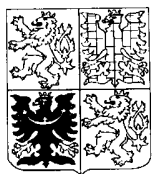


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 19.02.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 20.02.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/IL9700066

(33) Země priority: WO

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.04.2000
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: PCT/IL98/00081

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/37090

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2935

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/00
C 07 K 14/435
C 07 K 14/46
A 61 K 38/04
A 61 K 38/16
A 61 P 31/04
A 61 P 31/10
A 61 P 31/12
A 61 P 33/00
A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
CO. LTD., Rehovot, IL;

(72) Původce:
Shai Yechiel, Yahud, IL;
Oren Ziv, Rishon Le-Zion, IL;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

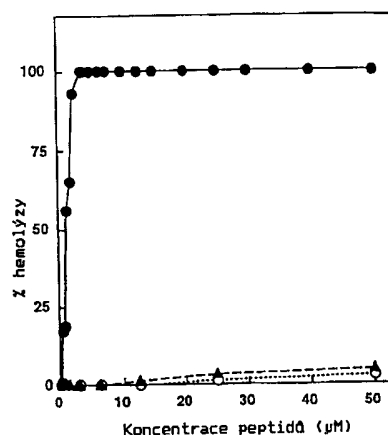
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nehemolytické cytolytické činidlo, peptid,
cyklický peptid, cyklický derivát nepřirodního
syntetického peptidu, Leu/Lys diastereomer,
komplex provázaných peptidů, směs,
nehemolytický cytolytický neuspořádaný
kopolymer a farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Nehemolytická cytolytická činidla volená z peptidů, komplexů provázaných peptidů, směsí peptidů nebo nahodilých kopolymerů peptidů mající selektivní cytolytické účinky na patogenní buňky, které se v těle nevyskytují přirozeně, zahrnující mikrobiální patogenní organismy a zhoubné buňky, přičemž tato činidla jsou nehemolytická, nemají žádné cytolytické účinky na červené krevní buňky. Peptidy mohou představovat cyklické deriváty přírodních peptidů, takových jako pardaxin a mellitin a jejich částí, ve kterých L-amino kyselinové zbytky jsou zaměněny odpovídajícími D-amino kyselinovými zbytky, nebo představují diastereomery lineárních peptidů tvořené různými poměry alespoň jedné pozitivně nabitě amino kyseliny a alespoň jedné hydrofobní amino kyseliny, ve kterých alespoň jeden z amino kyselinových zbytků je D-amino kyselina. Farmaceutické prostředky obsahující nehemocytolytická činidla mohou být použity pro ošetření různých chorob způsobených patogeny, jako bakteriální, plísňové, virové infekce, mykoplasma a

infekce způsobené prvoky a pro ošetření rakoviny.



NEHEMOLYTICKÉ CYTOLYTICKÉ ČINIDLO, PEPTID, CYKlickÝ PEPTID, CYKlickÝ DERIVÁT NEPŘÍRODNÍHO SYNTETICKÉHO PEPTIDU, LEU/LYS DIASTEREOMER, KOMPLEX PROVÁZANÝCH PEPTIDŮ, SMĚS, NEHEMOLYTICKÝ CYTOLYTICKÝ NEUSPOŘÁDANÝ KOPOLYMER A FARMACEUTICKÝ PROSTŘEDEK.

Oblast vynálezu

Předložený vynález zahrnuje nová nehemolytická cytolytická činidla, prostředky obsahující tyto peptidy a jejich použití při ~~ošetřování rostlinných nákaz a nemocí~~. *léčení nemocí, povrch a v nemědělích.*

Dosavadní stav techniky

Poznámky v následujícím textu jsou věnovány dokumentům popisujícím současný stav techniky, veškeré podrobnosti těchto dokumentů mohou být shledány v oddíle "Seznam literatury" uvedeném v textu. Zvyšující se odolnost mikroorganismů na dostupné antimikrobiální léky vedla k rozsáhlému výzkumu zaměřenému na vývoj alternativních antimikrobiálních sloučenin.

V dodatku nebo jako doplněk k velmi specifické imunitní reakci zprostředkované buňkami mají obratlovci a jiné organismy obranný systém tvořen rozdílnými skupinami širokého spektra cytolytických látek, např. antibakteriálními látkami, peptidy.

Studium vzájemných reakcí lipidů a peptidů, takových cytolytických peptidů také známých jako cytolysiny, vede ke zdůraznění amfipatické α -helikální struktury důležité pro jejich cytolytický účinek. Tento závěr je založen především na výzkumu cytolysinů, které působí buď na savčí buňky nebo na samostatné bakterie, nebo na oba typy uvedených buněk. Hlavní skupinou cytolytických peptidů uvedené skupiny jsou krátké lineární peptidy s obranným účinkem proti hostitelům (≤ 40 amino kyseliny), které jsou zbavené disulfidových můstků (Boman, 1995). Tyto peptidy se podstatně

mění v délce jejich řetězce, hydrofobnosti a celkové distribuci nábojů, ale při spojení s tukovou dvojnou vrstvou mají obvyklou strukturu, jmenovitě amfipatickou α -helixovou strukturu (Segrest a spol., 1990).

Vzorky známých cytolysinů zahrnují: (i) antibakteriální peptidy, které jsou cytolytické pouze k bakteriím, např. cekropiny izolované z "cekropia" molů (Steiner a spol., 1981), magaininy (Zaslöff, 1987) a dermaseptiny (Mor a spol., 1991) izolované z kůže žab; (ii) cytolysiny, které jsou selektivně cytotoxické k savčím buňkám, takové jako δ -hemolysin izolovaný z *Staphylococcus aureus* (Dhopale a Nagaraj, 1993); a (iii) cytolysiny, které nejsou selektivní k buňkám, takové jako včelí živočišný jed - mellitin (Habermann a Jentsch, 1967) a neurotoxin pardaxin (Shai a spol., 1988), který lýzuje jak savčí buňky tak i bakterie.

Antibakteriální peptidy byly původně objeveny u bezobratlých a teprve následně u obratlovců a u lidí. Tento druhotný chemický imunní systém, jako pomocný nebo doplňkový obranný systém, zabezpečuje organismus souborem instrukcí malých peptidů, které jsou syntetizovány ihned po indukci, a které působí proti vniknutí nahodilých a obligátních patogenů stejně jako proti nekontrolovanému bujení komenzálních mikroorganismů (Boman, 1995). Doposud bylo izolováno a charakterizováno více jak 100 různých antibakteriálních peptidů. Největší skupina a pravděpodobně nejvíce studovaná zahrnuje peptidy, které mají pozitivní náboj a přivlastňují si amfipatickou α -helikální strukturu. Řada studií spojených s různými přírodními antibakteriálními peptidy vede ke zdůraznění amfipatické α -helikální struktury a čistého pozitivního náboje důležitého pro jejich cytolytické účinky. Pozitivní náboj podporuje vzájemné působení peptidů s negativně nabitými membránami (Andreu a spol., 1985) objevenými v patogenních buněčných membránách ve vyšších koncentracích v porovnání s normálními eukaryontními buňkami, amfipatická α -helikální

struktura je základní pro lytický účinek peptidů (Chen a spol., 1988). Takové vzájemné působení bylo navrženo s cílem potlačit energii metabolismu cílového organismu zvýšením propustnosti membrán přenášejících energii (Okada a Natori, 1984). Vzhledem k amfipatické struktuře peptidů bylo navrženo, aby tyto anti-bakteriální peptidy pronikaly membránou způsobem vytváření iontových kanálků/pórů prostřednictvím mechanismu "sudových družin" (Rizzo a spol., 1987). V souladu s tím, modelové trans-membránové amfipatické α -helixy tvoří uzlíky, ve kterých zevně usměrněné hydrofobní povrchové vrstvy vzájemně působí se složkami lipidů membrány, zatímco vnitřní čelní povrchové vrstvy vytvářejí póry. Alternativně, peptidy váží paralelu na povrch membrány, pokrývají povrch membrány "kobercovitým" způsobem a rozpouštějí tento povrch jako smáčedlo (Shai, 1995). Přes rozsáhlá studia není přesná funkce účinků krátkých lineárních buněčně neselektivních peptidů, takových jako pardaxin a mellitin, doposud známá a není jasné, zda podobné strukturální tvary jsou požadovány pro jejich cytotoxicitu k savčím buňkám a bakteriím.

Pardaxin, 33-mer peptid, je excitační neurotoxin, který byl získán z mláďat platýzů Červeného moře *Pardachirus marmoratus* (Shai a spol., 1988) a z pavích platýzů západního Pacifiku *Pardachirus pavoninus* (Thompson a spol., 1986). Pardaxin projevuje různé biologické účinky v závislosti na jeho koncentraci (popsáno v Shai, 1994). Pardaxin při koncentraci nižší než 10^{-7} M vyvolává uvolnění nervových mediátorů způsobem závislým na vápníku. Při koncentracích od 10^{-7} M do 10^{-5} M je tento způsob nezávislý na vápníku a při koncentracích vyšších než 10^{-5} M pardaxin vyvolává cytolýzu. Pardaxin také ovlivňuje účinky různých fyziologických příprav *in vitro*. Biologické funkce pardaxinu byly přisouzeny jeho vlivu na iontový přenos osmoregulačního systému v epitelu a presynaptickým účinkům díky vytváření iontových kanálků, které jsou napěťově závislé a nepatrně selektivní

na kationty. Mechanismus "sudových družin", kterým je pardaxin zaváděn do membrán, byl navržen na základě struktury pardaxinu a na základě různých biofyzikálních studií (přehled v Shai, 1994). Pardaxin má strukturu helix-"kloub"-helix: N-helix zahrnuje zbytky 1-11 a C-helix zahrnuje zbytky 14-26. Helixy jsou odděleny prolinovým zbytkem umístěným na pozici 13. Tento strukturální typ je shledán jak v antibakteriálních peptidech, které mohou působit specificky na bakterie (např. cekropin), tak i v cytotoxických peptidech, které mohou lýzovat různé buňky (např. mellitin).

Mellitin, 26-mer amfipatický peptid, je hlavní složkou živočišného jedu medonosných včel *Apis mellifera* (Habermann a Jentsch, 1967) a je jedním z nejvíce studovaných peptidů působících na membrány (Dempsey, 1990). Mellitin je vysoce cytotoxický k savčím buňkám, ale je také vysoce účinným antibakteriálním činidlem (Steiner a spol., 1981). Byla provedena řada studií s cílem určit vlastnosti vzájemného působení mellitinu a membrán pro porozumění molekulárního mechanismu hemolýzy vyvolané mellitinem a modelové studie pro porozumění všeobecných vlastností struktur proteinů membrán a vzájemného působení takových proteinů s fosfolipidy membrán. Ve většině popsanych dokumentech je vymezena skutečnost, že rozdílné molekulární mechanismy mohou podmiňovat různé působení mellitinu. Nicméně, amfipatická α -helikální struktura byla ukázána jako nezbytný předpoklad různých účinků mellitinu (Perez a spol., 1994).

Struktura mellitinu byla zkoumána řadou technik. Výsledky rentgenové krystalografie a jaderné magnetické rezonance jsou důkazem toho, že molekula se sestává ze dvou α -helikálních částí (zbytků 1-10 a 13-26), které se protínají v úhlu 120° . Tyto části jsou spojeny "kloubem" (11-12) a tvoří lomené α -helikální spojení hydrofilní a hydrofobní strany, které jsou obráceny v opačných směrech. Čtyři takové monomerické molekuly mellitinu se díky vnitřnímu hydrofobnímu působení seskupují dohromady, vzniká

tetramer (Anderson a spol., 1980; Bazzo a spol., 1988; Terwilliger a Eisenberg, 1982; Terwilliger a Eisenberg, 1982). Na základě původního vnitřního působení na vnější vrstvy membrán bylo shledáno, že tetramer se rozštěpuje do monomerů, které dříve, než vnikají do membrán, si zachovávají α -helikální strukturu (Altenbach a Hubbell, 1988).

Mellitin a pardaxin mají některé podobnosti. Jak pardaxin, tak i mellitin jsou tvořeny dvěma helixy s prolinovým kloubem umístěným mezi nimi. Dále, mellitin i pardaxin ukazují významné souhlasné skupiny v jejich N-helixech, které jsou většinou hydrofobní (Thompson a spol., 1986). Avšak, pardaxin (čistý náboj +1) obsahuje v jeho C-koncové jednotce dodatečných sedm amino kyselinových zbytků s nábojem -2, zatímco mellitin (čistý náboj +6) končí amidovou skupinou a obsahuje pozitivně nabitou tetrapeptidovou posloupnost Lys-Arg-Lys-Arg. Mezi pardaxinem a mellitinem existuje několik funkčních rozdílů. Pardaxin se váže podobně jak k zwitteriontovým tak i k negativně nabitým fosfolipidům (Rapaport a Shai, 1994), zatímco mellitin se váže lépe k negativně nabitým než k zwitteriontovým fosfolipidům (Batenburg a spol., 1987; Batenburg a spol., 1987). Pardaxin se váže k fosfolipidům s pozitivní kooperativou (Rapaport a Shai, 1991), zatímco mellitin se váže s negativní kooperativou (Batenburg a spol., 1987; Batenburg a spol., 1987). I přesto, jak pardaxin, tak i mellitin jsou antibakteriálními peptidy s účinky proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, pardaxin je 40–100 krát méně hemolytický k lidským erytrocytům než mellitin (Oren a Shai, 1996).

Analogy pardaxinu s L- a D- substitucemi se projevily jako schopné lýzovat lidské erytrocyty (Pouny a Shai, 1992). Později bylo ukázáno (seznamte se s výsledky, které jsou uvedeny dále v textu), že dva z peptidů, které jsou popsány v Pouny a Shai, 1992, jmenovitě D-Pro⁷-pardaxin a D-Leu¹⁸Leu¹⁹-pardaxin, i přestože jsou hemolytické, mají velmi nízké antibakteriální

účinky. Analogy magaininu s L- a D- substitucemi se také projeví-
ly jako postrádající antibakteriální účinky (Chen a spol., 1988).
V následujícím textu bude vysvětleno několik pojmů vytvořených
pro účely rychlého čtení a snadnějšího porozumění vynálezu. Mělo
by však být uvedeno, že pro celkové porozumění těchto pojmů
a ucelenost popisu budou tyto uvedeny také v následujícím textu.
Pojmy a jejich významy v tomto textu jsou následující:

Pojem "nestejnorodý peptid" použitý v textu označuje peptid obsa-
hující D- a L- amino kyselinové zbytky.

Pojem "stejnorodý peptid" použitý v textu označuje peptid obsahu-
jící pouze přírodní L-amino kyselinové zbytky nebo pouze D-amino
kyselinové zbytky.

Pojmy "stejnorodý L-peptid" a "stejnorodý D-peptid" použité
v textu označují stejnorodý polypeptid zcela obsahující pouze buď
L-amino nebo D-amino kyselinové zbytky, jednotlivě.

Pojmy "stejnorodý L-základní peptid" a "stejnorodý D-základní
peptid" použité v textu označují stejnorodý peptid obsahující
hlavně L-amino kyselinové zbytky, např. peptidy odvozené ze
stejnorodých L-peptidů, ve kterých jeden nebo více L-amino kyse-
linových zbytků bylo zaměněno doplňujícím D-optickým izomerem
a stejnorodý peptid obsahující hlavně D-amino kyselinové zbytky,
ve kterém jeden nebo více D-amino kyselinových zbytků bylo zamě-
něno doplňujícím L-optickým izomerem, jednotlivě.

Pojem "helikální peptid" použitý v textu označuje peptid mající
spojitý α -helixový úsek přes většinou část své délky. Helikální
podíl helikálního peptidu obsahuje zcela buď L-amino kyselinové
zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky.

Pojem "nehelikální peptid" použitý v textu označuje peptid, který
nemá žádnou α -helixovou strukturu nebo má nespojitě α -helixové
struktury rozptýlené po své délce. Nehelikální peptid v souladu
s vynálezem může mít α -helixový úsek, který v případě, jestliže
je konečný, má délku úseku menší než je polovina šířky buňky
membrány, např. menší než přibližně 10 až 15 amino kyselinových

zbytků, a jestliže α -helixová část není konečná, má délku menší než je plná šířka buňky membrány, např. menší než přibližně 20 až 25 amino kyselinových zbytků. Nehelikální peptid může být stejnorodým peptidem s α -helixovou přerušovací částí (podívejte se dále) nebo může být nestejnorodým peptidem.

Pojem " α -helixová přerušovací část" použitý v textu označuje část, která jestliže je inkorporována do α -helixové struktury přerušuje její spojitost. Takovou částí může být např. amino kyselinový zbytek prolinu nebo glycinu, α -methyl substituovaný α -amino kyselinami, ne- α -amino kyselinami jak cyklickými, tak i necyklickými, takovými jako kyselina 6-amino-kapronová, kyselina 3-amino-1-cyklokapronová, kyselina 4-amino-1-cyklokapronová, nebo L- nebo D- optický izomer inkorporovaný do α -helixového úseku tvořený úsekem amino kyselinových zbytků opačného optického izomeru.

Pojem "patogenní buňky" použitý v textu označuje buňky, které vznikají v těle nepřirozeně, tyto buňky zahrnují buňky rakoviny a patogenní organismy, takové jako bakterie, houby, prvoci, viry a mykoplasma, stejně jako savčí buňky napadené patogenními organismy, takovými jako parazitičtí prvoci, např. Leishmania a Plasmodium.

Pojem "selektivní cytolytické účinky" použitý v textu označuje účinky činidla během vyvolané cytolyzy patogenní buňky, selektivita se projevuje tak, že činidlo je schopno vyvolat cytolyzu patogenních buněk v mnohem nižší koncentraci než je koncentrace požadována pro cytolyzu normálních nepatogenních buněk, takových jako červené krevní buňky.

Pojem "nehemolytická" použitý v textu označuje činidla, které vyvolávají hemolýzu červených krevních buněk v mnohem vyšší koncentraci než je koncentrace požadovaná pro vyvolání cytolyzy jiných buněk, takových jako patogenní buňky, např. buňky mikroorganismů, rakovinné buňky a podobné.

Pojem "diastereomery" použitý v textu označuje synonymum

"nejstejnorodého peptidu".

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje nehemolytické cytolytické činidlo volené z peptidu, komplexu svázaných peptidů, směsi peptidů nebo nahodilého kopolymeru peptidů, uvedené činidlo mající selektivní cytolytické účinky projevující se v tom, že činidlo má cytolytické účinky na patogenní buňky představující buňky, které se v těle nevyskytují přirozeně zahrnující mikrobiální patogenní organismy a zhoubné buňky; a činidlo je nehemolytické, totiž nemá žádné cytolytické účinky na červené krevní buňky nebo má cytolytické účinky na červené krevní buňky v koncentracích, které jsou podstatně vyšší než koncentrace při které projevují uvedené cytolytické účinky; uvedené nehemolytické cytolytické činidlo je voleno ze skupiny zahrnující:

- (1) cyklický derivát peptidu mající čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahující jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, nebo obsahující buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahující α -helixovou přerušovací část;
- (2) peptid obsahující jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, mající čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a mající posloupnost amino kyselin takovou, že odpovídající posloupnost amino kyselin obsahující pouze L-amino kyselinové zbytky se v přírodě nevyskytuje, a jeho cyklické deriváty;
- (3) komplex obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů, každý peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahuje jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, nebo obsahuje buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahuje α -helixovou přerušovací část, nebo

jeho cyklické deriváty, uvedené peptidy jsou společně prováděné použitím spojovací molekuly kovalentně vázané ke každému z peptidů;

- (4) směs obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů, každý peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahuje jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky nebo obsahuje buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahuje α -helixovou přerušovací část, nebo její cyklické deriváty; a
- (5) neuspořádaný kopolymer obsahující různé poměry hydrofobní, pozitivně nabitě a D-amino kyseliny.

Podle jednoho celku jsou cyklické deriváty výše uvedeného bodu (1) odvozeny z neselektivního cytolytického přírodního peptidu, takového jako např. pardaxin a mellitin, nebo z jeho části. Tyto cyklické diastereomery jsou získávány běžnými metodami cyklizace peptidů. Podle jednoho celku je cyklický diastereomer odvozen z části 1 až 22 pardaxinu, ke kterému byly dodány 1 až 3 Lys zbytky k N-koncové části a zbytky cysteinu byly dodány jak k N-koncové části, tak i k C-koncové části z důvodu cyklizace.

Čistý pozitivní náboj peptidů může být díky přírodnímu amino kyselinovému složení, díky neutralizaci volných karboxylových skupin a/nebo díky dodání pozitivně nabitých amino kyselinových zbytků nebo pozitivně nabitých chemických skupin.

V dalším celku vynález zabezpečuje nehemolytický cytolytický peptid a jeho cyklické deriváty definované v bodě (2) výše mající následující charakteristiky:

- (a) peptid je nepřirozeným syntetickým peptidem tvořeným různými poměry alespoň jedné hydrofobní amino kyseliny a alespoň jedné pozitivně nabitě amino kyseliny, ve kterém posloupnost alespoň jednoho z amino kyselinových zbytků je D-amino kyselina;
- (b) peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1; a
- (c) poměr hydrofobních k pozitivně nabitým amino kyselinám je

takový, aby peptid vyvolával cytolytické účinky k patogenním buňkám, ale nevyvolával cytolyzu červených krevních buněk.

Příklady pozitivně nabitých amino kyselin představují lysin, arginin a histidin a hydrofobních amino kyselin představují leucin, isoleucin, glycin, alanin, valin, fenylalanin, prolin, tyrosin a tryptofan. Čistý pozitivní náboj je přítomen díky amino kyselinovému složení, ale dodání pozitivně nabitých chemických skupin může být také zvažováno. V dodatku, polární amino kyseliny takové jako serin, threonin, methionin, asparagin, glutamin a cystein mohou být dodány s cílem snížení hydrofobnosti a/nebo toxicity molekuly. Ve výhodném celku je peptid tvořen jednou hydrofobní amino kyselinou, takovou jako leucin, alanin nebo valin a jednou pozitivně nabitou amino kyselinou, takovou jako lysin nebo arginin. Syntetický nepřirodní peptid může mít alespoň 6, výhodně 10 nebo více amino kyselinových zbytků. Syntetický diastereomer podle výhodného celku představuje 12-mer-peptid tvořený leucinem, alaninem nebo valinem a lysinem, s alespoň jednou třetinou jeho posloupnosti tvořenou D-amino kyselinami.

Vynález v jeho dalším celku poskytuje nehemolytický cytolytický komplex podle definice bodu (3) výše obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů spojených nebo "svázaných" dohromady, např. použitím spojovací nebo "matricové" molekuly kovalentně vázané na každý z peptidů. "Svazek" může být složen ze 2 nebo více, výhodně 5, molekul stejného peptidu nebo různých peptidů. Spojovačem/matricí může být peptid vynálezu nebo běžně používané spojovače, např. polymery, takové jako polyestery, polyamidy, polypeptidy, polyaminokyseliny (např. polylysin) nesoucí aktivní skupiny, takové jako OH, SH, COOH, NH₂, CH₂Br.

V dalším výhodném celku vynález poskytuje nehemolytickou cytolytickou směs podle definice bodu (4) uvedeného výše získanou dodáním směsi tvořené z 1 ekvivalentu každé z požadovaných hydrofobních, pozitivně nabitých a D-amino kyselin v každém kroku interakce pevné fázové metody syntézy peptidů. Tímto způsobem

byla získána směs ze 3¹² různých peptidů promícháním lysinu, leucinu a D-leucinu a po HF (vysoko frekvenčním) štěpení, extrakci s vodou a lyofilizací byla z této směsi získána hydrofilní směs.

V dalším celku vynález poskytuje nehemolytický cytolytický náhodný kopolymer podle definice bodu (5) výše obsahující různé poměry hydrofobní, pozitivně nabitě a D-amino kyseliny, např. 1:1:1, 2:1:1 a 3:1:1 (mol) kopolymery posloupnosti Lys:Leu:D-Leu. Přednostně, nehemolytický cytolytický peptid nemá žádnou α -helixovou strukturu nebo má α -helixovou strukturu, které délka není dostatečná pro překlenutí šířky buněčné membrány. Peptid tedy neobsahuje nepřerušovaný úsek buď všech D- nebo všech L- amino kyselinových zbytků délky schopné tvořit část transmembránového póru. Taková délka je běžně přibližně 20 až 22 amino kyselin, pokud tento úsek není v konečné části peptidu a přibližně polovinu, tj. 10 až 11 amino kyselin, pokud je úsek konečnou částí peptidů, protože v takovém případě dva peptidy mohou spojit jejich konečné části dohromady a překlenout buněčnou membránu.

