



(10) **DE 10 2010 004 541 A1** 2011.07.21

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2010 004 541.1**
 (22) Anmeldetag: **14.01.2010**
 (43) Offenlegungstag: **21.07.2011**

(51) Int Cl.: **C07K 14/435 (2006.01)**
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(71) Anmelder:
**Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24118,
 Kiel, DE**

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105, Kiel, DE

(72) Erfinder:
**Grötzinger, Joachim, Prof. Dr. rer. nat., 24214,
 Altwittenbek, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

DE 694 31 645 T2
DE 603 10 611 T2

**Internet-Recherche am 23.07.2010:www.
 ncbi.nlm.nih.gov**

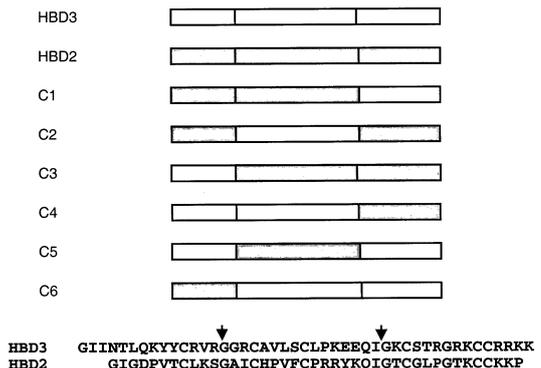
**Synthetic construct human beta-defensin-2
 precursor, gene Accession Nummer: AY155577**
Sequenzvergleich von AY155577 und "<400>3"
Sequenzvergleich von AY155577 und <400>11"

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Chimäre humane beta-Defensine**

(57) Zusammenfassung: Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus a) einem Nukleinsäuremolekül mit einer der in SEQ ID: NO 3 bis SEQ ID: NO 7 dargestellten Nukleotidsequenz, b) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Peptid mit einer der in SEQ ID: NO 11 bis SEQ ID: NO 15 dargestellten Aminosäuresequenz kodiert, c) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Komplementärstrang an ein Nukleinsäuremolekül nach a) oder b) hybridisiert und das ein Peptid mit antimikrobieller Aktivität codiert, und d) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Nukleotidsequenz von der Nukleotidsequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach c) aufgrund des degenerierten genetischen Codes abweicht.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft für antimikrobielle chimäre Peptide aus humanem beta-Defensin-2 (HBD2) und humanem beta-Defensin-3 (HBD3) mit einem neuen antimikrobiellen Wirkungsspektrum kodierende Sequenzen, die von diesen Sequenzen kodierten antimikrobiellen Peptide und deren Derivate, sowie deren Verwendung zur Herstellung antimikrobiell wirksamer Substanzen und ihre Anwendung.

[0002] Antimikrobielle Peptide wurden von einer breiten Vielfalt von Organismen isoliert, einschließlich des Menschen, bei dem sie hauptsächlich an der ersten Linie der Pathogenabwehr teilnehmen (1). Unter diesen Peptiden finden sich die Defensine, eine Familie von antimikrobiellen Peptiden, die eine Größe von 3 bis 6 kDa besitzen und einen hohen Anteil sowohl an kationischen Aminosäureresten als auch an Cysteinresten besitzen (2–5). Ihre Abundanz in Menschen und anderen Vertebraten, zusammen mit ihrer mikrobioziden Aktivität, machte sie zu wichtigen Effektor-Molekülen von Neutrophilen, mukosalen Oberflächen, Haut und anderen Epithelien (6).

[0003] Die humanen Defensine werden in zwei Subfamilien klassifiziert: alpha- und beta-Defensine, die sich in der Lokalisation und der Paarung von 6 Cysteinresten unterscheiden (7–9). Menschliche beta-Defensine (HBD1–HBD4) finden sich hauptsächlich in verschiedenen epithelialen Zellen und Geweben.

[0004] Zwei der humanen beta-Defensine, HBD2 und HBD3, wurden ursprünglich aus Keratinocyten von Patienten mit Psoriasis isoliert (10, 11). Außer in der Haut werden HBD2 und HBD3 auch in den Epithelien der Trachea, Lunge, Herzmuskel und Plazenta exprimiert (10, 12, 13). Beide Moleküle werden durch bakteriellen Einfluss oder proinflammatorische Cytokine, zum Beispiel TNF α , Interferon- γ und Interleukin-1 β , induziert (10, 12–16).

[0005] Die meisten Beweise für die antimikrobielle Aktivität der humanen beta-Defensine in vivo kommen aus Experimenten in denen gezeigt wurde, dass gereinigte Peptide auf eine große Anzahl von Mikroorganismen in vitro wirken. HBD1 hat eine antimikrobielle Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien und schützt gegen Infektionen mit Adenovirus (17, 18). HBD2 ist gegen viele gramnegative Bakterien aktiv, unter ihnen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, aber auch gegen *Candida albicans*. Es wurde zudem eine bakterio-statische Wirkung gegen grampositive *Staphylococcus aureus* Bakterien nachgewiesen (10). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass HBD2 stärker gegen *E. coli* wirkt als HBD1 (16). Die antimikrobielle Wirkung von HBD1 und HBD2 hängt von der Verfügbarkeit von Natriumchlorid ab (16). Im Gegensatz zu ihnen ist HBD3 viel stärker positiv geladen und besitzt eine antimikrobielle Wirkung nicht nur gegen gramnegative sondern auch gegen grampositive Bakterien, einschließlich *S. aureus* und *Enterococcus faecium* (11, 19). Darüber hinaus ist die bakteriozide Wirkung von HBD3 unempfindlich gegenüber der Ionenkonzentration (11).

