

Antimikrobiyal Peptidlere Yönelik Güncel Eğilimler; Nanotaşıyıcı Sistemeler ve Farmasötik Uygulamalar

Ahmet Arif Kurt¹

Bashar Ibrahim²

Özet

Son yıllarda geleneksel antimikrobiyallere direncin artması, özellikle çoklu dirençli bakteriler tarafından üretilenler olmak üzere ciddi bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için yeni antibiyotik arayışlarını artırdı. Antimikrobiyal dirence (AMR) bağlı dünya çapındaki yüksek ölüm oranı, başta antibiyotikler olmak üzere yeni molekül arayışlarını ve ürün geliştirme çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu bağlamda, antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), yeni terapötik ajanlar olarak kullanım için alternatif moleküller olarak mevcut antibiyotik tedavisiyle ilişkili AMP'lerin sinerjistik etkisi, AMR'nin üstesinden gelecek etkili yeni ilaçların üretilmesi için önemli sonuçlar getirebilir. AMP'lerin bakteri, mantar, parazit ve virüslere karşı geniş bir yelpazede önleyici etkileri vardır. Tüm canlı organizmalar tarafından yaygın olarak üretilen küçük biyoaktif proteinlerdir. Geniş spektrumlu antibakteriyel potansiyelleri immünomodülatör ve antitümör dahil diğer aktiviteleri nedeniyle, farmasötik endüstrisinin biyofarmasötik üretimi için büyük ilgi görmektedirler. AMP'lerin geliştirilmesi ve üretilmesi sürecinde uygulanan teknolojik platformlardan rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve maya hücrelerini ekspresyon konak sistemleri olarak kullanarak bu tür moleküllerin laboratuvar ölçeğinde ve büyük ölçekli ortamlarda üretilmesini sağlamıştır. Bu bölümde, mikrobiyal ekspresyon sistemleri ve ayrıca biyoişleme ve saflaştırma teknolojileri dahil olmak üzere AMP'lerin biyoişlemedeki son gelişmeleri, gelecekteki yönelimleri, nanotaşıyıcı sistemeler ve farmasötik

- 1 Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, ahmetkurt@sdu.edu.tr, ORCID ID: 0000-0002-3490-0192
- 2 Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, basharibrahim@sdu.edu.tr, ORCID ID: 0000-0003-3086-0995

uygulamalarını ele alacağız. Burada ayrıca bu alandaki başarılı vakaları açıklıyoruz ve AMP'lerin biyomühendisliği ile ilgili beklentileri ve zorlukları vurguluyoruz.

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakterilerin büyümesini engelleyen veya öldüren anti-bakteriyel ilaçlardır. Patojenik bakterilerin tedavisinde genellikle yetkindir. Ancak antibiyotiklerin yanlış kullanımıyla ilaca dirençli bakteriler ortaya çıktığı için antibiyotikler sürekli olarak antibakteriyel güçlerini kaybediyor. Antibiyotiğe dirençli bakteriler dünya çapında geliyor ve daha önce bulaşıcı hastalıklardan milyonlarca kişinin hayatını kurtarmış olan antibiyotiklerin etkinliğini tehdit ediyor. Bu senaryo, hastanede kalış süresinin uzamasına, sağlık bakım maliyetlerinin ve ölüm riskinin artmasına neden olacağından önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. Yeni etki mekanizmalarına sahip alternatif antimikrobiyal ajanların bulunması acil bir ihtiyaçtır. Her ne kadar bazı antibiyotikler bakterileri öldürmede hâlâ etkili olsa da, bunların kullanımının iyi ve kötü etkilerine ilişkin uzun vadeli endişeler hâlâ ciddiye alınmayı bekliyor. Endişe verici bir şekilde, bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu ölümlerin sayısı dramatik bir şekilde arttı ve bu da onu yaşamı tehdit eden hastalıkların önde gelen faktörlerinden biri haline getirdi. Bu sorun, mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde büyük bir sorun olan dirençli enfeksiyon etkenlerinin ortaya çıkması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Mevcut antibiyotiklerin yerine geçecek başka maddelerin keşfedilmesi çabaları günümüze kadar devam etmekte ve araştırılmaktadır. Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), bakteri üremesini engelleyebilecek alternatif bileşenlerden biridir ve muhtemelen gelecekte antibiyotiklerin işlevinin yerini alacaktır (Fatsis-Kavalopoulos vd., 2022). Antimikrobiyal peptidler (AMP), mikroorganizmalara karşı inhibitör etkili bileşikler olup, prokaryotlardan insanlara kadar hemen hemen tüm canlılar tarafından doğal olarak üretilirler. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve β -laktamaza dirençli *Escherichia coli* (ESBL), birçok hastanede tekrarlayan bakteriyel suşlardır (Wall, 2019; Han vd., 2023). Günümüzde *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter* türleri gibi bakteriler de halihazırda mevcut ilaçlara karşı yüksek mikrobiyal direnç sergileyen hastane enfeksiyonlarından yaygın olarak sorumludur (Uddin vd. 2021; Denissen, 2022). Yukarıda bahsedilenler gibi çoklu dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması, antimikrobiyal ilaçların insanlar ve diğer hayvanlar tarafından aşırı ve/veya yanlış kullanımından kaynaklanabilir. Sonuç olarak, bu patojenlerle savaşmak için yaygın olarak kullanılan birçok ilaç artık etkili değildir (Denissen vd.,

