesetzte Wirkstoff Api 301 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api301 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 5 zeigt die Serumstabilität von Api 300 (tPEG⁷⁵⁰-GARSG) (links) und Api 300 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GARSG) (rechts) Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der freigesetzte Wirkstoff Api 300 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api300 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 6 zeigt die Serumstabilität von Api 301 (tPEG⁷⁵⁰-GARSG) (links) und Api 301 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GARSG) (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der freigesetzte Wirkstoff Api 301 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api301 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 7 zeigt die Serumstabilität von Api 300 (tPEG⁷⁵⁰-GAARSG) (links) und Api 300 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GAARSG) (rechts) Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der freigesetzte Wirkstoff Api 300 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api300 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 8 zeigt die Serumstabilität von Api 301 (tPEG⁷⁵⁰-GAARSG) (links) und Api 301 (tPEG⁵⁰⁰⁰-GAARSG) (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck), der freigesetzte Wirkstoff Api 301 (SG) (Raute) und dessen am C-Terminus verkürztes Abbauprodukt Api301 (SG) 1-16 (Stern).

Fig. 9 zeigt die Serumstabilität von tPEG⁷⁵⁰-GAR-Onc 72 (links) und tPEG⁵⁰⁰⁰-GAR-Onc 72 (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck) und der freigesetzte Wirkstoff Onc72 (Raute). Abbauprodukte von Onc72 wurden nicht detektiert.

Fig. 10 zeigt die Serumstabilität von tPEG⁷⁵⁰-GAR-Onc 110 (links) und tPEG⁵⁰⁰⁰-GAR-Onc 110 (rechts) in Mausserum (100 %). Gezeigt werden die jeweiligen Ausgangsprodukte (Dreieck) und der freigesetzte Wirkstoff Onc 110 (Raute). Abbauprodukte von Onc 110 wurden nicht detektiert.

Beispiel 1 Peptidsynthese und Modifizierung1. Peptidsynthese:

Alle Chemikalien für die Peptidsynthese wurden, wenn nicht anders angegeben, von Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) in der größtmöglichen Reinheit bezogen.

Die Peptide wurden mittels konventioneller Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc/^tBu-Strategie synthetisiert. Alle Standard-Fmoc-Aminosäuren wurden von MultiSynTech GmbH (Witten, Deutschland) bzw. Orpegen Pharma GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Trans-4-Hydroxyprolin (t-4-Hyp) und tert.-Leucin wurde von Novabiochem (Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Die Peptide wurden im 25- μ mol-Maßstab mit Hilfe eines SYRO 2000 Peptidsynthese-Roboters (MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) synthetisiert. Dafür wurden pro Synthesereaktor 42 mg Leu-Wang-Harz (Beladung: 0,6 mmol/g) eingewogen und 30 min in DMF gequollen. Nach der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurden die Peptide mit dem nachfolgenden Synthesesyklus (Tab. 2) synthetisiert.

Tabelle 2: Synthesesyklus der automatischen multiplen Festphasenpeptidsynthese (SYRO 2000) für die Kopplung einer Aminosäure.

Syntheseschritt	Reagenzien	Reaktionszeit
Aminosäurekopplung	8 eq. Aminosäure in HOBt/DMF (0,5 mol/L) und DIC/DMF (2,0 mol/L)	60 min
Waschen	3 x mit je 600 μ L DMF	1 min
Fmoc-Abspaltung	400 μ L 40 % Piperidin/DMF 500 μ L 20 % Piperidin/DMF	3 min 10 min
Waschen	6 x mit je 600 μ L DMF	1 min

Für die Synthese im 100- μ mol-Maßstab mit Hilfe eines Liberty Mikrowellen-Peptidsynthese-Roboters (CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland) wurden pro Synthesereaktor 156,3 mg kommerziell erhältliches Leu-Wang-Harz der Firma NovaBiochem (Beladung: 0,64 mmol/g) eingewogen und 30 min in DMF gequollen. Nach der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe, wurden die Peptide u. a. mit dem nachfolgenden Synthesesyklus (Tab. 3) synthetisiert.

Tabelle 3: Synthesesyklus der automatischen multiplen Festphasenpeptidsynthese (Liberty) für die Kopplung der einzelnen Aminosäuren.

Zyklus	Syntheseschritt	Reagenzien	Reaktionszeit
Aminosäure (0,10-Einzel)	Waschen	7,0 mL DMF	0,5 min
	Fmoc-Abspalten	7,0 mL 20 % Piperidin 35 Watt bei 75 °C	
	Waschen	5,0 mL DMF	3 min
	Fmoc-Abspalten	7,0 mL 20 % Piperidin 35 Watt bei 75 °C	
	Waschen	4 x mit je 7,0 mL DMF	10 min
	Kopplung	2,5 mL 0,2 mol/L Aminosäure in DMF 1,0 mL 0,5 mol/L HBTU 25 Watt bei 75 °C	
Waschen	3 x mit je 7,0 mL DMF		

Die Peptide wurden entweder als Säure an Wang-Harz bzw. Leu-Wang-Harz oder als Säureamid an Rink-Amid 4-Methylbenzylhydrolamin (MBHA) Harz (0,67 mmol/g), der Firma MultiSynTech GmbH (Witten, Deutschland) synthetisiert.

Als Seitenkettenschutzgruppen wurden Triphenylmethyl (trityl) für Cys, Asn, His und Gln, *tert.*-Butylether (^tBu) für Tyr, Ser und Thr, *tert.*-Butylester (O^tBu) für Asp und Glu, ω-N-2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) für Arg, *tert.*-Butyloxy-carbonyl (Boc) für Lys und Orn eingesetzt. Die temporäre Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 40% Piperidin (Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande) in DMF (v/v) für 5 min und erneut mit frischen 20% Piperidin in DMF (v/v) für 10 min abgespalten.

2. Modifizierung der Peptide:

a.) Guanidierung des N-Terminus:

Das Harz (1 eq.) wurde zunächst für 20 min in DMF gequollen. Dann wurde es mit HBTU in DMF (0,5 mol/L, 10 eq.) und NMM (10 eq.) für 3 Stunden bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Reaktionslösung erneuert und die Suspension für weitere 4 Stunden inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionslösung abgetrennt und das Harz sechsmal mit DMF bzw. DCM gewaschen.

b.) Iodacetylierung

Das Harz (1 eq.) wurde zunächst für 20 min in DMF gequollen. Dann wurde es mit Iodessigsäure (8 eq.) und HOBt in DMF (0,5 mol/L, 8 eq.) versetzt und die Reaktion mit DIC (8 eq.) aktiviert. Anschließend

wurde das Reaktionsgemisch für 16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionslösung abgetrennt und das Harz sechsmal mit DMF bzw. DCM gewaschen und anschließend getrocknet.

Die Vollständigkeit der Modifikation am N-terminus des Peptids bzw. der Seitenkette wurde mittels Kaisertest überprüft. Dazu wurde etwas Harz mit 0,28 mol/L Ninhydrin (Riedel de Haen, Seelze, Deutschland) in Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 0,2 mmol/L Kaliumcyanid in Pyridin und 76% Phenol in Ethanol im Verhältnis (1:1:2) bei 95°C inkubiert. Falls eine Blaufärbung auftrat, was auf freie primäre Aminogruppen hindeutet, wurde die Kopplung wiederholt.

3. Kopplung des Polyethylenglykols:

Da das Polyethylenglykol hygroskopische Eigenschaften aufweist, wurde es vor jeder Kopplungsreaktion am Hochvakuum getrocknet.

Folgende Polyethylenglykole-Derivate (alle Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland, > 95 % Reinheit) wurden als Ausgangsstoffe für die nachfolgend beschriebenen Kopplungen verwendet:

α -Methoxy- ω -carbonsäure Polyethylenglykol (20000 Da)	MeO-PEG ²⁰⁰⁰⁰ -COOH
α -Methoxy- ω -carbonsäure Polyethylenglykol (750 Da)	MeO-PEG ⁷⁵⁰ -COOH
α -Methoxy- ω -carbonsäure Polyethylenglykol (5000 Da)	MeO-PEG ⁵⁰⁰⁰ -COOH
α -Methoxy- ω -mercapto Polyethylenglykol (750 Da)	MeO-PEG ⁷⁵⁰ -SH
α -Methoxy- ω -mercapto Polyethylenglykol (5000 Da)	MeO-PEG ⁵⁰⁰⁰ -SH

a.) Kopplung des Polyethylenglykols mit freier Säuregruppe (sPEG, z. B. für MeO-PEG-COOH) via DIC und HOBt:

Das Harz (1 eq.) wurde zunächst für 20 min in DMF gequollen. Dann wurde es mit dem in HOBt/DMF (0,5 mol/L, 5 eq.) gelösten Polyethylenglykol-Derivat (5 eq.) versetzt und die Reaktion mit DIC (5 eq.) aktiviert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei RT und unter Schütteln inkubiert. Dann wurde erneut DIC (2,5 eq.) beigelegt und für weitere 30 min inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionslösung abgetrennt und das Harz sechsmal mit DMF gewaschen. Die vollständige Kopplung wurde mittels Kaiser-Test überprüft.

b.) Kopplung nach Aktivierung des Polyethylenglykol, insbesondere für PEG⁵⁰⁰⁰ und größer:

Hier wurde das Polyethylenglykol-Derivat mit freier Säuregruppe zunächst als N-Hydroxysuccinimid-(NHS-)Ester aktiviert und anschließend in Lösung gekoppelt.