[0006] Obwohl die Tertiärstrukturen der humanen beta-Defensine bestimmt wurden, ist der Mechanismus der Permeabilisierung der bakteriellen Doppelmembranen nicht bestätigt. Humane beta-Defensine zeigen eine charakteristische Faltung die aus dreisträngigen antiparallelen β -Faltblättern und einer kurzen N-terminalen α -Helix aufgebaut sind (20–23). Strukturuntersuchungen haben ergeben, dass sowohl HBD2 als auch HBD3 in Lösung Dimere bilden können, wobei dies für HBD2 nur bei hohen Peptidkonzentrationen gilt (20, 23). Für HBD2-Dimere wurde postuliert, dass sie Oktamere bilden, wobei diese mit ihren strukturellen und elektrostatischen Eigenschaften keine Membran-durchspannende Pore zu bilden scheinen. Für HBD2 wurde vorgeschlagen, dass es die Bakterienmembran durch elektrostatische Interaktionen zerstört (20). Darüber hinaus wurde für HBD3 gezeigt, dass es Innenkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* erzeugt (19).

[0007] Der Wirkungsmechanismus der Defensine ist zwar nicht vollständig aufgeklärt, es wird aber angenommen, dass ihr amphipatischer Charakter der Schlüssel zur antimikrobiellen Aktivität ist. Innerhalb der Defensinfamilie sind die Primärstrukturen, mit Ausnahme der Cysteinreste, wenig konserviert. Es wird vermutet, dass die antimikrobielle Wirkung mit der positiven Gesamtladung und der Hydrophobizität des Moleküls zunimmt (24).

[0008] Die Primärstrukturen von HBD1–3 legen nahe, dass es beachtliche Unterschiede in der Gesamtladung zwischen diesen Defensinen gibt. HBD1–3 zeigen eine positive Gesamtladung von +4, +6 bzw. +11. Kationische Aminosäurereste treten hauptsächlich hinter dem dritten Cystein in HBD1 und HBD2 auf. In HBD3 liegen neun von dreizehn kationischen Aminosäureresten hinter diesem Cysteinrest. Die antimikrobielle Wirkung von diesen Peptiden variiert. HBD3 zeigt die stärkste Aktivität und die höchste positive Ladung. Die Bedeutung der Struktur für die Funktion wurde in Studien intensiv erforscht, in denen die Defensin Primärstruktur verändert wurde. Einzelne Aminosäureaustausche und N-terminale Deletionen, die keinen Einfluss auf die Ladung

haben oder die Hydrophobie nicht massiv verändern, erhalten die antimikrobielle Wirkung. Allerdings können diese Änderungen die Empfänglichkeit der Bakterien und die Tötungsrate verändern. Es wird diskutiert, dass eine Erhöhung der Gesamtladung und der Hydrophobie die antimikrobielle Aktivität verstärkt. Peptide mit einer geringeren Anzahl an kationischen Resten und moderater Hydrophobie sind nahezu inaktiv, während Peptide mit einer hohen Gesamtladung und mit signifikant hydrophobem Charakter aktiv sind. HBD3 wurde in mehreren Studien analysiert, wobei verschiedene Regionen des Peptides eingehend untersucht wurden. Synthetische Peptide mit Sequenzen aus dem N-Terminus und dem C-Terminus wurden hergestellt. Die N-terminale Sequenz von HBD3 bestehend aus 17 Aminosäuren und einer Gesamtladung von nur +4 wurde synthetisiert. Trotz seiner geringen Ladung zeigte dieses Peptid eine antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Organismen. N-terminale Deletionsmutanten von HBD3 heben die Bedeutung der ersten sieben Reste für die Aktivität gegen grampositive Organismen hervor (24).

[0009] Es besteht dringender Bedarf an neuen Therapeutika, um pathogene Mikroorganismen erfolgreich zu bekämpfen. Die natürlich vorkommenden humanen beta-Defensine sind in diesem Zusammenhang eine Proteinfamilie mit sehr interessanten und unterschiedlichen antibiotischen Eigenschaften. Wie bereits oben erwähnt zeigen z. B. HBD2 und HBD3 bemerkenswerte Unterschiede in ihren Wirkungsspektren.

[0010] Der vorliegenden Erfindung liegt damit die Aufgabe zugrunde, neue Peptide bereitzustellen, die, ausgehend von den natürlichen Stoffen HBD2 und HBD3, als Arzneimittel mit einer kombinierten und verbesserten biologischen und therapeutischen Defensin-Aktivität verwendet werden können.

[0011] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Chimäre aus HBD2 und HBD3 mit den Merkmalen des Anspruch 1 gelöst. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausführungen der Erfindung wieder.

[0012] Die Erfindung wird in den Figuren näher veranschaulicht. Es zeigen:

[0013] [Fig. 1](#) eine schematische Strukturdarstellung der HBD2/HBD3-Chimären (C1–C6) und einen Sequenzvergleich zwischen HBD2 und HBD3; und

[0014] [Fig. 2](#) das Ergebnis der chromatographischen Aufreinigung der rekombinanten HBD2/HBD3-Chimären.