Přerušování úseku D- nebo L- amino kyselinových zbytků může být provedeno zaměněním jedné nebo více amino kyselin v úseku amino kyselinou opačného optického izomeru nebo umístěním α -helixové přerušovací části do spojitého úseku, takové jako prolin, glycin, kyselina α -methyl- α -amino nebo kyselina ne- α -amino.

Peptidy podle vynálezu a peptidy obsažené v komplexech, směsi a kopolymery vynálezu mají čistý pozitivní náboj vyšší než +1. Čistý pozitivní náboj může být přítomen díky složení přírodních amino kyselin vynálezu, neutralizací volných COOH skupin, např. amidací, nebo vzhledem k dodání pozitivně nabitých amino kyselin nebo chemických skupin. Bylo shledáno, že selektivní cytolytické účinky mohou být občas zvýšeny přírůstkem čistého pozitivního náboje, např. připojením molekuly pozitivně nabitě amino kyseliny a/nebo pozitivně nabitě skupiny na jakoukoliv pozici. Např. polyaminová skupina, alkylamino skupina nebo aminoalkylamino

skupina, atd. mohou být připojeny k jedné z jeho koncových částí, běžně k jeho karboxylové koncové části. Výhodné skupiny zahrnují aminoethylamino skupinu $-NH-CH_2-NH_2$, která je dále v textu označována jako "TA".

Peptidy, které jsou odvozeny z neselektivních cytolytických přírodních peptidů, např. pardaxinu a mellitinu, jsou amfipatické, což znamená, že tyto mají jednu povrchovou vrstvu, která je tvořena hlavně hydrofobními amino kyselinovými zbytky a opačnou povrchovou vrstvu, která je tvořena hlavně hydrofilními amino kyselinovými zbytky. Amfipatická přirozenost peptidů může ověřena metodami známými ze současného stavu techniky. Příkladem takové metody je použití Shiffer-Edmondsonova kruhové projekce, ve které jsou amino kyselinové zbytky zapsány podle jejich posloupnosti v kruhu tak, že každá amino kyselina v posloupnosti je úhlově posunuta o 100° od jejich sousedících amino kyselinových zbytků (3,6 amino kyselin na jeden kruh). Pokud je na jedné straně kruhu nejvyšší koncentrace hydrofilních amino kyselin a nejvyšší koncentrace hydrofobních amino kyselin je na opačné straně kruhu, potom peptid může být považován za amfipatický.

Peptidy vynálezu, které nejsou odvozeny z neselektivních cytolytických přirozených peptidů, např. syntetické diastereomery tvořené hydrofobní, pozitivně nabitou a D-amino kyselinami nejsou amfipatické. Tyto mají čistý pozitivní náboj vyšší než +1 a vhodný poměr hydrofobní k pozitivně nabitě amino kyselině takový, aby výsledný peptid byl cytolytický k patogenním buňkám, ale ne hemolytický. Tyto peptidy mohou být podle vynálezu zkoumány velmi jednoduše použitím antibakteriálních a hemolytických testů popsaných v dále tomto textu. Podle jednoho celku vynálezu může být vhodný poměr peptidu složeného z leucinu a lysinu Leu:Lys 64 % : 36 % pro diastereomer ze 6 amino kyselinových zbytků a 66 % : 34 % pro diastereomer ze 12 amino kyselinových zbytků.

Je domněnkou, bez teoretického omezení, že cytolytické účinky mohou být vyvolány nahromaděním řady peptidů na povrchové vrstvě

membrány, které společně mohou být příčinou poškození buněčné membrány. V souladu s tím a podle popisu uvedeného výše je také zvažováno použití velkého množství peptidů vynálezu buď ve směsi nebo spojené (nebo svázané) dohromady, např. použitím spojovací molekuly kovalentně vázané ke každému z peptidů.

Jednotlivý peptid běžně obsahuje alespoň 6 a výhodně 10 nebo více amino kyselinových zbytků. Podle vynálezu může každý jednotlivý peptid mít běžně délku přibližně 5 amino kyselinových zbytků.

Předložený vynález také poskytuje farmaceutický prostředek obsahující nehemolytický cytolytický peptid vynálezu jako aktivní příměs a farmaceuticky akceptovatelný nosič. Prostředky jsou určeny pro použití při ošetření chorob a nemocí způsobených různými patogenními organismy, takovými jako grampozitivní a gramnegativní bakterie, viry, houby, mykoplasma a parazitičtí prvoci, např. druhu *Leishmania*, které jsou příčinou leishmaniózy a druhu *Plasmodium*, které jsou příčinou malárie. Ve výhodném celku je antipatogenní prostředek antimikrobiálním, především antibakteriálním prostředkem. V dodatku, prostředky vynálezu jsou použitelné proti zhoubným buňkám a mohou být použity při ošetření rakoviny.

Předložený vynález také popisuje metodu ošetření zahrnující podávání uvedeného hemolytického necytolytického peptidu ošetřovanému subjektu. Metoda vynálezu stejně jako výše zmíněný prostředek jsou aplikovatelné jak v lékařství tak i veterinární medicíně.

V souladu s vynálezem je poskytnuto také použití uvedeného nehemolytického cytolytického peptidu v přípravě farmaceutického prostředku určeného pro ošetření chorob nebo nemocí v lidském nebo zvířecím těle, detailněji antibakteriálních prostředků.

V dalším celku mohou být selektivní peptidy vynálezu použity jako dezinfekční prostředek pro ničení mikroorganismů, tj. peptid může být použit jako ochranný prostředek v roztoku pro smáčení kontaktních čoček, dále v kosmetickém nebo potravinářském průmyslu a také jako pesticid, např. fungicid, baktericid

v zemědělství nebo pro ochranu zemědělských produktů, např. ovoce a zeleniny.

Současní vědci překvapivě zjistily, že nestejnorodé L-základní peptidy mají selektivní cytolytické účinky projevující se selektivním ničením patogenních buněk, např. bakterií, s malým nebo žádným vlivem na nepatogenní buňky, tj. červené krevní buňky. Tento objev je velmi překvapující z pohledu dosavadní domněnky vyplývající ze současného stavu techniky, že cytolytické normálních savčích buňkách, vyplývá z jednoduchého skrytého mechanismu spojeného s α -helixovou konfigurací.

Studie funkcí a struktury inkorporovaných analogů D-amino kyselin (diastereomerů) pardaxinu a mellitinu, dvou známých buněčně neselektivních cytolytysinů, provedené s cílem objasnit molekulární mechanismus skrývající se za buněčnou selektivitou ukazují, že výsledné diastereomery nemají zachovanou jejich α -helikální strukturu, což je příčinou potlačení jejich cytotoxických účinků k savčím buňkám. Avšak, diastereomery si zachovávají vysoké antibakteriální účinky, které se projevíly ucelenou lýzou jak grampozitivních tak i gramnegativních bakterií. α -helikální struktura pardaxinu a mellitinu byla ukázána jako důležitá podmínka pro cytotoxicitu k savčím buňkám, ale ne jako nezbytná podmínka antibakteriálního působení. Avšak, samostatná D-amino kyselina inkorporovaná do nehemolytického antibakteriálního peptidu magaininu eliminovala podle dalších studií téměř zcela jeho antibakteriální účinky (Chen a spol., 1988). Výsledky získané na tomto místě s diastereomery pardaxinu a mellitinu podotýkají, že hydrofobnost a čistý pozitivní náboj dává neselektivním cytolytickým peptidům selektivní antibakteriální účinky, a že amfipatická α -helikální struktura není nutně požadována. Avšak, diastereomery pardaxinu a mellitinu obsahovaly dlouhé úseky L-amino kyselin (14 až 17 amino kyselin dlouhé), které zvyšovaly možnost vzniku membránové vazby a destabilizace přítomností malé, ale možně dostatečné, zbytkové helicity.

Pro zkoušku modulace hydrofobnosti a čistého pozitivního náboje lineárních cytotoxických peptidů, která dostatečně ověří jejich selektivní antibakteriální účinky, byly prověřeny diastereomery peptidů krátkého modelu (12 amino kyselin dlouhé) tvořené různými poměry leucinu a lysinu s jednou třetinou jejich posloupností tvořenou D-amino kyselinami. Délka peptidu a pozice D-amino kyselin byly takové, aby byly vytvořeny krátké peptidy s velmi krátkými posloupnými úseky 1 až 3 L-amino kyselin, které nebyly schopné tvořit α -helikální strukturu. Diastereomery byly hodnoceny z pohledu na (1) jejich cytotoxicitu proti bakteriím a lidským erytrocytům, (2) jejich strukturu a (3) jejich schopnost vzájemně působit a rozrušovat morfologii bakteriální hradby a modelové fosfolipidy membrán. Údaje ukazují, že modulace hydrofobnosti a pozitivního náboje je dostatečná pro ověření antibakteriálních účinků a cytolytické selektivity. Dále, výsledné antibakteriální peptidy působí synergicky v ne-smrtečných koncentracích s dostupnými antibakteriálními léky, takovými jako tetracyklin, a dále jsou zcela odolné proti inaktivaci lidským sérem, které drasticky snižuje aktivitu přírodních antibakteriálních peptidů. Dále byly připraveny a zkoušeny krátké diastereomery (6 amino kyselin a 8 amino kyselin dlouhé), které byly shledány jako nehemolytické cytolytické.

Objev jistých cytolytických nehelikálních peptidů majících antipatogenní účinky zahrnuje způsob přípravy anti-patogenních činidel obsahujících takové nehelikální polypeptidy. Pokud jsou nehelikální peptidy nesourodými peptidy složenými jak z L-amino kyselin tak i D-amino kyselin, anti-patogenní činidla mají na jedné straně dodatečnou výhodu tu, že jsou více odolné proti rozkladu, např. proteázou, než stejnorodé L-peptidy, ale na druhé straně nejsou zcela odolné proti rozkladu jako plně stejnorodé D-peptidy. Odolnost proti rozkladu může být nevýhodou z pohledu pomalého vylučování z těla s možnými přidruženými následnými toxickými postranními vlivy. Ne- α -helikální antipatogenní peptidy

mohou být použity v různých terapeutických procedurách.

Protože je známe, že stejnorodé D-peptidy mají především shodné cytolytické účinky jako stejnorodé L-peptidy (Bessalle a spol., 1990), potom je v souladu s tím jasné, že nestejnorodé D-založené peptidy mají stejné anti-patogenní vlastnosti jako nestejnorodé L-založené peptidy.

Objev, tj. skutečnost, že určité ne- α -helikální peptidy mají cytolytické účinky proti bakteriím bez cytolytickým účinkům proti červeným krevním buňkám, je založen na skutečnosti, že bakteriální buňky se liší od červených krevních buněk ve složení jejich buněčných membrán. Rozdíly ve složení buněčné membrány mohou být také shledány mezi řadou patogenních buněk, takových jako rakovinné buňky a normální buňky. Podle objevu předloženého vynálezu, tedy činidla předloženého vynálezu zakládají způsob vývoje různých léčiv majících selektivní cytolytické účinky proti jedné třídě buněk uvnitř těla, takových jako bakteriální buňky, buňky parazitů, buňky hub, buňky prvoků nebo rakovinové buňky, s malými nebo žádnými účinky proti ne-patogenním buňkám normálního těla.

Ne-hemolytická cytolytická činidla podle vynálezu mající selektivní cytolytické účinky proti patogenním buňkám a mající mnohem nižší nebo žádné cytolytické účinky proti normálním, ne-patogenním buňkám, mohou být použity pro různé terapeutické aplikace bez nebo s malým toxickým postranním vlivem.

Cyklické peptidy jedné skupiny v souladu s vynálezem jsou odvozeny z ne- α -helikálních nestejnorodých peptidů odvozených ze stejnorodých peptidů s α -helikální strukturou majících široké rozmezí cytolytických účinků. Předložený vynález tímto poskytuje v souladu s jedním celkem nestejnorodý cyklický derivát peptidu obsahující D- a L- amino kyselinové zbytky mající posloupnost takovou, že stejnorodý peptid s otevřeným řetězcem obsahující pouze L- nebo pouze D- amino kyselinové zbytky a mající stejnou posloupnost amino kyselin jako uvedený nestejnorodý peptid, má

α -helikální strukturu a má široké spektrum cytolytických účinků projevujících se na řadě buněk; uvedený nestejnorodý cyklický peptid projevuje cytolytické účinky pouze k některým z buněk, ke kterým je uvedený stejnorodý peptid cytolyticky aktivní. Např. cytolytické účinky nestejnorodého cyklického peptidu se projevují pouze k patogenním buňkám, zatímco tento peptid zůstává k normálním buňkám, takovým jako červené krevní buňky, necytolytický.

Příklady nehemolytických cytolytické cyklických peptidů v souladu s vynálezem jsou odvozeny z přírodních peptidů, které mají α -helikální strukturu a mají cytolytické účinky. Ne- α -helikální peptidy podle vynálezu mají posloupnost především odpovídající celé nebo částečné posloupnosti přírodního peptidu, ve kterém D-amino kyseliny jsou inkorporovány podél N- a C- helixů molekuly a čistý pozitivní náboj je získán buď dodáním pozitivně nabitého amino kyselinového zbytku, např. lysinu, argininu, histidinu, např. na N- koncovou jednotku a/nebo pozitivně nabitě skupiny, např. aminoalkylamino skupiny, takové jako aminoethylamino, např. na C- koncovou jednotku molekuly nebo neutralizací volných karboxylových skupin, např. přeměnou těchto skupin na amidové skupiny. Příklady takových přirozených peptidů jsou mellitin a pardaxin a jejich fragmenty.

Např. ne- α -helikální cyklický peptid může být odvozen z pardaxinu, který je 33-mer peptid, nebo z mellitinu, který je 26-mer peptid, ne- α -helikální cyklický peptid může být 33-mer nebo 26-mer peptid obsahující posloupnost odpovídající celé posloupnosti pardaxinu nebo mellitinu, jednotlivě, nebo může být nehelikální cyklický peptid mající posloupnost odpovídající částečné posloupnosti pardaxinu nebo mellitinu, např. 8 až 23 mer mellitinovou posloupnost. V případě nestejnorodého cyklického peptidu odvozeného z pardaxinu, nestejnorodý cyklický peptid v souladu s vynálezem může obsahovat částečnou posloupnost odpovídající posloupnosti pardaxinu obsahující nejméně 10 amino

kyselinových zbytků a mající rozmezí mezi 10 a 24 amino kyselinovými zbytky.

Další skupinou peptidů v souladu s vynálezem jsou nehelikální peptidy, které mají posloupnost obsahující nepřirozené homology a které jsou tvořeny alespoň jednou hydrofobní a alespoň jednou pozitivně nabitou amino kyselinou, a ve kterých posloupnost alespoň jednoho amino kyselinového zbytku je D- amino kyselina.

Předešlá studia modelů peptidu vysvětlovaly strukturální a funkční studie antibakteriálních peptidů zaměřené na tři parametry; helikální strukturu, hydrofobnost a náboj (Anzai a spol., 1991; Agawa a spol., 1991). Každá změna jednoho z těchto parametrů má současně za následek změny dalších dvou, určit jednoznačný podíl každého parametru na celkových antibakteriálních účincích je tedy velmi složité. V souladu s předloženým vynálezem byl vliv helikální struktury vyloučen, studie byly tedy zaměřeny pouze na dva parametry, jmenovitě hydrofobnost a čistý pozitivní náboj, ovlivnitelné změnou poměru leucinu a lysinu. Pro účely výzkumu byly vybrány modely diastereomerů krátkých peptidů (12 amino kyselin dlouhé) obsahující úseky pouze 1 až 3 návazných L- amino kyselin, které jsou pro vytvoření α -helikální struktury příliš krátké.

CD spektroskopie ukázala, že tyto Leu/Lys diastereomery samozřejmě zcela postrádají α -helikální strukturu (údaje nejsou uvedeny), nepodobně k diastereomerům mellitinu a pardaxinu podle vynálezu, ve kterých zůstává malá část α -helikální struktury.

Nicméně, Leu/Lys diastereomery projevují silné antibakteriální účinky, které jsou podobné nebo větší než účinky přirozených antibakteriálních peptidů, takových jako dermaseptin S nebo antibiotický lék tetracyklin. Nejvíce účinné peptidy

[D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈ a [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇ (peptid 23 a 24, jednotlivě, příklad 3 uvedený v textu) byly zbaveny hemolytických účinků proti vysoce cytolyticky-náchylným lidským erytrocytům. Mělo by být zmíněno, že [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉ (peptid 22) je zbaven

α -helikální struktury, ale projevuje značné hemolytické účinky, které jsou srovnatelné s účinky přírodního cytolytického peptidu, pardaxinu. Tato skutečnost by mohla znamenat, že rovnováha mezi hydrofobností a pozitivním nábojem vyvažuje amfipatickou α -helikální strukturu. Zvyšující se pozitivní náboj však drasticky snižuje hemolytické účinky, přičemž antibakteriální účinky zůstávají zachovány, což znamená, že amfipatická α -helikální struktura není pro antibakteriální účinky nezbytná.

Vnitřní působení Leu/Lys diastereomerů s negativně nabitými i zwitteriontovými fosfolipidovými membránami bylo zkoušeno s cílem objasnit podstatu jejich selektivní cytotoxicity proti bakteriím. Negativně nabitá PE/PG vezikuly byly použity pro simulaci lipidového prostředí *E. coli* (Shaw, 1974) a zwitteriontové PC vezikuly byly použity pro simulaci vnějšího obalu lidských erytrocytů (Verkleij a spol., 1973). Biologické účinky Leu/Lys peptidů na erytrocyty (obrázek 12) a *E. coli* (tabulka 5) dobře koreluje ve vztahu s jejich schopností pronikat modelovou membránou. Peptid, který pronikl PC vezikuly, byl peptidem majícím značné hemolytické účinky. Tyto výsledky ukazují, že fosfolipidové složení bakteriálních membrán je funkcí důležitou pro propustnost této skupiny antibakteriálních peptidů. Schopnost antibakteriálních a nehemolytických peptidů vázat a pronikat negativně nabitě, ne však zwitteriontové, fosfolipidové vezikuly, je charakteristikou přírodních antibakteriálních peptidů (Gazit a spol., 1994) přisuzovanou obsahu lipopolysacharidů (LPS, u gramnegativních bakterií) a polysacharidů (kyselina teichoová u grampozitivních bakterií) ve vnějších vrstvách bakterií a fosfatidylglycerolu (PG) ve vnitřních membránách bakterií, všechny tyto jsou negativně nabité, zatímco normální eukaryontní buňky, takové jako erytrocyty, převážně obsahují zwitteriontový fosfolipid PC na jejich vnějším obalu.

Antibakteriální peptid magaininu je nehemolytický peptidem, zatímco mellitin, pardaxin a modelový peptid s posloupností

podobnou jako u [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈, ale tvořený pouze L-amino kyselinami, jsou hemolytické především díky jejich vysoké hydrofobnosti. Pakliže α -helikální struktura magaininu byla přerušena inkorporací tří D-amino kyselin, výsledný diastereomer neměl žádné antibakteriální účinky (Chen a spol., 1988), přestože jeho pozitivní náboj byl podobný pozitivnímu náboji přírodního magaininu. Optimální rovnováha, která již existuje mezi α -helikální strukturou, hydrofobností a čistým pozitivním nábojem přírodního magaininu, takto umožňuje selektivní antibakteriální účinky a jakákoliv změna jedné z těchto tří vlastností by mohla být příčinou ztráty antibakteriálních účinků magaininu. V protikladu, hydrofobnost pravděpodobně hraje důležitou roli při ztrátě α -helikální struktury v mellitinu, pardaxinu a Leu/Lys diastereomerů vynálezu.

Výsledky v souladu s vynálezem navrhuje novou strategii vývoje nového rozsahu krátkých, jednoduchých a snadno manipulovatelných antibakteriálních peptidů. Každý diastereomerický model Leu/Lys peptidů má jednoznačné spektrum účinků (tabulka 5). Existence ucelené řady diastereomerických antibakteriálních peptidů bude umožňovat výběr nejvíce efektivního peptidu s ohledem na cílovou buňku. Dále, souběžná aplikace složených forem diastereomerů peptidů, působících odděleně nebo společně, má také selektivní zbytkovou hodnotu a zabezpečuje lepší ochranu proti široké škále infekčních mikrobů. Všechny Leu/Lys diastereomery projevovaly zvýšené antibakteriální účinky proti grampozitivním bakteriím v porovnání s gramnegativními bakteriemi. Tyto výsledky jsou důležité uvážíme-li zvyšující se odolnost grampozitivních bakterií, takových jako *Staphylococcus aureus*, *enterococci* a *pneumococci* na běžná antibiotika (Russell a spol., 1995). V dodatku oproti přírodnímu antibakteriálnímu peptidu - dermaseptinu S, [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇ (peptid 24) si zachovává své antibakteriální účinky i při přítomnosti usazeného lidského séra. Diastereomerické peptidy by měly mít oproti známým

antibakteriálním peptidům několik výhod: (1) peptidy by neměly mít různé patologické a farmakologické vlivy vyvolané α -helikálními lytickými cytolytasy. Např. staphylococcus δ -toxin, antibakteriální peptid alamethicin, ochranný usměrněný lytický faktor a pardaxin vyvolávají několik histopatologických vlivů na různé buňky prostřednictvím vytváření pórů a aktivace kaskády kyseliny

arachidonové. Avšak, diastereomery pardaxinu nevyvolávají tyto účinky. V dodatku, mnoho amfipatických α -helikálních peptidů se váže na kalmodulin a vyvolávají několik buněčných reakcí, stejně jako všechny D-amino kyselinové α -helixy zahrnující mellitin mají podobné účinky (Fisher a spol., 1994). Diastereomery s přerušenu α -helikální strukturou se pravděpodobně neváží na kalmodulin; (2) místní substituce D-amino kyselinou by vedla ke kontrolovanému čištění antibakteriálních peptidů proteolytickými enzymy na rozdíl od celkové ochrany požadované úplnou substitucí D-amino kyselin (Wade a spol., 1990). Celková odolnost lytických peptidů proti rozpadu je výhodná pro terapeutické použití. Dále, antigenita krátkých fragmentů obsahujících D, L amino kyseliny je dramaticky pozměněna v porovnání s jejich plně L- nebo D- amino kyselinovými výchozími molekulami (Benkirane a spol., 1993); (3) celkový útlum růstu bakterií vyvolaný diastereomery je spojován s celkovou lýzou bakteriální stěny, což je ukázáno díky elektronové mikroskopii (obrázek 14). Proto bakterie nemohou snadno vyvinout odolnost proti lékům a vyvolat ničivý mechanismus; (4) [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇ (peptid 24) má schopnost proniknout buněčnou stěnou bakterie v koncentracích nižších než je jejich MIC, což vidět pomocí elektronové mikroskopie (obrázek 14). Souběžná aplikace klinicky používaných antibiotik, které nemají účinky vzhledem k jejich neschopnosti proniknout buněčnou stěnou bakterie, společně s peptidem 24 může dávat řešení tohoto mechanismu odolnosti bakterie.

Vynález bude dále v textu doplněn poznámkami k některým nákresům

a příkladům, které však nejsou nikterak omezeny.

Prostředky a metody použité v příkladech vynálezu

(i) Materiály. Butyloxykarbonyl-(amino kyselina)-(fenylacetamido)-methylová pryskyřice byla získána od Applied Biosystems (Foster City, CA) a butyloxykarbonyl (Boc) amino kyseliny byly získány od Peninsula Laboratories (Belmont, Ca). Další činidla použitá pro syntézu peptidů zahrnovala kyselinu trifluorooctovou (TFA, Sigma), N,N-diisopropylethylamin (DIEA, Aldrich, destilovaný přes ninhydrin), dicyklohexylkarbodiimid (DCC, Fluka), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt, Pierce) a dimethylformamid (peptid syntézní značka, Biolab). Vaječný fosfatidylcholin (PC) a fosfatidylserin (PS) z míchy hovězího dobytka (sodná sůl - úroveň I) byly získány od Lipid Products (South Nutfield, U.K.). Vaječný fosfatidylglycerol (PG) a fosfatidylethanolamin (PE) (typ V, z *Escherichia coli*) byly získány ze Sigmy. Cholesterol (extra čistý) byl dodán od Merck (Darmstadt, Německo) a dvakrát překrystalizován z ethanolu. 3,3'-diethylthiodikarbocyaniniodid [diS-C₂-5] byl získán od Molecular Probes (Eugene, OR). Přírodní mellitin byl získán ze Sigmy. Obchodně dostupný mellitin obvykle obsahuje stopy fosfolipázy A₂, která vyvolává rychlou hydrolýzu fosfolipidů. Proto byla věnována zvláštní pozornost odstranění celkové fosfolipázy A₂ z mellitinu použitím RP-HPLC. Všechna další činidla měla analytickou kvalitu. Tlumivé roztoky byly připraveny v sodno-draselném destilovaném vodním skle.