Zur Bildung des Aktivesters wurden das Polyethylenglykol (1 eq.) mit je einem 1 eq. des zuvor in DMF gelösten DCC und N-Hydroxysuccinimid bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert bis sich nach drei Stunden ein feiner Niederschlag bildete. Der im Überstand gelöste PEG-Aktivester (1 eq.) wurde zum Peptid (0,9 eq.) gegeben und bei RT unter Schütteln in PBS (pH = 7,4) bzw. DMF inkubiert. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC und MALDI-TOF-MS bzw. mit LC-MS verfolgt.

c.) Thioether-Ligation mit Thiol-modifiziertem Polyethylenglykol (tPEG):

Das iodacetylierte Peptid (4 eq.) in PBS (pH = 7,4) wurde mit einem Thiolderivatisierten Polyethylenglykol (z. B. MeO-PEG-SH) (1 eq.) versetzt, die Reaktionslösung entgast und unter einer N₂-Atmosphäre bei 4 °C für 18 Stunden inkubiert. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels RP-HPLC und MALDI-TOF-MS verfolgt.

Die PEGylierten Peptide wurden in einer Ausbeute von 25 bis 40 % erhalten und mittels RP-HPLC und MALDI-MS charakterisiert.

Tabelle 4: Übersicht der synthetisierten Peptidsequenzen

SEQ ID No.	Name	Sequenz
2	Api 1b*	GNNRPVYIPQPRPPHPRL-OH
14	Api 88*	Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH ₂
15	Api 134*	Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH ₂
16	Api 137*	Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
17	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰)	Guan-O (sPEG ⁷⁵⁰) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
18	Api 137 (SG) *	Guan-O (SG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
19	Api 137 (GRSG) *	Guan-O (GRSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
20	Api 137 (GARSG) *	Guan-O (GARSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
21	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	Guan-O (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
22	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	Guan-O (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
23	Api 137 (sPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	Guan-O (sPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
24	Api 137 (sPEG ²⁰⁰⁰⁰ -GARSG)	Guan-O (sPEG ²⁰⁰⁰⁰ -GARSG) NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH
25	Api 300 (SG) [†]	Guan-OO (SG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
26	Api 300 (GRSG) *	Guan-OO (GRSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
27	Api 300 (GARSG) *	Guan-OO (GARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
28	Api 300 (GAARSG) *	Guan-OO (GAARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
29	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	Guan-OO (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
30	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	Guan-OO (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH

31	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	Guan-OO (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
32	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	Guan-OO (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
33	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	Guan-OO (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
34	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	Guan-OO (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
35	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)	Guan-OO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
36	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	Guan-OO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
37	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)	Guan-OO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG) NRPVYIPRPRPPHPRL-OH
38	Api 301 (SG) ⁺	Guan-ONO (SG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
39	Api 301 (GRSG) *	Guan-ONO (GRSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
40	Api 301 (GARSG) *	Guan-ONO (GARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
41	Api 301 (GAARSG) *	Guan-ONO (GAARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
42	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	Guan-ONO (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
43	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	Guan-ONO (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
44	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	Guan-ONO (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
45	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	Guan-ONO (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
46	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	Guan-ONO (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
47	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	Guan-ONO (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
48	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)	Guan-ONO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
49	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	Guan-ONO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
50	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)	Guan-ONO (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG) RPVYIPRPRPPHPRL-OH
51	Onc 72 ⁺	VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂
52	Onc 110 ⁺	VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH ₂
53	GAR-Onc 72*	GAR-VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂
54	GAR-Onc 110*	GAR-VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH ₂
55	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 72	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂
56	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH ₂
57	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 72*	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂
58	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH ₂
59	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-Onc 72	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂
60	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-Onc 110	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH ₂

Guan = Guanidino-Gruppe am N-Terminus, Hyp = *trans*-4-Hydroxyprolin, L(N₃) = N α -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)- ϵ -azido-L-Lysine, O = Ornithin, Pra = N α -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-progargylglycine, Tle = L-tertiär-Leucine (L-tertiär -Butylglycine), sPEG: über Säuregruppe verknüpftes PEG, tPEG: über Thiolgruppe verknüpftes PEG.

mit * sind Vergleichsbeispiele markiert, mit + sind Spaltungsprodukte markiert.

c.) Abspaltung Schutzgruppen und Aufreinigung:

Nach Beendigung der Synthese der Peptide und ggf. Modifizierung wurden die Harze sorgfältig mit DMF und DCM gewaschen und getrocknet. Die Harz-gebundenen Peptide wurden mit einer Mischung aus Wasser, m-Kresol, Thioanisol und Ethandithiol (5:5:5:2,5) in 87,5% Trifluoressigsäure (TFA) bei Raumtemperatur für 4 h abgespalten und zugleich die Seitenketten entschützt. Die Peptide und Peptidderivate wurden mit kaltem Diethylether präzipitiert und bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit kaltem Ether gewaschen, getrocknet und in 0,1% wässriger TFA (UV-Spektroskopie) gelöst. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Die abgespaltenen (ggf. modifizierten) Peptide wurden mittels RP-HPLC an einem Äkta HPLC System (Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Deutschland) mit einer Jupiter C₁₈ 5 µm 300 Å, 250 x 10 mm bzw. Jupiter C₁₈ 15 µm, 300 Å, 250 x 21 mm Säule (Phenomenex Inc., Torrance, USA) gereinigt.

Als Laufmittel wurde jeweils 0,1% wässrige TFA (Eluent A) und 60% wässriges Acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande) mit 0,1% TFA (Eluent B) verwendet. Ein typischer linearer Gradient begann bei 5% B und die Elution erfolgte bei einer Steigung von 1% B pro Minute mit einer Flussrate von 10 mL/min (250 x 21 mm Säule) bzw. 5 mL/min (250 x 10 mm Säule). Detektiert wurde bei 220, 230 und 240 nm. Die Analytik der gereinigten Peptide erfolgte mit dem gleichen HPLC System mit einer Jupiter C₁₈ 5 µm, 300 Å, 150 x 4,6 mm Säule (Phenomenex Inc., Torrance, USA). Eluiert wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min mit einem linearen Gradienten von 5-95% B in 30 min und detektiert bei 220 nm. Zusätzlich wurde die Reinheit mittels Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisierung mit Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS; 4700 Proteomic Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Dafür wurde 0,5 µL Peptidlösung mit 0,5 µL α-Cyanohydroxyzimtsäure (Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland) als Matrix (4 mg/mL in 60% Acetonitril in 0,1% wässriger TFA) co-kristallisiert.

Beispiel 2: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen und Wachstumskinetik

1. minimale Hemmkonzentrationen:

Die minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der Peptide wurden in einer Doppelbestimmung von Triplikaten mit einer Positiv-(Gentamycin) und einer Negativkontrolle (0,9 % NaCl-Lösung) ermittelt.

Die Peptide wurden dazu in Wasser gelöst und in einer zweifachen Verdünnungsreihe mit 1 % wässrigem Sojabohnen-Medium (TSB) in sterilen 96-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH) von 128 µg/mL in zwölf Verdünnungsschritten auf 62,5 ng/mL verdünnt. Übernachtskulturen von *Escherichia coli* Stamm BL21AI wurden mit 1 % TSB auf ca. $1,5 \times 10^7$ Kolonie bildende Einheiten

pro mL eingestellt. Daraufhin wurde jeweils 50 μ L Peptidlösung pro Well mit je 50 μ L der Bakterienlösung vermischt, um eine Anfangskonzentration von 4×10^5 Bakterien pro Well zu erreichen. Nach 20 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 595 nm (Mikroplatten-Leser, TECAN Trading AG) bestimmt. Die minimale Hemmkonzentration wurde als die niedrigste Peptidkonzentration identifiziert, bei der kein bakterielles Wachstum nachgewiesen wurde.

Zusätzlich wurde die antibakterielle Aktivität auch in Gegenwart von 25% Mausserum bestimmt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, die MHK-Werte bestimmt, allerdings wurden jedem Well vor der Inkubation noch 25 μ L Mausserum zugesetzt (25% Endkonzentration).

Tabelle 5: Minimale Hemmkonzentrationen.

Seq. ID	Peptidderivat	MHK [μ mol/L] in TSB	MHK [μ mol/L] in TSB/Mausserum
2	Apidaecin 1b*	0,48	1,75
14	Api 88*	0,44	1,19
15	Api 134*	1,78	7,12
16	Api 137*	0,46	0,23
18	Api 137 (SG) ⁺	0,2	
19	Api137(GRSG)*	0,7	
20	Api 137 (GARSG)*	0,9	
22	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	1,1	
23	Api 137 (sPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	3,7	
24	Api 137 (sPEG ²⁰⁰⁰⁰ -GARSG)	10,2	
25	Api 300 (SG) ⁺	0,8	0,21
29	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	2,9	0,37
30	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	2,9	0,54
31	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	2,8	
32	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	2,9	
33	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	1,5	
34	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	2,8	
35	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)	>44,8	
36	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	17,4	0,44

37	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)	25,4	
38	Api 301 (SG) ⁺	1,6	
42	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	1,5	
43	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	2,9	0,27
44	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	5,6	
45	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	2,9	
46	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	1,5	
47	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)	2,8	
48	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)	>38	
49	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)	9,2	
50	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)	>47,5	
51	Onc 72 ⁺	1,7	1,7
53	GAR-Onc 72*	3,1	
55	sPEG750-GAR-Onc 72	12,2	6,1
57	tPEG750-GAR-Onc 72	24,3	
52	Onc 110 ⁺	6,9	
54	GAR-Onc 110*	1,5	0,65
56	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110	24,3	9,2
58	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110	48,4	

mit * sind Vergleichsbeispiele markiert, mit + sind Spaltungsprodukte markiert.