[0015] Die unter der SEQ ID: NO 3 bis SEQ ID: NO 8 angegebenen Nukleinsäuresequenzen codieren für neuartige Peptide, die HBD2/HBD3-Chimäre HBDC1 bis C6 (Aminosäuresequenzen: SEQ ID: NO 11 bis SEQ ID: NO 16). Die erfindungsgemäße Peptide HBDC3 und C5 weisen eine einzigartige Aktivität gegen *E. coli* und *S. aureus* auf (siehe Tabelle 1): Sie sind überraschenderweise mindestens genauso wirksam oder gar wirksamer gegen diese Erreger als die natürlich vorkommenden Defensine HBD2 und HBD3.

[0016] Die strukturellen Bestimmungsfaktoren, die für die verschiedenen Aktivitäten von HBD2 und HBD3 gegen grampositive und gramnegative Bakterien verantwortlich sind, wurden untersucht durch die Generierung sechs chimärer Moleküle aus HBD2 und HBD3 und der Ermittlung ihrer Aktivität gegen *E. coli*- und *S. aureus*-Stämme.

[0017] Bei HBD2 und HBD3 sind nicht nur die beta-Defensin-typischen Cysteinreste sondern auch zwei Glycinreste konserviert (siehe [Fig. 1](#)). Die dreidimensionale Struktur beider Defensine zeigte, dass diese Glycinreste sich in loop-Regionen (21, 23) befinden.

[0018] Die Sequenzen von HBD2 (Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 1; Proteinsequenz SEQ ID: NO 9) und HBD3 (Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 2; Proteinsequenz SEQ ID: NO 10) wurden in drei Domänen aufgeteilt, wobei die konservierten Glycinreste (siehe Pfeile in [Fig. 1](#)) als interne Grenze zwischen den verschiedenen Regionen für die Zusammensetzung der erfindungsgemäßen chimären Peptide dienten. Aus den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der drei Regionen entstanden somit folgende Peptide (vgl. [Fig. 1](#)):

HBDC1: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 3; Proteinsequenz SEQ ID: NO 11
 HBDC2: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 4; Proteinsequenz SEQ ID: NO 12
 HBDC3: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 5; Proteinsequenz SEQ ID: NO 13
 HBDC4: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 6; Proteinsequenz SEQ ID: NO 14
 HBDC5: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 7; Proteinsequenz SEQ ID: NO 15
 HBDC6: Nukleotidsequenz SEQ ID: NO 8; Proteinsequenz SEQ ID: NO 16

[0019] Interessanterweise, bilden die drei Domänen, die durch die Aufteilung von HBD2 und HBD3 an den konservierten Glycinresten entstehen, ein einziges, eigenständiges Epitop auf der Moleküloberfläche.

[0020] Die erfindungsgemäßen Chimären wurden wie in den Beispielen beschrieben als Fusionsproteine exprimiert. Nach der Spaltung der Fusionsproteine und der Aufreinigung durch RP-HPLC (**Fig. 2**) wurden die verschiedenen Fraktionen mittels MALDI-TOF analysiert. Die HPLC-Fraktionen, die den erwarteten Massen der Peptide entsprechen sind in **Fig. 2** durch * gekennzeichnet. Die Chimäre HBDC1 wurde in 7 verschiedenen Fraktionen detektiert, alle mit der gleichen erwarteten Masse (Peptide HBDC1.1–1.7). Die restlichen Chimären, HBDC2, 3, 4, 5 und 6, wurden als eine einzige Fraktion mit der erwarteten Masse eluiert. Die unterschiedlichen Elutionszeiten hängen wahrscheinlich mit einer unterschiedlichen Verknüpfung der Cysteinseitenketten in den verschiedenen Molekülen zusammen.

[0021] Die antimikrobielle Aktivität der erfindungsgemäßen Chimären gegen *E. coli* (ATCC 35218) und *S. aureus* (ATCC 12600) wurde bestimmt und mit der Aktivität von HBD2 und HBD3 verglichen (Tabelle 1). Dabei stellt sich heraus, dass HBDC3 überraschenderweise eine höhere Aktivität gegen beide Stämme aufweist als HBD2, HBD3 und alle anderen erfindungsgemäßen Chimären (mit der Ausnahme der minimalen bakteriziden Konzentration von HBDC5 gegen *S. aureus*). Die höhere Aktivität von HBDC3 im Vergleich zu den anderen getesteten Peptiden kann nicht anhand der Gesamtladung des Proteins erklärt werden. Der theoretische Wert bei pH 7 liegt für HBDC3 bei 8,8, und ist somit genau so hoch wie der Wert für das weniger aktive HBDC4, und niedriger als der Wert für die ebenfalls weniger aktiven HBD3 und HBDC1 (Tabelle 1). Nach HBDC3 erweist sich das chimäre Peptid mit der höchsten Gesamtladung, HBDC5, als genau so effektiv wie HBD2 und sogar besser als HBD3 gegen *E. coli* sowie effektiver als beide natürliche Defensine gegen *S. aureus*.

[0022] 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 (MBC) 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.

[0023] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin solche Peptide, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind. Bevorzugt handelt es sich dabei um konservative Austausch, d. h. Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften werden ersetzt, beispielsweise Alanin gegen Serin, Leucin gegen Isoleucin, etc. Auch hier wird bevorzugt, dass nicht mehr als 10% der Aminosäuren in den Peptiden ersetzt werden.

[0024] 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.

