

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Juni 2010 (10.06.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2010/063250 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
A61K 38/17 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2009/001587
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
9. November 2009 (09.11.2009)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2008 060 844.0  
6. Dezember 2008 (06.12.2008) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL [DE/DE]; Christian-Albrechts-Platz 4, 24118 Kiel (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BOSCH, Thomas, C., G. [DE/DE]; Hasselkrug 2a, 24631 Langwedel (DE). AUGUSTIN, René [DE/DE]; Jungfernstieg 32, 24116 Kiel (DE).
- (74) Anwalt: LOBEMEIER, Martin, Landolf; Boehmert & Boehmert, Niemannsweg 133, 24105 Kiel (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)  
— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: ANTIMICROBIAL PEPTIDES MADE OF HYDRA

(54) Bezeichnung : ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE AUS HYDRA

FIG. 1

```
1      TTTGGAAAATGAAGACAGTGTGGCATTTTGTGTTTGGACATTCATTGCGTTCACATACG
1      M K T V L A F L F L T F I A F T Y
61     CAGAAAGTTATGAGGATGTGAAAGAAGAAATAAAAATGAAGTTGAAAAGAAATATTTG
18     A E S Y E D V K E E I K N E V E K E I F
121    AAGATCTTGAAGAGGAAAGTGACGCATTAGATAGTAGCGTTAGAGAGTTTAAATGATGCAA
38     E D L E E E S D A L D S S V R E F N D A
181    AGCCATGGAGATTTTCGTAGAGCTATTTCGAAGAGTACGATGGAGAAAAGTTGCTCCTTACA
58     K P W R F R R A I R R V R W R K V A P Y
241    TACCATTTGTGTTAAGACGGTTGGTAAAAAGTAAACGAAAACAACCTAAGATAAATCTTTT
78     I P F V V K T V G K K
```

(57) Abstract: A nucleic acid molecule, selected from the group consisting of a) a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence shown in SEQ ID:NO 1, 4 or 6, b) a nucleic acid molecule coding a peptide with the amino acid sequence shown in SEQ ID:NO 2, 3, 5, 7 or 8, c) a nucleic acid molecule, the complementary strand of which hybridizes a nucleic acid molecule according to a) or b) and codes a peptide with antimicrobial activity, and d) a nucleic acid molecule, the nucleotide sequence of which varies from the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule according to c) due to degenerated genetic code.

(57) Zusammenfassung: Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus a) einem Nucleinsäuremolekül mit der in der SEQ ID:NO 1, 4 oder 6 dargestellten Nucleotidsequenz, b) einem Nucleinsäuremolekül, das ein Peptid mit der in der SEQ ID:NO 2, 3, 5, 7 oder 8 dargestellten Aminosäuresequenz codiert, c) einem Nucleinsäuremolekül, dessen Komplementärstrang an ein Nucleinsäuremolekül nach a) oder b) hybridisiert und das ein Peptid mit antimikrobieller Aktivität codiert, und d) einem Nucleinsäuremolekül, dessen Nucleotidsequenz von der Nucleotidsequenz eines Nucleinsäuremoleküls nach c) aufgrund des degenerierten genetischen Codes abweicht.

WO 2010/063250 A1

Antimikrobielle Peptide aus *Hydra*

5 Die Erfindung betrifft aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra* isolierte, für antimikrobielle Peptide codierende Gene, die von diesen Genen codierten antimikrobiellen Peptide und deren Derivate, sowie deren Verwendung zur Herstellung antimikrobiell wirksamer Arzneimittel.

10 Heutzutage sind Infektionen in Entwicklungsländern die Haupttodesursache und in Industrieländern nach Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer noch die dritthäufigste Todesursache (WHO, Global Burden of Diseases). Das Auftreten und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen stellt eine zunehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. WHO-Daten zufolge infizierten sich 2005 in Europa bereits rund drei Millionen Menschen mit Keimen, gegen die herkömmliche Antibiotika unwirksam sind, und 50.000 starben daran.

15 Im Moment sterben mehr Patienten an MRSA-Infektionen, d. h. durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, als an der Immunschwäche AIDS [Taubes, G. (2008) The bacteria fight back. Science. 321: 356–61]. MRSA-Infektionen waren in der Vergangenheit fast ausschließlich auf Krankenhäuser beschränkt. Der exzessive Umgang mit Antibiotika und die Gefahr wiederholter Infektionen in Krankenhäusern haben die Entwicklung von resistenten Keimen begünstigt. Diese Infektionen sind meist nicht mehr mit konventionellen Antibiotika zu behandeln.

25 Hinzu kommt gerade bei MRSA, dass diese Infektionen nicht mehr nur auf den Krankenhausbereich beschränkt sind, sondern auch außerhalb („community aquired“, caMRSA) *S.-aureus*-Stämme auftreten, die gegen Methicillin resistent sind. Die beschriebenen Zusammenhänge wurden zunächst in den USA entdeckt und endeten mit der Isolierung des besonders infektiösen Stammes US300. Aber auch in Europa sind solche Stämme bereits aufgetreten, hier unter der Bezeichnung ST398. Eine Pandemie ist somit nicht mehr auszuschließen.