Auf Grund der großen Massenunterschiede der unmodifizierten und der PEG-gekoppelten Peptide wird die MHK nicht in der herkömmlichen Einheit $\mu\text{g/mL}$, sondern in $\mu\text{mol/L}$ angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit des Peptidlinkers (GAR-Onc 72 und GAR-Onc 120) bzw. dessen in den Spaltungsprodukt verbleibenden Reste (Api 137 (SG), Api 300 (SG) und Api 301 (SG)) die MHK nicht oder nur unwesentlich erhöht. In den PEG-modifizierten Peptiden nimmt die MHK in TSB mit der Größe des PEG zu. Ohne Serum (TSB) zeigen die PEG-modifizierten Peptide eine erhöhte MHK. Im Serum haben die PEG-modifizierten Peptide jedoch eine MHK, die mit den unpegylierten Peptiden vergleichbar ist.

Beispiel 3: Freisetzung der Peptidwirkstoffe in Serum**1. Analyse in Maus-Serum:**

Es wurden 30 µL einer 1 mg/mL Peptidlösung mit 120 µL Wasser verdünnt und nach Zugabe von 50 µL Serum bei 37 °C für 0 Stunden, 0,5 Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden bzw. 4 Stunden inkubiert. Alternativ wurden die Peptide-Derivate mit einer Ausgangskonzentration von 3 mg/mL mit Serum auf eine Endkonzentration von 15 µg/mL verdünnt. Je nach Stabilität der Peptide wurden die Proben zu den zuvor genannten Zeitpunkte analysiert oder nach 0 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden. Die Serumproteine wurden durch Zugabe von 50 µL 15 %iger TCA ausgefällt und der Überstand mit 25 µL einer 1 mol/L NaOH neutralisiert. Es wurden die Proben mit 5 % B auf 250 µL aufgefüllt, 230 µL der Lösung in ein HPLC-Vial überführt und 220 µL injiziert.

Die RP-HPLC Analyse erfolgte mit einem linearen Acetonitrilgradienten (Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande) in Gegenwart von 0,1% Trifluoressigsäure (TFA, UV-grade, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) als Ionenpaarreagenz. Die Fraktionen wurden mit α -Cyanohydroxyzimtsäure (Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland) als Matrix (4 mg/mL in 60% Acetonitril in 0,1% wässriger TFA) co-kristallisiert und mit einem Tandem-Massenspektrometer (MALDI-TOF/TOF-MS, 4700 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) im Positiv-Ionenreflektor-Modus analysiert. Der Anteil der intakten Peptide und deren Abbauprodukte bzw. Metabolite konnten so zu den einzelnen Zeitpunkten identifiziert und quantifiziert werden. Als Kontrolle diente 25%iges wässriges Mausserum, das parallel für die gleichen Zeitintervalle analysiert wurde.

Tabelle 6: Übersicht der Halbwertszeiten in 25 %igem (V/V) und reinem Maus-Serum, verglichen wurden die unterschiedlichen Seitenkettenmodifikationen in Kombination mit PEG750; primäre (rot) und sekundäre Spaltstelle (blau), die mit * gekennzeichneten Halbwertszeiten wurden mittels MALDI-TOF MS quantifiziert.

Seq. ID	Peptidderivat	Halbwertszeit ($t_{1/2}$)	
		in 25% Serum	in Serum
16	Api 137*	>360 min	
18	Api 137 (GRSG)*	60 min	
20	Api 137 (GARSG)*	30 min	
21	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)	120 min	
22	Api 137 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)	60 min	
25	Api 300 (SG) ⁺		240 min
29	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)		50 min
32	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)		40 min

35	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)		75% (6 h)**
30	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)		35 min
33	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)		45 min
36	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)		69% (6 h)**
31	Api 300 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)		45 min
34	Api 300 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)		35 min
37	Api 300 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)		76% (6 h)**
38	Api 301 (SG) ⁺		60 % (4 h)**
42	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)		30 min
45	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GRSG)		55 min
48	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GRSG)		75% (6 h)**
43	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)		45 min
46	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GARSG)		45 min
49	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GARSG)		62% (6 h)**
44	Api 301 (sPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)		55 min
47	Api 301 (tPEG ⁷⁵⁰ -GAARSG)		50 min
50	Api 301 (tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAARSG)		78% (5 h)**
51	GAR-Onc 72*		85% (4 h)**
52	GAR-Onc 110*		75% (4 h)**
55	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 72		6 h
56	sPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110		73% (6 h)**
57	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 72		55% (6 h)**
58	tPEG ⁷⁵⁰ -GAR-Onc 110		64% (6 h)**
59	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-Onc 72		86% (6 h)**
60	tPEG ⁵⁰⁰⁰ -GAR-Onc 110		96% (6 h)**

mit * sind Vergleichsbeispiele markiert, mit + sind Spaltungsprodukte markiert.

**Rest ungespaltenes Peptid nach angegebener Zeit (statt Halbwertszeit)

Die Halbwertszeiten (bzw. Rest ungespaltenes Peptid nach angegebener Zeit) beziehen sich bei den freien Peptiden (Api 137, Api300 (SG) und Api 301 (SG)) auf die Spaltstelle im Peptide (nach Arg-16). Bei den restlichen Derivaten beziehen sich die Werte auf die Spaltung im Linker in der Seitenkette unter Freisetzung von Api 137 (SG), Api300 (SG) und Api 301 (SG) bzw. von Onc 72 und Onc 110.

In der Erfindungsbeschreibung werden folgende Abkürzungen verwendet:

Agp	2-Amino-3-guanidinopropionsäure
BOC	<i>tert.</i> -Butyloxy-carbonyl
^t Bu	<i>tert.</i> -Butylether
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eq.</i>	<i>equivalents per mol</i> , Moläquivalente
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Guan	Guanidino-Gruppe (am N-Terminus)
Hyp	<i>trans</i> -4-Hydroxyprolin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
LC-MS	Flüssigchromatographie (engl. <i>Liquid Chromatography</i>) mit Massenspektrometrie-Kopplung
MALDI-TOF	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>) mit Flugzeitanalyse (engl. <i>time of flight</i>)
MHK	minimalen Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
Mtt	4-Methyltrityl
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholine
O	Ornithin
O ^t Bu	<i>tert.</i> -Butylester
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phospho-buffered Saline</i>)
PEG	Polyethylenglykol
sPEG	über Säuregruppe verknüpftes PEG
tPEG	über Thiolgruppe verknüpftes PEG
Pra	N α -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-progargylglycine
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>)
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure

TFA	Trifluoressigsäure
Tle	L-tertiär-Leucine (L-tertiär -Butylglycine)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> , tryptisches Soja Medium

Patentansprüche

1. Modifiziertes Peptid, welches einer der folgenden Sequenz enthält:

NT-X₁X₂NX₃PVYIPX₄X₅RPPHP-CT (Formel 1)

NT-X₁NX₂X₃PVYIPX₄X₅RPPHP-CT (Formel 2)

NT-X₂NNX₃PVYIPX₄X₅RPPHP-CT (Formel 3)

wobei **X₁** ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt O,

wobei **X₂** ein Aminosäurerest mit einer Aminogruppe in der Seitenkette ist,

wobei **X₃** ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt R,

wobei **X₄** ein Aminosäurerest ist, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, bevorzugt R,

wobei **X₅** Prolin oder ein Prolinderivat ist,

wobei CT der C-Terminus ist oder ein Peptid mit 1 bis 4 Aminosäureresten, bevorzugt ist ein Dipetid mit der Sequenz RL

wobei NT der N-Terminus ist, der bevorzugt guanidiert ist,

dadurch gekennzeichnet, dass an die Aminogruppe in der Seitenkette von **X₁** oder **X₂** über einen Peptidlinker eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist und der Peptidlinker 3 bis 10 Aminosäurereste lang ist und mindestens ein Arginin oder Lysin enthält,

2. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass **X₁** und/oder **X₂** ein L-Ornithinrest ist.

3. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die anderen Aminosäurereste im Peptidlinker ausgewählt sind aus Glycin, Alanin und Serin..

4. Modifiziertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, welches eine der folgenden Sequenzen enthält:

ONORPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 9),

OONRPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 10) oder

ONNRPVYIPRPRPPHPRL (SEQ ID No. 11) mit O = L-Ornithin,

wobei die alpha-Aminogruppe des ersten Ornithins guanidiert ist und an die delta-Aminogruppe des ersten oder zweiten Ornithins über einen Peptidlinker, bevorzugt ausgewählt aus GRSG, GARSG, GAARSG, GAAARSG und GAAAARSG eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist.