(ii) Syntéza a čištění peptidů. Peptidy byly syntetizovány použitím pevné fázové metody aplikované pro butyloxykarbonyl-(amino kyselina)-(fenylacetamido)methylovou pryskyřici (0,05 meq) (Merrifield a spol., 1982). Peptidy vázané na pryskyřici byly odštěpeny od pryskyřic použitím fluorovodíku (HF) a po HF odpaření podrobeny extrakci suchým etherem. Tyto surové peptidové přípravy obsahovaly jeden hlavní pík, jak je odhaleno

prostřednictvím RP-HPLC, pík byl 50 % až 70 % hmotn. čistým peptidem. Syntetizované peptidy byly dále čištěny pomocí RP-HPLC na C₁₈ zpětné fázi Bio-Rad polo-preparativní koloně (300 Å velikost pórů). Kolona byla eluována po dobu 40 minut použitím přímého spádu 10 % až 60 % acetonitrilu ve vodě, obě směsi obsahovaly 0,05 % TFA (v/v), při rychlosti 1,8 ml/min. Čištěné peptidy, které se prostřednictvím analytické HPLC ukázaly jako stejnorodé (~ 95 %) byly podrobeny analýze amino kyselin a hmotnostní spektrometrii pro ověření jejich posloupností.

(iii) Transaminace peptidů. Peptidy vázané na pryskyřice jako v případě (ii) výše byly transaminovány 30 % ethylendiaminem v DMF po dobu 3 dnů, následovala filtrace pryskyřice, vysrážení chráněných peptidů, jmenovitě aminoethylamino (TA) peptidů, s etherem a odstranění chránicích skupin prostřednictvím HF. Syntetické TA-peptidy byly čištěny (> 95 % stejnorodost) zpětnou fází HPLC na C₁₈ koloně použitím přímého spádu 25 % až 80 % acetonitrilu v 0,1 % TFA po dobu 40 minut a následně podrobeny amino kyselinové analýze ověřující jejich složení.

(iv) Amidace peptidů. Peptid vázaný na pryskyřici (20 mg) byl upravován po dobu 3 dnů směsí složenou z nasyceného roztoku čpavku (30 %) v methanolu v poměru 1:1 v/v a DMSO (1:1 v/v), což vedlo k aminaci karboxylátové skupiny glutaminového zbytku umístěného na C-konečné jednotce [D1-V5,8, I17, K21-mellitinu. Takto byly peptidy získány, ve kterých všechny chránicí skupiny zůstaly připojené, ale jejichž C-konečné zbytky byly přeměněny jednou amidovou skupinou. Methanol a čpavek byly odpařeny pod proudem dusíku a chráněné peptidy byly podrobeny extrakci z pryskyřice prostřednictvím DMSO a vysráženy suchým etherem. Produkty byly následně podrobeny HF štěpení a dalšímu čištění použitím RP-HPLC podle popisu uvedeného výše.

(v) Příprava lipidových vezikul. Malé jednotné lamelární vezikuly (SUV) byly připraveny sonikací PC/cholesterolu (10:1 w/w) nebo PC/PS (1:1 w/w) disperzí. Suchý lipid a cholesterol (10:1 w/w)

byly rychle rozpuštěny v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ směsi (2:1 v/v). Roztoky byly následně odpařeny pod proudem dusíku a lipidy (v koncentraci 7,2 mg/ml) byly upravovány ve vakuu po dobu 1 hodiny a následně opět suspendovány ve vhodném tlumivém roztoku vířením. Výsledné lipidové disperze byly následně sonikovány po dobu 5 až 15 minut v sonikátoru lážňového typu (G1125SP1 sonikátor, Laboratory Supplies Company Inc., NY) až do okamžiku jejich vyčištění. Koncentrace lipidů výsledných příprav byla určena analýzou fosforem (Barlett, 1959). Vezikuly byly zobrazeny použitím JEOL JEM 100B elektronového mikroskopu [Japan Electron Optics Laboratory Co. (japonská elektronová optická laboratoř), Tokyo, Japan] následovně. Kapka vezikul byl umístěna na mřížku upravenou uhlíkem a negativně zbarvena uranylacetátem. Zkouška mříží ukázala, že vezikuly byly jednotně lamelární s průměrným průměrem 20 až 50 nm (Papahadjopoulos a Miller, 1967).

(vi) Příprava séra. Krev byla získána od pěti dobrovolných dárců a ponechána se srážet při pokojové teplotě po dobu 4 hodin. Krev byla následně centrifugována po dobu 15 minut v 1500 g, sérum bylo odstraněno a spojeno. Sérový komplement byl inaktivován zahříváním při teplotě 56 °C po dobu 30 minut.

(vii) CD spektroskopie. CD spektra peptidů byla měřena Jasco J-500A spektropolarimetrem po rozdělení stupnice přístroje (+)-10-kafrsulfonovou kyselinou. Spektra byla zkoumána při teplotě 23 °C ve cloněných krystalových optických buňkách s optickou délkou 0,5 mm. Spektra byla získána při vlnových délkách 250 až 190 nm. Pro každý peptid bylo provedeno osm zkoušek s rychlostí snímání 20 nm/min. Peptidy byly prohlíženy v koncentraci $1,5 \times 10^{-5}$ až $2,0 \times 10^{-5}$ M v 40 % trifluoroethanolu (TFE), rozpouštědle silně podporujícím δ -helikální strukturu. Frakční helicity (Greenfield a Fasman, 1969; Wua spol., 1981) byly proočteny následovně:

$$f_h = \frac{[\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0}{[\theta]_{222}^{100} - [\theta]_{222}^0}$$

kde $[\theta]_{222}$ je experimentálně pozorovaná střední zbytková eliptičnost při 222 nm a hodnoty $[\theta]_{222}^0$ a $[\theta]_{222}^{100}$, které odpovídají 0 % a 100 % obsahu helixů při 222 nm, jsou odhadnuty hodnotami 2000 a 32000 deg.cm²/dmol (stupňů.cm²/decimol), jednotlivě (Wu a spol., 1981).

(viii) Antibakteriální účinky peptidů. Antibakteriální účinky diastereomerů byly zkoušeny ve sterilních deskách s 96 otvory (Nunc F96 mikrotitrační desky) v konečných objemech 100 µL následovně: Alikvotní části (50 µl) suspenze obsahující bakterie v koncentraci 10⁶ "jednotek tvorby kolonií" (Colony-Forming Units CFU)/ml LB (Lauria broth) média byly dodány do 50 µL vody nebo 66 % spojeného normálního lidského séra v PBS obsahujícího peptid ve 2-složkovém postupném ředění. Útlum růstu byl určen měřením absorbance při 492 nm automatickým čtecím přístrojem mikrodesek E1309 (Bio-tek Instruments) následovně po inkubaci trvající 18 až 20 hodin při teplotě 37 °C. Antibakteriální účinek byl vyjádřen jako minimální útlumová koncentrace (MIC), koncentrace při které byl pozorován 100 % útlum růstu po 18 až 20 hodinách inkubace. Byly použity následující bakterie; *Escherichia coli* D21, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter calcoaceticus* Ac11, *Salmonella typhimurium* LT2, *Bacillus megaterium* Bm11, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

(ix) Hemolýza lidských červených krevních buněk. Byly testovány hemolytické účinky peptidů vůči lidským červeným krevním buňkám (hRBC). Čerstvá hRBC s EDTA byla 3 krát promyta s PBS (35 mM fosfátového tlumivého roztoku/0,15 M NaCl, pH 7,3) centrifugací trvající 10 minut v 800 g a opět suspendována v PBS. Peptidy rozpuštěné v PBS byly následně dodány do 50 µL roztoku uskladněné

hRBC v PBS, čímž se získal konečný objem 100 μ L (konečná koncentrace erytrocytů, 5 % v/v). Výsledná suspenze byla po dobu 30 minut podrobena inkubaci při promíchávání a teplotě 37 °C. Vzorky byly následně po dobu 10 minut podrobeny centrifugaci v množství 800 g. Uvolnění hemoglobinu bylo monitorováno měřením absorbance povrchově aktivní látky při 540 nm. Kontrolní hodnoty pro 0 % hemolýzy (prázdna) a 100 % hemolýzy byly získány z hRBC suspendované v PBS a Tritonu 1 %, jednotlivě.

(x) Zviditelnění vlivů peptidů na bakterie použitím elektronové mikroskopie. Vzorky obsahující *E. coli* (10^6 CFU/ml) v LB médiu byly po dobu 16 hodin podrobeny inkubaci s různými peptidy v jejich MIC, jedno zředění bylo nižší než MIC, a následně centrifugovány po dobu 10 minut v 3000 g. Peletky byly opět suspendovány a kapka obsahující bakterie byla umístěna na mříž povrchově upravenou uhlíkem, která byla následně negativně zbarvena 2 % kyselinou fosfowolframovou (PTA), pH 6,8. Mřížky byly zkoušeny použitím JEOL JEM 100B elektronového mikroskopu.

(xi) Průchod membrány vyvolaný peptidy. Prostupnost membrány byla odhadnuta prostřednictvím analýzy difuzního potenciálu (Loew a spol., 1983; Sims a spol., 1974) podle popisu uvedeného výše (Shai a spol., 1991). Pro běžnou zkoušku ve skleněné trubici byly 4 μ l suspenze liposomů (konečná fosfolipidová koncentrace 33 μ M) v K^+ tlumivém roztoku (50 mM K_2SO_4 , 25 mM HEPES- SO_4^{2-} , pH 6,8) zředěny v 1 ml izotonického K^+ volného tlumivého roztoku (50 mM Na_2SO_4 , 25 mM HEPES- SO_4^{2-} , pH 6,8), následně bylo dodáno fluorescenční potenciálově-senzitivní barvivo diS-C₂-5. Valinomycin (1 μ l 10^{-7} M) byl dodán do suspenze tak, aby uvnitř vezikul pomalu vznikal negativní difuzní potenciál, který způsobuje prudké ochlazení barvivové fluorescence. Jakmile byla fluorescence stabilizována, což trvalo 3 až 10 minut, byly dodány peptidy. Následný rozptyl difuzního potenciálu odražený zvýšením fluorescence byl monitorován na Perkin Elmer LS-50B spektrofluorometru s excitačním zařízením upraveným na 620 nm,

vyzařováním při 670 nm a přírůstkem upraveným na 100 %. Procentický podíl normalizace fluorescence F_t byl definován takto:

$$F_t = (I_t - I_0 / I_f - I_0) \times 100$$

kde I_0 = původní fluorescence, I_f = celková fluorescence pozorovaná před dodáním valinomycinu a I_t = fluorescence pozorovaná po dodání peptidu v čase t .

(xii) Vazby peptidů k vezikulám. Vzájemné působení [D]-V5¹⁸, I17, K21-mellitinu s vezikulami obsahujícími zwitteriontové (PC) nebo negativně nabitě fosfolipidy (PC/PS) bylo charakterizováno měřením změn intenzity vyzařování intrinsického tryptofanu peptidu při SUV titračních zkouškách. Stručně, SUV byly při teplotě 24 °C dodány do stálého množství peptidu (0,5 μ M) rozpuštěného v tlumivém roztoku obsahujícím 50 mM Na₂SO₄, 25 mM HEPES-SO₄²⁻, pH 6,8. 1-cm optické délky křemenné kyvety, která obsahovala konečný reakční objem 2 ml, byly použity ve všech zkouškách. Intenzita fluorescence byla měřena jako funkce molárního poměru lipidu/peptidu (4 oddělené zkoušky) na Perkin-Elmer LS-5 Spektrofluorometru s excitací upravenou na 280 nm použitím 5 nm zářezu a vyzařováním upraveným na 340 nm použitím 2,5 nm zářezu. Izotermy vazeb byly analyzovány jako částečná rovnováha použitím následujícího vzorce:

$$X_b = K_F C_f$$

kde X_b je definováno jako molární poměr vázaného peptidu (C_b) k celkovému lipidu (C_L), K_F odpovídá rozdělovacímu koeficientu a C_f představuje rovnovážnou koncentraci volného peptidu v roztoku. Praktickým účelovým předpokladem bylo, že peptidy byly původně rozdělovány pouze na vnější vrstvě (60 %) SUV. Odtud tedy rozdělovací rovnice:

$$X_B^* = K_F^* C_f$$

kde X_B^* je definováno jako molární poměr vázaného peptidu na 60 % celkového lipidu a K_F^* je odhadnutá povrchově rozdělovací konstanta. Křivka vychází z nákresu X_B^* oproti volnému peptidu, C_f je označeno jako běžná izoterma vazby.

(xiii) Zkoušky útlumu (rychlého chlazení) tryptofanu. Tryptofan, který je citlivý na své prostředí, byl použit v přecházejících metodách v kombinaci s bromovanými fosfolipidy (Br-PC) s cílem zjistit rozmístění peptidů v membráně (Bolen a Holloway, 1990; De Kroon a spol., 1990). Br-PC použité jako tlumicí (ochlazovací) látka fluorescence tryptofanu jsou vhodné pro zkoušku absorpce peptidů v membráně, jelikož tyto působí při krátké vzdálenosti a drasticky neporušují membránu. Mellitin a jeho diastereomer, jednotlivě obsahující jeden tryptofanový zbytek, byly dodány (koncentrace 0,5 μ M) do 2 ml tlumivého roztoku (50 mM Na_2SO_4 , 25 mM HEPES- SO_4^{2-} , pH 6,8) obsahujícího 20 μ l (50 μ M) Br-PC/PS (1:1 w/w) SUV, takto upravující poměr lipidu/peptidu na 100:1. Po 2 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo zaznamenáno emisní spektrum tryptofanu použitím Perkin-elmer LS-50B Spektrofluorometru s excitací stabilizovanou na 280 nm (8 nm zářez). Byly použity SUV tvořené PC/PS (1:1 w/w), které obsahovaly 25 % buď 6,7-Br-PC nebo 9,10-BrPC nebo 11,12-Br-PC. Pro každý peptid byly provedeny tři oddělené zkoušky. V kontrolních zkouškách byly použity PC/PS (1:1 w/w) SUV bez Br-PC.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 znázorňuje cyklický dichroismus (CD) spektra aminomethylaminoparadoxinu (TApap)-odvozeného peptidu. Spektra byla zachycena při koncentraci peptidu 0,8 až 2,0 $\times 10^{-5}$ M v 40 % 2,2,2-trifluoroethanolu (TFE)/vodě. Symboly: TApap (—);

[D]P7-TApar (.....); [D]L¹⁸L¹⁹-TApar(—) a [D]P7L¹⁸L¹⁹-TApar(._._.);

Obrázek 2 znázorňuje reakční křivky hemolytických účinků podle dávkování TApar-odvozených peptidů v lidských červených krevních buňkách (hRBC). Příloha znázorňuje výsledky testů při nízkých koncentracích. Symboly: plné čtverce, mellitin; plné trojúhelníky, TApar; plné kruhy, [D]P7-TApar; prázdné kruhy, [D]L¹⁸L¹⁹-TApar; prázdné čtverce, [D]P7L¹⁸L¹⁹-TApar; prázdné trojúhelníky, dermaseptin.

Obrázek 3A-B znázorňuje maximální rozptyl difuzního potenciálu ve vezikule vyvolaný TApar-odvozenými peptidy. Peptidy byly dodány do izotonického K⁺ volného tlumivého roztoku obsahujícího malé jednotné lamelární vezikuly (SUV) složené z vaječného fosfatidylcholin/fosfatidylserinu (PC/PS) (obrázek 3A) nebo PC (obrázek 3B), předem vyvážené fluorescenčním barvivem diS-C₂-5 a valinomycinem. Normalizace fluorescence byla měřena 10 až 20 minut po promíchání peptidu s vezikulami. Symboly: plné trojúhelníky, TApar; plné kruhy, [D]P7-TApar; prázdné kruhy, [D]L¹⁸L¹⁹-TApar; prázdné čtverce, [D]P7L¹⁸L¹⁹-TApar;

Obrázek 4A-C znázorňuje elektronové mikrografy negativně zbarvených *E.coli* buněk neošetřených (obrázek 4A) nebo ošetřených [D]P7L¹⁸L¹⁹-TApar v koncentracích nižších než minimální útlumová koncentrace (MIC) (4B) nebo v MIC koncentracích (4C);

Obrázek 5 znázorňuje CD spektra mellitinu a mellitin-odvozených diastereomerů. Spektra byla zachycena při koncentraci peptidu 0,8 až 2,0 x 10⁻⁵ M 40 TFE/voda. Symboly: mellitin, (—); [D]-V^{5,8},I¹⁷,K²¹-mellitin, (.); [D]-V^{5,8},I¹⁷,K²¹-mellitin-COOH, (- - - - -);

Obrázek 6 znázorňuje reakční křivky hemolytických účinků podle dávkování mellitin odvozených diastereomerů v hRBC. Symboly: plné kruhy, mellitin, prázdné kruhy, [D]-V^{5,8},I¹⁷,K²¹-mellitin-COOH; plné trojúhelníky, [D]-V^{5,8},I¹⁷,K²¹-mellitin;

Obrázek 7A-C znázorňuje elektronové mikrografy negativně

zbarvených *E. coli* neošetřených (obrázek 7A) nebo ošetřených [D]-V5,8,I17,K21-mellitin v koncentraci nižší než MIC (7B) nebo MIC koncentraci (7C);

Obrázek 8A-B znázorňuje maximální rozptyl difuzního potenciálu ve vezikulách vyvolaný mellitinem a mellitin-odvozenými diastereomery. Peptidy byly dodány do izotonického K^+ tlumivého roztoku obsahujícího SUV složené z PC (8A) nebo PC/PS (8B), předem vyvážené fluorescenčním barvivem diS-C₂-5 a valinomycinem. Normalizace fluorescence byla měřena 10 až 20 minut po promíchání peptidů s vezikulami. Symboly: plné kruhy, mellitin; plné trojúhelníky, [D]-V5,8,I17,K21-mellitin;

Obrázek 9A-B znázorňuje zvýšení fluorescence [D]-V5,8,I17,K21-mellitinu (0,5 μ M celkové koncentrace) po titraci s PC/PS vezikulami (plné trojúhelníky) nebo PC vezikulami (prázdné trojúhelníky), s excitační vlnovou délkou sestavenou na 280 nm a vyzařováním při 340 nm. Pokus byl proveden při 25 °C v 50 mM Na₂SO₄, 25 mM HEPES-SO₄⁻², pH 6,8 (obrázek 9A); a návaznou isoterma odvozenou z obrázku 9A nákresem X_D^* (molární poměr vázaného peptidu na 60 % lipidu) oproti C_f (rovnovážná koncentrace volného peptidu v roztoku) (obrázek 9B);

Obrázek 10A-B znázorňuje rychlé ochlazení tryptofanu senzitivního na prostředí bromovanými fosfolipidy. Mellitin (obrázek 10A) a [D]-V5,8,I17,K21-mellitin (10B) byl dodán do útlumového roztoku obsahujícího PC/PS (1:1 w/w) SUV. SUV obsahovalo 25 % buď 6,7-Br-Pc (— · — · — ·) nebo 9,10-Br-Pc (— — — —) nebo 11,12-Br-PC (· · · · ·). Po 2 minutách inkubace bylo zaznamenáno spektrum vyzařování tryptofanu použitím spektrofluorometru s vymezením excitace při 280 nm. Pro porovnání bylo použito PC/PS (1:1 w/w) SUV bez Br-PC (—).

Obrázek 11 znázorňuje vliv hydrofobnosti Leu/Lys diastereomerů na RP-HPLC retenční dobu.

Obrázek 12 znázorňuje reakční křivku hemolytických účinků podle dávkování Leu/Lys diastereomerů v hRBC. Příloha znázorňuje

výsledky testů v nízkých koncentracích. Symboly: prázdné čtverce, mellitin; plné čtverce, [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉; plné kruhy, [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈; prázdné trojúhelníky, [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇; plné trojúhelníky, [D]-L^{3,4,8,10}-K₇L₅.

Obrázek 13A-B znázorňuje maximální rozptyl difuzního potenciálu ve vezikulách vyvolaný Leu/Lys diastereomery. Peptidy byly dodány do izotonického K⁺ volného tlumivého roztoku obsahujícího SUV složené z PC (obrázek 13A) nebo PE/PG (13B), předem vyvážené fluorescenčním barvivem diS-C₂-5 a valinomycinem. Normalizace fluorescence byla měřena 3 až 10 minut po promíchání peptidů s vezikulami. Symboly: plné čtverce, [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉; plné kruhy, [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈; plné trojúhelníky, [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇; křížkované kruhy, [D]-L^{3,4,8,10}-K₇L₅.

Obrázek 14A-H znázorňuje elektronové mikrografy negativně zbarvených *E. coli* neošetřených a ošetřených různými Leu/Lys diastereomery v 80 % jejich MIC. Obrázek 14A, kontrolní; obrázek 14B, *E. coli* ošetřené s [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉; obrázek 14C, *E. coli* ošetřené s [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈; obrázek 14D, *E. coli* ošetřené s [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇; obrázek 14E, *E. coli* ošetřené s [D]-L^{3,4,8,10}-K₇L₅; obrázek 14F, kontrolní; obrázek 14G, *E. coli* ošetřené s [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈; obrázek 14H, *E. coli* ošetřené [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 – Syntéza a biologické účinky diastereomerů odvozených z pardaxinu

1.1 Syntéza. Pro zkoušku funkce α -helikální struktury polykationového cytolysinu při jeho cytotoxicitě na savčí buňky a bakterie byla syntetizována řada peptidů odvozených od pardaxinu podle popisu odstavců (ii) a (iii) metod zkoušek, byla charakterizována jejich struktura, hemolytické účinky na hRBC,

antibakteriální účinky a vliv na morfologii bakterie.

Pardaxin (par) je 33-mer peptidem s následující posloupností:

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-
-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-Gln-
-Glu

Modifikace molekuly pardaxinu s cílem zavést pozitivní náboj byla provedena buď zrušením kyselého C-koncové jednotky pardaxinu nebo přeměnou kyselého C-koncové jednotky pardaxinu nebo jeho fragmentu na pozitivní reakcí obou karboxylových skupin Glu zbytku C-koncové jednotky s ethylendiaminem (TA) a/nebo dodáním pozitivně nabitých amino kyselinových zbytků, takových jako Lys, k N-koncové jednotce diastereomerů pardaxinu, ve kterých N-helix a/nebo C-helix byly přeměněny buď záměnou zbytku Pro na 7 pozici TAp_{ar} nebo fragmentu pardaxinu za D-Pro (zde označované jako [D]P⁷) nebo dvou Leu zbytků na pozicích 18 a 19 TAp_{ar} nebo fragmentu pardaxinu za D-Leu (zde označované jako [D]L¹⁸L¹⁹), nebo společnou záměnou těchto dvou (zde označované [D]P⁷L¹⁸L¹⁹). D-amino kyseliny byly zavedeny do středu N- a C- helixů.

Následující diastereomery odvozené z pardaxinu byly shledány jako nehemolytické, projevující selektivní cytolytické účinky (tučné a podtržené uvedené zbytky jsou D-amino kyseliny). Peptidy byly označeny v textu tučnými číslicemi.