2022). 2014 yılında Lord Jim O'Neill ve ekibi, Birleşik Krallık hükümeti tarafından yaptırılan “Antimikrobiyal Direnç: Ulusların sağlığı ve zenginliği için bir krizle mücadele” (AMR İncelemesi) başlıklı bir inceleme yayınladı. İnceleme, antimikrobiyal direncin (AMR) 2050 yılına kadar yılda 10 milyon ölüme neden olabileceği tahmininde bulundu (Kraker vd., 2016; Uddin vd., 2021). Geleneksel antibiyotiklere alternatif bir tedavi olarak yeni, geniş spektrumlu ve düşük toksisiteli ilaçların geliştirilmesi oldukça arzu edilir. Hem akademi hem de endüstri, aday molekülleri araştırmak ve bulaşıcı hastalıklarla mücadele için yeni tedaviler üretmek için çalışmalar devam etmektedir (Murugaiyan vd., 2022; Denissen vd., 2022). Bu bağlamda, antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), dirençli mikroorganizmalarla mücadelede geleneksel terapötik bileşiklerin yerini almak veya tamamlamak için yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Mba vd., 2022). Mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi çeşitli canlı organizmalar tarafından doğal olarak üretilirler ve ekzojen patojenlere karşı önemli bağışıklık sistemi bileşenleri görevi görürler (Denissen vd., 2022). Genel olarak, birkaç mikroorganizmaya karşı aktivite gösterirler ve bazı durumlarda, bir immünomodülatör veya antitümör olarak hareket etme dahil olmak üzere birden fazla işlevi yerine getirebilirler, bu nedenle rastgele moleküller olarak kabul edilirler (Kiki, 2023). Yeni AMP bazlı ilaçların geliştirilmesi, biyoteknolojik çalışmalar ve farmasötik değerlendirme için bu moleküllerin büyük miktarlarda elde edilmesini gerektirir (Roshanak vd., 2023). Son birkaç yılda, birkaç yeni teknoloji nedeniyle AMP'lerin endüstriyel ölçekte üretilmesinde dikkate değer gelişmeler olmuştur (Chaudhary vd., 2023). AMP'lerin birçok faydalı özelliğine rağmen uygulama sonrasında diğer proteinler ile bir araya gelerek inaktive olması, gastrointestinal sistem ve kanda proteazlar ile parçalanması, böbrek ve karaciğerlerden hızlı klirensi, yüksek toksisite ve immünojenite, düşük oral absorpsiyon, düşük metabolik stabilite, yüksek üretim maliyetleri gibi sebepler nedeni ile in vivo uygulamaların tamamen gerçekleşmemekte ve sadece çok az bir kısmı klinik uygulamalara geçebilmektedir (Makowski vd., 2019). Bu dezavantajların üstesinden gelmek için son yıllardaki çalışmalar, AMP'lerin nanotaşıyıcı sistemler ile formülasyonlarının hazırlanmasına odaklanmıştır. Nanoteknolojinin sağladığı bazı avantajlar, nano boyutlarda gerçekleşen olayların anlaşılması, nano taşıyıcı sistemlerin tasarımı, karakterizasyonu, üretimi ve uygulanmasıdır (Scioli Montoto vd., 2020). Hücre hattının seçimi ve geliştirilmesi, hücre kültürü parametrelerinin optimizasyonu ve besleme stratejilerinin kullanımı gibi akış yukarı biyoproses adımlarındaki yenilikler, büyük ölçekli üretimin nihai hedefine sahiptir (Xu vd., 2022; Park vd., 2021). Hücre hattı yapımında rekombinant sistemlerin uygulanması, AMP üretimi için verimli ve maliyetler açısından