30 Um dieser am Beispiel der MRSA-Infektion beschriebenen Resistenz-Problematik zu begegnen, sind neue Antibiotika notwendig, möglichst solche, die andere Angriffspunkte haben, als die zum gegenwärtigen Zeitpunkt eingesetzten Antibiotika, um pathogene, resistente Keime zu töten.

35

Die Wirkung konventioneller Antibiotika beruht meist auf der Hemmung eines spezifischen Enzyms. Bei den Beta-Lactam-Antibiotika, der hauptsächlich verwendeten Gruppe von Antibiotika, werden Enzyme (sogenannte Transpeptidasen) gehemmt, die zur Zellwandsynthese benötigt werden. Das Beta-Lactam-Grundgerüst wurde ständig modifiziert, um das Wirkungsspektrum zu erweitern und um Resistenzen zu begegnen.

Nachteil der konventionellen Antibiotika ist die rasche Ausbildung resistenter Keime. Diese Resistenzen werden erworben, indem a) das Angriffsziel modifiziert wird, b) die Ausschüttung von Antibiotika-inaktivierenden Substanzen stattfindet und/oder c) ein schneller(er) Transport des Antibiotikums aus der Zelle erfolgt. Da viele konventionelle Antibiotika meist Substanzen sind, die aus Bakterien oder Pilzen isoliert wurden, existiert oft bereits ein Resistenzmechanismus, den die abgebende Zelle benutzt, um sich zu schützen. Da Bakterien und Pilze effektiv neues genetisches Material aus der Umwelt aufnehmen, ist die Übertragung von Resistenzgenen nur eine Frage der Zeit.

Darüber hinaus gibt es Versuche, Peptidantibiotika zu entwickeln. Hierbei handelt es sich i. d. R. um kleine (< 10 kDa), amphiphile und positiv geladene Peptide. Diese sind die Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, des Hauptverteidigungssystems der meisten Lebewesen, von Prokaryoten bis zum Menschen. Mit unterschiedlichen Sequenz- und Struktureigenschaften sind solche Substanzen gegen viele Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen, Pilze und Viren aktiv. Die Wirkung der bereits beschriebenen antimikrobiellen Peptide (AMP) beruht im Wesentlichen auf relativ unspezifischen Mechanismen, die zu einer Störung der Integrität der Membranstrukturen führen, z. B. durch die Ausbildung von Poren, aber sie können auch die angeborene Immunantwort stimulieren. Einige AMPs befinden sich gerade in den Phasen der präklinischen oder der klinischen Studien für die Behandlung verschiedener Infektionskrankheiten [Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. CEJB 2: 1–33].

Gegen die Verbreitung dieser neuen Art der antibakteriellen Therapie sprechen hauptsächlich die hohen Produktionskosten der AMPs. Peptide sind außerdem ziemlich empfindlich gegen proteolytischen Abbau. Die schnelle „clearance“ der Peptide und die ungünstige Pharmakokinetik aufgrund der Proteolyse können zudem die Anwendungsmöglichkeiten der AMPs stark eingrenzen.

Aus der geschilderten Problematik folgt, dass ein dringender Bedarf an neuen, effektiven Wirkstoffe gegen pathogene resistente Bakterien besteht.

5 Der vorliegenden Erfindung liegt damit die Aufgabe zugrunde, neue Peptid-Antibiotika bereitzustellen, bei denen eine Resistenzbildung weniger wahrscheinlich ist, die auch bei bestehenden Resistenzen eingesetzt werden können und als gut zugängliche Arzneimittel mit biologischer und therapeutischer Aktivität verwendet werden können, sowie einen Weg zu deren  
10 Produktion aufzuzeigen. Diese Peptid-Antibiotika sollen außerdem eine kostengünstige Alternative zu den bereits bekannten AMP darstellen und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptide mit den in den Ansprüchen wiedergegebenen Merkmalen sowie deren Verwendung  
15 gelöst.

Die Erfindung wird in den Fig. 1 bis 3 näher veranschaulicht. Es zeigen:

20 Fig. 1 die cDNA- und die Proteinsequenz von Hydraarminin 1a;

Fig. 2 einen Sequenzvergleich zwischen Hydraarminin 1a und ARM-C31-N; und

Fig. 3 einen Sequenzvergleich zwischen Hydraarminin 1a, b und c

25 Die unter der SEQ ID:NO 1 angegebene Nukleinsäuresequenz stellt eine cDNA des Süßwasserpolypen *Hydra* dar und codiert für ein strukturell neuartiges Peptid, Hydraarminin 1a (Aminosäuresequenz siehe SEQ ID:NO 2). Das daraus abgeleitete Peptid ARM-C31-N (SEQ ID:NO 3) weist eine einzigartige Aktivität gegen ein breites Spektrum pathogener Bakterien einschließlich multiresistenter Bakterienstämme auf (siehe Tabelle 1). Besonderes Augen-  
30 merk liegt dabei auf der Behandlung von MRSA-Infektionen. ARM-C31-N ist den derzeit in der Klinik eingesetzten klassischen Antibiotika sowie den derzeit bekannten Breitband-AMPs in seiner bakteriziden Wirkung deutlich überlegen. Es handelt sich außerdem um ein sehr

kleines Molekül, das relativ einfach chemisch synthetisiert werden kann, da es keine Cysteine und damit auch keine Disulfidbrücken aufweist.