1. [D]P⁷L¹⁸L¹⁹-TAp_{ar} s posloupností:

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-
-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-
-Gln-Glu-(NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂

2. [D]P⁷L¹⁸L¹⁹ [1 až 22]-TAp_{ar} s posloupností:

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-
-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-(NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂

3. [D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-
-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val

4. K¹[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-T_Apar s posloupností:

Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-
-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-(NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂

5. K¹K²[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-T_Apar s posloupností:

Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-
-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-(NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂

6. K¹K²[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-
-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val

7. [D]P⁷-[1 až 11]-T_Apar s posloupností:

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-NH-CH₂-CH₂-NH₂

Byly syntetizovány následující deriváty pardaxinu, které byly
shledány jako hemolyticky aktivní, což je ukázáno v tabulce 1
uvedené dále v textu.

8. T_Apar9. [D]P¹³-T_Apar10. [D]L⁵L¹⁹-T_Apar11. [D]P⁷L¹⁹-T_Apar12. [D]P⁷-T_Apar13. [D]P⁷-par14. [D]L¹⁸L¹⁹-T_Apar15. [D]L¹⁸L¹⁹-par16. [D]P⁷L¹⁸L¹⁹-par17. [D]P⁷[1 až 22]-T_Apar

1.2 Určení sekundární (odvozené) struktury peptidů. Sekundární
struktury peptidů 1, 8, 12, 14 byly ohodnoceny z jejich CD
spekter v 40 % TFE, rozpouštědle které silně podporovalo
α-helikální strukturu, podle popisu metod zkoušek, odstavec (vii),
a v PBS (35 mM fosfátového tlumivého roztoku/0,15 M NaCl, pH
7,0).

CD spektra diastereomerů odvozených z pardaxinu jsou znázorněny
na obrázku 1, na kterém [8] (—), [12] (....), [14] (-----)
a [1] (-.-.-.-). Dramatický pokles α-helixového obsahu peptidů je

podle očekávání pozorován u peptidů s vyšším obsahem D-amino kyseliny, což se odráží minimálními hodnotami v 208 a 222 nm v 40 % TFE.

Byl pozorován více jak 90 % pokles α -helixového obsahu mezi peptidy 8 (TApar) (50 % α -helix) a 1 ([DIP⁷L¹⁸L¹⁹-TApar) (4 %). Obsahy α -helixů peptidů 12 ([DIP⁷-TApar) a 14 ([DIL¹⁸L¹⁹-TApar) byly 25 % a 15 %, jednotlivě. Mělo by být poznamenáno, že prolin na pozici 7 nezavádí do struktury ohyb, ale spíše se podílí na vytváření N-helixu, což je zřejmé podle NMR spektroskopie (Zagorski a spol., 1991). Pardaxin v PBS dal nízkou hodnotu ~12 % α -helixového obsahu, zatímco všechny analogy s D-amino kyselinovými zbytky projevovaly velmi malé znaky, které nemohly být přisuzovány specifickým strukturám (údaje nejsou uvedeny).

1.3 Hemolytické a antibakteriální účinky. Peptidy 1 až 17 odvozené od pardaxinu byly následně zkoušeny pro jejich hemolytické účinky proti vysoce senzitivním lidským erytrocytům a pro jejich vysoké účinky potlačení růstu rozdílných druhů bakterií podle popisu metod zkoušek, odstavec (ix) a (xviii), jednotlivě. V dodatku, cytotoxický včelý jed mellitin, antibakteriální peptid dermaseptin S a antibiotický tetracyklin byly použity jako kontrolní látky.

Na obrázku 2 je znázorněna křivka hemolytických účinků peptidů 1, 8, 12, 14. Ukazuje se, že D-amino kyseliny inkorporované do TApar dramaticky snižují jeho hemolytické účinky, které korelují se ztrátou α -helixového obsahu odpovídajících analogů. Peptid 8 TApar s nejvyšším obsahem α -helixů je nejvíce hemolytický, zatímco peptid 1 [DIP⁷L¹⁸L¹⁹-TApar s nejnižším obsahem α -helixů je prakticky zbaven hemolytických účinků až do maximální testované koncentrace (50 μ M). Neschopnost lýzovat RBC je charakteristická pro většinu přirozeně vznikajících antibakteriálních peptidů, takových jako dermaseptin (podívejte se na obrázek 2), magainin a cekropin.

Tabulka 1 ukazuje hodnoty MIC (v μ M) peptidů 1 až 17 pro

předložené druhy testovaných bakterií, které zahrnují dva gramnegativní druhy, *Escherichia coli* a *Acinetobacter calcoaceticus* a dva grampozitivní druhy, *Bacillus megaterium* a *Bacillus subtilis*, a také % hemolýzy pro 50 μ M peptidů. Tabulka 2 ukazuje hodnoty MIC (v μ M) peptidů 1, 8, 12, 14 a mellitinu, dermaseptinu S a tetracyklinu pro některé druhy bakterií. Údaje ukazují, že, i přes snížený obsah α -helixů a pokles hemolytických účinků diastereomerických analogů 1 až 7, si tyto analogy ponechávají většinu silných antibakteriálních účinků původního peptidu pardaxinu, který je porovnatelný se známými přírodními antibakteriálními peptidy.

Tabulka 1

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky analogů diastereomerů pardaxinu

Peptid	Minimální útlumová koncentrace (μM)					Hemolýza %		
	E.coli (D 21)	A. calcoacet. (Ac11)	B. megater. (Bm11)	M. luteus (ATCC 9341)	S. typhimur. (LT2)	P. aeruginosa (ATCC 27853)	v 50 μM pep.	
1.	6	6	0.9	12.5	N.D	N.D	5	
2.	12.5	12.5	2.5	N.D ^a	N.D	N.D	0	
3.	130	>130	30	N.D	>130	>130	0	
4.	7.5	7.5	1.5	N.D	N.D	N.D	0	
5.	3.5	3.5	0.75	N.D	N.D	N.D	0	
6.	15	6	6	N.D	120	60	0	
7.	>120	>120	30	N.D	>120	>120	0	
8.	3	3	0.8	5	15	8	100	
9.	3	N.D	1.5	N.D	N.D	N.D	83	
10.	3	N.D	1.3	N.D	N.D	N.D	56	
11.	3	N.D	1.5	N.D	N.D	N.D	82	

Tabulka 1 - pokračování

12.	10	5	1.2	5	N.D	N.D	49
13.	30	15	3.5	N.D	>100	>100	23
14.	3.5	1.5	0.6	2.5	N.D	N.D	100
15.	15	3.5	1.7	N.D	60	60	44
16.	100	100	50	N.D	>100	>100	0
17.	10	N.D	1	N.D	N.D	N.D	17

a-N.D. - neurčeno

Tabulka 2

Minimální útlumová koncentrace (μM)^a peptidů

Bakterie	druh	8	12	14	1	Mellitín	Derma-septin S	Tetracyklin
<i>Escherichia coli</i>	D21	3	10	3.5	6	5	6	1.5
<i>A. calcoaceticus</i>	Ac11	3	5	2.5	6	2	3	1.5
<i>Bacillus megaterium</i>	Bm11	0.8	1.2	0.6	0.9	0.3	0.5	1.2
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC-6051	1.5	2	1.5	3	0.6	4	6.5

a. výsledky jsou středními hodnotami 3 nezávislých pokusů.

jednotlivě provedených duplikovaně se standardní odchylkou 20 %.

1.4 Destabilizace membrány vyvolaná peptidy odvozenými z pardaxinu. Běžné doposud studované vlastnosti všech α -helikálních, pozitivně nabitých, přírodně vzniklých antibakteriálních peptidů vyjadřují jejich schopnosti vzájemně působit na a pronikat negativně nabitě fosfolipidy lépe než zwitteriontové fosfolipidy. Význam těchto objevů pro jejich biologické cílové membrány byl přisuzován skutečnosti, že povrch bakterií obsahuje lipopolysacharidy (LPS, v gramnegativních bakteriích) a polysacharidy (kyseliny teichoové, v grampozitivních bakteriích), oba tyto jsou kyselé, zatímco normální savčí buňky (např. erytrocyty) obsahují převážně na jejich vnitřních vrstvách zwitteriontové fosfolipidové PC. Rozptyl difuzního potenciálu určujícího schopnosti peptidů pronikat membránami obou PC a PC/PS fosfolipidových vezikul (připravených podle metod zkoušek, odstavec v) byl zkoušen podle popisu v metod zkoušek, odstavec xi. Na obrázku 3 jsou znázorněny výsledky získané z peptidů 1, 8, 12, 14, které ukazují, že D-amino kyseliny inkorporované do pardaxinu nijak podstatně neovlivňují schopnost peptidů pronikat fosfolipidovými membránami. Avšak, peptid 1, diastereomer, který jediný je zbaven hemolytických účinků a který si zachovává svoje antibakteriální účinky, proniká negativně nabitě fosfolipidy podstatně lépe než zwitteriontové fosfolipidy. Tento diastereomer působí podobně jako přírodní antibakteriální peptidy i přesto, že je zbaven α -helikální struktury. Ztráta podstatných přechodných účinků peptidů 12 a 14 by mohla být vysvětlena skutečností, že oba tyto peptidy mají jak hydrofobní N-helixovou tak i amfipatickou C-helixovou celistvost, která je dostatečná pro podporu silné vazby na oba typy vezikul prostřednictvím hydrofobního vzájemného působení.

1.5 Zviditelnění lýzy bakterií použitím elektronové mikroskopie.

Vliv peptidů odvozených od pardaxinu na morfologii neošetřených a ošetřených bakterií byl zviditelněn použitím negativní barevné elektronové mikroskopie podle popisu metod zkoušek, odstavec xx. Peptidy byly aplikovány na bakterie v hodnotách jejich MIC nebo

nižších při stejných podmínkách, které byly použity pro anti-bakteriální zkoušku (podívejte se na příklad 1.3 výše). Vzorky byly vyjmuty po 18 hodinách inkubace, ihned byly ustáleny a testovány přechodovou elektronovou mikroskopií. Obrázek 4 ukazuje snímané grafy získané s nehemolytickým analogem 1 [D]P7L¹⁸L¹⁹-TAPar jako příklad. Bylo shledáno, že při MIC peptid 1 lýzoval bakterie zcela a pozorovány mohly být pouze malé fragmenty (obrázek 4C). Avšak při koncentraci nižší než MIC byly pozorovány stopy na bakteriální hradbě (obrázek 4B). Tyto stopy by mohly indikovat původní krok zahrnutý v procesy lýzy.

Příklad 2 - Syntéza a biologické účinky diastereomerů odvozených od mellitinu

2.1 Syntéza. Čtyři diastereomery mellitinu byly syntetizovány s cílem provést další zkoušky funkce α -helikální struktury cytolysinů při jejich cytotoxické reakci proti savčím buňkám a bakteriím a také pro větší porozumění mechanismu skrývajícím se pod těmito reakcemi.

Mellitin je 26-mer peptidu s posloupností:

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

Modifikace molekuly mellitinu s cílem upravit pozitivní náboj byla provedena přeměnou C-koncové jednotky mellitinu nebo jeho fragmentů na pozitivní reakcí karboxylové skupiny C-koncové jednotky s ethylendiaminem v diastereomerech mellitinu, ve kterých N-helix a C-helix byly přeměněny zaměněním dvou Val zbytků na pozici 5 a 8 mellitinu, Ile zbytku na pozici 17 a Lys zbytku na pozici 21 za D-Val, D-Ile a D-Lys zbytky, jednotlivě (na tomto místě v textu [D]-V⁵V⁸I¹⁷K²¹).

Následující diastereomery odvozené z mellitinu byly shledány jako nehemolytické, projevující selektivní cytolytické účinky (tučná a podtržená označení zbytků jsou D-amino kyseliny);

18. [D]-V⁵V⁸I¹⁷K²¹-mel s posloupností:

Gly-Ile-Gly-Ala-**Val**-Leu-Lys-**Val**-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-
-**Ile**-Ser-Trp-Ile-**Lys**-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

19. [D]-V⁵V⁸I¹⁷K²¹-mel-COOH s posloupností:

Gly-Ile-Gly-Ala-**Val**-Leu-Lys-**Val**-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-
-**Ile**-Ser-Trp-Ile-**Lys**-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-COOH

20. [D]-V⁵V⁸I¹⁷K²¹-[1 až 22]-TAmel s posloupností:

Gly-Ile-Gly-Ala-**Val**-Leu-Lys-**Val**-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-**Ile**-
-Ser-Trp-Ile-**Lys**-Arg-NH-CH₂-CH₂-NH₂

21. [D]-V⁵V⁸I¹⁷K²¹-[4 až 22]-TAmel s posloupností:

Ala-**Val**-Leu-Lys-**Val**-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-**Ile**-Ser-Trp-Ile-
-**Lys**-Arg-NH-CH₂-CH₂-NH₂

Peptidy 18 až 21 byly následně charakterizovány s ohledem na jejich strukturu, biologickou funkci a vzájemné působení proti bakteriím a membránové modely složené buď ze zwitteriontových nebo negativně nabitých fosfolipidů.

2.2 CD spektroskopie. Rozsah α -helikální struktury peptidů 18 a 19 byl určen z jejich CD spekter v 40 % TFE, rozpouštědle silně podporujícím α -helikální strukturu. α -helikální obsah diastereomerů byl podle očekávání mnohem nižší (80 % pokles) než u mellitinu, určeno podle odrazu minimálních hodnot v 208 nm a 222 nm (obrázek 5). Obsah α -helixů mellitinu byl 73 % v porovnání s 15 % a 7 % obsahem v jeho diastereomerech 18 a 19, jednotlivě.

2.3 Antibakteriální a hemolytické účinky diastereomerů mellitinu 18 až 21. Byly zkoumány hemolytické účinky peptidů 18 až 21 proti hRBC a jejich útlumové účinky proti růstu různých druhů bakterií. Antibiotický tetracyklin sloužil v antibakteriální zkoušce jako kontrolní látka. Byla získána reakční křivka hemolytických účinků v závislosti na dávkování peptidů (obrázek 6). Tabulka 3 znázorňuje hodnoty MIC pro předložené druhy testovaných bakterií. Může být pozorováno, že inkorporace D-amino kyselin do mellitinu dramaticky snižuje jeho hemolytické účinky, což odpovídá ztrátě α -helikálního obsahu u odpovídajících analogů. Mellitin

s nejvyšším α -helikálním obsahem byl nejvíce hemolytický až do maximální testované koncentrace (50 μ M), zatímco peptidy 18 a 19 s nejnižším α -helikálním obsahem byly prakticky zbaveny hemolytických účinků. Avšak, navzdory drastickému snížení hemolytických účinků u diastereomerů mellitinu 18 a 19, oba tyto diastereomery si uchovávaly většinu silných antibakteriálních účinků původního peptidu. Dále, antibakteriální účinky peptidu 19 byly pouze mírně nižší než peptidu 18, což ukazovalo, že amidová skupina na C-koncové jednotce mellitinu nepřispívá nikterak významně k antibakteriálním účinkům. Opačně je známo, že cekropin s volnou karboxylovou C-koncovou jednotkou měl výrazně nižší antibakteriální účinky než přírodního cekropin s amidovanou C-koncovou jednotkou (Li a spol., 1988).

Tabulka 3

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky analogů diastereomerů mellitinu						
Označ. peptidů	E.coli (D21)	A.calcoaceticus (Ac11)	Minimální útlumová koncentrace (μM)			
			B.megaterium (Bm11)	M.luteus (ATCC 9341)	B.subtilis (ATCC 6051)	% hemolýzy v 50 μM pept.
Mellitin	5	20	0.3	0.4	0.4	100
18	12	12	0.8	25	3.5	0
19	18	18	1.2	50	8	0
20	8	7	0.8	29	N.D	0
21	21	14	1.2	28	N.D	0
Dermaseptin S	6	3	0.5	N.D	4	9
Tetracyklin	1.5	1.5	1.2	N.D	6.5	—

2.4 Studie bakteriální lýzy elektronovou mikroskopií. Vliv peptidu 18 na morfologii neošetřených a ošetřených bakterií byl zviditelněn použitím přechodové elektronové mikroskopie. Podle ukázek na obrázku 7 způsobil peptid 18 v MIC celkovou lýzu bakterií (obrázek 7C). Avšak, při koncentracích nižších než MIC byly pozorovány stopy bakteriální stěny (obrázek 7B). Tyto stopy by mohly představovat původní krok lytického procesu.

2.5 Způsob vzájemného působení s fosfolipidovými membránami. Protože biologické účinky peptidů 18 a 19 byly podobné, byla porovnávána pouze forma vzájemného působení peptidu 18 a modelových fosfolipidových membrán s formou působení mellitinu s cílem objasnit podstatu pozorované membránové selektivity. Za tímto účelem byla měřena schopnost peptidů rozptýlit difuzní potenciál vytvořený jak v PC a PC/PS vezikulách, dále byly určeny rozdělovací koeficienty peptidů u obou typů vezikul a rozšíření peptidů, pokud jsou tyto vázány k membránám.

2.5.1 Průchod membránou vyvolaný peptidy. Různé koncentrace mellitinu a peptidu 18 byly promíchávány s vezikulami, které byly nejdříve ošetřeny fluorescenčním barvivem diS-C₂-5 a valinomycinem. Kinetika obnovy fluorescence byla zachycena časem a dále byla stanovena maximální úroveň dosažená jako funkce koncentrace peptidu. Podle ukázky na obrázku 18, jak mellitin tak i peptid 18 měly podobný vliv na propustnost membrán PC/PS vezikul ukazující, že inkorporace D-amino kyselin do mellitinu nikterak neovlivňuje schopnost výsledného diastereomeru pronikat negativně nabitě fosfolipidové (PS/PC) membrány. Avšak, zatímco mellitin byl vysoce aktivní s PC vezikulami, diastereomer byl zcela zbaven schopnosti pronikat membrány PC vezikul (až do maximální zkoušené koncentrace).

2.5.2 Studie vazeb. Neschopnost diastereomeru 18 proniknout PC vezikuly se může projevovat vzhledem k jeho neschopnosti se vázat na PC vezikuly, nebo alternativně se tento může vázat na PC vezikuly, ale jakmile je jednou vázán nemůže se dále vpravit do

struktury a tím vyvolat proniknutí membránou. Studie vazeb byly provedeny s cílem rozlišit mezi těmito dvěma možnostmi. Samostatný Trp zbytek na pozici 19 peptidu 18 byl použit pro vnitřní fluorescenční zkoušku sledující jeho vazby na PC a PC/PS vezikuly. Ustálená koncentrace ($+ 0,5 \mu\text{M}$) peptidu byla titrovaná s požadovanými vezikulami (PC nebo PC/PS) a v případě vzniku vazby bylo pozorováno zvýšení v intenzitě fluorescence. Nákresem výsledných zvýšení intenzit fluorescence Trp jako funkce molárního poměru lipidu:peptidu vznikly běžné vazebné křivky (obrázek 9A). Vazebná křivka peptidu 18 na PC/PS odhaluje, že téměř všechny molekuly peptidu byly vázány na vezikuly v molárním poměru lipidu:peptidu 100:1. Avšak, při zkoušce s PC vezikulami nebylo pozorováno žádné čisté zvýšení fluorescence Trp, a to ani v případě maximálního testovaného molárního poměru lipidu:peptidu, což ukazovalo, že peptid se na PC vezikuly neváže. Isotermy vazeb byly vytvořeny nákresem X^*_b (molární poměr vázaného peptidu na 60 % celkového lipidu) oproti C_f (rovnovážná koncentrace volného peptidu v roztoku) (obrázek 5B). Povrchové rozdělovací koeficienty byly určeny extrapolací původních směrníc křivky pro nulové C_f hodnoty. Hodnota odhadu povrchového rozdělovacího koeficientu Kp^* peptidu 18 byla $1,1 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (získáno ze čtyř měření). Tato hodnota je podobná hodnotě uvedené pro vazby mellitinu k fosfatidylglycerol/fosfatidylcholinu ($4,5 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Beschiaschvili a Seelig, 1990).

Tvar vazebné isotermy peptidu může poskytovat informace o uspořádání peptidů v membránách (Schwarz a spol., 1987). Isotermna vazeb peptidu 18 má ohyb směrem dolů naznačující negativní součinnost. Možné vysvětlení této negativní součinnosti je, že při nízké koncentraci je peptid 18 vázaný na PS/PC obohacen negativním nábojem fosfolipidových hlavních skupin, porovnáno s částečnou rovnováhou bez vlivu náboje. V dodatku, peptid, podle vazby na membránu, částečně neutralizuje negativní náboj povrchu membrány. Avšak, jakmile je náboj povrchu membrány neutralizován,

další vazba peptidu 18 není snadná, protože dominantním faktorem se stává odpudivost podobných nábojů. Podobné výsledky byly získány při studiích vazby mellitinu k negativně nabitým fosfolipidovým membránám (Batenburg a spol., 1987; Beschiaschvili a Seelig, 1990). Zajímavostí je, nepodobně u mellitinu, který se silně váže také k PC vezikulám (Kuchinka a Seelig, 1989), že peptid 18 se na PC vezikuly neváže.

2.6 Zkoušky útlumu (ochlazení) tryptofanu. Tryptofanový zbytek, přírodně se vyskytující v posloupnosti proteinu nebo peptidu, může sloužit jako intrinsická sonda lokalizace peptidu uvnitř membrány. Mellitin obsahuje tryptofanový zbytek na pozici 19 N-koncové strany C-helixu. U mellitinu i peptidu 18 bylo pozorováno největší utlumení tryptofanové fluorescence s 6,7-Br-PC/PS vezikulami (obrázek 10). Nižší útlum byl pozorován s 9,10-Br-PC/PS a nejnižší s 11,12-Br-PC/PS. Tyto výsledky podle vazby na vezikuly ukazují, že peptidy byly rozmístěny v blízkosti hlavních skupin fosfolipidů.

Příklad 3 - Syntéza a biologické účinky modelových Lys/Leu diastereomerů

3.1 Specifikace Lys/Leu diastereomerů. Byly syntetizovány šest diastereomerů krátkých lineárních modelových 12-mer peptidů tvořených různými poměry lysinu a leucinu s cílem (1) prověřit dostatečnost kritéria rovnováhy mezi hydrofobností a čistým pozitivním nábojem nezbytného pro selektivní bakteriální lyzu a (2) získat přehled o mechanismu, který se skrývá pod těmito účinky. V první řadě modelových Lys/Leu 12-mer peptidů 22 až 25, byla jedna třetina jejich posloupnosti tvořena D-amino kyselinovými zbytky. Rozmístění D-amino kyselin vytvořené pro maximální rozrušení α -helikální struktury zůstávalo ve všech peptidech konstantní. D-amino kyseliny byly rozmístěny v peptidu tak, aby ponechávaly pouze velmi krátké úseky 1 až 3 posloupných L-amino

kyselin. Byly syntetizovány následující peptidy:

22. [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-NH₂

23. [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈ a posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

24. [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

25. [D]-L^{3,4,8,10}-K₇L₅ s posloupností:

Lys-Lys-Leu-leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-NH₂

V druhé řadě modelových Lys/Leu 12-mer peptidů 26 až 27 byly dvě třetiny jejich posloupnosti tvořeny D-amino kyselinovými zbytky umístěnými na přesných pozicích L-amino kyselinových zbytků peptidů 23 a 24 následovně:

26. [D]-K^{1,5,9,12}L^{2,6,7,11}-K₄L₈ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

27. [D]-K^{1,5,7,9,12}L^{2,6,11}-K₅L₇ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

Ve třetí řadě modelových Lys/Leu peptidů byly syntetizovány 6-mer a 8-mer diastereomery (peptid 28 a 29, jednotlivě):

28. [D]-L^{2,4}-K₂L₄ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys

29. L^{2,4,6}-K₃L₅ s posloupností:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

Podle vynálezu byly syntetizovány další diastereomery:

30. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

31. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

32. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

3.2 Syntéza Lys/Leu diastereomerů. Peptidy byly syntetizovány podle popisu metod zkoušek, odstavec (ii). Peptidy byly následně charakterizovány s ohledem na jejich strukturu, biologickou funkci a vzájemné působení s bakteriemi a modelovými membránami tvořenými buď zwitteriontovými nebo negativně nabitými fosfolipidy.

3.3 Hydrofobnost. Hydrofobnost a čistý pozitivní náboj peptidů 22 až 25 jsou uvedeny v tabulce 4. Střední hodnoty hydrofobnosti byly propočteny použitím dohodnuté hodnoty stupnice hydrofobnosti (Eisenberg a spol., 1984). Přímá korelace byla podle ukázky na obrázku 11 shledána mezi hydrofobností a časem retence peptidů, tato naznačuje, že struktura se nikterak významně nepodílí na celkových hydrofobních vzájemných vlivech se stacionární fází.