[0025] 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 ihnen abgeleiteter Derivate mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide als Arzneimittel für verschiedene therapeutische Indikationen. Dazu können die Peptide als hochreine Stoffe oder – wenn für die Verwendung ausreichend – innerhalb eines teilweise gereinigten Peptidgemisches oder als Gemisch mehrerer erfindungsgemäßer Peptide verwendet werden.

[0027] Darüber hinaus eignen sich die erfindungsgemäßen Peptide auch zur Oberflächenbeschichtung von Materialien, die möglichst steril gehalten und insbesondere nicht von Bakterien besiedelt werden sollen, z. B. medizinische Instrumente, Katheter, medizinische Implantate oder Kontaktlinsen.

[0028] Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1:

Generierung chimärer HBD2- und HBD3-Konstrukte

[0029] Die Nukleotidsequenzen der HBD2/HBD3-Chimären wurden für die bakterielle Expression Codon-optimiert (SEQ ID: NO 3–8) und von GENEART synthetisiert. Diese Nukleotidsequenzen wurden in den Expressionsvektor pET/30a (Novagen) unter Verwendung der KspI und XhoI Restriktionsschnittstellen kloniert, um ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen (His)₆-Tag und einer Enterokinase- oder einer Faktor Xa-Restriktionsschnittstelle zu generieren. Die Sequenzen der chimären Peptide fusioniert mit dem (His)₆-Tag und einer Enterokinase- oder einer Faktor Xa-Restriktionsschnittstelle werden im Folgenden dargestellt. Die unterstrichen dargestellten Sequenzen gehören zu den HBD2/HBD3-Chimären.

Peptid 1 (enthält HBDC1):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAKFERQHMDSPDLGTDDDDK~~GIGDPVTCLKS-
GAICHPVFCPRRYKQIGKCSTRGRKCCRRKK

Peptid 2 (enthält HBDC2):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAK-~~
~~FERQHMDSPDLGTDDDDK~~GIGDPVTCLKSGGRCAVLSCLPKEE-
QIGTCGLPGTKCCKKP

Peptid 3 (enthält HBDC3):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAKFERQHMDSPDLGTIEGR~~GIINTLQ-
KYYCRVIRGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

Peptid 4 (enthält HBDC4):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAKFERQHMDSPDLGTIEGR~~GIINTLQ-
KYYCRVIRGGRCVLSCLPKEEQIGTCGLPGTKCCKKP

Peptid 5 (enthält HBDC5):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAKFERQHMDSPDLGTIEGR~~GIINTLQ-
KYYCRVIRGAICHPVFCPRRYKQIGKCSTRGRKCCRRKK

Peptid 6 (enthält HBDC6):

MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAK-~~
~~FERQHMDSPDLGTDDDDK~~GIGDPVTCLKSGGRCAVLSCLPKEE-
QIGKCSTRGRKCCRRKK .

Beispiel 2:

Proteinexpression

[0030] Die optimale Proteinexpression erfolgte in folgenden E. coli-Stämmen: BL21 (DE3) pLys (Peptid 1, Peptid 2 und Peptid 6), B121 (DE3) (Peptid 4 und Peptid 5) und BLR (DE3) (Peptid 3). Alle Stämme wurden in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C kultiviert. Als die Zellkulturen einen OD₆₀₀-Wert zwischen 0,5 und 0,6 erreichten, wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM oder 0,3 mM (Peptid 2) zur Kultur

hinzugefügt, um die Proteinexpression zu induzieren. Die Zellen wurden anschließend für weitere 3 Stunden kultiviert, mit Ausnahme der Peptid 2-Kultur, wobei diese 12 Stunden inkubiert wurde.

Beispiel 3:

Aufreinigung der rekombinant-exprimierten Peptide

[0031] Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 8000 g geerntet und in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5 aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit einem Sonopuls HD 2200 Gerät (20 kHz, 200 W) ausgestattet mit einem MS-73 Titanium-microtip (Bandelin electronic GmbH) sonifiziert (60% duty cycle, 35% power, 1–1,5 Min auf Eis), um die Zellmembranen aufzuschließen. Nach Zentrifugation der Zellysate für 30 Min. bei 15000 g, erhielt man die Peptide entweder in löslicher Form (Peptide 1, 2 und 4) oder als unlösliche Inklusionskörper (Peptide 3, 5 und 6).

[0032] Die löslichen Peptide (1, 2 und 4) im Überstand wurden auf Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen geladen, die mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 equilibriert wurden. Die Säulen wurden mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8,0, gewaschen, um unspezifisch-gebundene Proteine zu entfernen. Die Peptide wurden anschließend mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8, eluiert. Die Fraktionen, die die Peptide enthielten wurden gesammelt und mit einem 3000 MWCO Vivaspin 20 Konzentrator konzentriert.

[0033] Die unlöslichen Inklusionskörper (Peptide 3, 5 und 6) wurden in 100 mM Tris-HCl, 6 M GdnHCl, pH 8, aufgenommen und auf Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen geladen, die mit 100 mM Tris-HCl, 6 M GdnHCl, pH 8, equilibriert wurden. Die Säulen wurden mit 100 mM Tris-HCl, 6 M GdnHCl, pH 8, gewaschen, und die Elution erfolgte mit 6 M GdnHCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4. Die eluierten Fraktionen wurden gesammelt, und die Rückfaltung der Peptide erfolgte durch Dilution der Proteinproben zu einer Endkonzentration von 0,15 mg/ml bei 1 M GdnHCl. Das Redox-System (Endkonzentration 4 mM reduziertes und 0,4 mM oxidiertes Glutathion) wurde hinzugefügt, und der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt. Die Proben wurden für 72 h bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 Min. bei 18000 g zentrifugiert und konzentriert.