- Der Süßwasserpolyp *Hydra* ist ein entwicklungsgeschichtlich alter vielzelliger Organismus.
- 5 *Hydra*-Polypen zeichnen sich durch einen einfachen morphologischen Aufbau aus: Sie bestehen im Wesentlichen aus zwei Zellschichten, dem der äußeren Umgebung zugewandten Ektoderm und dem im Wesentlichen dem zentralen Gastralraum zugewandten Endoderm. Da die Polypen über keinerlei physikalische Barrieren (Epidermis, Hornhaut, Panzer etc.) verfügen, sind die dünnen Epithelien der *Hydra* dem umgebenden aquatischen Milieu und den darin
- 10 enthaltenen potentiell pathogenen Mikroorganismen scheinbar schutzlos ausgesetzt. Trotzdem besiedeln *Hydra*-Polypen selbst mikrobiell stark belastete Süßgewässer und zeigen dabei keine Anzeichen einer Infektion. Dieser Umstand hat die Erfinder dazu veranlasst, in der *Hydra* nach Substanzen, insbesondere Peptiden zu suchen, die einen wirksamen antimikrobiellen Schutz für die *Hydra* vermitteln [Bosch, T.C.G., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Fraune, S.,
- 15 Hemmrich, G., Zill, H., Rosenstiel, P., Jacobs, G., Schreiber, S., Leippe, M., Stanisak, M., Grötzinger, J., Jung, S., Podschun R., Bartels J., Harder, J., Schröder, J.-M. (2009) Uncovering the evolutionary history of innate immunity: The simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. *Developmental and Comparative Immunology* 33:559–569].
- 20 Ausgangspunkt für die erfindungsgemäße Substanz ARM-C31-N (SEQ ID: NO 3) war die Isolation des Gens für Hydraarminin 1a aus *Hydra* (Beispiel 1; Fig. 1). Hydraarminin 1a wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert, die durch einen Transkriptom-Vergleich von *Hydra* mit und ohne interstitiellen Zellen mittels SSH („Suppression Subtractive Hybridisation“) erstellt wurde. Proteinextrakte aus *Hydra* ohne interstitielle Zellen und damit auch ohne deren
- 25 zellulären Abkömmlinge weisen eine erhöhte antibakterielle Aktivität auf [Kasahara, S., Bosch, T.C. (2003) Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 79–85]. Die so erstellte cDNA-Bibliothek enthält folgerichtig Transkripte, deren Produkte eine antimikrobielle Aktivität aufweisen können. Das natürliche in *Hydra* gefundene Hydraarminin 1a hat folgende Eigenschaften: Der offene Leserahmen umfasst 276
- 30 Nukleotide (Fig.1; SEQ ID:NO 1), die für ein 88 Aminosäurereste langes Peptid codieren (Fig. 1; SEQ ID:NO 2); davon bilden die ersten 18 Aminosäurereste das vorhergesagte Signalpeptid (unterstrichen in Fig. 1). Die kalkulierte Masse liegt bei 10567 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei 6,3.

In dieser Form bzw. mit abgespaltenem Signalpeptid hat dieses Peptid mit sehr großer Wahrscheinlichkeit keine antibakterielle Aktivität. Auffällig ist allerdings eine Separierung von negativen und positiven Aminosäureresten. So ist der N-Terminus des Peptides stark negativ geladen, der C-terminus hingegen stark positiv geladen (Fig. 2). Prozessierungsstellen von Proteasen, die diese beiden Teile trennen, sind nicht nachweisbar.

Die erfindungsgemäße Substanz ARM-C31-N (Fig. 2; SEQ ID:NO 3) ist ein artifizielles Produkt und basiert auf der Überlegung der Erfinder, die Anzahl der positiven Ladungen auf Grundlage der C-terminalen Hydraarminin-1a-Sequenz zu maximieren. Um einen zusätzlichen Schutz gegen proteolytischen Abbau zu erreichen, wurde zusätzlich der C-Terminus amidiert. Das C-terminale Ende des gencodierten Peptids Hydraarminin 1a mit der Aminosäuresequenz G<sub>86</sub>-K<sub>87</sub>-K<sub>88</sub> könnte ein natürliches Amidierungssignal sein, das durch Spaltung am Glycin zu einer Carboxy-Amidierung des dann C-terminalen Aminosäurerestes V<sub>85</sub> führen würde. Für das erfindungsgemäße Peptid ARM-C31-N wurde jedoch bewusst das Lys<sub>88</sub> amidiert. Somit kann das erfindungsgemäße Peptid ARM-C31-N in dieser Form nicht aus einem nativen Hydraextrakt gereinigt und dargestellt werden.