Tabulka 4

Hydrofobicita a čistý náboj Leu/Lys diastereomerů

Označení peptidu	Čistý náboj	Hydrofobicita
22.	+ 4	0,12
23.	+ 5	- 0,01
24.	+ 6	- 0,15
25.	+ 8	- 0,42

3.4 CD spektroskopie. Rozsah α -helikální struktury diastereomerů 22 až 25 byl určen z jejich CD spekter v 40 % TFE. Podle očekávání, následně po inkorporaci D-amino kyselin, nebyl ani u jednoho z diastereomerů pozorován žádný znak, který by prokazoval ztrátu jakékoliv specifické sekundární struktury (údaje nejsou uvedeny). Podle současných výzkumných prací by mělo být uvedeno, že peptid s posloupností totožnou s posloupností peptidu 23, který je však tvořen pouze L-amino kyselinami, obsahuje přibližně 40 % α -helikální struktury v methanolu a v DMPC vezikulách (Cornut a spol., 1994).

3.5 Antibakteriální a hemolytické účinky peptidů 22 až 29. Byly testovány hemolytické účinky peptidů 22 až 29 proti hRBC. Reakční

křivka hemolytických účinků podle dávkování peptidů 22 až 25 je znázorněna na obrázku 12, ve kterém hemolytické účinky mellitinu sloužily jako kontrolní údaje. Přímý vzájemný vztah byl zjištěn mezi hydrofobností (tabulka 4) a hemolytickými účinky diastereomerů. Peptid 22, [D]-L^{3,4,8,10}-K₃L₉, který má nejvyšší hydrofobnost, byl nejvíce hemolytickým peptidem. Jeho hemolytické účinky jsou však v porovnání s mellitinem velmi nízké (>60 krát nižší účinky). Všechny další peptidy až do maximální testované koncentrace (100 μ M) neprojevovaly výrazné hemolytické účinky. Hemolytické účinky peptidů 22 až 29 jsou znázorněny v tabulce 5. Mělo by být uvedeno, že ačkoliv peptid 23, [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈, není při koncentracích rovnajících se >100 násobku koncentrace požadované pro výraznou hemolýzu vyvolanou mellitinem hemolytický, jeho ucelená L-amino kyselinová forma projevila v nedávných výzkumech hemolytické účinky podobné hemolytickým účinkům melittinu (~ 5 krát nižší) (Cornut a spol., 1994).

Byly také provedeny testy antibakteriálních účinků peptidů 22 až 29 proti předloženým druhům bakterií, ve kterých tetracyklin, dermaseptin S a melittin sloužily jako kontrolní látky. Výsledné MIC jsou uvedeny v tabulce 5. Údaje ukazují, že antibakteriální účinky diastereomerů 22 až 29 byly modulovány rovnováhou mezi hydrofobností a pozitivně nabitými amino kyselinami. Jak nejvíce hydrofobní peptid 22 tak i nejvíce hydrofilní peptid 25 projevují nejnižší úroveň antibakteriálních účinků (tabulka 5). Avšak, peptidy 23 a 24 projevovaly vysoké antibakteriální účinky proti většině testovaných bakterií, dříve uvedený projevoval mírně silnější účinky. Dále, každý peptid měl jednoznačné spektrum antibakteriálních účinků a všechny byly účinnější proti grampozitivním bakteriím ve srovnání s účinky proti gramnegativním bakteriím.

3.6 Synergické vlivy mezi tetracyklinem a Lys/Leu diastereomery v séru. Pro zkoušky možného synergického vztahu mezi antibiotickým tetracyklinem a diastereomery byl tetracyklin testován

při 2-násobném sériové ředění proti *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) za přítomnosti konstantní ekvimolární koncentrace ($1 \mu\text{M}$) peptidu 24 [D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇. Antibakteriální účinky směsi byly určeny podle popisu metod zkoušek, odstavec (xii). Synergický vliv byl pozorován mezi tetracyklinem a diastereomerem 24. Tetracyklin projevoval malé účinky proti *P. aeruginosa*. Avšak, jestliže je tetracyklin smíchán s $1 \mu\text{M}$ roztokem peptidu 24, bylo pozorováno, že koncentrace, která je 10 krát nižší než koncentrace požadovaná pro lytické účinky proti *P. aeruginosa*, 8 krát zvyšuje účinky tetracyklinu (tabulka 6). Možné vysvětlení synergický vlivů je, že peptid lehce narušuje bakteriální hradbu, což zvyšuje rozložení tetracyklinu do bakterií. Toto vysvětlení je podpořeno studiemi elektronové mikroskopie, která ukazuje, že peptid 24, při koncentraci nižší než je jeho MIC, vyvolá morfologické změny v bakteriální hradbě (obrázek 14). V dodatku, vliv spojeného lidského séra na antibakteriální účinky peptidu 24 a přírodního antibakteriálního peptidu dermaseptinu proti *P. aeruginosa* a *E. coli* byl shledán značně rozdílným (tabulka 6). Zatímco dermaseptin byl za přítomnosti séra 8 až 10 krát méně aktivní, peptid 24 si uchoval jeho antibakteriální účinky.

Tabulka 5

Minimální útlumová koncentrace (μM) peptidů		Minimální útlumová koncentrace a (μM)					% hemolýzy ve 100 μM
Označ.	peptidů	<i>E.coli</i> (D21)	<i>A.calcoaceticus</i> (Ac11)	<i>P.aeruginosa</i> (ATCC-27853)	<i>B.megaterium</i> (Bm11)	<i>B.subtilis</i> (ATCC-6051)	
22		9	20	125	0.7	1.1	58
23		3.5	4	10	0.4	0.5	0
24		7	20	10	0.25	2	0
25		80	200	>200	1	100	0
26		4	N.D	N.D	0.5	N.D	0
27		7	N.D	N.D	0.2	N.D	0
28		200	N.D	N.D	50	N.D	0
29		3	N.D	N.D	3	N.D	0
Dermaseptin S	6		3	25	0.5	4	-
Mellitin	5		2	25	0.3	0.6	-
Tetracyklin	1.5		1.5	50	1.2	6.5	-

a. výsledky jsou středními hodnotami 3 nezávislých pokusů, jednotlivě provedených duplikovaně se standardní odchylkou 20 %, ard deviation of 20%

Tabulka 6

Minimální útlumová koncentrace (μM)^a za přítomnosti lidského séra
a synergické účinky peptidu 24.

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidu	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC-27853)		<i>E. coli</i> (D21)	
	0 % séra	33 % séra	0 % séra	33 % séra
24	10	10	7	7
Dermaseptin S	25	200	6	50
Tc ^b	50			
Tc+24 (1 μM)	6			

^a Výsledky jsou středními hodnotami 2 nezávislých pokusů, každý proveden dvakrát se standardní odchylkou 20 %.

^b Tc – Tetracyklin

3.7 Peptidem vyvolané proniknutí membránou. Různé koncentrace peptidů byly smíchány s vezikulami, které byly nejdříve upraveny fluorescenčním barvivem diS-C₂-5 a valinomycinem. Byla zaznamenána kinetika obnovy fluorescence, maximální úroveň fluorescence byla určena jako funkce koncentrace peptidu (obrázek 13).

PC/cholesterol vezikuly (10:1) sloužily jako modelové fosfolipidové prostředky vnější vrstvy erytrocytů (Verkleij a spol., 1973) a PE/PG vezikuly (7:3) byly použity jako modely fosfolipidového prostředku *E. coli* (Shaw, 1974). Přímý vzájemný vztah byl zjištěn mezi účinky peptidů, které pronikají modelovými fosfolipidovými membránami, a jejich lytickými účinky proti erytrocytům

a *E. coli*. Zwitteriontovými fosfolipidovými vezikulami pronikl pouze hemolytický peptid 22. Dále, schopnost peptidů pronikat PE/PG vezikulami byla ve vzájemném vztahu s antibakteriálními účinky peptidů proti *E. coli* (tabulka 5). Peptid 25, který má nejnižší antibakteriální účinky, měl v porovnání s dalšími třemi peptidy 22 až 24 výrazně sníženou schopnost pronikat PE/PG vezikulami.

3.8 Studie elektronové mikroskopie bakteriální lýzy. Vliv diastereomerů 22 až 25 na morfologii ošetřených *E. coli* byl zviditelněn použitím přechodové elektronové mikroskopie. Všechny peptidy vyvolaly při jejich MIC celkovou lýzu bakterií (údaje nejsou uvedeny). Avšak, jestliže peptidy byly použity v koncentracích odpovídajících 80 % jejich MIC, byly pozorovány některé rozdíly v morfologii ošetřených bakterií podle použitého peptidu. Nejvíce hydrofobní peptid 22 vyvolal nejvyšší poškození buněčné stěny a membrány, zatímco nejméně hydrofobní peptid 25 vyvolal pouze lokální poruchy (obrázek 14).

Příklad 4. - Syntéza a biologické účinky modelových Lys/Ala a Lys/Val diastereomerů.

4.1 Specifikace diastereomerů. Pro další zkoušky dostatečnosti modulace hydrofobicity a čistého pozitivního náboje lineárních cytotoxických peptidů vyvolávajících selektivní antibakteriální účinky, byly syntetizovány dva další modelové 12-mer peptidy 33 a 34 až 37 tvořené Lys/Ala nebo Lys/Val zbytky, jednotlivě, které měly alespoň jednu třetinu jejich posloupnosti tvořenou D-Ala nebo D-Val zbytky:

33. [D]-A^{3,4,8,10}-K₄A₈ s posloupností:

Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-NH₂

34. [D]-V^{3,4,8,10}-K₄V₈ s posloupností:

Lys-Val-Val-Val-Lys-Val-Val-Val-Lys-Val-Val-Lys-NH₂

35. Lys-Val-Val-Val-Lys-Val-Lys-Val-Lys-Val-Val-Lys

36. ~~Lys-Val-Val-Val~~-Lys-Val-Lys-~~Val~~-Lys-~~Val-Val~~-Lys

37. Lys-Val-~~Val~~-Val-~~Lys~~-Val-Lys-~~Val-Lys~~-Val-~~Val~~-Lys

4.2 Syntéza. Lys/Ala a Lys/Val diastereomery byly syntetizovány podle popisu, který je uveden v části "Metody zkoušek" (Experimentální procedury), část (ii).

4.3 Antibakteriální a hemolytické účinky. Peptidy 33 a 34 byly testovány proti *E. coli*, *B. megaterium* a hRBC. Výsledky v tabulce 7 ukazují, že oba modely diastereomerů jsou antibakteriální a nehemolytické:

Tabulka 7

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky peptidů 28 a 29

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidů	<i>E. coli</i> (D 21)	<i>B. megaterium</i> (Bm11)	% hemolýzy při 100 μM
33	12	1	0
34	3,5	0,8	0

Příklad 5 – Syntéza dalších modelových diastereomerů

Byly syntetizovány následující modelové diastereomery podle vynálezu tvořené posloupností 6, 8, 12, 14, 16, 19, 25, 26 a 30 zbytků dvou, tří nebo více různých amino kyselin:

38. Lys-~~Leu~~-Ile-Leu-Lys-~~Leu~~

39. Lys-~~Val~~-Leu-His-Leu-~~Leu~~

40. Leu-~~Lys~~-Leu-Arg-Leu-~~Leu~~

41. Lys-Pro-Leu-~~His~~-Leu-Leu
42. Lys-~~Leu-Ile-Leu~~-Lys-~~Leu~~-Val-Arg
43. Lys-~~Val~~-Phe-~~His-Leu-Leu~~-His-Leu
44. ~~His-Lys~~-Phe-~~Arg~~-Ile-~~Leu-Lys~~-Leu
45. Lys-Pro-Phe-His-~~Ile~~-Leu-His-Leu
46. ~~Lys-Ile~~-Ile-Ile-Lys-~~Ile~~-Lys-~~Ile~~-Lys-Ile-~~Ile~~-Lys
47. Lys-~~Ile-Ile-Ile~~-Lys-Ile-Lys-~~Ile~~-Lys-~~Ile-Ile~~-Lys
48. ~~Lys-Ile-Ile-Ile~~-Lys-Ile-Lys-~~Ile-Lys~~-Ile-~~Ile~~-Lys
49. Lys-Ile-Pro-Ile-Lys-Ile-~~Lys~~-Ile-Lys-Ile-Pro-Lys
50. Lys-Ile-Pro-Ile-Lys-~~Ile~~-Lys-Ile-Lys-~~Ile~~-Val-Lys
51. Arg-~~Ile-Ile-Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-Ile-~~Ile~~-Arg
52. Arg-~~Ile-Ile-Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile-Ile~~-Arg
53. ~~Arg-Ile-Ile-Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-Ile-~~Ile~~-Arg
54. Arg-~~Ile~~-Val-Ile-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-Leu-~~Ile~~-Arg
55. Arg-~~Ile-Ile-Val~~-Arg-Ile-Arg-~~Leu~~-Arg-~~Ile-Ile~~-Arg
56. Arg-Ile-~~Gly~~-Ile-~~Arg~~-Leu-Arg-~~Val-Arg~~-Ile-~~Ile~~-Arg
57. Lys-~~Ile~~-Val-Ile-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-Leu-~~Ile~~-Arg
58. Arg-~~Ile-Ala-Val~~-Lys-Trp-Arg-~~Leu~~-Arg-~~Phe-Ile~~-Lys
59. Lys-Ile-~~Gly~~-Trp-~~Lys~~-Leu-Arg-~~Val-Arg~~-Ile-~~Ile~~-Arg
60. Lys-~~Lys~~-Ile-~~Gly~~-Trp-Leu-~~Ile~~-Ile-Arg-~~Val-Arg~~-Arg
61. Arg-~~Ile~~-Val-Ile-Arg-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg-Leu-~~Ile~~-Arg-~~Ile~~-Arg
62. ~~Arg-Ile-Ile-Val~~-Arg-Ile-Arg-~~Leu~~-Arg-~~Ile-Ile~~-Arg-~~Val-Arg~~
63. Arg-Ile-~~Gly~~-Ile-~~Arg~~-Leu-Arg-~~Val-Arg~~-Ile-~~Ile~~-Arg-Arg-~~Val~~
64. ~~Lys-Ile~~-Val-Ile-Arg-~~Ile-Arg~~-Ala-Arg-Leu-~~Ile~~-Arg-Ile-Arg-
-~~Ile-Arg~~
65. Arg-~~Ile-Ile-Val~~-Lys-Ile-~~Arg-Leu~~-Arg-~~Ile-Ile~~-Lys-~~Lys-Ile~~-Arg-
-~~Leu~~
66. ~~Lys-Ile-Gly~~-Ile-~~Lys~~-Ala-Arg-~~Val-Arg~~-Ile-~~Ile~~-Arg-~~Val-Lys~~-Ile-
-~~Ile~~
67. Arg-~~Ile-Ile-Val~~-His-Ile-~~Arg-Leu~~-Arg-~~Ile-Ile~~-His-~~His-Ile~~-Arg-
-~~Leu~~
68. ~~His-Ile-Gly~~-Ile-~~Lys~~-Ala-His-~~Val-Arg~~-Ile-~~Ile~~-Arg-~~Val-His~~-Ile-
-~~Ile~~

69. Arg-Ile-Tyr-Val-Lys-Ile-His-Leu-Arg-Tyr-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu
70. Lys-Ile-Gly-His-Lys-Ala-Arg-Val-His-Ile-Ile-Arg-Tyr-Lys-Ile-
-Ile
71. Arg-Ile-Tyr-Val-Lys-Pro-His-Pro-Arg-Tyr-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu
72. Lys-Pro-Gly-His-Lys-Ala-Arg-Pro-His-Ile-Ile-Arg-Tyr-Lys-Ile-
-Ile
73. Lys-Ile-Val-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-Arg-Leu-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-
-Arg-Lys-Ile-Val
74. Arg-Ile-Ile-Val-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu-Ile-Lys-Lys
75. Lys-Ile-Gly-Trp-Lys-Leu-Arg-Val-Arg-Ile-Ile-Arg-Val-Lys-Ile-
-Gly-Arg-Leu-Arg
76. Lys-Ile-Val-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-Arg-Leu-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-
-Arg-Lys-Ile-Val-Lys-Val-Lys-Arg-Ile-Arg
77. Arg-Phe-Ala-Val-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-Lys-Arg-Val-Ile--Lys
78. Lys-Ala-Gly-Trp-Lys-Leu-Arg-Val-Arg-Ile-Ile-Arg-Val-Lys-Ile-
-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ile-Gly-Trp-Lys-Lys-Arg-Val-Arg-Ile-Lys
79. Arg-Ile-Tyr-Val-Lys-Pro-His-Pro-Arg-Tyr-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu
80. Lys-Pro-Gly-His-Lys-Ala-Arg-Pro-His-Ile-Ile-Arg-Tyr-Lys-Ile-
-Ile
81. Lys-Ile-Val-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-Arg-Leu-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-
-Arg-Lys-Ile-Val
82. Arg-Ile-Ile-Val-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu-Ile-Lys-Lys
83. Arg-Ile-Tyr-Val-Ser-Lys-Ile-Ser-Ile-Tyr-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-
-Leu
84. Lys-Ile-Val-Ile-Phe-Thr-Arg-Ile-Arg-Leu-Thr-Ser-Ile-Arg-Ile-
-Arg-Ser-Ile-Val

85. Lys-Pro-Ile-His-Lys-Ala-Arg-Pro-Thr-Ile-Ile-Arg-Tyr-Lys-Met-
-Ile

Příklad 6 - Syntéza a biologické účinky cyklických diastereomerů

6.1 Specifikace. Byly syntetizovány následující cyklické deriváty diastereomerů fragmentů pardaxinu s cysteinovými zbytky jak na N- tak i C- koncových jednotkách:

86. Cyklický K¹[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

87. Cyklický K¹K²[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

88. Cyklický K¹K²K³[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-
-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

Byly syntetizovány následující deriváty diastereomerů různých amino kyselinových zbytků s cysteinovými zbytky jak na N- tak i na C- koncových jednotkách:

89. Cyklický Cys-Arg-Ile-Val-Ile-Arg-Ile-Arg-Ile-Arg-Leu-Ile-
-Arg-Ile-Arg-Cys

90. Cyklický Cys-Lys-Pro-Gly-His-Lys-Ala-Arg-Pro-His-Ile-Ile-Arg-
-Tyr-Lys-Ile-Ile-Cys

91. Cyklický Cys-Arg-Phe-Ala-Val-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-Ile-Ile-
-Lys-Lys-Ile-Arg-Leu-Ile-Lys-Lys-Ile-Arg-Lys-Arg-Val-Ile-Lys-Cys

92. Cyklický Cys-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Cys

93. Cyklický Cys-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys

Byly syntetizovány následující cyklické deriváty diastereomerů různých amino kyselinových zbytků bez přítomnosti cysteinových zbytků jak na N-koncové části, tak i na C-koncové části:

94. HN-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-CO



95. HN-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-CO



6.2 Syntéza cyklických diastereomerů. Cyklické peptidy s přítomností cysteinových zbytků jak na N- tak i na C- koncových jednotkách peptidů nebo bez přítomnosti těchto zbytků byly syntetizovány pevnou fázovou metodou podle popisu metod zkoušek, část (ii). Cyklizace bez přítomnosti cysteinu byla provedena ochráněním N-koncové části, aktivací C-koncové části, deprotekcí N-koncové části a reakcí C- a N-koncových skupin, zatímco tyto stále zůstávaly vázány na pryskyřici. Po HF štěpení a RP-HPLC čištění byly peptidy rozpuštěny v malé koncentraci PBS (pH 7,3) a cyklizace byla dokončena po 12 hodinách. Cyklické peptidy byly dále čištěny na RP-HPLC a podrobeny analýze amino kyselin ověřující jejich složení a SDS-PAGE ověřující jejich monomerní stav.

6.3 Antibakteriální a hemolytické účinky. Peptidy 86 až 88 byly testovány proti *E. Coli*, *B. megaterium* a hRBC. Výsledky v tabulce 8 ukazují, že všechny tři cyklické diastereomery odvozené z pardaxinu jsou antibakteriální a nehemolytické:

Tabulka 8

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky
cyklických diastereomerů odvozených od pardaxinu

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidu	<i>E. coli</i> (D21)	<i>B. megaterium</i> (Bm11)	% hemolýzy v 100 μM
86	30	10	0
87	15	6	0
88	7,5	2	0

6.4 Antibakteriální a hemolytické účinky. Peptidy 92 až 95 byly testovány proti *E. coli*, *B. subtilis* a *P. aeruginosa*. Výsledky v tabulce 8a ukazují, že všechny čtyři cyklické diasteremey jsou antibakteriální a nehemolytické.

Tabulka 8a

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky
cyklických diastereomerů

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Ozn. peptidu	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	% hemolýzy v 50 μM
92	12,5	1,2	25	0
93	15	5	25	0
94	12,5	1,5	30	0
95	15	6	20	0

Příklad 7 – Syntéza a biologické účinky "svázaných" Lys/Leu
diastereomerů peptidu

7.1 Specifikace. Použitím peptidu 23 jako vzoru a peptidu 23 nebo 24 obsahujícího dodatečné cysteinové zbytky na C-koncové jednotce (23C a 24C) jako monomeru, jednotlivě, byly připraveny následující "svázané" posloupnosti:

96. ([D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈C)₅ [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈ s posloupností:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-NH₂)₅-
-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

97. ([D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇C)₅-[D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₉ s posloupností:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-NH₂)₅-
-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

7.2 Syntéza. DCC a kyselina bromooctová v molárním poměru 1:1 byly ponechány reagovat v DMSO při teplotě 25 °C po dobu 1 hodiny s cílem připravit diastereomer vázaný na vzoru. Do reakční směsi byl dodán vzor (peptid 23) a směs byla ponechána promíchávat po dobu 12 hodin, DMSO bylo následně lyofilizováno. Zůstávající kyselina bromooctová byla podrobena extrakci se suchým etherem. Reakční směs byla následně ponechána reagovat po dobu 1 hodiny s přebytkem diastereomerů 23C a 24C obsahujících cysteinové zbytky na jejich C-koncových jednotkách v PBS pH 7,3 při teplotě 25 °C. Diastereomery 96 a 97 vázané na vzoru byly dále čištěny použitím RP-HPLC a posouzeny prostřednictvím SDS-PAGE ověřující jejich soudržné stavy.

7.3 Antibakteriální a hemolytické účinky. Diastereomery 92 a 93 vázané na vzoru byly testovány proti *E. coli*, *B. megaterium* a hRBC. Výsledky v tabulce 9 ukazují, že obě svázané posloupnosti jsou antibakteriální a nehemolytické.

Tabulka 9

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické působení diastereomerů

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidu	<i>E. coli</i> (D21)	<i>B. megaterium</i> (Bm11)	% hemolýza ve 100 μM
96	0,2	0,05	0
97	0,1	0,02	0

Příklad 8 - Syntéza a biologické účinky směsí Lys/Leu 12-mer
peptid-diastereomerů

Peptidy byly syntetizovány pevnou fázovou metodou podle popisu metod zkoušek, odstavec (ii), uvedeném výše v textu. V každém kroku interakce byla do reakce dodána směs tvořená z 1 ekvivalentu lysinu, leucinu a D-leucinu. Byla syntetizována směs ze 3^{12} různých peptidů. Po HF štěpení byly hydrofilní peptidy podrobeny extrakci s dvakrát destilovanou vodou (ddw) a lyofilizovány. Směs Lys/Leu 12-mer peptid-diastereomerů byla testována proti *E. coli* D21 (MIC: 15 $\mu\text{g/ml}$), *B. megaterium* Bm11 D21 (MIC: 3 $\mu\text{g/ml}$) a hRBC (0 % hemolýzy ve 100 μM). Podle očekávání měla hydrofilní směs antibakteriální účinky, ale byla nehemolytická.

Příklad 9 - Syntéza a biologické účinky Lys/Leu/D-Leu nahodilých
kopolymerů.

Přebytky N-karboxyanhydridových zbytků proti inicializačním volným amino kyselinám byly ponechány polymerizovat v DMF při teplotě 25 °C po dobu 4 hodin (Katchalski a Sela, 1958) s cílem připravit diastereomery polymerů různých velikostí. Polymery obsahující různé poměry lysinu, leucinu a D-leucinu byly připraveny použitím různých poměrů lysin-N-karboxyanhydridu, leucin-N-karboxyanhydridu a D-leucin-N-karboxyanhydridu. Tři takové polymery a jejich antibakteriální a hemolytické účinky jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10

Minimální útlumová koncentrace (μM) a hemolytické účinky
Lys/Leu/D-Leu kopolymerů.