Beispiel 4:

Spaltung der Peptide durch Enterokinase oder Faktor Xa

[0034] Vor der Spaltung wurden die Peptide (in 1 M GdnHCl, pH 8,5) auf eine NAP-10-Säule geladen, um den Puffer gegen 50 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,8 (Spaltungspuffer) zu ersetzen. Die Spaltung erfolgte übernacht bei Raumtemperatur.

Beispiel 5:

Aufreinigung der gespaltenen Peptide durch HPLC

[0035] Alle Peptide wurden nach der Spaltung durch HPLC aufgereinigt mittels einer VP 250/10 Nucleosil 300-7 C18 reverse-phase HPLC-Säule (Macherey Nagel) verbunden mit einer VP 50/10 Nucleosil 300-7 C18 reverse-phase HPLC-Vorsäule. Die Absorption wurde bei 214 nm gemessen. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt, um die verschiedenen Formen der Peptide getrennt zu erhalten. Alle Proben wurden auf einen sauren pH Wert eingestellt, bevor sie auf die Säule aufgetragen wurden. Die Gradienten bestanden aus Puffer A (2% ACN in 0,1% TFA) und B (95% ACN in 0,1% TFA). Folgende Gradienten wurden für die Aufreinigung der Peptide verwendet:

HBDC1:	2 Min. 80% A, 10 Min. 80% A, 20 Min. 70% A, 23 Min. 0% A, 28 Min. 0% A, 33 Min. 100% A, 38 Min. 100% A.
HBDC2:	2 Min. 80% A, 20 Min. 36% A, 22 Min. 0% A, 27 Min. 0% A, 32 Min. 100% A, 37 Min. 100% A.
HBDC3:	2 Min. 80% A, 20 Min. 25% A, 22 Min. 0% A, 27 Min. 0% A, 32 Min. 100% A, 37 Min. 100% A.
HBDC4:	2 Min. 80% A, 20 Min. 25% A, 22 Min. 0% A, 27 Min. 0% A, 32 Min. 100% A, 37 Min. 100% A.

HBDC5:	3 Min. 69% A, 10 Min. 69% A, 20 Min. 68% A, 30 Min. 68% A, 34 Min. 0% A, 39 Min. 0% A, 44 Min. 100% A, 49 Min. 100% A.
HBDC6:	2 Min. 80% A, 20 Min. 36% A, 22 Min. 0% A, 27 Min. 0% A, 32 Min. 100% A, 37 Min. 100% A.

Beispiel 6:

Bestimmung der Proteinkonzentration

[0036] Die Extinktion bei 214 nm wurde für die verschiedenen Peptide gemessen, und die Proteinkonzentration wurde anhand folgender Extinktionskoeffizienten ermittelt:

HBDC1: $\epsilon_{214} = 138805 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

HBDC2: $\epsilon_{214} = 116686 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

HBDC3: $\epsilon_{214} = 161699 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

HBDC4: $\epsilon_{214} = 142426 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

HBDC5: $\epsilon_{214} = 158853 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

HBDC6: $\epsilon_{214} = 122378 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Beispiel 7:

Massenspektrometrie

[0037] Die durchschnittlichen Massen der Derivate aus den gereinigten Peptiden wurden mittels matrix-assisted-laser desorption ionization-time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) bestimmt. Die Proben wurden mit der Matrix-Lösung (8 mg/ml α -Cyanozimtsäure in 60% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure) vermischt und auf einen Edelstahlträger aufgebracht. Zur Aufnahme der Massenspektren im Positiv-Ionen-Linearmodus wurde ein MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) verwendet. Vor jeder Messung wurde die interne Gerätekalibration durchgeführt. Die durchschnittlichen Massen der Proteine wurden mit den theoretischen durchschnittlichen Massen der Derivate unter Berücksichtigung potenzieller Disulfidbildung verglichen.

Beispiel 8:

Molekulares Modelling

[0038] Modelle der dreidimensionalen Struktur der HBD2/HBD3-Chimären wurden mit den Strukturen von HBD2 (pdb accession code: 1e4q) und HBD3 (pdb accession code: 1kj6) als Vorlage erstellt. Die Position der sechs Cysteinreste in jedem Molekül wurde verwendet, um die zwei Strukturen zu superponieren. Die wesentlichen Teile wurden aus jeder Struktur entnommen und zu den chimären Molekülen kombiniert.