Die Aminosäuresequenz von ARM-C31-N ist:

20

KPWRFRAIRRVWRKVAPYIPFVVKTVGKK-NH<sub>2</sub>

ARM-C31-N besteht aus 31 Aminosäureresten, die am C-Terminus amidiert wurden. Die erfindungsgemäße Substanz hat eine kalkulierte Masse von 3896 Da und einen isoelektrischen Punkt von 12,1. Unter physiologischen Bedingungen ist ARM-C31-N positiv geladen. Interessanterweise verfügt ARM-C31-N über keinerlei Cysteine, im Gegensatz zu fast allen bekannten antimikrobiellen Peptiden. Die Anwesenheit von Cysteinen erhöht in der Regel die Stabilität des Peptides und behindert den proteolytischen Abbau. Allerdings erschweren viele Cysteine die Herstellung eines solchen Peptides (Sicherstellen der richtigen Verknüpfung der verschiedenen Cysteine, Reinigung und Separierung verschiedener Konformere, etc.). ARM-C31-N hingegen lässt sich kostengünstig rekombinant oder synthetisch in größeren Mengen herstellen, da es über keine Cysteine und entsprechende Disulfidbrücken verfügt. Für erste antimikrobielle Tests (Beispiel 3) wurde ARM-C31-N chemisch synthetisiert (auf Basis der

30

Merrifield-Synthese; Beispiel 2). Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Feststellung der hohen bakteriziden Wirkung gegen *S. aureus* war überraschend, da *Hyd-*  
5 *ra* nicht mit diesen Bakterien vergesellschaftet ist, und eine solch starke Wirkung keineswegs  
erwartet werden konnte. Das hat die Erfinder veranlasst, die Minimale Bakterizide Konzentra-  
tion (*minimal bactericidal concentration*, MBC) gegen *S. aureus* detaillierter zu betrachten.  
Hier zeigte sich, dass ARM-C31-N bereits bei niedrigen Konzentrationen von 0,4 bis 0,8  $\mu\text{M}$   
*S. aureus* und sogar einige MRSA-Stämme eliminiert (Tabelle 1). Aber auch andere gram-  
10 positive Bakterien werden von ARM-C31-N effektiv getötet. Darunter sind beispielsweise  
gram-positive Vancomycin-resistente Stämme von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus*  
*faecium*. Besonders hervorzuheben ist darüber hinaus die starke Aktivität gegenüber gram-  
negativen ESBL-Enterobacteriaceae wie *K.-pneumoniae*-Stämmen und den *E.-coli*-Stämmen  
E4 and E9 (Tabelle 1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ARM-C31-N ein wir-  
15 kungsvolles Breitband-Peptidantibiotikum und eine exzellente Ausgangsstruktur für das De-  
sign einer neuen Generation von Antibiotika ist.

Da Peptidantibiotika auf einem anderen Wirkmechanismus beruhen als konventionelle Anti-  
biotika, sind sie eben auch wirksam gegen Bakterien, die bereits eine Resistenz gegen kon-  
20 ventionelle Antibiotika aufweisen. Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen sehr deut-  
lich, dass ARM-C31-N gegen Methicillin-resistente *S. aureus* wirkt, genauso wie gegen Van-  
comycin resistente Stämme von *E. faecalis* und *E. faecium*. Infektionen mit multiresistenten  
Bakterienstämmen können mit herkömmlichen Antibiotika nicht mehr behandelt werden, und  
die vorhandenen Reserveantibiotika sind nur eingeschränkt einsetzbar. Obwohl z.B. Linezolid  
25 im Moment als Reserveantibiotikum gilt („last line of defense“), ist die Behandlung nur unter  
strengen Auflagen erlaubt. So darf es sich bei der Infektion nicht um eine Mischinfektion aus  
gram-positiven und gram-negativen Erregern handeln, und die Bakterien müssen vor der Be-  
handlung auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Linezolid geprüft werden. Bei Mischinfektio-  
nen wird nur dann eine Behandlung mit Linezolid befürwortet, wenn Behandlungsalternativen  
30 fehlen und gleichzeitig mit einer weiteren Antibiotikatherapie die Infektion durch gram-  
negative Bakterien bekämpft wird (Wichtige Sicherheitsinformation, Pfizer Pharma GmbH,  
März 2007; [http://www.ifap.de/pdf/Zyvoxid\\_BfArM.pdf](http://www.ifap.de/pdf/Zyvoxid_BfArM.pdf)). Für Infektionen mit Keimen, die  
methicillin- und/oder vancomycinresistent sind, werden alternative Antibiotika benötigt, die

weniger Nebenwirkungen aufweisen und die ein größeres Wirkspektrum besitzen als Linezolid, so wie es für das erfindungsgemäße Peptid ARM-C31-N demonstriert werden konnte. Zudem ist es nur eine Frage der Zeit, bis sich auch gegen die letzten konventionellen Reserveantibiotika Resistenzen bilden werden.

5

Anhand der Sequenz von Hydraarminin 1a haben die Erfinder EST-Datenbanken durchmustert (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>; <http://compagen.zoologie.uni-kiel.de/>) und konnten dabei zwei zusätzliche Genfamilienmitglieder identifizieren: Hydraarminin 1b und c (SEQ ID:NO 4 und 6). Der offene Leserahmen von Hydraarminin 1b und c (SEQ ID:NO 5 und 7) umfasst, wie bei Hydraarminin 1a, 276 Nukleotide, die für 88 Aminosäurereste lange Peptide codieren. Fig. 3 zeigt einen Sequenzvergleich der 3 erfindungsgemäßen Hydraarminin-Peptide. Gegenüber Hydraarminin 1a weisen Hydraarminin 1b und c jeweils 7 und 4 Aminosäureaustausche auf (grau dargestellt in Fig. 3). Davon befindet sich in beiden Fällen nur ein Aminosäureaustausch (K gegen R, Position 83) im C-terminalen Bereich der Peptide. Somit ergibt sich sowohl aus Hydraarminin 1b als auch aus Hydraarminin 1c ein gleiches erfindungsgemäßes Peptid ohne Signalsequenz, ARM-C31b-N (SEQ ID:NO 8, schwarz dargestellt in Fig. 3), das gegenüber der Sequenz von ARM-C31-N nur den Aminosäureaustausch K gegen R aufweist. Wie im Fall von ARM-C31-N, ist die bevorzugte Ausführung des erfindungsgemäßen Peptides ARM-C31b-N auch C-terminal amidiert. Wie bei ARM-C31-N kann das erfindungsgemäße Peptid ARM-C31b-N in dieser Form nicht aus einem nativen Hydraextrakt gereinigt und dargestellt werden.