5. Modifiziertes Peptid, welches eine der folgenden Sequenzen enthält:

NT-X₁-D₂-K₃-P₄-P₅-Y₆-L₇-P₈-R₉-P₁₀-X₂-P₁₂-P₁₃-R₁₄-X₃-I₁₆-Y₁₇-N₁₈-X₄-CT

NT-X₁-D₂-K₃-P₄-P₅-Y₆-L₇-P₈-R₉-P₁₀-X₂-P₁₂-P₁₃-R₁₄-X₃-I₁₆-Y₁₇-N₁₈-N₁₉-X₄-CT

NT-X₁-D₂-K₃-P₄-P₅-Y₆-L₇-P₈-R₉-P₁₀-X₂-P₁₂-P₁₃-R₁₄-X₃-I₁₆-P₁₇-N₁₈-X₄-CT

X₁ ist ein Rest mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette oder ein Aminosäurerest, dessen Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette;

D₂ ist ein Asparaginsäure- oder Glutaminsäurerest,

K₃ ist ein Rest mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette, bevorzugt Lysin oder Arginin,

X₂ und X₄ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Resten mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette;

X₃ ist ein Rest mit einer positiven Nettoladung oder einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette oder Prolin oder ein Prolinderivat;

L₇ und I₁₆ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Resten mit einer unpolaren, hydrophoben Seitenkette, bevorzugt Leucin, Isoleucin und Valin,

Y₆ und Y₁₇ sind jeweils Tyrosin, R₉ und R₁₄ sind jeweils Arginin, N₁₈ und N₁₉ sind jeweils Asparagin oder Glutamin, P₄, P₅, P₈, P₁₀, P₁₂, P₁₃ und P₁₇ sind unabhängig von einander ausgewählt aus Prolin und Prolinderivaten oder Hydroxyprolin und Hydroxyprolinderivaten,

wobei gegebenenfalls P₁₃ und R₁₄ vertauscht sind, und/oder

gegebenenfalls ein oder zwei der Reste ausgewählt aus D₂, P₄, P₅, P₈, P₁₀, P₁₂, P₁₃, P₁₇ und Y₁₇ durch einen beliebigen Rest ersetzt sind,

NT ist der freie oder modifizierte N-Terminus der Aminosäure X₁,

CT ist die freie oder modifizierte C-Terminus der Aminosäure X₄,

dadurch gekennzeichnet, dass an NT über einen Peptidlinker eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist und wobei der Peptidlinker 3 bis 8 Aminosäurereste lang ist und mindestens ein Arginin oder Lysin am C-Terminus des Peptidlinkers, d.h. vor X₁ enthält.

6. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 5, welches eine der folgenden Sequenzen enthält:

VDKPPYLPRPRPPROINYNO-NH₂ (SEQ ID No. 12) oder

VDKPPYLPRPRPHypRHypTleYNO-NH₂ (SEQ ID No. 13) mit O = L-Ornithin,
Hyp = L-4-Hydroxyprolin,
Tle = L-t-Leucine
(L-t-Butylglycine),

wobei an die N-terminale Aminogruppe (alpha-Aminogruppe des ersten Aminoests V) über den Peptidlinker eine lineare oder verzweigte Polyethylenglykol-Polymerkette gebunden ist.

7. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die anderen Aminosäurereste im Peptidlinker ausgewählt sind aus Glycin, Alanin und Serin.

8. Modifiziertes Peptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Polyethylenglykol-Polymerkette ein Molekulargewicht von 500 bis 40000 Da aufweist

9. Verwendung eines modifizierten Peptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 in der Medizin, als Antibiotikum, in einem Desinfektions- oder Reinigungsmittel, als Konservierungsmittel oder in einem Verpackungsmaterial.

10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von mikrobiellen, bakteriellen oder Pilz-Infektionen oder Verunreinigungen mit Mikroben, Bakterien oder Pilzen.

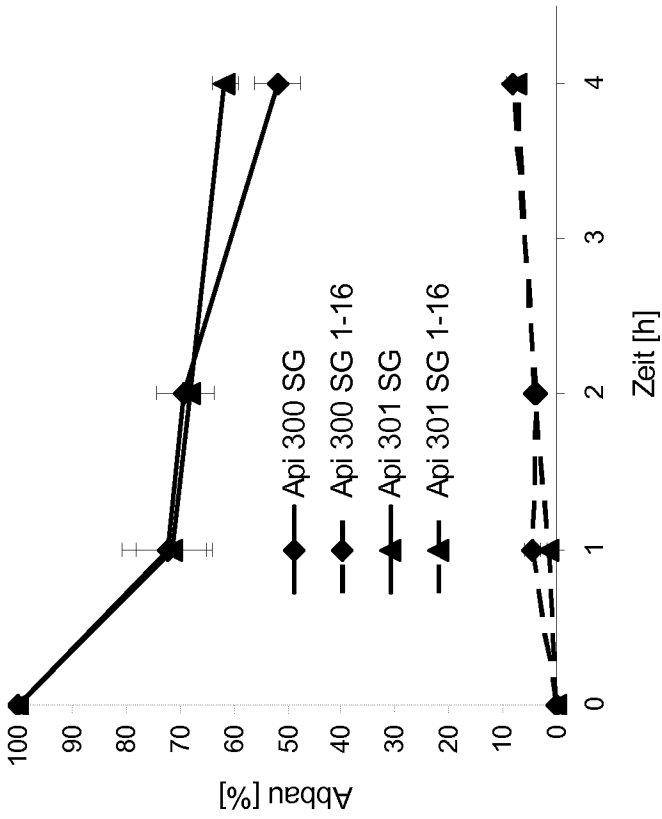
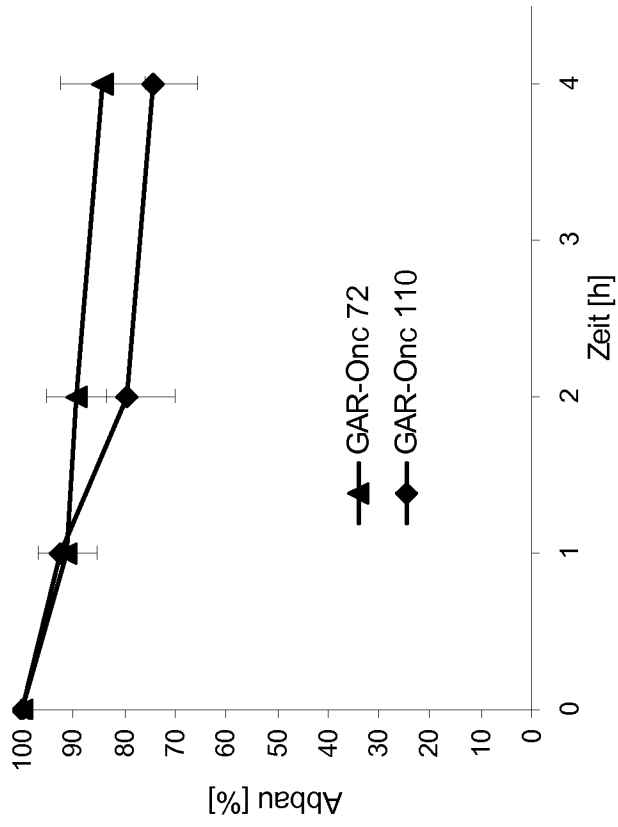


Fig. 1

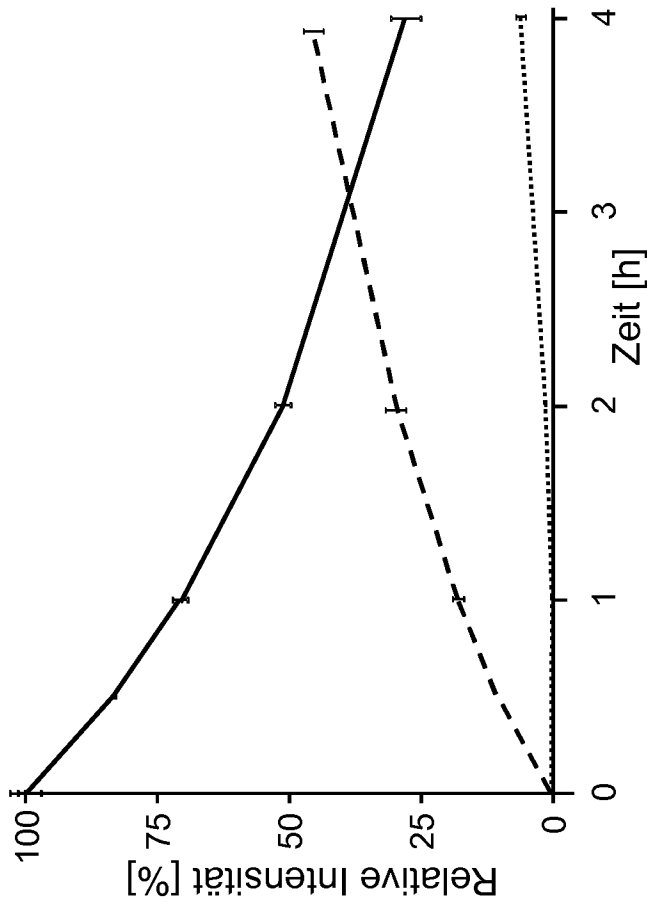
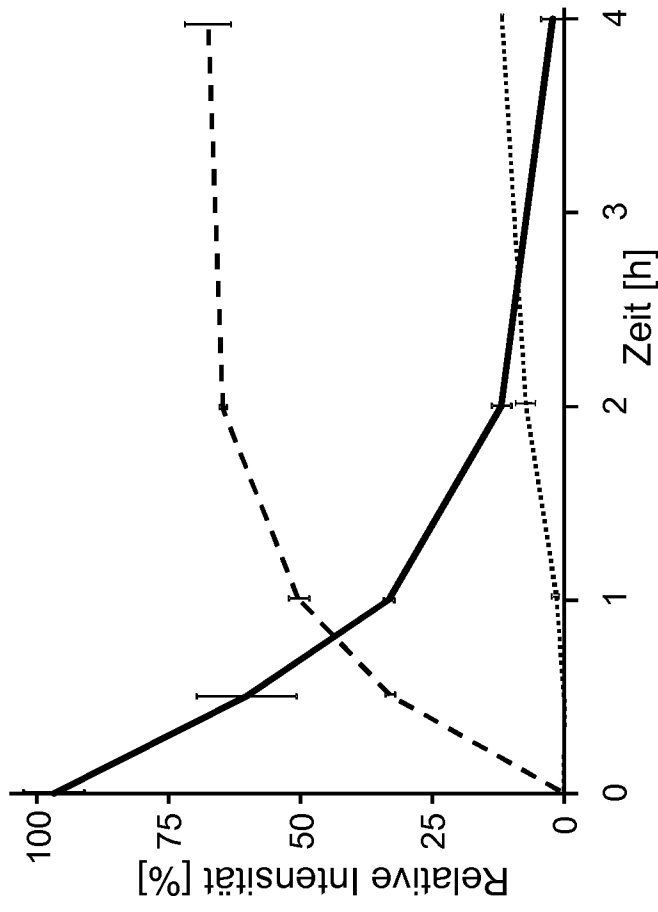