Beispiel 9:

Antimikrobielle Aktivität

[0039] Die antimikrobielle Aktivität der Peptide wurde anhand eines veränderten Mikrodilutionsversuches wie bereits beschrieben bestimmt (25). In Kürze, nach 2–3 h Wachstum in „brain heart infusion broth“ bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$, wurden die Bakteriensuspensionen auf 10^4 bis 10^5 Bakterien/ml eingestellt in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) mit 1% „tryptic soy broth“ (TSB). Je 100 μl Bakteriensuspension wurden mit 10 μl Lösung eines antimikrobiellen Peptids versetzt (getestete Endkonzentrationen: 0,0125–100 $\mu\text{g/ml}$) und bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. CFUs („colony forming units“ = „koloniebildende Einheiten“) wurden nach 2 h bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Bakteriensuspensionen, die mit 10 μl Phosphat-Puffer/1% TSB oder mit 10 ml 0,01% Essigsäure statt mit Peptid-Lösung versetzt wurden. Die antibakteriellen Aktivitäten der Peptide werden als LD₉₀ („90% lethal dose“, Konzentrationen, die für 90% der Mikroorganismen letal sind) oder als MBCs („minimal bactericidal concentrations“, minimale bakterizide Konzentrationen; $\geq 99,9\%$ Tötung) angegeben. Ein Bakterienstamm wurde willkürlich definiert als empfindlich gegenüber ein Peptid bei MBC-Werten $\leq 12,5 \mu\text{g/ml}$, als mittelmäßig empfindlich bei $25 < \text{MBC} < 100 \mu\text{g/ml}$ und als resistent bei MBC-Werten $> 100 \mu\text{g/ml}$.

Tabelle 1: Antimikrobielle Aktivität und Gesamtladung bei pH 7 von HBD2, HBD3 und HBD2/HBD3-Chimären HBDC1–6.

Protein	E. coli ATCC 35218		S. aureus ATCC 12600		Gesamtladung (pH 7)
	LD ₉₀ [µg/ml]	MBC [µg/ml]	LD ₉₀ [µg/ml]	MBC [µg/ml]	
HBD2	0,1	0,39	1,56	12,5	+5,8
HBD3	0,39	1,56	0,15	1,19	+10,7
1.1	0,1	0,2	0,78	6,25	+10,8
1.2	0,025	0,1	0,39	3,125	+10,8
1.3	0,025	0,1	0,39	1,56	+10,8
1.4	0,025	0,2	0,78	3,125	+10,8
1.5	0,025	0,1	0,39	6,25	+10,8
1.6	0,025	0,2	3,125	6,25	+10,8
1.7	0,05	0,2	0,39	6,25	+10,8
2	0,39	n. d.	> 100	> 100	+2,7
3	0,025	0,1	0,1	0,78	+8,8
4	1,56	6,25	0,39	3,125	+8,8
5	0,1	0,39	0,1	0,39	+13,8
6	n. d.	> 100	> 100	> 100	+7,7

MBC: minimal bactericidal concentration, minimale bakterizide Konzentration (Konzentration, bei der mehr, als 99,9% der Bakterien getötet werden).

LD 90: letale Dosis für 90% der Zellen

n. d.: nicht bekannt

Bibliographie

- (1) Jenssen, H, Hamill, P, Hancock, RE. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19, 491–511.
- (2) Ganz, T, Selsted, ME, Szklarek, D, Harwig, SS, Daher, K, Bainton, DF, Lehrer, RI. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 76, 1427–1435.
- (3) Selsted, ME, Brown, DM, DeLange, RJ, Harwig, SS, Lehrer, RI. (1985) Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem.* 260, 4579–4584.
- (4) Selsted, ME, Harwig, SS, Ganz, T, Schilling, JW, Lehrer, RI. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest.* 76, 1436–1439.
- (5) Diamond, G, Zasloff, M, Eck, H, Brasseur, M, Maloy, WL, Bevins, CL. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide Isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 3952–3956.
- (6) Lehrer, RI, Ganz, T. (1996) Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann NY Acad Sci.* 797, 228–239.
- (7) Ganz, T. (2005) Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update. *Comb Chem High Throughput Screen.* 8, 209–217.
- (8) Selsted, ME, Harwig, SS. (1989) Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem.* 264, 4003–4007.
- (9) Selsted, ME, Tang, YQ, Morris, WL, McGuire, PA, Novotny, MJ, Smith, W, Henschen, AH, Cullor, JS. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem.* 268, 6641–6648.
- (10) Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, Schröder, JM. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387, 861.
- (11) Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, Schröder, JM. (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 276, 5707–5713.