10

15

20

25

30

Gegenstand der Erfindung sind neben den beschriebenen Peptiden auch deren biologisch aktive Fragmente. Biologisch aktiv bedeutet, dass die Fragmente gemäß dem in den Beispielen angegebenen Messverfahren eine maximal 10-fach höhere minimale bakterizide Konzentration (MBK) aufweisen als die zugrunde liegenden kompletten Peptide. Bevorzugt handelt es sich um Derivate, bei denen N- oder C-terminal eine oder mehrere Aminosäuren fehlen. Es können jedoch auch Aminosäuren aus der Sequenz deletiert sein. Solche Fragmente weisen bevorzugt nicht mehr als 30 % deletierte Aminosäuren auf.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin solche Peptide, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind. Bevorzugt handelt es sich dabei um konservative Austausche, d. h. Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften werden ersetzt, beispielweise Alanin gegen Serin, Leucin

gegen Isoleucin, etc. Auch hier wird bevorzugt, dass nicht mehr als 10 % der Aminosäuren in den Peptiden ersetzt werden.

5 Darüber hinaus können auch einzelne Aminosäuren durch nicht-natürliche Aminosäuren ersetzt sein, d.h. durch Aminosäuren, die weitere funktionelle Gruppen tragen, beispielsweise Hydroxyprolin, Methylthreonin, Homocystein, etc. Auch in diesem Fall sind bevorzugt nicht mehr als 10 % der Aminosäuren entsprechend modifiziert. Weiterhin können die Peptide Derivatisierungen tragen, beispielsweise amidiert, glycosiliert, acetyliert, sulfatiert oder phosphoryliert sein.

10 Die vorliegende Erfindung stellt des Weiteren ein Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäßen Peptide bereit. Neben der gentechnischen Herstellung der Peptide ist auch die aufbauende Totalsynthese an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese oder einer Flüssigphasensynthese möglich. Die Synthesestrategie und der Aufbau der Peptide und von  
15 ihnen abgeleiteter Derivate mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide als Arzneimittel für verschiedene therapeutische Indikationen. Dazu können die Peptide als  
20 hochreine Stoffe oder – wenn für die Verwendung ausreichend – innerhalb eines teilweise aufgereinigten Peptidgemisches oder als Gemisch mehrerer erfindungsgemäßer Peptide verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft des Weiteren folgende Anwendungen der erfindungsgemäßen antimikrobiellen Peptide:  
25

- rein äußerliche Anwendungen in Form von Hautcremes.
- Desinfektion chronischer Wunden, die vor allem bei stationären Patienten oft mit multiresistenten Keimen (z. B. *S. aureus*) infiziert sind, durch Spülen mit antimikrobielle Peptide enthaltenden Lösungen.
- 30 – Beschichtung von Transplantaten, die kontinuierlich antimikrobielle Peptide freigeben. Diese Transplantate können z. B. Biopolymere, die als künstliche Haut nach schwersten Verbrennungen zum Einsatz kommen, oder auch künstliche Gelenke umfassen.

- Desinfektion von Kathetern durch eine Beschichtung mit antimikrobiellen Peptiden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

5

#### Beispiel 1: Isolation des Peptids Hydraarminin 1a

Zur Stimulation der Immunabwehr wurden (i) die *Hydra*-Polypen mit einem *Pseudomonas-aeruginosa*-Kulturüberstand inkubiert oder (ii) die Nervenzellen eines speziellen Hydrastammes entfernt. Die Nervenzellen wurden wie bereits beschrieben [Kasahara, S., Bosch, T.C. 10 (2003) Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells. Dev. Comp. Immunol. 27: 79–85] durch das Kultivieren von wärmesensitiven *Hydra magnipapillata* sf-1 Tieren bei 25 °C für 25 Tage entfernt.

Die Gesamt-RNA aus den Polypen wurde mit TRIzol (Invitrogen) gewonnen. „Suppression 15 Subtractive Hybridisation“ wurde wie beschrieben durchgeführt [Genikhovich, G., Kurn, U., Hemmrich, G., Bosch, T.C. (2006) Discovery of genes expressed in Hydra embryogenesis. Dev. Biol. 289: 466–81].