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

Molární poměr amino kyselin Lys:Leu:[D]-Leu	<i>E. coli</i> (D21)	<i>B. megaterium</i> (Bm11)	% hemolýza ve 100 μM
1 : 1 : 1	90	15	0
2 : 1 : 1	35	8	0
3 : 1 : 1	80	20	0

Příklad 10 – Účinky diastereomerů proti houbám

Účinky pardaxin-odvozeným peptidů 1 a 16 proti houbám (podívejte se na příklad 1 výše) byly prověřeny ve sterilních deskách s 96-komůrkami (Nunc F96 mikrotitrační desky) při konečném objemu 100 μL následovně: 50 μL suspenze obsahující houby v koncentraci 1×10^6 jednotek tvořících kolonie (CFU)/ml v kultivačním médiu (Sabouraud glukózové médium) bylo dodáno do 50 μL vody obsahující peptid v seriovém 2-násobném ředění ve vodě. Útlum růstu byl určen měřením absorbance v 492 nm využitím automatického čtecího zařízení mikrodesek E1309 (Bio-ter Instruments) následně po inkubaci trvající 48 hodin při teplotě 30 °C. Účinky proti houbám byly vyjádřeny jako minimální útlumová koncentrace (MIC), koncentrace při které byl pozorován 100 % útlum růstu po 48 hodinách inkubace. Byly použity následující houby: *Candida albicans*

(IP886-65) a *Cryptococcus neoformans* (IP960-67). Jak je ukázáno v tabulce 11, oba peptidy 1 a 16 projevovaly antifugální účinky.

Tabulka 11

Minimální útlumová koncentrace (μM) diastereomerů 1 a 16 proti houbám

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidů	<i>Candida albicans</i> (IP886-65)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (IP960-67)
1	35	50
16	120	150

Příklad 11 – Protirakovinné účinky diastereomerů

Protirakovinné účinky Lys/Leu diastereomerů 23 a 24 (podívejte se do příkladu 3 výše) byly prověřeny zkouškou proti adenokarcinomu u myši. Buňky byly uchovány v množství 5 až 10.000/komórka mikrotitračních desek s 96 komůrkami v Dulbecco's modifikovaném Eagle's médiu. Po uchycení buněk bylo do komůrek přeneseno 20 μL ředěného roztoku peptidu v normálním solném roztoku, čímž se získala celková koncentrace v rozmezí 20 až 150 μM . Následovala inkubace s peptidy po dobu 1 hodiny, životaschopnost rakovinných buněk byla měřena zkouškou zbarvení živých tryptanovou modří (0,1 % w/v). V kontrolních pokusech byl do buněk dodán samotný roztok peptidu. Protirakovinné účinky byly vyjádřeny jako minimální útlumová koncentrace (MIC), koncentrace při které byl pozorován 100 % útlum růstu po 1 hodině inkubace. Výsledky v tabulce

12 ukazují, že oba zvolené peptidy jsou aktivní proti savčím buňkám.

Tabulka 12

Minimální útlumová koncentrace (μM) diastereomerů proti adenokarcinomu u myši

Minimální útlumová koncentrace (μM)

Označení peptidu	Adenokarcinom u myši
23	50
24	80

Příklad 12 – Účinky diastereomerů proti *Leishmania mexicana*

Diastereomer peptid 20 odvozený z melittinu (podívejte se na příklad 2 výše) a Leu/Lys diastereomer peptidu 23 (podívejte se na příklad 3 výše) byly testovány proti *Leishmania*. Promastigoty *Leishmania mexicana* NR kmenu vybrané pro zkoušku byly kultivovány při teplotě 27 °C v RPMI 1640 médiu doplněném 10 % fetálním hovězím sérem. Parazity byly získány centrifugací v 1200 x g trvající 10 minut při teplotě 4 °C a dvakrát promyty s PBS (50 mM fosfátu sodného, 150 mM NaCl, pH 7). Promyté promastigoty byly spočteny hemocytometrem a upraveny na koncentraci 1×10^6 parazitů/ml. Alikvotní části této suspenze byly analyzovány v konečném objemu 100 μl propočtením živých (pohyblivých) buněk po 24 hodinách inkubace při teplotě 26 °C bez nebo za přítomnosti různých koncentrací diastereomerů. Účinky proti *Leishmania* byly vyjádřeny jako minimální útlumová koncentrace (MIC), koncentrace při které

bylo pozorováno 100 % mrtvých buněk po 24 hodinách inkubace. Bylo sledováno, že pro peptid 23 je hodnota MIC 17 μM a pro peptid 20 je hodnota MIC 32 μM .

Příklad 13 – Účinky diastereomeru 23 proti virům

Sendai virus (Z kmen) byl pěstován v alantoickém vřecku 10 až 11 dní starých slepičích vajec se zárodky, viry byly získány 48 hodin po injikování a čištěny. Virus byl opět suspendován v útlumovém roztoku složeném z 160 mM NaCl, 20 mM tricinu, pH 7,4 a skladován při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Virové hemaglutinační účinky byly měřeny v hemaglutinačních jednotkách (HAU). Jeden mikrolitr obsahoval ~ 60.000 HAU. Čerstvá lidská krev byla získána z krevní banky a skladována až 1 měsíc při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím byly erytrocyty dvakrát promyty s PBS, pH 7,2 a ředěny na požadovanou koncentraci (% v/v) stejným tlumivým roztokem. Viriony, erytrocyty a peptidy byly promíchány v různých pořadích a různých množstvích. Konečná inkubace byla provedena vždy při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut, následovala centrifugace v 5700 g po dobu 10 minut pro odstranění nedotčených buněk. Ve všech případech byly použity duplikátní vzorky a dva alikvotní díly byly odebrány ze supernatantu každého vzorku do dvou komůrek desky s 96-komůrkami. Množství uvolněného hemoglobinu bylo zaznamenáno měřením absorbance komůrek použitím ELISA čtecího zařízení desek v 540 nm. Účinky proti virům byly vyjádřeny jako minimální útlumová koncentrace (MIC), koncentrace při které nebylo pozorováno žádné uvolnění hemoglobinu po inkubaci. Bylo určeno, že hodnota MIC pro Lys/Leu diastereomer peptidu 23 je 80 μM .

Seznam posloupností

(1) Všeobecné informace

(i) Žadatel:

(A) Jméno: YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD

(B) Ulice: ve Weizmann Vědeckém Ústavu
P.O. Box 95

(C) Město: Rehovot

(E) Stát: Izrael

(F) Poštovní kód (ZIP): 76100

(G) Tel. číslo: 972-08-9470617

(H) Fax: 972-08-9470739

(ii) Název vynálezu: Antipatogenní peptidy a farmaceutické
prostředky obsahující tyto peptidy

(iii) Počet posloupností: 95

(iv) Forma čtecího média pro počítač:

(A) Typ média: disketa

(B) Počítač: IBM PC kompatibilní

(C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: Patentová žádost 1.0,
verze 1,30 (EPD)

(v) Běžné informace týkající se žádosti:

Číslo aplikace:

(vi) Údaje o prioritě žádosti:

(A) Číslo aplikace: PCT/IL97/00066

(B) Datup podání: 20-únor-1997

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 1:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 33 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 1

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (7, 18, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 33
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 1:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 2:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 22 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 2

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (7, 18, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 22
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "aminoethylamino skupina
je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 2:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 3:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 22 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 3

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (7, 18, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 3:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 4:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 23 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 4

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (8, 19, 20)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 23

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "aminoethylamino skupina
je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 4:

Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu
Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 5:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 24 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 5

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (9, 20, 21)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 24
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "aminoethylamino skupina je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 5:

Lys Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro
Leu Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 6:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 24 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 6

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (9, 20, 21)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 6:

Lys Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro
Leu Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 7:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 11 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 7

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 7

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový
zbytek"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 11

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "aminoethylamino skupina"

je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 7:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 8:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu (části): lineární

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 8

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 33

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 8:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 9:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 33 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 9

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 13
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový zbytek"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 33
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 9:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 10:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 33 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu (části): lineární

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 10

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (5, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 33
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 10:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 11:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 33 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu (části): lineární

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Knihovna: peptid 11

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (7, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 33
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 11:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 12:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 33 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 12

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 7
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový zbytek"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 33
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 12:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 13:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 13

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 7

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový
zbytek"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 13:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 14:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 14

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (18, 19)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 33

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "dvě aminoethylamino skupiny
jsou připojeny k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 14:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 15:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 15

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (18, 19)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 15:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 16:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 16

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (7, 18, 19)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 16:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 17:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 22 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 17

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 7
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový
zbytek"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 22
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "aminoethylamino skupina"

je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 17:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 18:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 26 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 18

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (5, 8, 17, 21)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 26
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 18:

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala
Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 19:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 26 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 19

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (5, 8, 17, 21)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 19:

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala
Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 20:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 22 amino kyselin

85

- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 20

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (5, 8, 17, 21)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 22
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "aminoethylamino skupina
je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 20:

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala
Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg

:(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 21:

:(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 19 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 21

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 5, 14, 18)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 19

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "aminoethylamino skupina
je připojena k C-koncové části"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 21:

Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser
Trp Ile Lys Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 22:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 22

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 22:

Lys Leu Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 23:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 23

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 23:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 24:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 24

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 12
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "karboxylová skupina na C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 24:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 25:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 25

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 25:

Lys Lys Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 26:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 26

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na

C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 26:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 27:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 27

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části je zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 27:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 28:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 6 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 28

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 4)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 28:

Lys Leu Leu Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 29:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 8 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 29

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 4, 6)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 29:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 30:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 30

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6, 8, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 30:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 31:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 31

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 8, 10, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 31:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 32:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 32

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 32:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 33:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 33

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na

C-koncové části byla zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 33:

Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 34:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 34

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 12

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části byla zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 34:

Lys Val Val Val Lys Val Val Val Lys Val Val Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 35:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 35

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6, 8, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 35:

Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 36:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 36

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1..4, 8, 10, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 36:

Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 37:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 37

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 37:

Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 38:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 6 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché

100

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 38

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 38:

Lys Leu Ile Leu Lys Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 39:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 6 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 39

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6)

101

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 39:

Lys Val Leu His Leu Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 40:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 6 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 40

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 40:

Leu Lys Leu Arg Leu Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 41:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 6 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 41

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 4
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový zbytek"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 41:

Lys Pro Leu His Leu Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 42:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 8 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 42

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 42:

Lys Leu Ile Leu Lys Leu Val Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 43:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 8 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 43

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 4, 5, 6)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 43:

Lys Val Phe His Leu Leu His Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 44:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 8 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 44

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 4, 6, 7)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 44:

His Lys Phe Arg Ile Leu Lys Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 45:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 8 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

105

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 45

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 5

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový
zbytek"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 45:

Lys Pro Phe His Ile Leu His Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 46:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 46

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 6, 8, 11)

106

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 46:

Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 47:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 47

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 8, 10, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 47:

Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 48:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 48

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (1, 3, 5, 8, 9, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 48:

Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 49:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 49

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 7

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinový
zbytek"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 49:

Lys Ile Pro Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Pro Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 50:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 50

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (6, 10)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 50:

Lys Ile Pro Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Val Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 51:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 51

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 4, 6, 8, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 51:

Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 52:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché

110

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 52

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 52:

Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 53:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 53

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 3, 5, 8, 9, 11)

111

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 53:

Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 54:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 54

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6, 8, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 54:

Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 55:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 55

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 8, 10, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 55:

Arg Ile Ile Val Arg Ile Arg Leu Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 56:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 56

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 56:

Arg Ile Gly Ile Arg Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 57:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 57

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 6, 8, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 57:

Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 58:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 58

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 8, 10, 11)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 58:

Arg Ile Ala Val Lys Trp Arg Leu Arg Phe Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 59:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 12 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché

115

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 59

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 59:

Lys Ile Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 60:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 12 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 60

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 4, 7, 10, 11)

116

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 60:

Lys Lys Ile Gly Trp Leu Ile Ile Arg Val Arg Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 61:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 14 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 61

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 6, 8, 11, 13)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 61:

Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 62:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 14 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 62

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (1..4, 8, 10, 11, 13, 14)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 62:

Arg Ile Ile Val Arg Ile Arg Leu Arg Ile Ile Arg Val Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 63:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 14 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 63

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11, 14)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 63:

Arg Ile Gly Ile Arg Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Arg Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 64:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 64

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 6, 7, 11, 15, 16)

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 64:

Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ala Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile
Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 65:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 65

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 14,
16)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 65:

Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg
Leu

120

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 66:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 66

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 3, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 66:

Lys Ile Gly Ile Lys Ala Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 67:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

121

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 67

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 14,
16)(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 67:

Arg Ile Ile Val His Ile Arg Leu Arg Ile Ile His His Ile Arg
Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 68:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 68

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 3, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 68:

His Ile Gly Ile Lys Ala His Val Arg Ile Ile Arg Val His Ile
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 69:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 69

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 16)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 69:

Arg Ile Tyr Val Lys Ile His Leu Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg
Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 70:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin

123

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 70

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 3, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 70:

Lys Ile Gly His Lys Ala Arg Val His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 71:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 71

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 71:

Arg Ile Tyr Val Lys Pro His Pro Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg
Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 72:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 72

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 72:

Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 73:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 19 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 73

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 6, 7, 11, 15, 16, 18)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 73:

Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile
Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 74:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 19 amino kyselin

126

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 74

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13,
14, 16, 17, 19)(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 74:

Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg
Leu Ile Lys Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 75:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 19 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 75

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 18)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 75:

Lys Ile Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile
Gly Arg Leu Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 76:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 25 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 76

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 6, 7, 11, 15, 16, 18, 20, 24, 25)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 76:

Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile
Arg Lys Ile Val Lys Val Lys Arg Ile Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 77:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 26 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 77

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13,
14, 16, 17, 19..22, 24, 25)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 77:

Arg Phe Ala Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg
Leu Ile Lys Lys Ile Arg Lys Arg Val Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 78:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 30 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 78

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 27, 28, 30)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 78:

Lys Ala Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile
Gly Arg Leu Arg Lys Ile Gly Trp Lys Lys Arg Val Arg Ile Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 79:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

130

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 79

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2..5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 79:

Arg Ile Tyr Val Lys Pro His Pro Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg
Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 80:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 80

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 3, 5, 7..11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové

131

zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 80:

Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 81:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 19 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 81

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 4..8, 10..13, 15, 16, 18)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 81:

Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile
Arg Lys Ile Val

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 82:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 19 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 82

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6..11, 13, 14, 16, 17, 19)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 82:

Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg
Leu Ile Lys Lys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 83:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 16 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

133

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 83

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2..5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 83:

Arg Ile Tyr Val Ser Lys Ile Ser Ile Tyr Ile Lys Lys Ile Arg
Leu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 84:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 19 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 84

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (2, 4..8, 10..13, 15, 16, 18)

(D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové

134

zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 84:

Lys Ile Val Ile Phe Thr Arg Ile Arg Leu Thr Ser Ile Arg Ile
Arg

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 85:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 85

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: skupiny (1, 2, 3, 5, 7..11, 13, 14, 16)

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 85:

Lys Pro Ile His Lys Ala Arg Pro Thr Ile Ile Arg Tyr Lys Met
Ile

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 86:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 25 amino kyselin

135

- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 86

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (9, 20, 21)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 86:

Cys Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro
Leu Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 87:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 26 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 87

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (10, 21, 22)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 87:

Cys Lys Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser
Pro Leu Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 88:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 27 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 88

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (11, 22, 23)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 88:

Cys Lys Lys Lys Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser

Ser Pro Leu Phe Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 89:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 16 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 89

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 89:

Cys Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg
Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 90:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 18 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: peptid 90

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (2, 3, 4, 6, 8..12, 14, 15, 17)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 90:

Cys Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys
Ile Ile Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 91:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 28 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: kruhová

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 91

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20..23, 25, 26)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 91:

Cys Arg Phe Ala Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile
Arg Leu Ile Lys Lys Ile Arg Lys Arg Val Ile Lys Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 92:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 13 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 23C (část peptidu 92)

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové
zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 13
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části byla zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 92:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 93:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

- (A) Délka: 13 amino kyselin
- (B) Typ: amino kyselina
- (C) Větvení: jednoduché
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

- (B) Klon: peptid 24C (část peptidu 93)

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: skupiny (3, 4, 8, 10)
- (D) Další informace: /produkt= "D-amino kyselinové zbytky"

(ix) Charakteristika:

- (A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný
- (B) Umístění: 13
- (D) Další informace: /produkt= "jiné"
/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části byla zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 93:

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys Cys

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 94:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 33 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: pardaxin

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 94:

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe
Lys Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly
Gly Gln Glu

(2) Informace o posloupnosti SEQ ID č. 95:

(i) Charakteristiky posloupnosti:

(A) Délka: 26 amino kyselin

(B) Typ: amino kyselina

(C) Větvení: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(vii) Přímý zdroj:

(B) Klon: mellitin

18.08.99

142

(ix) Charakteristika:

(A) Jméno/klíč: Stranně modifikovaný

(B) Umístění: 26

(D) Další informace: /produkt= "jiné"

/poznámka= "karboxylová skupina na
C-koncové části byla zaměněna amino skupinou"

(xi) Popis posloupnosti: SEQ ID č. 95:

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala
Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Nehemolytické cytolytické činidlo volené z peptidu, komplexu svázaných peptidů, směsi peptidů nebo nahodilého kopolymeru peptidů, uvedené činidlo mající selektivní cytolytické účinky projevující se v tom, že činidlo má cytolytické účinky na patogenní buňky představující buňky, které se v těle nevyskytují přirozeně zahrnující mikrobiální patogenní organismy a zhoubné buňky; a činidlo je nehemolytické, totiž nemá žádné cytolytické účinky na červené krevní buňky nebo má cytolytické účinky na červené krevní buňky v koncentracích, které jsou podstatně vyšší než koncentrace při které projevují uvedené cytolytické účinky; uvedené nehemolytické cytolytické činidlo je voleno ze skupiny zahrnující:

- (1) cyklický derivát peptidu mající čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahující jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, nebo obsahující buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahující α -helixovou přerušovací část;
- (2) peptid obsahující jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, mající čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a mající posloupnost amino kyselin takovou, že odpovídající posloupnost amino kyselin obsahující pouze L-amino kyselinové zbytky se v přírodě nevyskytuje, a jeho cyklické deriváty;
- (3) komplex obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů, každý peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahuje jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky, nebo obsahuje buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahuje α -helixovou přerušovací část, nebo jeho cyklické deriváty, uvedené peptidy jsou společně

provázané použitím spojovací molekuly kovalentně vázané ke každému z peptidů;

(4) směs obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů, každý peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1, a obsahuje jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky nebo obsahuje buď L-amino kyselinové zbytky nebo D-amino kyselinové zbytky nebo oba tyto typy a obsahuje α -helixovou přerušovací část, nebo její cyklické deriváty; a

(5) neuspořádaný kopolymer obsahující různé poměry hydrofobní, pozitivně nabitě a D-amino kyseliny.

2. Cyklický peptid podle nároku 1(1) obsahující jak D-, tak i L-amino kyselinové zbytky mající posloupnost takovou, že stejnorodý peptid otevřeného řetězce obsahující pouze L- nebo D-amino kyselinové zbytky a mající stejnou posloupnost amino kyselin jako uvedený peptid, má α -helixovou konfiguraci a má široké spektrum cytolytických účinků projevujících se na různých buňkách.

3. Cyklický peptid podle nároku 2, který představuje cyklický diastereomer odvozený z pardaxinu nebo mellitinu nebo z jejich částí.

4. Cyklický peptid podle nároku 3, ve kterém čistý pozitivní náboj vyšší než +1 je díky přírodnímu amino kyselinovému složení nebo je získán neutralizací volných karboxylových skupin nebo dodáním pozitivně nabitých amino kyselinových zbytků a/nebo pozitivně nabitých chemických skupin.

5. Cyklický peptid podle nároku 4, který je volen z cyklického diastereomeru pardaxinu nebo jeho části, ke které byly dodány Lys zbytky k N-koncové části a/nebo aminoethylamino skupiny

byly dodány k C-koncové části.

6. Cyklický peptid podle nároku 5 volený z cyklických peptidů odvozených z pardaxinu v textu označených jako peptidy 86 až 88 s posloupností:

86: Cyklický K¹[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

87: Cyklický K¹K²[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

88: Cyklický K¹K²K³[D]P⁷L¹⁸L¹⁹[1 až 22]-par s posloupností:

Cys-Lys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-
-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

7. Peptid podle nároku 1(2) obsahující jak L-amino kyselinové zbytky, tak i D-amino kyselinové zbytky a mající posloupnost amino kyselin takovou, že odpovídající amino kyselinová posloupnost obsahující pouze L-amino kyselinové zbytky se v přírodě nevyskytuje.

8. Peptid podle nároku 7 mající následující charakteristiky:

- (a) peptid představuje nepřirodní syntetický peptid tvořený různými poměry alespoň jedné hydrofobní amino kyseliny a alespoň jedné pozitivně nabitě amino kyseliny, ve kterém posloupnost alespoň jednoho z amino kyselinových zbytků je D-amino kyselina;

- (b) peptid má čistý pozitivní náboj, který je vyšší než +1; a
 (c) poměr hydrofobních k pozitivně nabitým amino kyselinám je takový, že peptid je cytolytický k patogenním buňkám, ale nevyvolává cytolýzu červených krevních buněk.

9. Peptid podle nároku 8, ve kterém pozitivně nabitá amino kyselina je volena ze skupiny zahrnující lysin, arginin a histidin a hydrofobní amino kyselina je volena ze skupiny zahrnující leucin, izoleucin, glycin, alanin, valin, fenylalanin, prolin, tyrosin a tryptofan.

10. Peptid podle nároku 9, ve kterém čistý pozitivní náboj vyšší než +1 je díky amino kyselinovému složení nebo díky dodání pozitivně nabitých chemických skupin nebo kterého hydrofobnost může být snížena dodáním polárních amino kyselin, takových jako serin, threonin, methionin, asparagin, glutamin a cystein.

11. Peptid podle nároku 10 mající alespoň 6 amino kyselinových zbytků, ve kterém hydrofobní amino kyselina představuje leucin, alanin nebo valin a pozitivně nabitá amino kyselina představuje lysin.

12. Peptid podle nároku 11 představující diastereomer 6-mer, 8-mer nebo 12-mer peptidu tvořeného leucinem a lysinem, ve kterém alespoň jedna třetina posloupnosti je tvořena D-amino kyselinami, ale s vyloučením peptidu, který je v textu označen 23:

23: Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

13. Leu/Lys diastereomer podle nároku 12 volený ze skupiny peptidů označených v textu 24 až 29 (SEQ ID č.: 24 až 29, jednotlivě) s posloupností:

- 24: Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂
 25: Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-NH₂
 26: Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂
 27: Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂
 28: Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys
 29: Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

14. Cyklický derivát nepřirodního syntetického peptidu podle kteréhokoliv z nároků 7 až 13 volený ze skupiny peptidů v textu označovaných 92 až 95 s posloupností:

- 92: Cyklický Cys-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Cys
 93: Cyklický Cys-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys
 94: HN-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-CO



- 95: HN-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-CO



15. Komplex provázaných peptidů podle nároku 1(3) obsahující velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, uvedené peptidy jsou vzájemně provázané přes spojovací molekulu kovalentně vázanou na každý z peptidů.

16. Komplex podle nároku 15, ve kterém je svazek tvořen 2 nebo více, výhodně 5, molekulami stejného peptidu nebo různých peptidů a spojovací molekula představuje peptid podle kteréhokoliv z předcházejících nároků nebo běžně používanou spojovací molekulu.

17. Komplex podle nároku 16 volený z provázaných Lys/Leu diastereomerů v textu označovaných 96 a 97:

96: ([D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈C)₅ [D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₈ s posloupností:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-NH₂)₅-
-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

97: ([D]-L^{3,4,8,10}-K₅L₇C)₅-[D]-L^{3,4,8,10}-K₄L₉ s posloupností:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-NH₂)₅-
-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH₂

18. Směs podle nároku 1(4) vyznačující se tím, že obsahuje velké množství 2 nebo více nehemolytických cytolytických peptidů, ve které peptidy představují ty definované v kterémkoliv z nároků 1 až 4.