- (12) Garcia, JR, Krause, A, Schulz, S, Rodriguez-Jimenez, FJ, Kluver, E, Adermann, K, Forssmann, U, Frimpong-Boateng, A, Bals, R, Forssmann, WG. (2001) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J.* 15, 1819–1821.
- (13) Jia, HP, Schutte, BC, Schudy, A, Linzmeier, R, Guthmiller, JM, Johnson, GK, Tack, BF, Mitros, JP, Rosenthal, A, Ganz, T, McCray, PB, Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 263, 211–218.
- (14) Schröder, JM. (1999) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci.* 56, 32–46.
- (15) Harder, J, Meyer-Hoffert, U, Teran, LM, Schwichtenberg, L, Bartels, J, Maune, S, Schroder, JM. (2000) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22, 714–721.
- (16) Singh, PK, Jia, HP, Wiles, K, Hesselberth, J, Liu, L, Conway, BA, Greenberg, EP, Valore, EV, Welsh, MJ, Ganz, T, Tack, BF, McCray, PB, Jr. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 14961–14966.
- (17) Gropp, R, Frye, M, Wagner, TO, Bargon, J. (1999) Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther.* 10, 957–964.
- (18) Valore, EV, Park, CH, Quayle, AJ, Wiles, KR, McCray, PB, Jr., Ganz, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 101, 1633–1642.
- (19) Garcia, JR, Jaumann, F, Schulz, S, Krause, A, Rodriguez-Jimenez, J, Forssmann, U, Adermann, K, Kluver, E, Vogelmeier, C, Becker, D, Hedrich, R, Forssmann, WG, Bals, R. (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306, 257–264.
- (20) Hoover, DM, Rajashankar, KR, Blumenthal, R, Puri, A, Oppenheim, JJ, Chertov, O, Lubkowski, J. (2000) The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem.* 275, 32911–32918.
- (21) Sawai, MV, Jia, HP, Liu, L, Aseyev, V, Wiencek, JM, McCray, PB, Jr., Ganz, T, Kearney, WR, Tack, BF. (2001) The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry.* 40, 3810–3816.
- (22) Hoover, DM, Chertov, O, Lubkowski, J. (2001) The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J Biol Chem.* 276, 39021–39026.
- (23) Schibli, DJ, Hunter, HN, Aseyev, V, Starner, TD, Wiencek, JM, McCray, PB, Jr., Tack, BF, Vogel, HJ. (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 277, 8279–8289.
- (24) Taylor, K, Barran, PE, Dorin, JR. (2008) Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers.* 90, 1–7.
- (25) Rudolph, B, Podschun, R, Sahly, H, Schubert, S, Schröder, JM, Harder, J. (2006) Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 3194–3196.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Jenssen, H, Hamill, P, Hancock, RE. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19, 491–511 [0039]
- Ganz, T, Selsted, ME, Szklarek, D, Harwig, SS, Daher, K, Bainton, DF, Lehrer, RI. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 76, 1427–1435 [0039]
- Selsted, ME, Brown, DM, DeLange, RJ, Harwig, SS, Lehrer, RI. (1985) Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem.* 260, 4579–4584 [0039]
- Selsted, ME, Harwig, SS, Ganz, T, Schilling, JW, Lehrer, RI. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest.* 76, 1436–1439 [0039]
- Diamond, G, Zasloff, M, Eck, H, Brasseur, M, Maloy, WL, Bevins, CL. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 3952–3956 [0039]
- Lehrer, RI, Ganz, T. (1996) Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann NY Acad Sci.* 797, 228–239 [0039]
- Ganz, T. (2005) Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update. *Comb Chem High Throughput Screen.* 8, 209–217 [0039]
- Selsted, ME, Harwig, SS. (1989) Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem.* 264, 4003–4007 [0039]
- Selsted, ME, Tang, YQ, Morris, WL, McGuire, PA, Novotny, MJ, Smith, W, Henschen, AH, Cullor, JS. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem.* 268, 6641–6648 [0039]
- Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, Schröder, JM. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387, 861 [0039]
- Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, Schröder, JM. (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 276, 5707–5713 [0039]
- Garcia, JR, Krause, A, Schulz, S, Rodriguez-Jimenez, FJ, Kluver, E, Adermann, K, Forssmann, U, Frimpong-Boateng, A, Bals, R, Forssmann, WG. (2001) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J.* 15, 1819–1821 [0039]
- Jia, HP, Schutte, BC, Schudy, A, Linzmeier, R, Guthmiller, JM, Johnson, GK, Tack, BF, Mitros, JP, Rosenthal, A, Ganz, T, McCray, PB, Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 263, 211–218 [0039]
- Schröder, JM. (1999) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci.* 56, 32–46 [0039]
- Harder, J, Meyer-Hoffert, U, Teran, LM, Schwichtenberg, L, Bartels, J, Maune, S, Schroder, JM. (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22, 714–721 [0039]
- Singh, PK, Jia, HP, Wiles, K, Hesselberth, J, Liu, L, Conway, BA, Greenberg, EP, Valore, EV, Welsh, MJ, Ganz, T, Tack, BF, McCray, PB, Jr. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 14961–14966 [0039]
- Gropp, R, Frye, M, Wagner, TO, Bargon, J. (1999) Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther.* 10, 957–964 [0039]
- Valore, EV, Park, CH, Quayle, AJ, Wiles, KR, McCray, PB, Jr., Ganz, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 101, 1633–1642 [0039]
- Garcia, JR, Jaumann, F, Schulz, S, Krause, A, Rodriguez-Jimenez, J, Forssmann, U, Adermann, K, Kluver, E, Vogelmeier, C, Becker, D, Hedrich, R, Forssmann, WG, Bals, R. (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306, 257–264 [0039]
- Hoover, DM, Rajashankar, KR, Blumenthal, R, Puri, A, Oppenheim, JJ, Chertov, O, Lubkowski, J. (2000) The structure of human

- beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem.* 275, 32911–32918 [0039]
- Sawai, MV, Jia, HP, Liu, L, Aseyev, V, Wiencek, JM, McCray, PB, Jr., Ganz, T, Kearney, WR, Tack, BF. (2001) The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry.* 40, 3810–3816 [0039]
 - Hoover, DM, Chertov, O, Lubkowski, J. (2001) The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J Biol Chem.* 276, 39021–39026 [0039]
 - Schibli, DJ, Hunter, HN, Aseyev, V, Starner, TD, Wiencek, JM, McCray, PB, Jr., Tack, BF, Vogel, HJ. (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 277, 8279–8289 [0039]
 - Taylor, K, Barran, PE, Dorin, JR. (2008) Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers.* 90, 1–7 [0039]
 - Rudolph, B, Podschun, R, Sahly, H, Schubert, S, Schröder, JM, Harder, J. (2006) Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 3194–3196 [0039]