Fig. 2

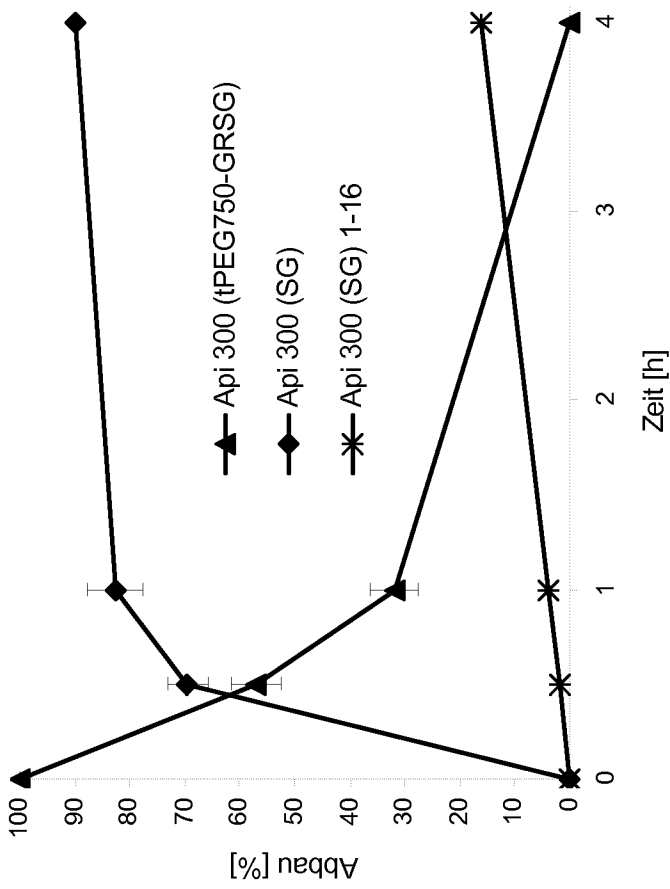
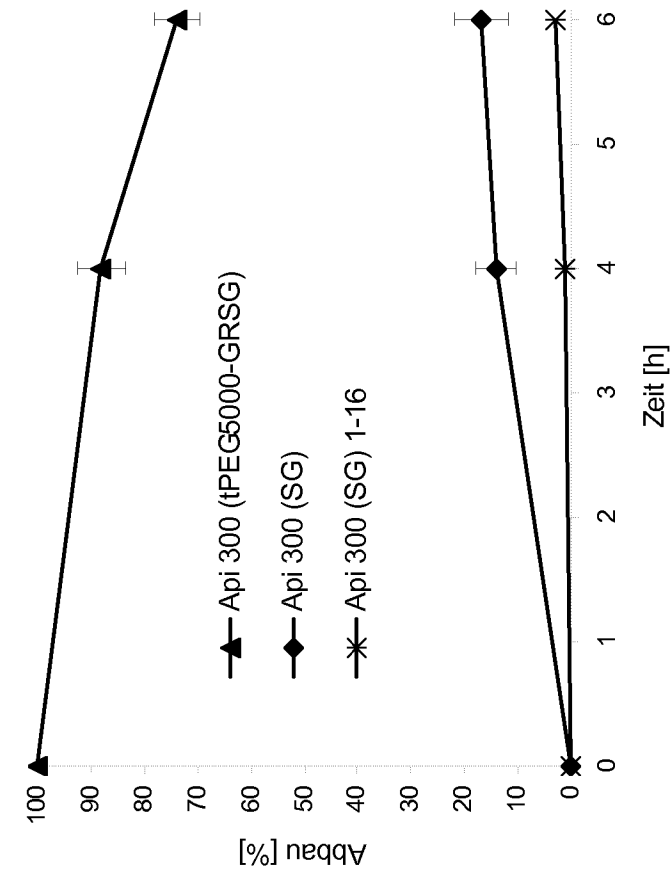


Fig. 3

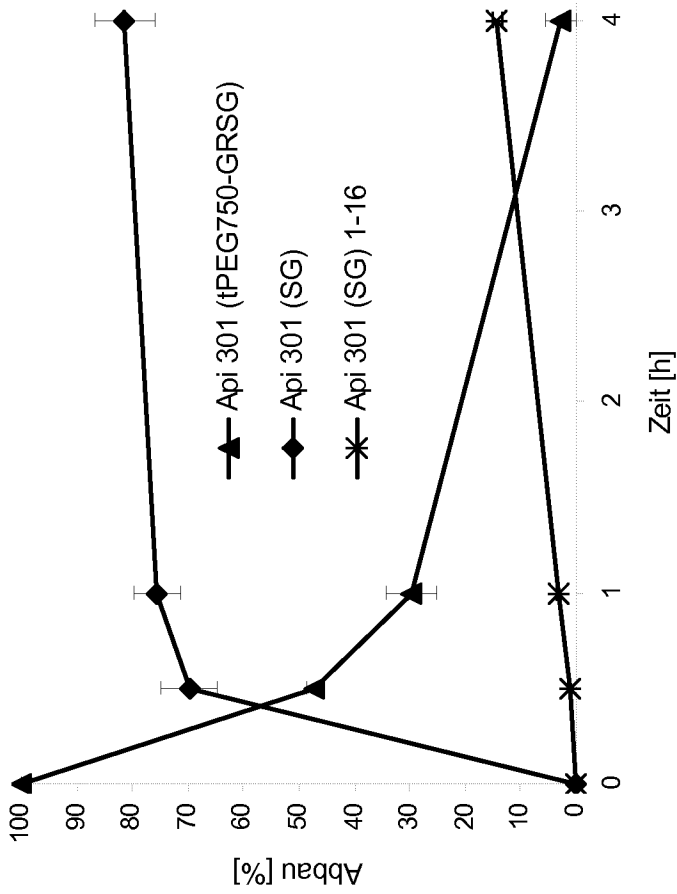
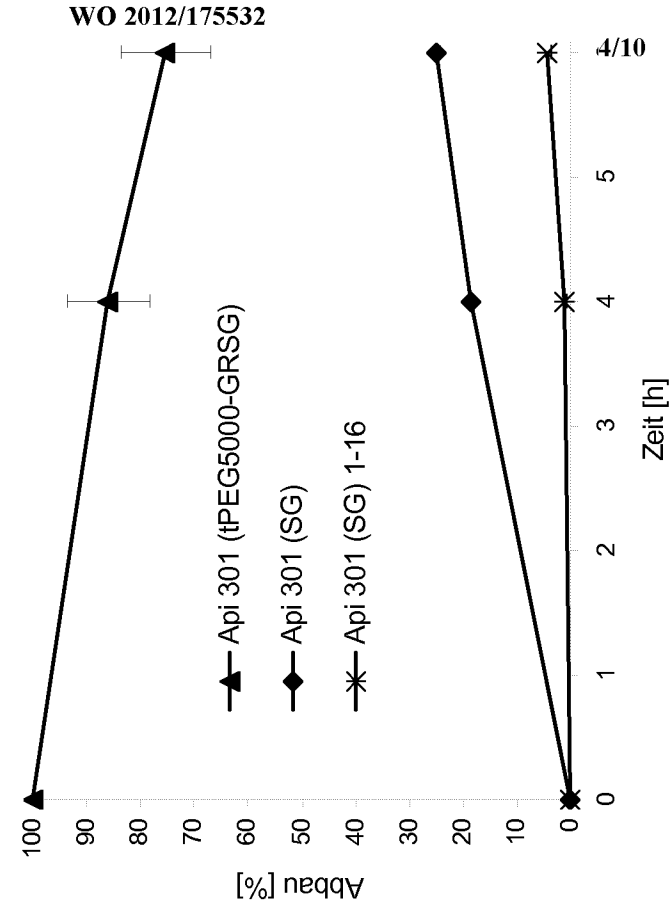