#### Beispiel 2: Herstellung von ARM-C31-N

20 Nachdem das Transkript von Hydraarminin 1a durch die oben beschriebene „Suppression Subtractive Hybridisation“ isoliert und seine Sequenz analysiert werden konnte, haben die Erfinder festgestellt, dass die Sequenz des Peptids mindestens drei unterschiedliche Bereiche aufweist. N-terminal konnte mit dem SignalP-3.0-Programm [Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. 25 Biol. 340: 783–95] ein Signalpeptid vorhergesagt werden. Daraus folgt, dass Hydraarminin 1a ins endoplasmatische Reticulum gelangt, dort prozessiert und dann wahrscheinlich sezerniert wird. Das Signalpeptid spielt also keine Rolle für die antibakterielle Aktivität und konnte weggelassen werden. Weiterhin war auffällig, dass das Peptid eine Ladungsverteilung aufweist: N-terminal negativ, C-terminal positiv (Fig. 2). Die Erfinder haben die Sequenz so aufgeteilt, dass möglichst viele positive Ladungen am C-Terminus des Peptides erhalten bleiben. 30 Um das so entstandene Peptid, ARM-C31-N genannt, auf seine antimikrobielle Wirkung hin zu untersuchen, wurde es synthetisch hergestellt (Firma Caslo Laboratory). Dies erfolgte

durch „Fmoc solid phase synthesis“. Das Peptid wurde daraufhin HPLC-gereinigt und die Sequenz wurde durch Massenspektrometrie überprüft.

Um ARM-C31-N vor Proteolyse zu schützen, wurde es zusätzlich C-terminal amidiert. Das natürliche Arminin-1a besitzt mit G<sub>86</sub>-K<sub>87</sub>-K<sub>88</sub> ein mögliches Amidierungssignal, jedoch würde dieses Signal durch Spaltung des Glycins zu einer Amidierung des dann C-terminalen V<sub>85</sub> führen. Dies wiederum schließt aus, dass man ARM-C31-N mit der Amidierung am K<sub>88</sub> aus der natürlichen Ressource (*Hydra*) isolieren könnte.

### 10 Beispiel 3: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität von ARM-C31-N wurde wie bereits beschrieben bestimmt [Sahly, H., Schubert, S., Harder, J., Rautenberg, P., Ullmann, U., Schroder, J., Podschun, R. (2003) *Burkholderia* is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1739–41]. Test-Isolate wuchsen 2 bis 3 h in „brain heart infusion broth“ bei 36 +/- 1 °C, wurden dann dreimal in 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) mit 1 % „tryptic soy broth“ (TSB) gewaschen und auf 10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> Bakterien/ml eingestellt. Je 100 µl Bakterien suspension wurden mit 10 µl Lösung des antimikrobiellen Peptids versetzt (getestete Endkonzentrationen: 0,0125–100 µg/ml) und bei 36 +/- 1 °C inkubiert. CFUs („colony forming units“ = „koloniebildende Einheiten“) wurden nach 2 h bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Bakterien suspensionen, die mit 10 µl Phosphat-Puffer/1 % TSB statt mit Peptid-Lösung versetzt wurden. Die Ergebnisse werden als MBK („minimale bakterizide Konzentration; >=99,9 % Tötung) angegeben.

Tabelle 1: Antimikrobielle Aktivität von ARM-C31-N

25

Bakterien - Stämme	MBK* [µg/ml]	MBK* [µM]
<b>Methicillin-resistente Stämme (gram-positiv)</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 33393 MRSA	1,56	0,40
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	1,56	0,40
<i>S. aureus</i> wilder Stamm 344 MRSA	3,13	0,80
<i>S. aureus</i> wilder Stamm 355 MRSA	3,13	0,80
<i>S. aureus</i> wilder Stamm 358 MRSA	1,56	0,40

<b>Vancomycin-resistente Stämme (gram-positiv)</b>		
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 VRE	6,25	1,60
<i>E. faecium</i> wilder Stamm 354 VRE	1,56	0,40
<i>E. faecium</i> wilder Stamm 356 VRE	3,13	0,80
<i>E. faecium</i> wilder Stamm G70 VRE	1,56	0,40
<i>E. faecium</i> wilder Stamm G71 VRE	1,56	0,40
<b>„Extended spectrum betalactamase“ Enterobakterien (gram-negativ)</b>		
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 700603 ESBL	3,13	0,80
<i>Kl. pneumoniae</i> wilder Stamm CF1 ESBL	1,56	0,40
<i>Kl. pneumoniae</i> wilder Stamm CF7 ESBL	1,56	0,40
<i>E. coli</i> wilder Stamm E4 ESBL	1,56	0,40
<i>E. coli</i> wilder Stamm E9 ESBL	0,78	0,20

\* MBK: minimale bakterizide Konzentration (Konzentration, bei der mehr als 99,9 % der Bakterien getötet werden.)

ANSPRÜCHE

- 5 1. Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) einem Nukleinsäuremolekül mit der in der SEQ ID:NO 1, 4 oder 6 dargestellten Nukleotidsequenz,
- 10 b) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Peptid mit der in der SEQ ID:NO 2, 3, 5, 7 oder 8 dargestellten Aminosäuresequenz codiert,
- c) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Komplementärstrang an ein Nukleinsäuremolekül nach a) oder b) hybridisiert und das ein Peptid mit antimikrobieller
- 15 Aktivität codiert, und
- d) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Nukleotidsequenz von der Nukleotidsequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach c) aufgrund des degenerierten genetischen Codes abweicht.
- 20
2. Vektor, gekennzeichnet durch ein Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz nach Anspruch 1.
- 25
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuremolekül mit regulatorischen Elementen für die Expression in *Hydra* kombiniert ist.
- 30 4. Wirtszelle, gekennzeichnet durch ein Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz nach Anspruch 1.
5. Wirtszelle, gekennzeichnet durch den Vektor nach Anspruch 2.