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) einem Nukleinsäuremolekül mit einer der in SEQ ID: NO 3 bis SEQ ID: NO 7 dargestellten Nukleotidsequenz,
 - b) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Peptid mit einer der in SEQ ID: NO 11 bis SEQ ID: NO 15 dargestellten Aminosäuresequenz kodiert,
 - c) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Komplementärstrang an ein Nukleinsäuremolekül nach a) oder b) hybridisiert und das ein Peptid mit antimikrobieller Aktivität codiert, und
 - d) einem Nukleinsäuremolekül, dessen Nukleotidsequenz von der Nukleotidsequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach c) aufgrund des degenerierten genetischen Codes abweicht.
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuremolekül ein antimikrobiell wirkendes Peptid mit einer durch Deletion und/oder Substitution wenigstens einer Aminosäure von einer der in SEQ ID: NO 11 bis SEQ ID: NO 15 dargestellten Aminosäuresequenz abweichenden Aminosäuresequenz kodiert.
3. Vektor, gekennzeichnet durch ein Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
4. Wirtszelle, gekennzeichnet durch ein Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 oder 2.
5. Wirtszelle, gekennzeichnet durch den Vektor nach Anspruch 3.
6. Peptid mit einer der unter SEQ ID: NO 11 bis SEQ ID: NO 15 dargestellten Aminosäuresequenz.
7. Peptid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid ein zyklisches, amidiertes, acetyliertes, sulfatiertes, phosphoryliertes, glycosiliertes oder oxidiertes Derivat ist.
8. Peptid nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass $\leq 30\%$ der angegebenen Aminosäuren durch andere Aminosäuren konservativ substituiert sind.
9. Peptid nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass $\leq 10\%$ der angegebenen Aminosäuren mit nicht-natürlich-vorkommenden Aminosäuren substituiert sind.
10. Peptid nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die nicht-natürlich-vorkommenden Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyprolin, Methylthreonin oder Homocystein.
11. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 6 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung mikrobieller Infektionen.
12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Behandlung von Infektionen mit gramnegativen oder grampositiven Bakterien.
13. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 6 bis 10 als Beschichtung für ein medizinisches Instrument, einen Katheter, ein medizinisches Implantat oder eine Kontaktlinse.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

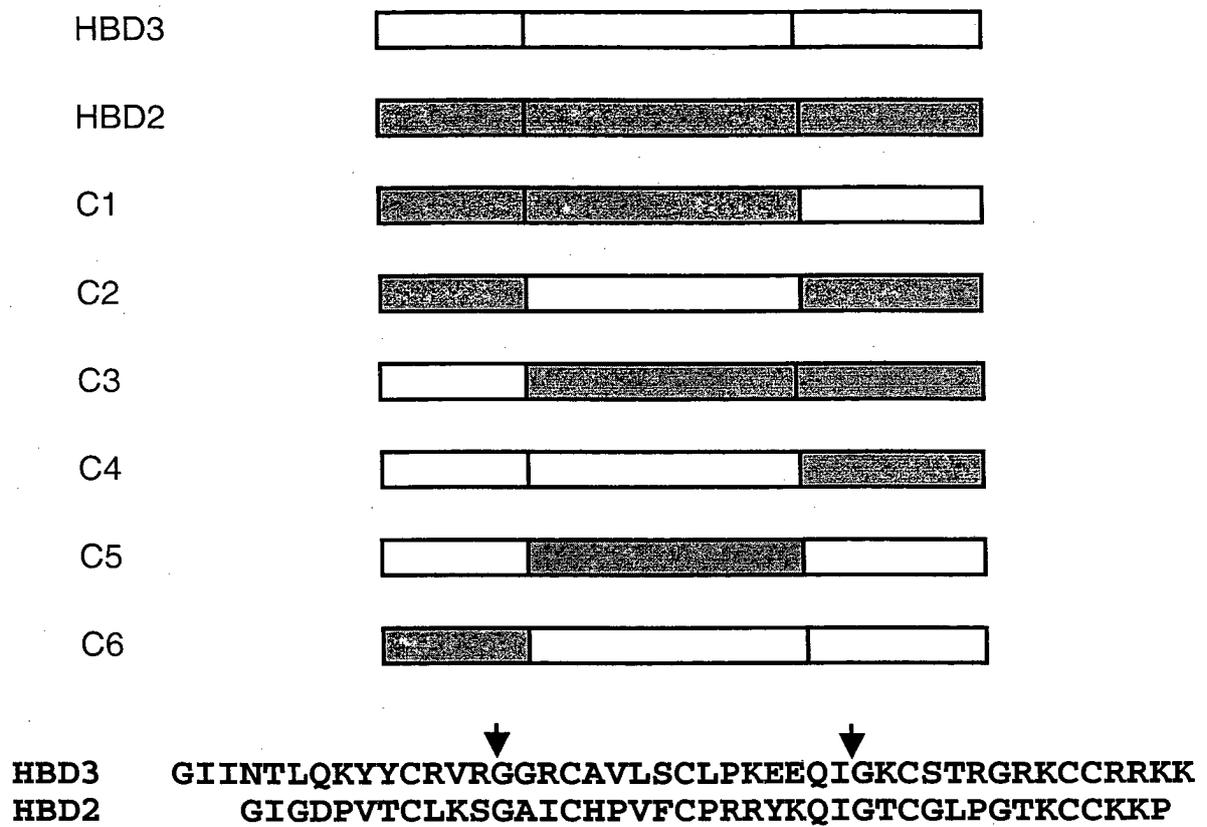


FIG. 2