Fig. 4

5/10

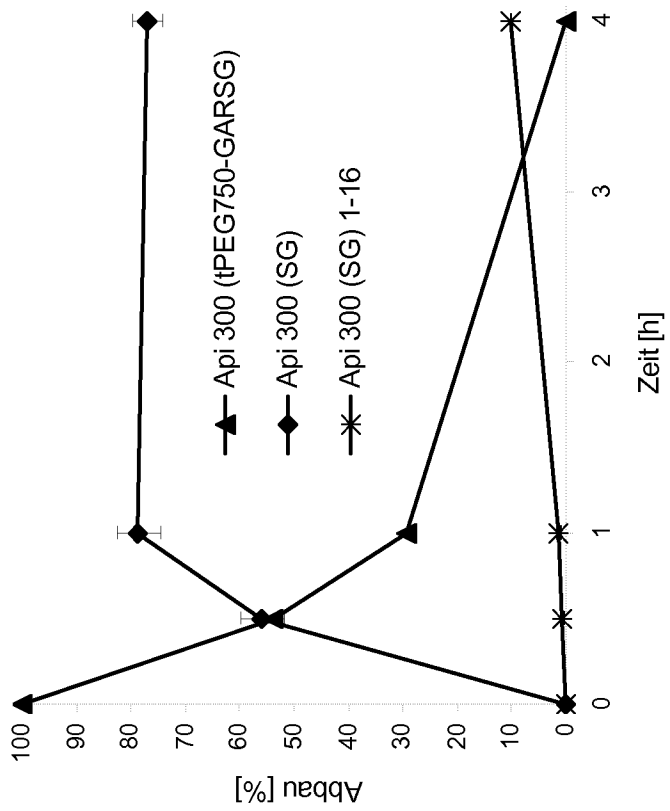
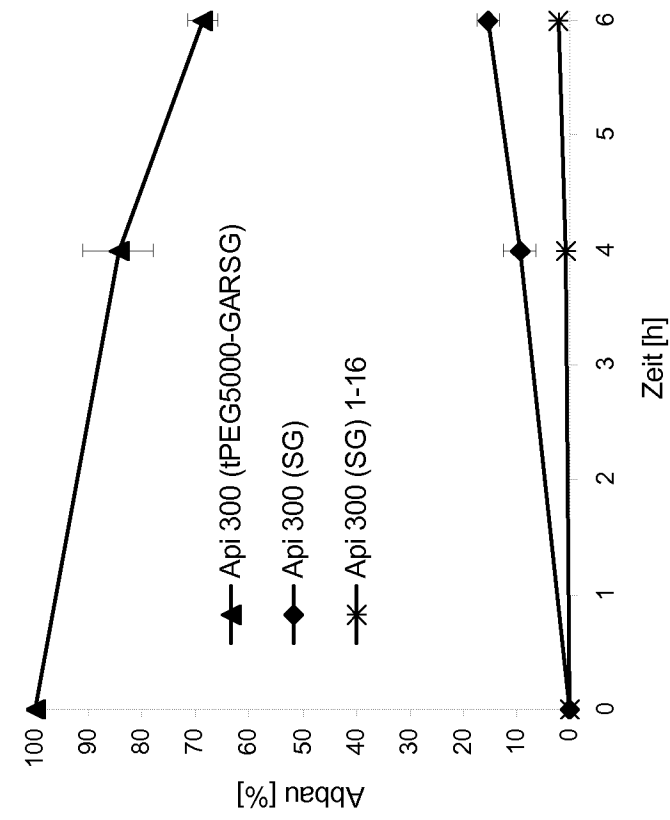


Fig. 5

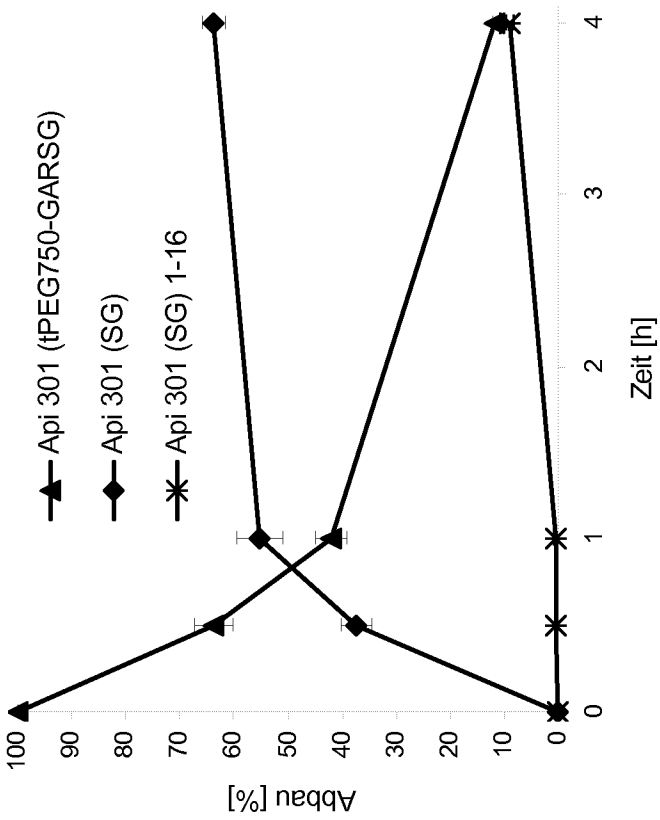
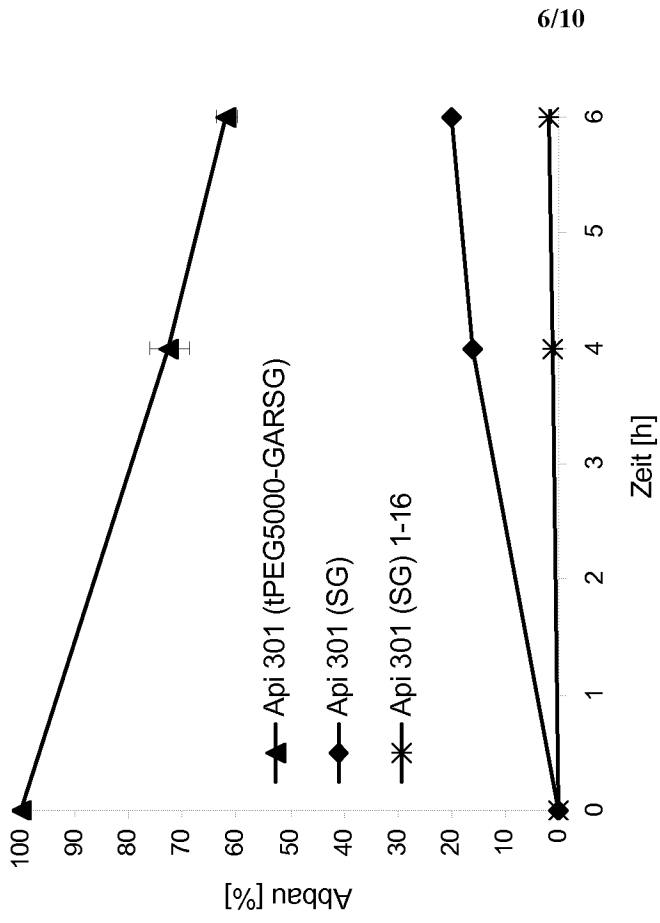


Fig. 6

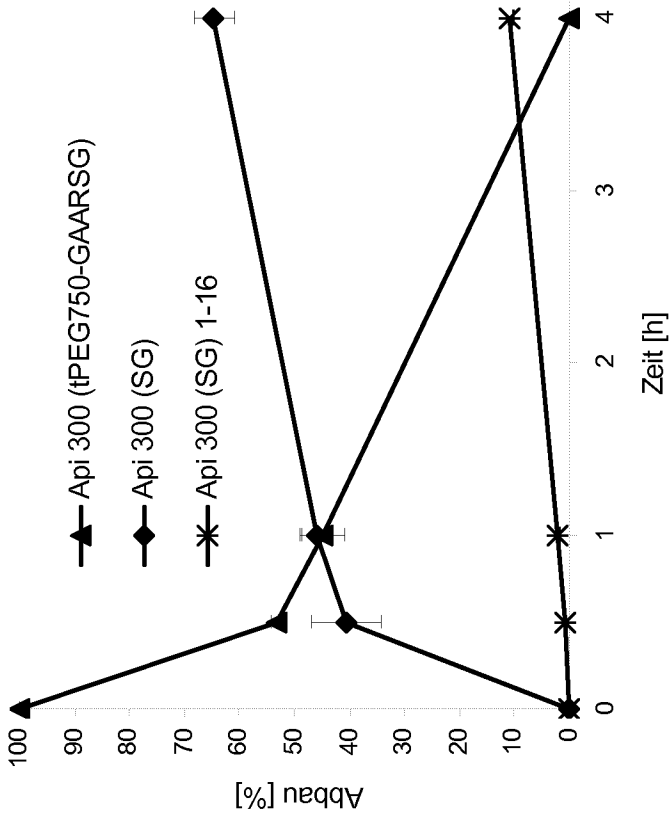
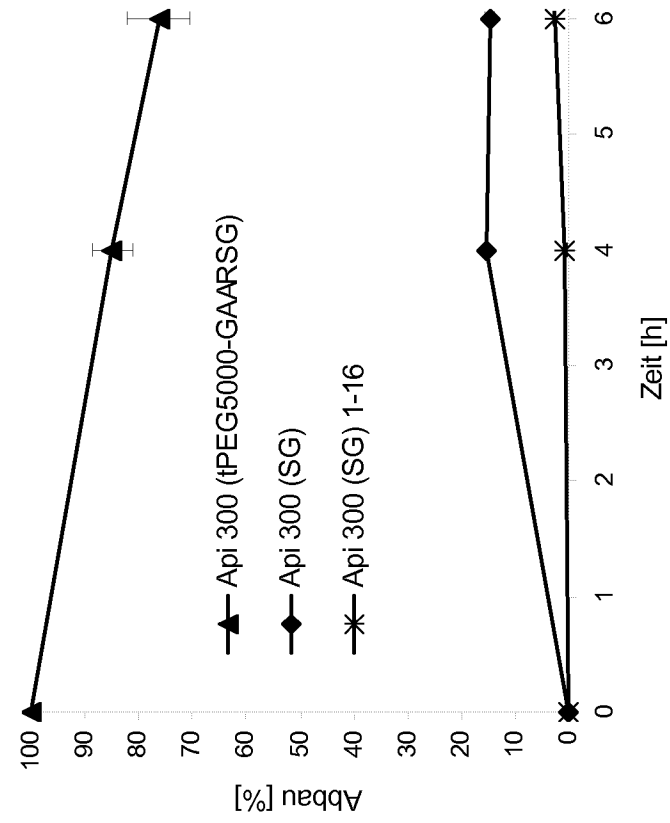