19. Směs podle nároku 18 vyznačující se tím, že zahrnuje směs Lys/Leu 12-mer diastereomerů peptidu.

20. Nehemolytický cytolytický neuspořádaný kopolymer podle nároku 1(5) obsahující různé poměry hydrofobní, pozitivně nabitě a D-amino kyseliny.

21. Nehemolytický cytolytický neuspořádaný kopolymer podle nároku 20 tvořený lysinem, leucinem a D-leucinem v poměru 1:1:1, 2:1:1 nebo 3:1:1 (mol).

22. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje nehemolytické cytolytické činidlo podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21 a farmaceuticky akceptovatelný nosič.

23. Farmaceutický prostředek podle nároku 22 vyznačující se tím, že prostředek je určen pro ošetření infekcí způsobených patogenními organismy.

24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23 vyznačující se tím, že patogenní organismy jsou voleny ze skupiny zahrnující

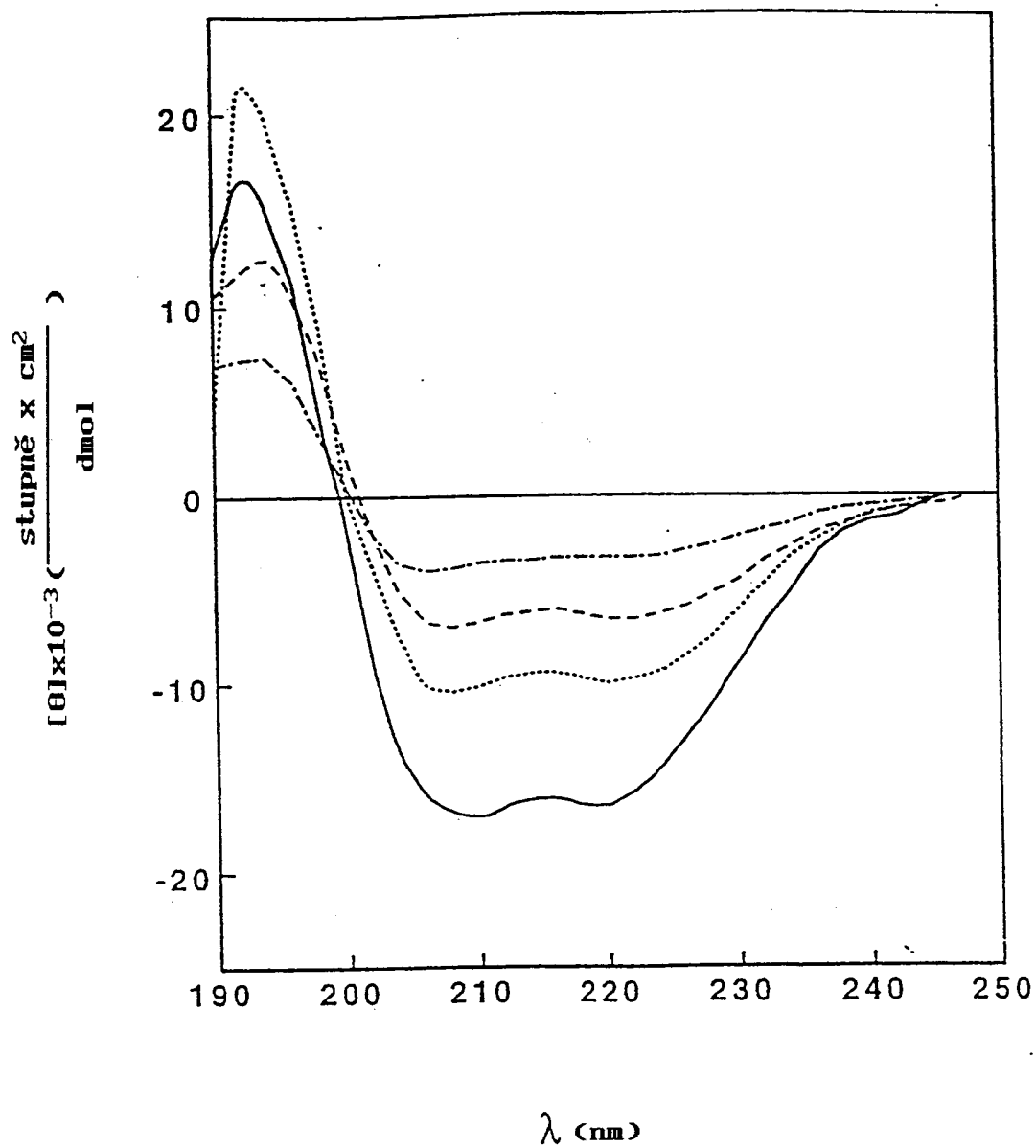
bakterie, plísně, prvoky, mykoplasma a viry.

- 25. Farmaceutický prostředek podle nároku 24 vyznačující se tím,
že patogenními organismy jsou bakterie.
- 26. Farmaceutický prostředek podle nároku 22 vyznačující se tím,
že prostředek je určen pro ošetření rakoviny.

18.08.99

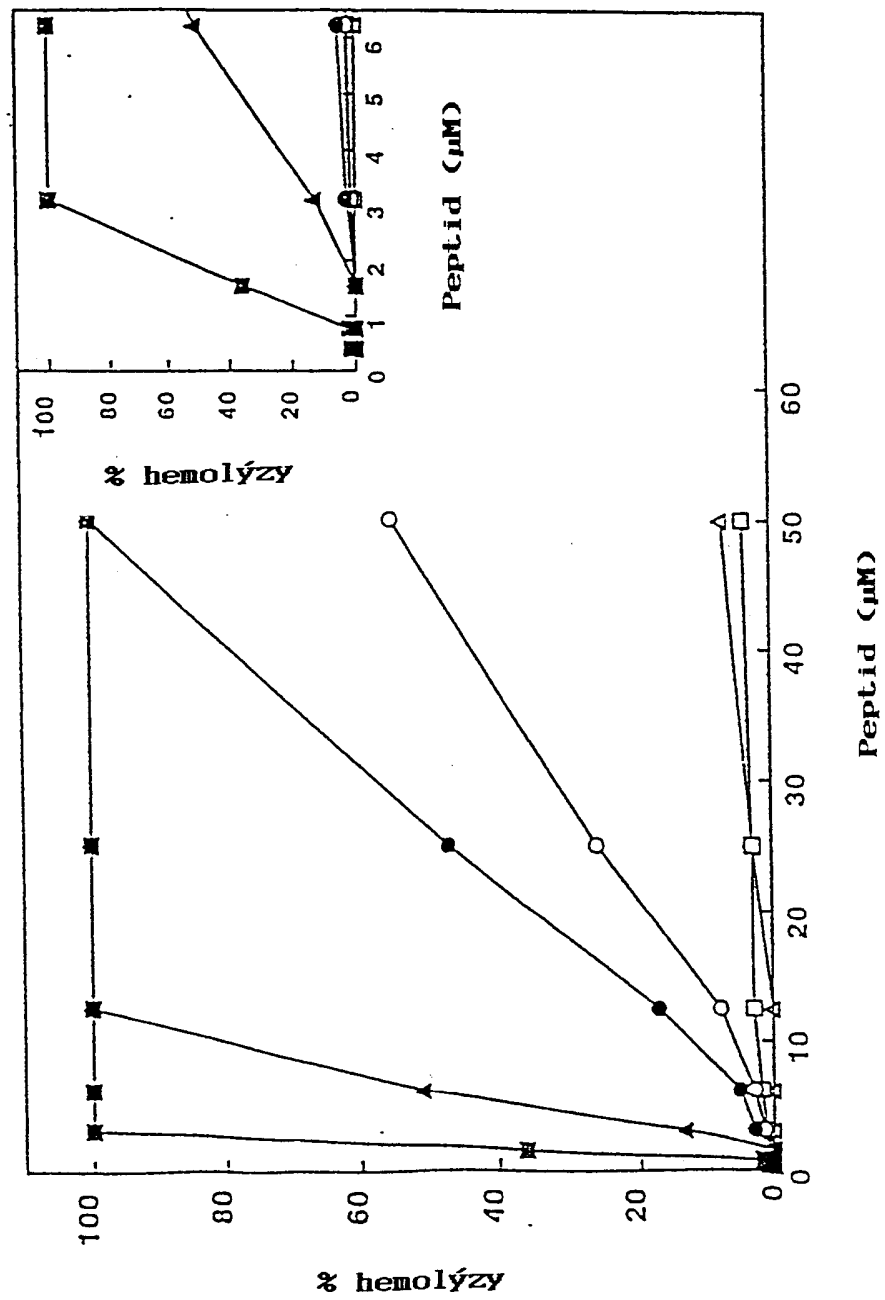
PV 1999-2935

1/14



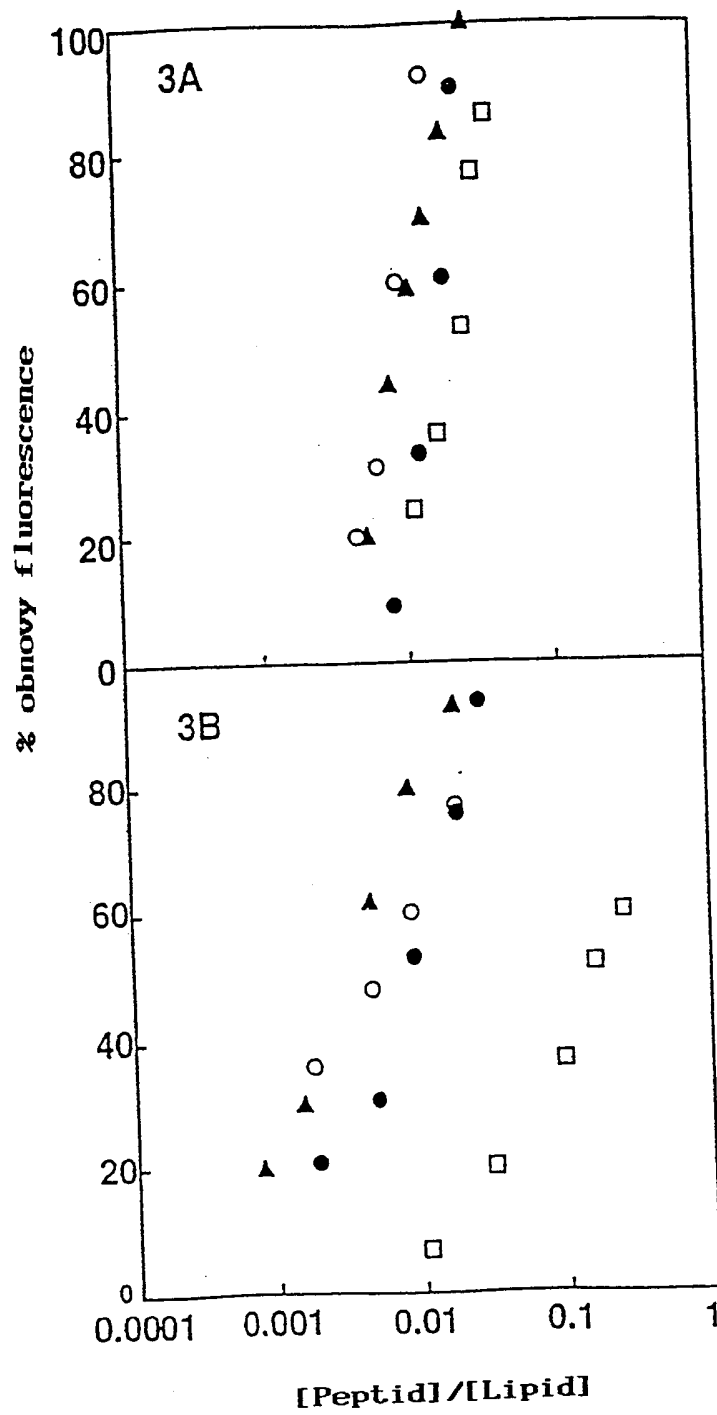
Obrázek 1:

2/14

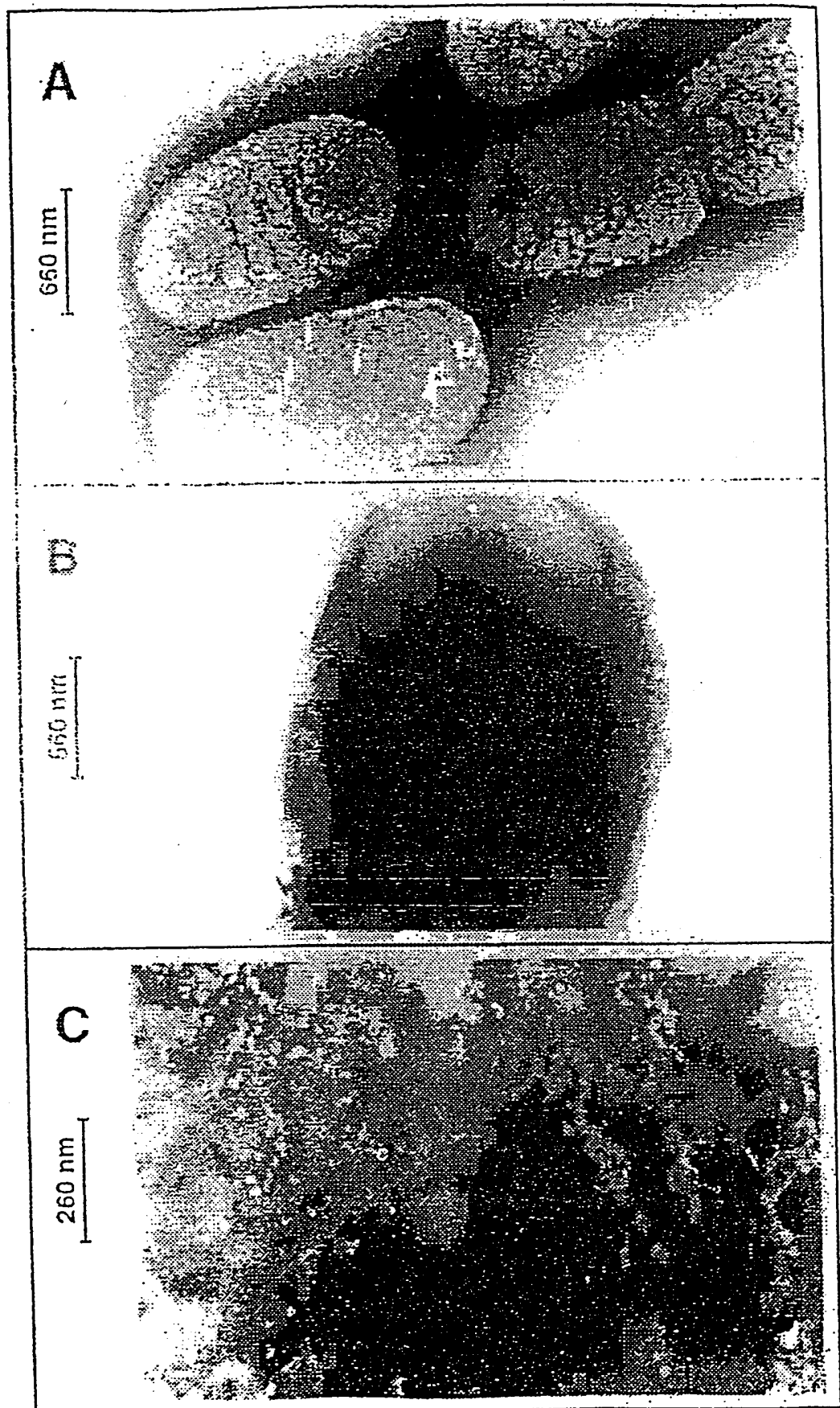


Obrázek 2

3/14

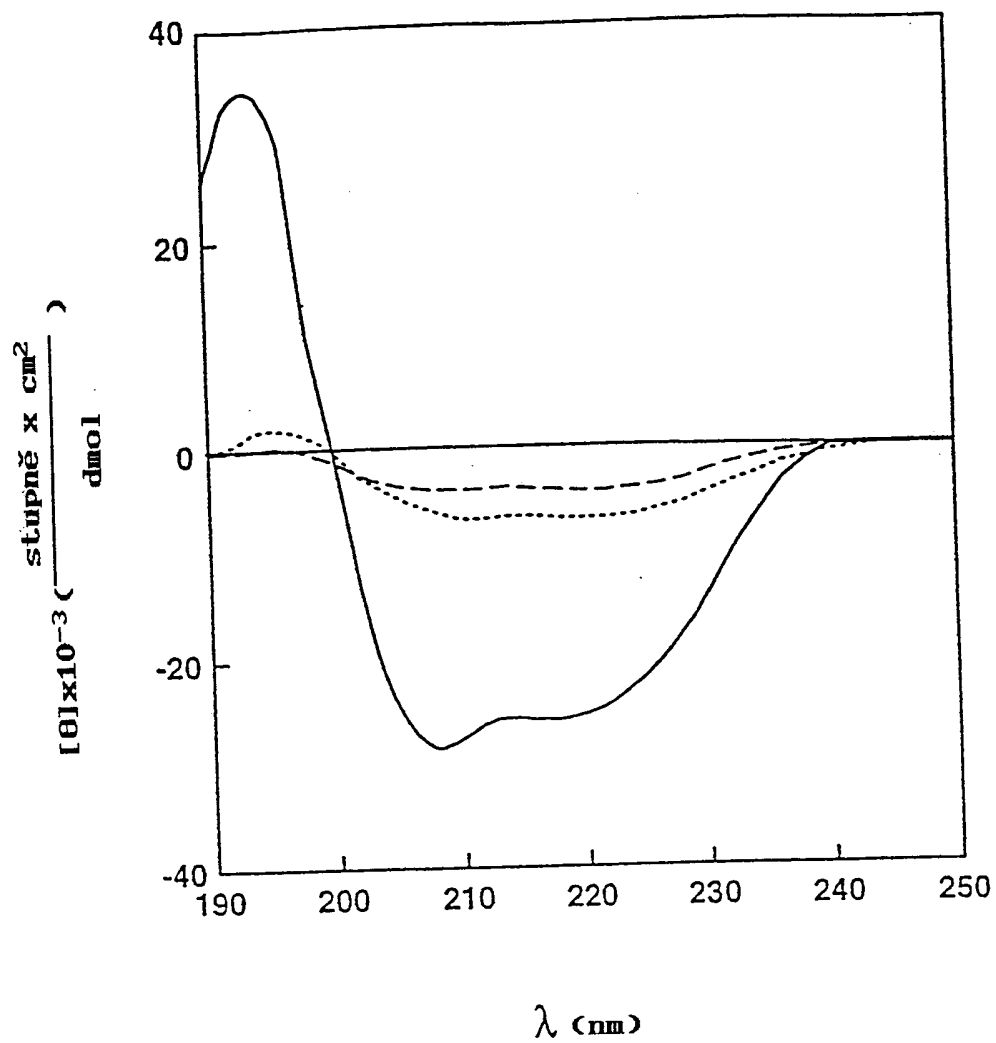


Obrázek 3



Obrázek 4

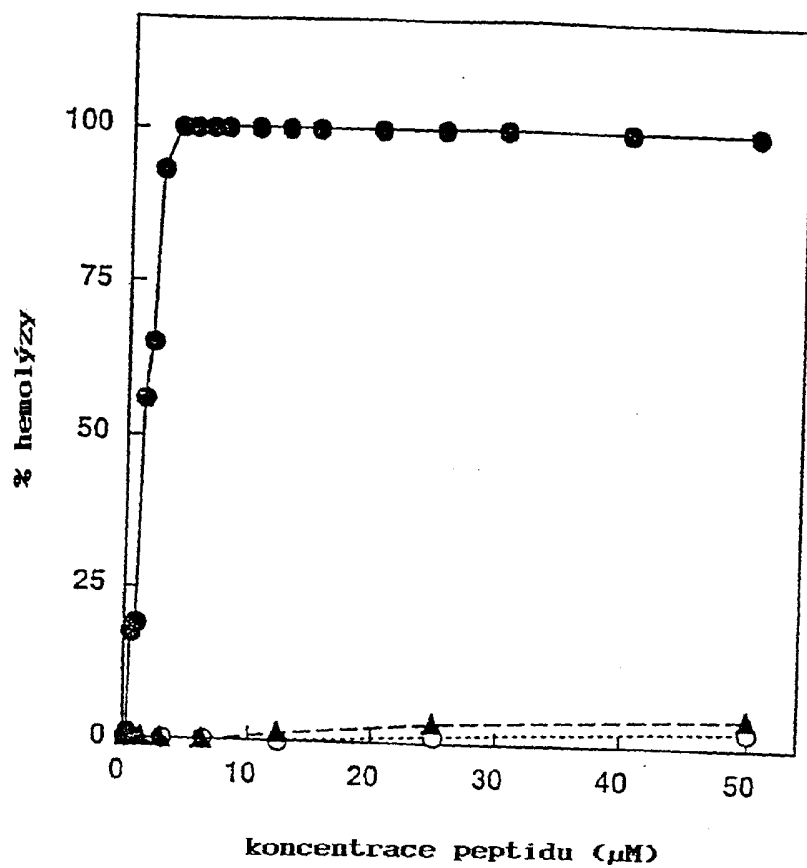
5/14



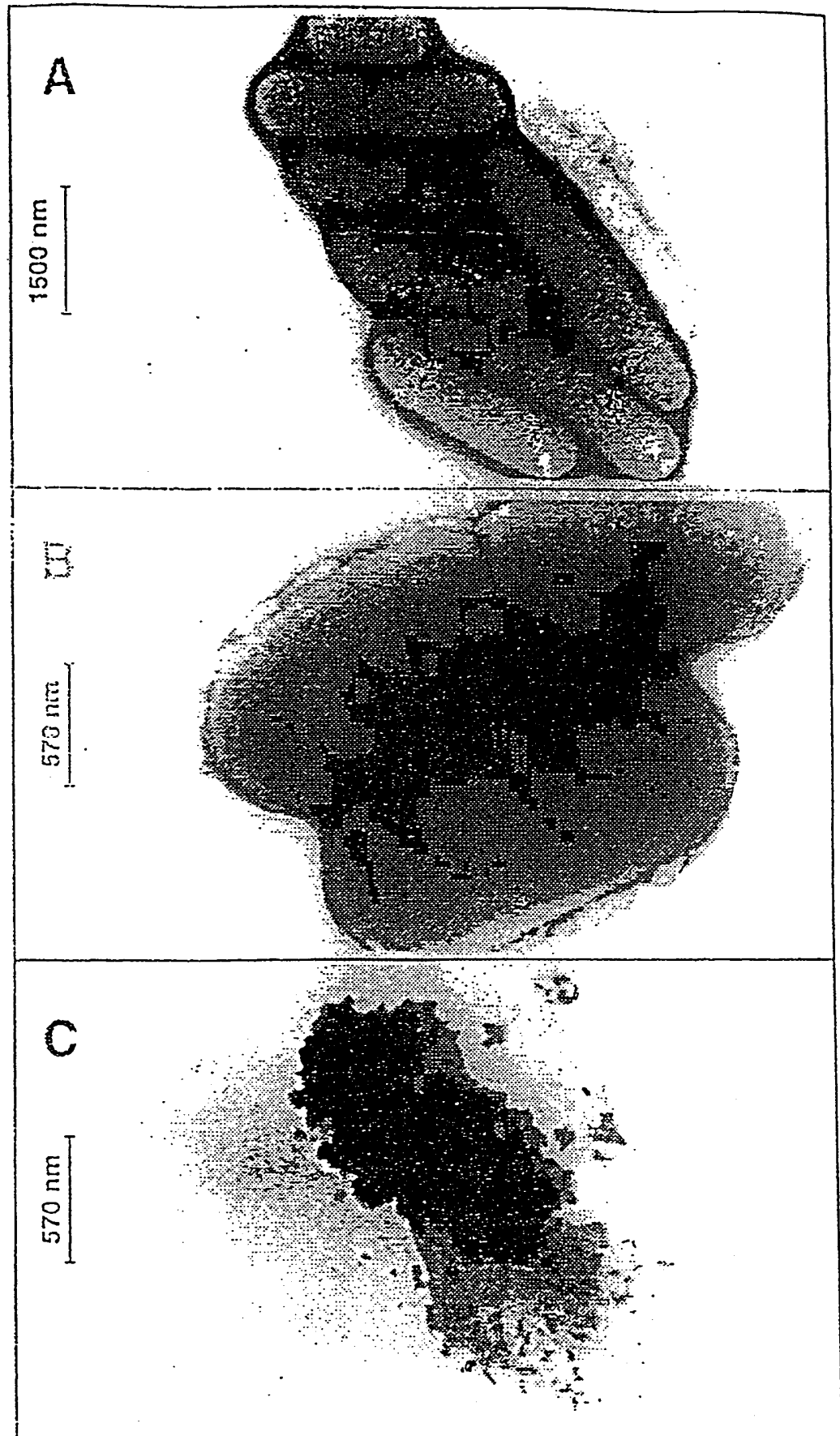
Obrázek 5

18.08.99

6/14



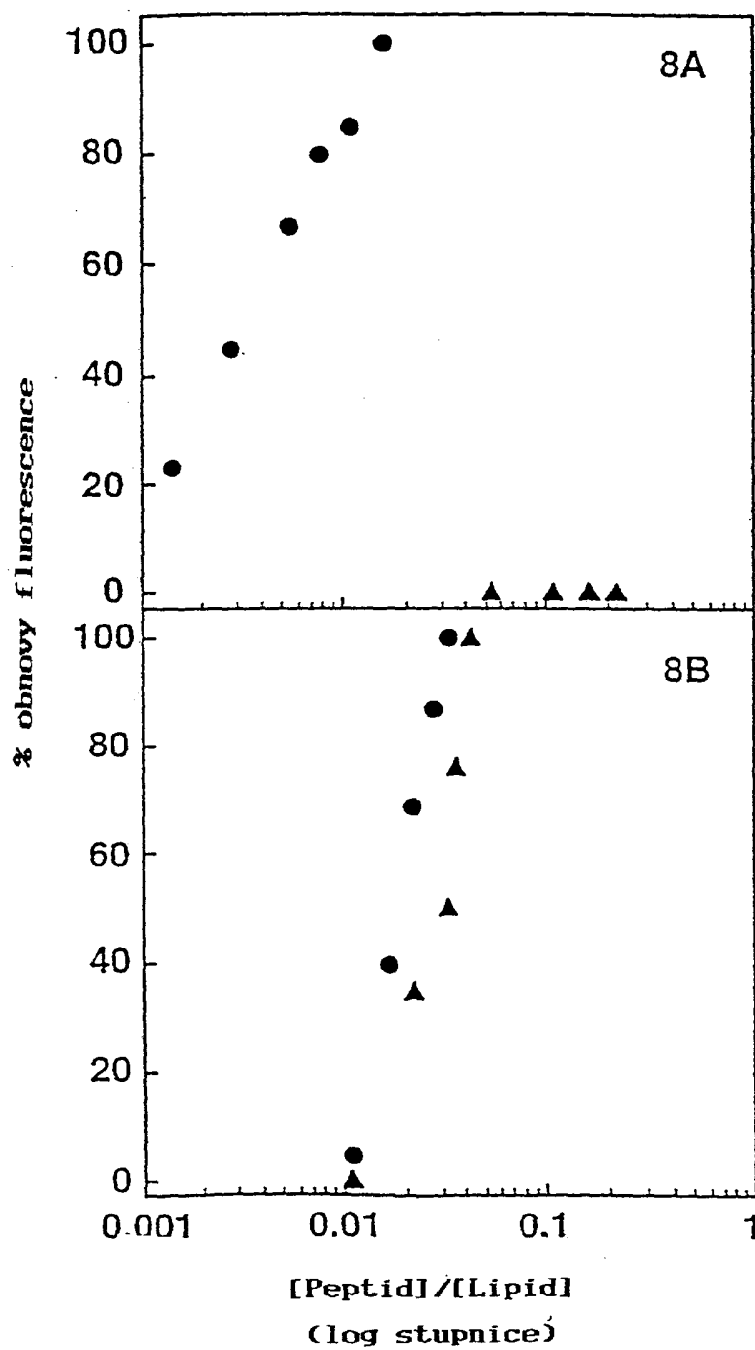
Obrázek 6



Obrázek 7

18.08.99

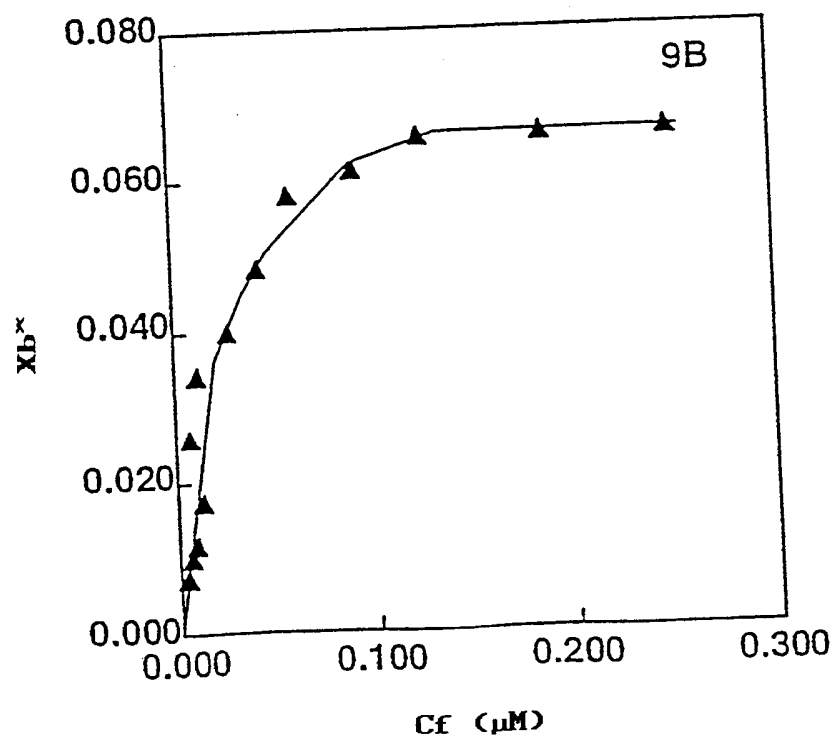
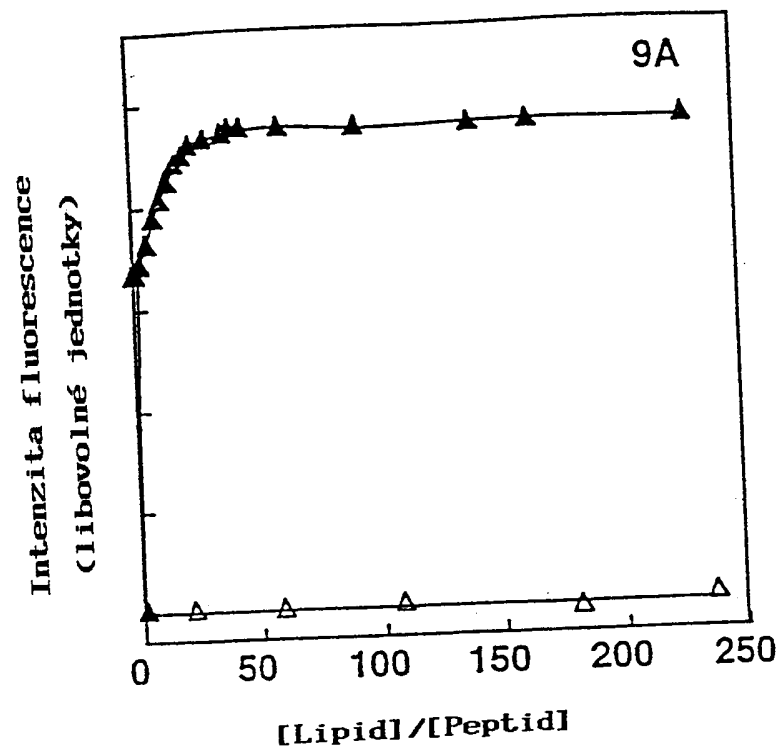
8/14



Obrázek 8

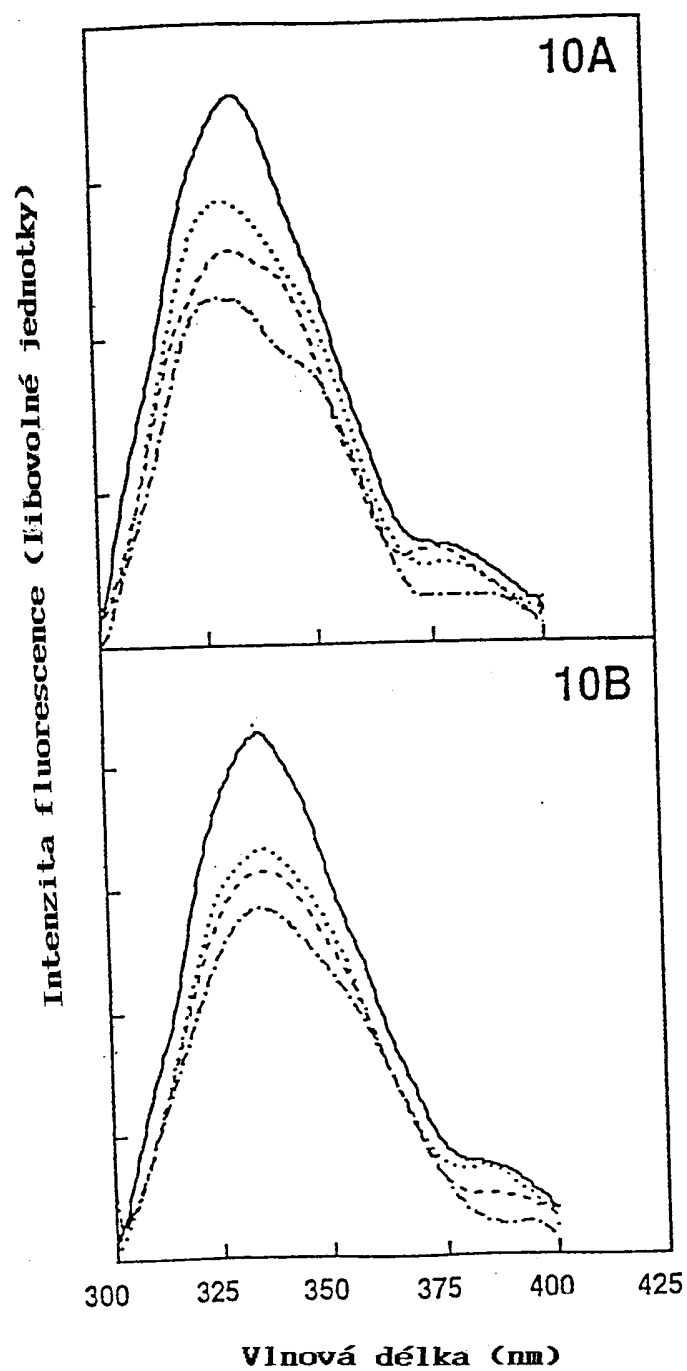
18.08.99

9/14



Obrázek 9

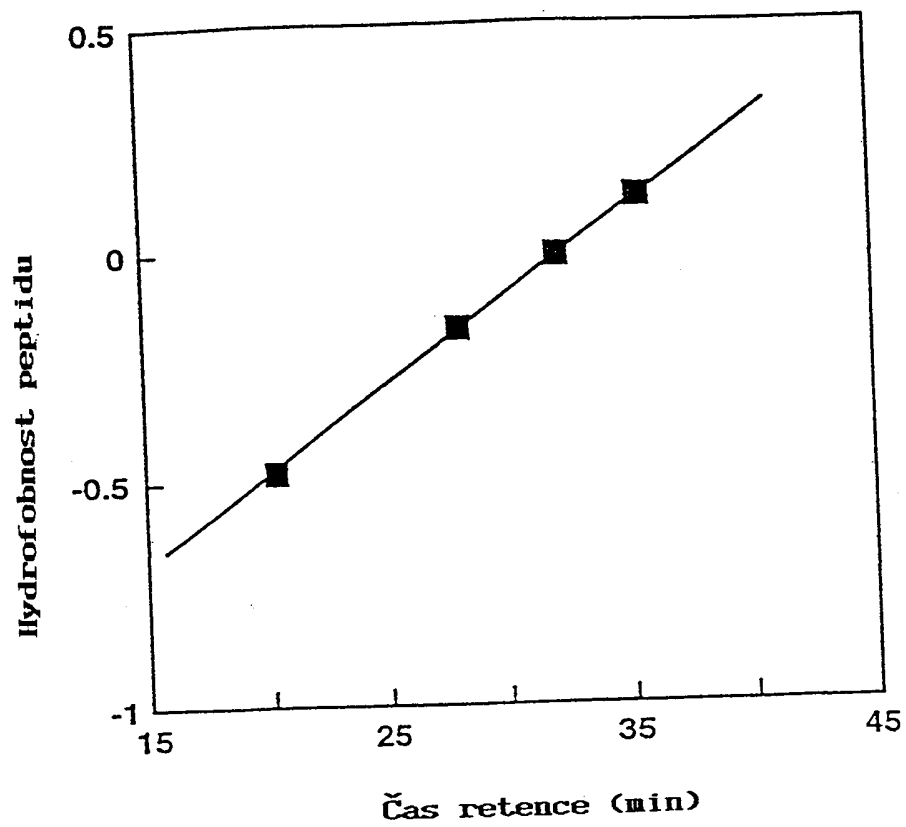
10/14



Obrázek 10

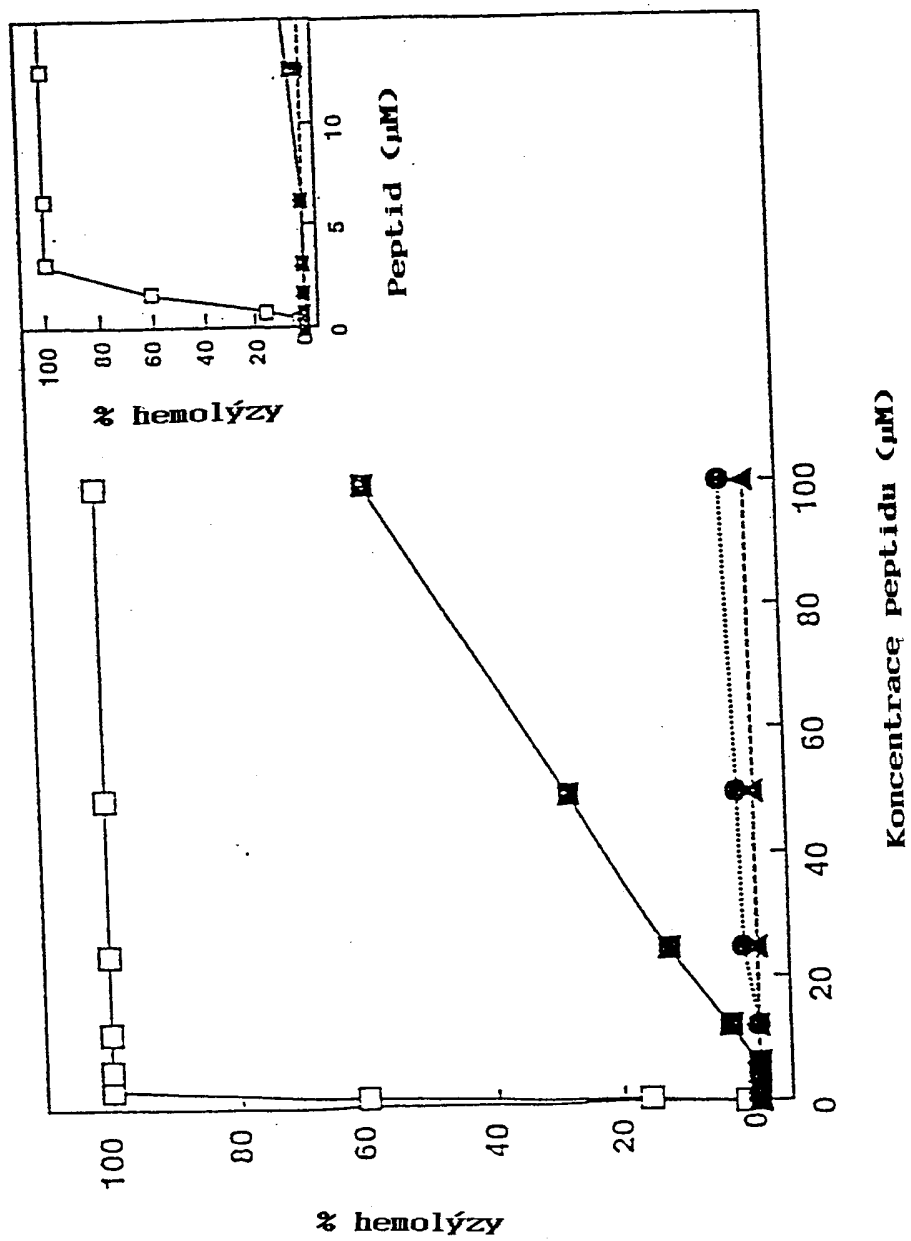
18.08.99

11/14



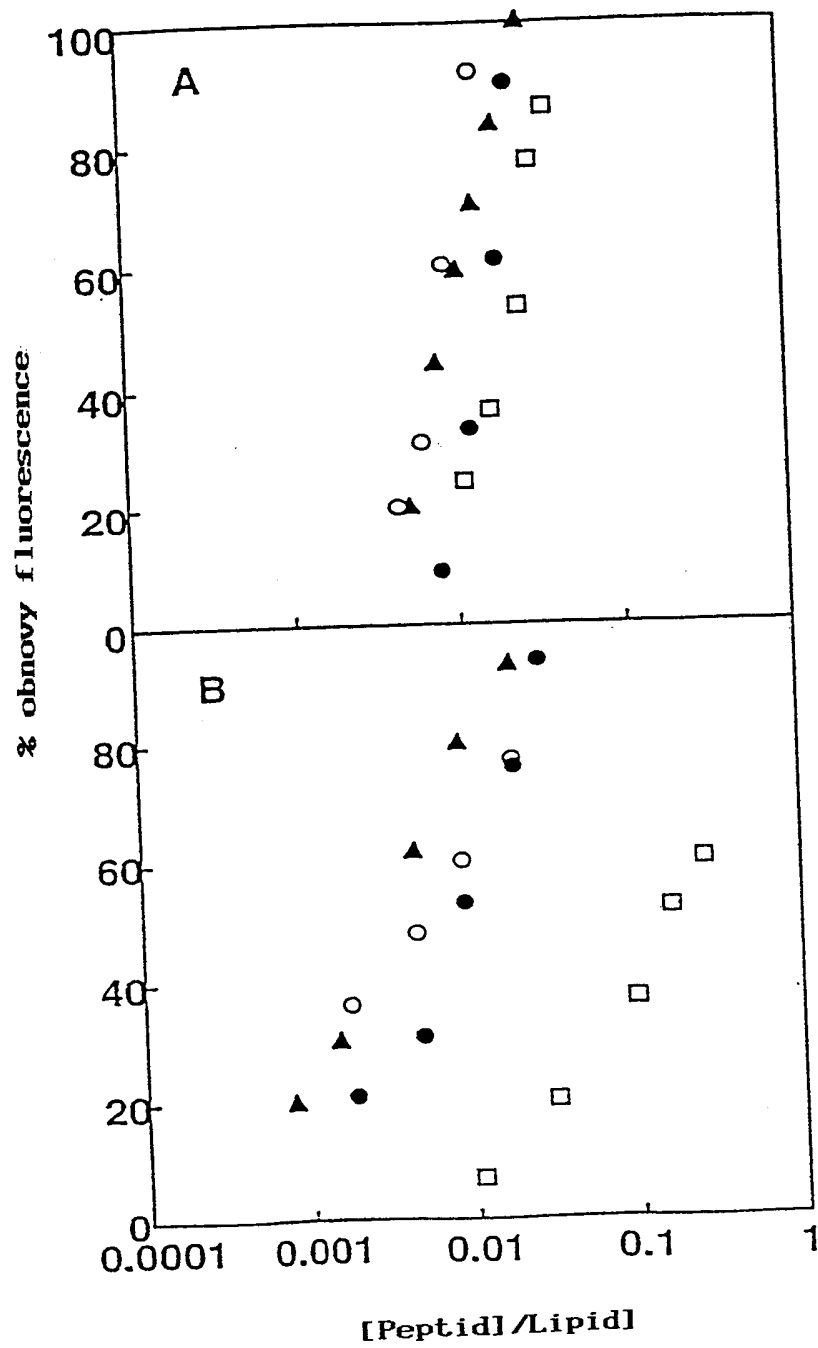
Obrázek 11

12/14

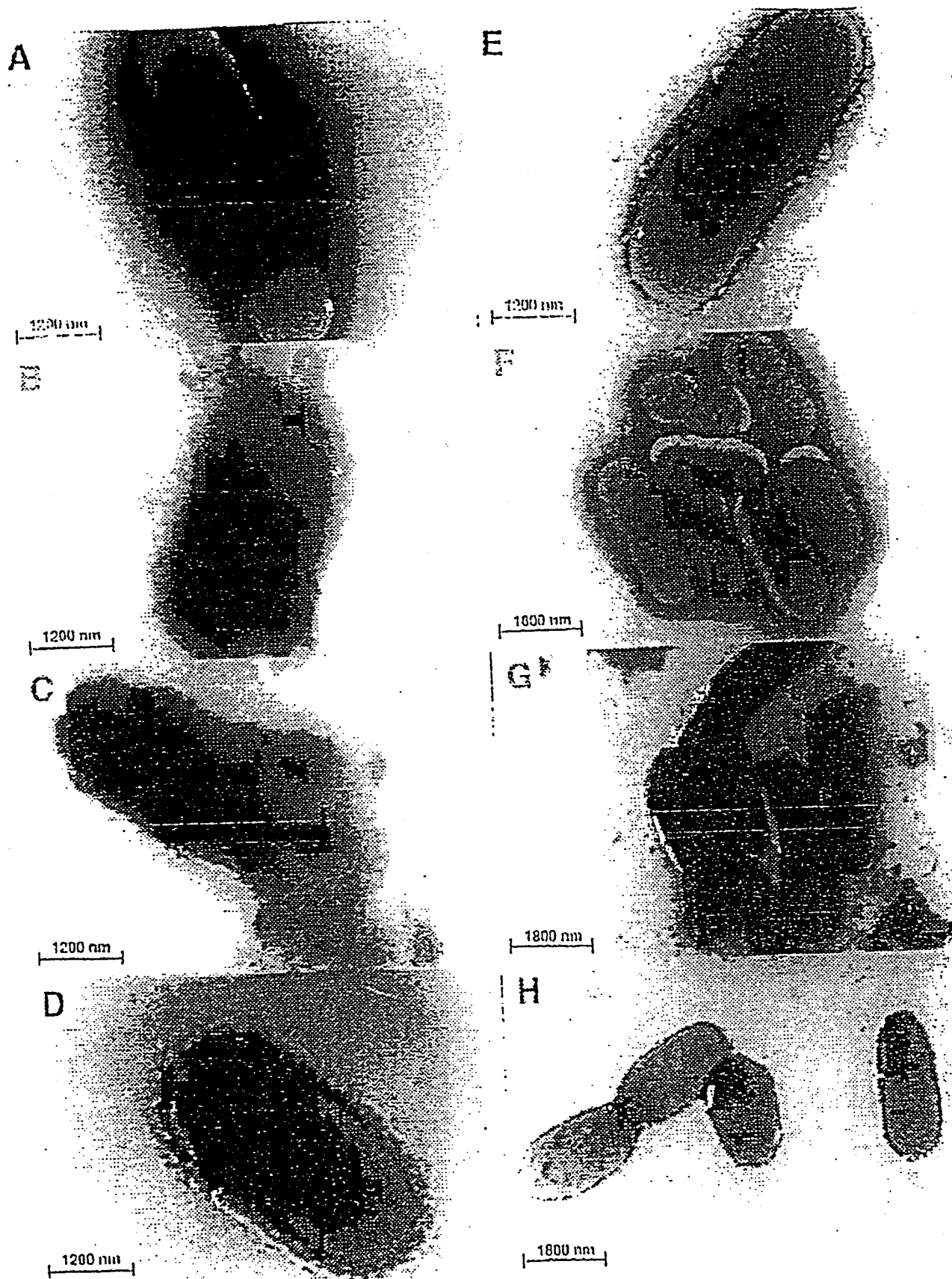


Obrázek 12

13/14



Obrázek 13



Obrázek 14