6. Peptid mit der unter SEQ ID:NO 2, 3, 5, 7 oder 8 dargestellten Aminosäuresequenz.
- 5
7. Peptid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es ein zyklisches, amidiertes, acetyliertes, sulfatiertes, phosphoryliertes, glycosiliertes oder oxidiertes Derivat ist.
- 10
8. Peptid nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass  $\leq 30$  % der angegebenen Aminosäuren durch andere Aminosäuren konservativ substituiert sind.
- 15
9. Peptid nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass  $\leq 10$  % der angegebenen Aminosäuren mit nicht-natürlich-vorkommenden Aminosäuren substituiert sind.
- 20
10. Peptid nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die nicht-natürlich-vorkommenden Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyprolin, Methylthreonin oder Homocystein.
- 25
11. Peptid nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Lysin-Aminosäurerest durch einen Arginin-Aminosäurerest oder wenigstens ein Arginin-Aminosäurerest durch einen Lysin-Aminosäurerest substituiert ist.
- 30
12. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung mikrobieller Infektionen.

13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Behandlung von Infektionen mit gram-negativen oder gram-positiven Bakterien.
- 5 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 oder 13 zur Behandlung von Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* oder *Escherichia coli*.
- 10 15. Verwendung das Peptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Beschichten eines medizinischen Instruments, Katheters, medizinischen Implantats oder einer Kontaktlinse.

5

10 1 TTTGGAAAATGAAGACAGTGTGGCATTGTTTTGTTTTGACATTCATTGCGTTCACATACG  
1 M K T V L A F L F L T F I A F T Y

61 CAGAAAGTTATGAGGATGTGAAAGAAGAAATTAATAATGAAGTTGAAAAAGAAATATTTG  
18 A E S Y E D V K E E I K N E V E K E I F

15 121 AAGATCTTGAAGAGGAAAGTGACGCATTAGATAGTAGCGTTAGAGAGTTAATGATGCAA  
38 E D L E E E S D A L D S S V R E F N D A

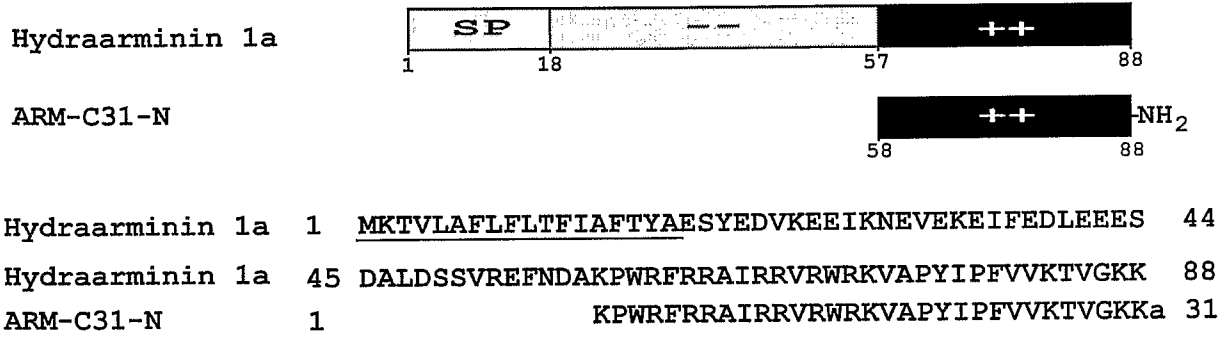
181 AGCCATGGAGATTTTCGTAGAGCTATTCGAAGAGTACGATGGAGAAAAGTTGCTCCTTACA  
58 K P W R F R R A I R R V R W R K V A P Y

20 241 TACCATTTGTTGTTAAGACGGTTGGTAAAAAGTAAACGAAAACAACACTAAGATAAATCTTTT  
78 I P F V V K T V G K K

25

**FIG. 1**

5



10

FIG. 2

5

10   hydraarminin\_1b   MKTVLAFLEFLTFIAFTHAESYEDVKKEIKNEVEREIFEDLEEESDVLESNVRELNDAKPW 60  
      hydraarminin\_1c   MKTVLAFLEFLTFIAFTYAESYEDVKKEIKNEVEREIFEDLEEESDVLDNSVREFNDAKPW 60  
      hydraarminin\_1a   MKTVLAFLEFLTFIAFTYAESYEDVKKEIKNEVEKEIFEDLEEESDALDSSVREFNDAKPW 60  
                          \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*:\*.\*:\*\*\*\*\*

15   hydraarminin\_1b   RFERRAIRRVWRKVAPYIPFVVRTVGKK 88  
      hydraarminin\_1c   RFERRAIRRVWRKVAPYIPFVVRTVGKK 88  
      hydraarminin\_1a   RFERRAIRRVWRKVAPYIPFVVRTVGKK 88  
                          \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