Fig. 7

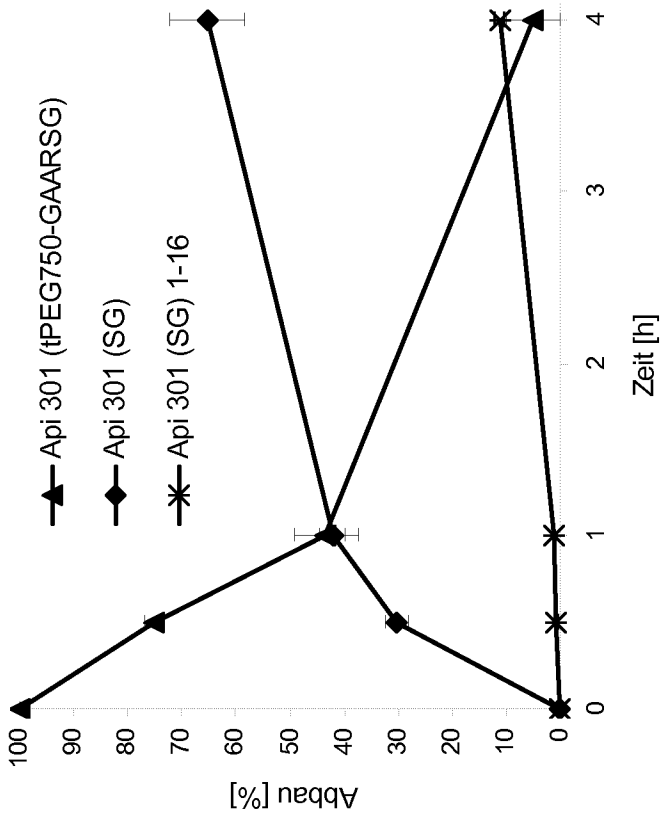
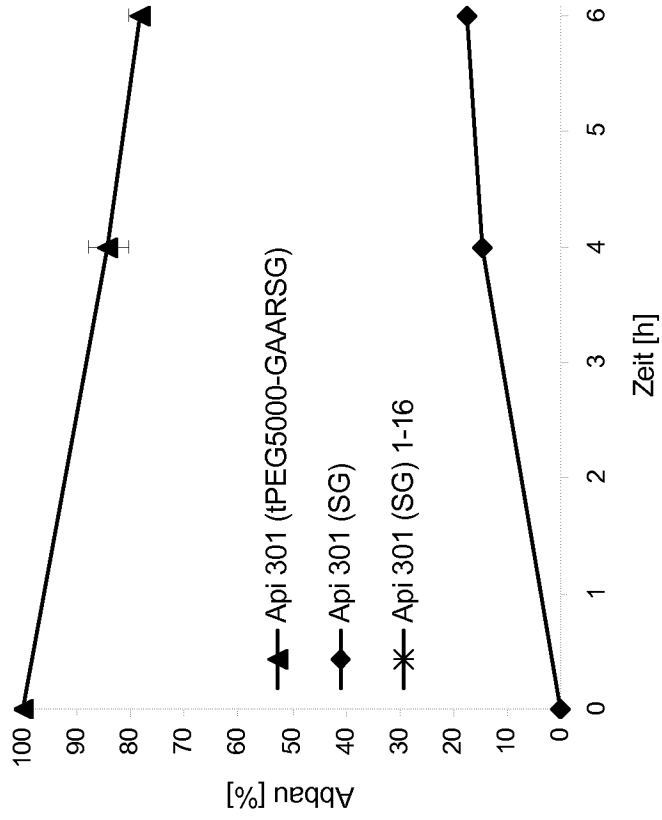


Fig. 8

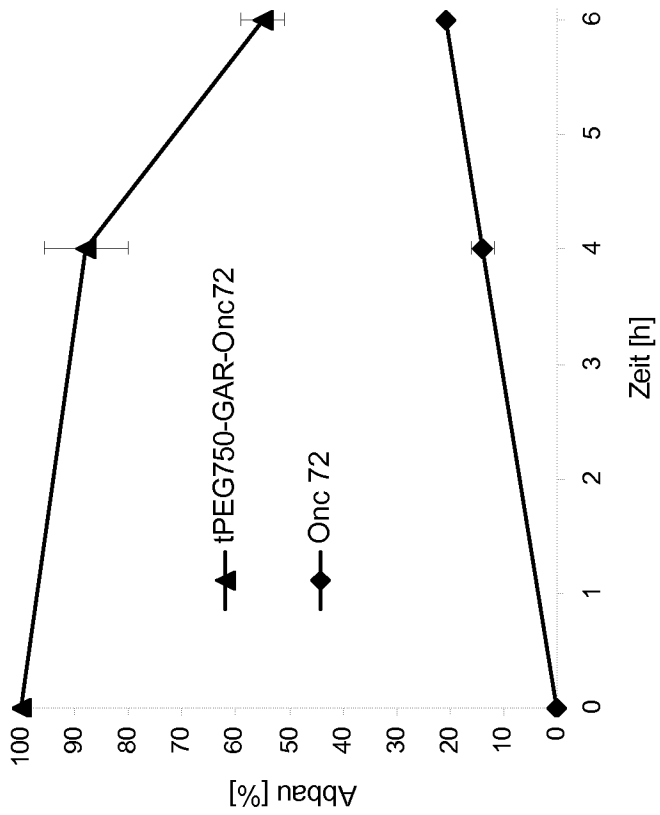
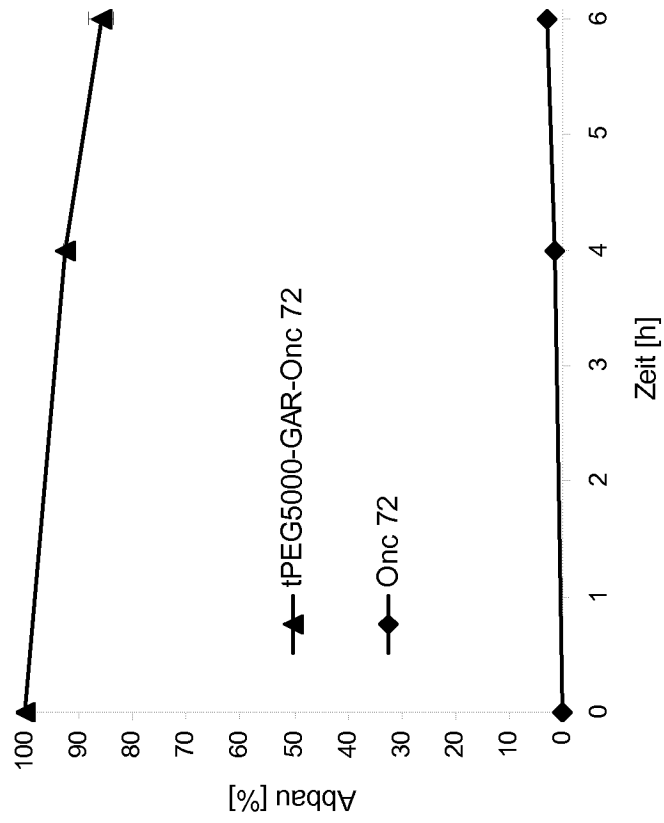


Fig. 9

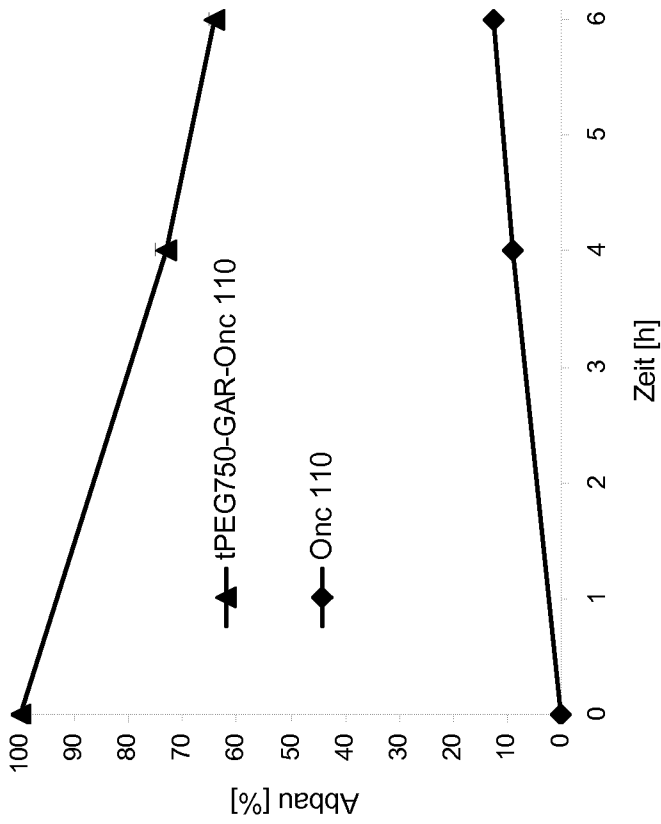
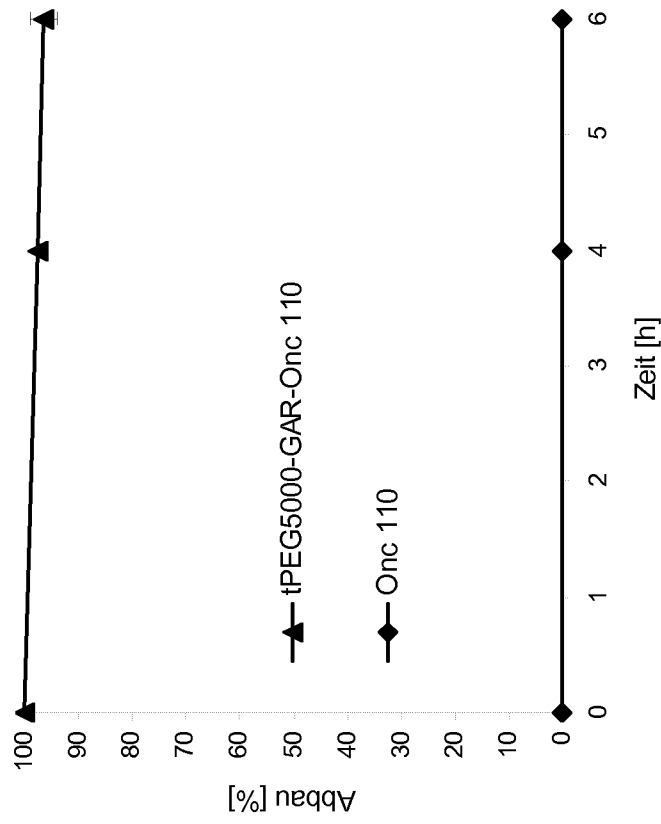


Fig. 10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K7/08 C12Q1/37 A01N37/46 A01N63/02 A61K38/10
 C07K14/435
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K C12Q A01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HONGJIAN LI ET AL: "A Protease-Based Strategy for the Controlled Release of Therapeutic Peptides", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), vol. 122, no. 29, 5 July 2010 (2010-07-05), pages 5050-5053, XP55011884, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201000287 cited in the application the whole document ----- -/--	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 5 September 2012	Date of mailing of the international search report 02/10/2012
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer R. von Eggelkraut-G.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061780

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANCESCO M VERONESE ET AL: "PEG-Doxorubicin Conjugates: Influence of Polymer Structure on Drug Release, in Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 16, no. 4, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 775-784, XP55036563, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc040241m the whole document	1-8
X	----- WO 2010/072752 A2 (GE HEALTHCARE AS [NO]; TOLLESHAUG HELGE [NO]) 1 July 2010 (2010-07-01) S. 10, Zeile 24 - S. 16, Zeile 19, S. 31, Bsp. 1	1-8
X	----- BENEDICT LAW ET AL: "Proteolysis: A Biological Process Adapted in Drug Delivery, Therapy, and Imaging", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 20, no. 9, 16 September 2009 (2009-09-16), pages 1683-1695, XP55036460, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc800500a cited in the application the whole document	1-8
A	----- FILPULA ET AL: "Releasable PEGylation of proteins with customized linkers", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 60, no. 1, 30 November 2007 (2007-11-30), pages 29-49, XP022370570, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2007.02.001 the whole document	1-10
Y	----- WO 2009/013262 A1 (UNIV LEIPZIG [DE]; HOFFMANN RALF [DE]; CZIHAL PATRICIA [DE]) 29 January 2009 (2009-01-29) cited in the application S. 4, Zeile 1 - 24, letzte Zeile, Ansprüche 1-27	1-10
Y	----- DE 10 2009 007381 A1 (AMP THERAPEUTICS GMBH & CO KG [DE]) 5 August 2010 (2010-08-05) S. 4, Paragraph [0012] - S. 17, Paragraph [0125], Ansprüche 1-24	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010072752 A2	01-07-2010	CN 102325551 A	18-01-2012
		EP 2389201 A2	30-11-2011
		JP 2012513382 A	14-06-2012
		US 2011263975 A1	27-10-2011
		WO 2010072752 A2	01-07-2010

WO 2009013262 A1	29-01-2009	AU 2008280151 A1	29-01-2009
		CA 2694461 A1	29-01-2009
		CN 101801995 A	11-08-2010
		DE 102007036128 A1	12-02-2009
		EP 2170928 A1	07-04-2010
		JP 2010534066 A	04-11-2010
		RU 2010106192 A	27-08-2011
		US 2010222268 A1	02-09-2010
		WO 2009013262 A1	29-01-2009

DE 102009007381 A1	05-08-2010	AU 2010209695 A1	15-09-2011
		CA 2751010 A1	05-08-2010
		CN 102369210 A	07-03-2012
		DE 102009007381 A1	05-08-2010
		EP 2391636 A1	07-12-2011
		JP 2012516142 A	19-07-2012
		KR 20110120917 A	04-11-2011
		US 2012021975 A1	26-01-2012
WO 2010086401 A1	05-08-2010		

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a. (Form)
- in Papierform
- in elektronischer Form
- b. (Zeitpunkt)
- in der eingereichten internationalen Anmeldung
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
- bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C07K7/08 C12Q1/37 A01N37/46 A01N63/02 A61K38/10
 C07K14/435
 ADD.
 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE
 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C07K C12Q A01N A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HONGJIAN LI ET AL: "A Protease-Based Strategy for the Controlled Release of Therapeutic Peptides", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), Bd. 122, Nr. 29, 5. Juli 2010 (2010-07-05), Seiten 5050-5053, XP55011884, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201000287 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/--	1-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. September 2012	02/10/2012
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter R. von Eggelkraut-G.

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FRANCESCO M VERONESE ET AL: "PEG-Doxorubicin Conjugates: Influence of Polymer Structure on Drug Release, in Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 16, Nr. 4, 1. Juli 2005 (2005-07-01), Seiten 775-784, XP55036563, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc040241m das ganze Dokument	1-8
X	----- WO 2010/072752 A2 (GE HEALTHCARE AS [NO]; TOLLESHAUG HELGE [NO]) 1. Juli 2010 (2010-07-01) S. 10, Zeile 24 - S. 16, Zeile 19, S. 31, Bsp. 1	1-8
X	----- BENEDICT LAW ET AL: "Proteolysis: A Biological Process Adapted in Drug Delivery, Therapy, and Imaging", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 20, Nr. 9, 16. September 2009 (2009-09-16), Seiten 1683-1695, XP55036460, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc800500a in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8
A	----- FILPULA ET AL: "Releasable PEGylation of proteins with customized linkers", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, Bd. 60, Nr. 1, 30. November 2007 (2007-11-30), Seiten 29-49, XP022370570, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2007.02.001 das ganze Dokument	1-10
Y	----- WO 2009/013262 A1 (UNIV LEIPZIG [DE]; HOFFMANN RALF [DE]; CZIHAL PATRICIA [DE]) 29. Januar 2009 (2009-01-29) in der Anmeldung erwähnt S. 4, Zeile 1 - 24, letzte Zeile, Ansprüche 1-27	1-10
Y	----- DE 10 2009 007381 A1 (AMP THERAPEUTICS GMBH & CO KG [DE]) 5. August 2010 (2010-08-05) S. 4, Paragraph [0012] - S. 17, Paragraph [0125], Ansprüche 1-24	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/061780

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010072752 A2	01-07-2010	CN 102325551 A	18-01-2012
		EP 2389201 A2	30-11-2011
		JP 2012513382 A	14-06-2012
		US 2011263975 A1	27-10-2011
		WO 2010072752 A2	01-07-2010

WO 2009013262 A1	29-01-2009	AU 2008280151 A1	29-01-2009
		CA 2694461 A1	29-01-2009
		CN 101801995 A	11-08-2010
		DE 102007036128 A1	12-02-2009
		EP 2170928 A1	07-04-2010
		JP 2010534066 A	04-11-2010
		RU 2010106192 A	27-08-2011
		US 2010222268 A1	02-09-2010
		WO 2009013262 A1	29-01-2009

DE 102009007381 A1	05-08-2010	AU 2010209695 A1	15-09-2011
		CA 2751010 A1	05-08-2010
		CN 102369210 A	07-03-2012
		DE 102009007381 A1	05-08-2010
		EP 2391636 A1	07-12-2011
		JP 2012516142 A	19-07-2012
		KR 20110120917 A	04-11-2011
		US 2012021975 A1	26-01-2012
WO 2010086401 A1	05-08-2010		