20

FIG. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2009/001587

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. A61K38/17 C07K14/435 C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 15 September 2003 (2003-09-15), "Hydra magnipapillata cDNA, clone:hmp_12630." XP002567535 retrieved from EBI accession no. EMBL:BP516266 Database accession no. BP516266 abstract</p>	1, 2, 4, 5
A	<p>KASAHARA SHINJI ET AL: "Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells." DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 79-85, XP002567534 ISSN: 0145-305X the whole document</p>	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 Februar 2010

Date of mailing of the international search report

23/02/2010

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

Authorized officer

Roscoe, Richard

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2009/001587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BOSCH T C G ET AL: "Uncovering the evolutionary history of innate immunity: The simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence" DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, vol. 33, no. 4, 12 November 2008 (2008-11-12), pages 559-569, XP025922908 ISSN: 0145-305X [retrieved on 2008-11-12] the whole document</p>	1-15
A	<p>HEMMRICH ET AL: "The evolution of immunity: a low-life perspective" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 28, no. 10, 25 September 2007 (2007-09-25), pages 449-454, XP022266065 ISSN: 1471-4906 the whole document</p>	1-15
P,A	<p>WO 2009/037714 A (TEL HASHOMER MEDICAL RES INFRA [IL]; ZLOTKIN AMIR [IL]; ZLOTKIN ELIAHU) 26 March 2009 (2009-03-26) the whole document</p>	1-15
P,A	<p>DE 10 2007 056836 A1 (UNIV KIEL CHRISTIAN ALBRECHTS [DE]) 28 May 2009 (2009-05-28) the whole document</p>	1-15
T	<p>AUGUSTIN RENE ET AL: "Activity of the Novel Peptide Arminin against Multiresistant Human Pathogens Shows the Considerable Potential of Phylogenetically Ancient Organisms as Drug Sources" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON; DC, US, vol. 53, no. 12, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 5245-5250, XP009129219 ISSN: 0066-4804 the whole document</p>	
T	<p>AUGUSTIN R ET AL: "Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system" DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, vol. 33, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 830-837, XP026048761 ISSN: 0145-305X [retrieved on 2009-02-23] the whole document</p>	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2009/001587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>JUNG SASCHA ET AL: "Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the Basal metazoan hydra" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 284, no. 3, 16 January 2009 (2009-01-16), pages 1896-1905, XP002513802 ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2008-11-19] the whole document</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2009/001587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009037714 A	26-03-2009	NONE	
DE 102007056836 A1	28-05-2009	WO 2009067968 A1	04-06-2009

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2009/001587

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 INV. A61K38/17 C07K14/435 C12N15/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 C07K

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] 15. September 2003 (2003-09-15), "Hydra magnipapillata cDNA, clone:hmp_12630." XP002567535 gefunden im EBI accession no. EMBL:BP516266 Database accession no. BP516266 Zusammenfassung	1,2,4,5
A	KASAHARA SHINJI ET AL: "Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells." DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, Bd. 27, Nr. 2, Februar 2003 (2003-02), Seiten 79-85, XP002567534 ISSN: 0145-305X das ganze Dokument	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

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

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
9. Februar 2010	23/02/2010
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Roscoe, Richard

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2009/001587

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BOSCH T C G ET AL: "Uncovering the evolutionary history of innate immunity: The simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence" DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, Bd. 33, Nr. 4, 12. November 2008 (2008-11-12), Seiten 559-569, XP025922908 ISSN: 0145-305X [gefunden am 2008-11-12] das ganze Dokument	1-15
A	HEMMRICH ET AL: "The evolution of immunity: a low-life perspective" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, Bd. 28, Nr. 10, 25. September 2007 (2007-09-25), Seiten 449-454, XP022266065 ISSN: 1471-4906 das ganze Dokument	1-15
P,A	WO 2009/037714 A (TEL HASHOMER MEDICAL RES INFRA [IL]; ZLOTKIN AMIR [IL]; ZLOTKIN ELIAHU) 26. März 2009 (2009-03-26) das ganze Dokument	1-15
P,A	DE 10 2007 056836 A1 (UNIV KIEL CHRISTIAN ALBRECHTS [DE]) 28. Mai 2009 (2009-05-28) das ganze Dokument	1-15
T	AUGUSTIN RENE ET AL: "Activity of the Novel Peptide Arminin against Multiresistant Human Pathogens Shows the Considerable Potential of Phylogenetically Ancient Organisms as Drug Sources" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 53, Nr. 12, 1. Dezember 2009 (2009-12-01), Seiten 5245-5250, XP009129219 ISSN: 0066-4804 das ganze Dokument	
T	AUGUSTIN R ET AL: "Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system" DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, Bd. 33, Nr. 7, 1. Juli 2009 (2009-07-01), Seiten 830-837, XP026048761 ISSN: 0145-305X [gefunden am 2009-02-23] das ganze Dokument	

-/--

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2009/001587

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>JUNG SASCHA ET AL: "Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the Basal metazoan hydra" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, Bd. 284, Nr. 3, 16. Januar 2009 (2009-01-16), Seiten 1896-1905, XP002513802 ISSN: 0021-9258 [gefunden am 2008-11-19] das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2009/001587

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2009037714 A	26-03-2009	KEINE	
DE 102007056836 A1	28-05-2009	WO 2009067968 A1	04-06-2009