uygundur (Roshanak vd., 2023). Bu rekombinant sistemler arasında, mikroorganizma konakçıları genellikle en çok kullanılanlardır, çünkü bunlar yüksek düzeyde sentez, modifikasyon ve heterolog AMP'lerin salgılanmasını sağlayan özelliklere sahiptir. Bu konaklar tarafından üretilen AMP'ler de dahil olmak üzere piyasada halihazırda çeşitli rekombinant proteinler mevcuttur (Chaudhary vd., 2023). *E. coli* bakterisi, genetik ve biyolojik süreçleri iyi bilindiğinden, hızlı büyüme oranı, yüksek verim ve basit akış yukarı süreci sergilediği için en yaygın kullanılan mikrobiyal hücre fabrikasıdır (Carreón-Rodríguez vd., 2023). Ayrıca, maya sistemleri arasında *Saccharomyces cerevisiae* en köklü olanıdır (Parapouli vd., 2020). Ekspresyon sistemini geliştiren bir sonraki adım, transforme edici klonları taramak ve seçmek için küçük ölçekli rekombinant proteinin üretilmesinden oluşur. Bu noktada, rekombinant AMP'nin ifadesini doğrudan etkilediklerinden yetiştirme koşullarının izlenmesi (Sıcaklık, pH, havalandırma, ortam bileşimi, indükleyicilerin konsantrasyonu, indüksiyon süresi) esastır (Carreón-Rodríguez vd., 2023). Sürecin sürdürülmesinde, biyofarmasötik olarak büyük ölçekli AMP'lerin üretimi için sürekli kültür gibi biyoreaktör sistemleri ve biyoproses stratejileri kullanılmaktadır (Park vd., 2021). Büyük ölçekli üretimin ardından, önemli bir amaç, hedef biyomolekülün geri kazanılması ve kültür ortamında bulunan yabancı maddelerin uzaklaştırılmasıdır (Chaudhary vd., 2023). Akış aşağı süreci olarak bilinen bu aşama, üretim süreçlerinde büyük hacimlerin işlenmesi ve ayrıca ilgili rekombinant biyomolekülün geri kazanılması için yeni teknolojilere sahiptir (Chaudhary vd., 2023). Filtrasyon, hücre biyokütlesini ortadan kaldırır, kültür ortamı netleştirmesini sağlar, afinite kromatografisi, belirli ayırma reçineleri kullanarak rekombinant proteini yakalar ve ilgili proteinler için yüksek derecede saflık sağlar (Chen vd., 2023). Özetle, bu bölüm biyofarmasötik üreten AMP'ler için yukarı ve akış aşağı süreçlerine yönelik yenilikçi yaklaşımları, nano taşıyıcı sistemeler ve farmasötik uygulamaları ele almaktadır. Uygun ekspresyon konaklarının seçimi, biyoproseslerin geliştirilmesi, biyoproseslerdeki son stratejiler, saflaştırma ile ilgili teknikler ve üretim esnekliğini ve nihai ürün kalitesini artırırken daha düşük üretim maliyetleri elde etmenin yolları burada açıklanmaktadır.

2. ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN ÖZELLİKLERİ

AMP'ler, çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteri, mantar, parazit ve virüs türlerine karşı etkili olan küçük biyoaktif proteinlerdir (Dini vd., 2022). Bu moleküller aynı zamanda konak savunma peptitleri olarak da bilinir (Kim vd., 2023). Mikrobisidal, bakteriyostatik ve sitolitik özellikte olan bu konak savunma peptitleri canlı organizmaların doğuştan gelen bağışıklık sisteminin

temel unsurlarıdır (Sinha ve Shukla 2019; Kim vd., 2023). AMP'ler, doğal bir bağışıklık sistemi sunmadıklarından, bitkiler ve böcekler için patojenik mikroorganizmalara karşı birincil savunma hattıdır (Browne vd. 2020). Örneğin bitki köklerinde gelişen *Paenibacillus polymyxa* bakterisi, *P. aeruginosa* veya *S. aureus* biyofilmlerini parçalayabilen antibiyotik polimiksini üretir (Jeong vd., 2019). AMP'ler, farklı dizilimlere, yapılara ve kaynaklara sahip, bileşim ve uzunluk bakımından son derece çeşitli olan evrimsel olarak korunmuş moleküllerdir, ancak bazı tipik özelliklere sahiptirler (Dini vd., 2022). AMP'lerin potansiyelini net bir şekilde tanımlayabilmek için AMP'lerin yapısının iyi bir şekilde aydınlatılması gerekmektedir. AMP'ler, amfipatik yapıya sahip 12-100 amino asit içeren nispeten kısa moleküllerdir. Bu peptitler yaygın olarak +2 ila +11 arasında değişen, lizin ve arginin kalıntıları gibi katyonik moleküller olarak nitelendirilen pozitif net yüke sahiptir (Getahun vd., 2022). Bu moleküller genellikle peptit dizisinde valin, lösin, izolösin, alanin, metionin, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi önemli miktarda hidrofobik kalıntıya sahiptir (Canepa vd., 2022).

AMP'lerin uygulanmasında nanopartiküller

Nanotaşıyıcı sistemlerin genel hedefi AMP'lerin enkapsülasyonunu sağlayarak tedavide etkinliği artırmak, yan etkileri en aza indirmek, kontrollü bir dozlama sağlamak, etki bölgesine doğrudan uygulama sağlamak ve toksisiteyi azaltmaktır. AMP'lerin kullanımında bu avantajların sağlanması için niozom, lipozom, katı lipid nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, in situ formülasyonlar gibi her birinin keline özgü avantajları bulunan nanotaşıyıcı sistemler olarak araştırılmaya devam edilmektedir (Ryan vd., 2021). Farklı taşıyıcı sistemlerin gruplandırıldığı sağlamış olduğu avantajların ve kimyasal yapılarının belirtildiği tablo son 5 yıllık tablo gösterilmiştir.

3. EYLEM MEKANİZMALARI VE HEDEFLER

Genel olarak, bakteri hücre zarı ile ilk AMP etkileşimi, mikroorganizma zarının katyonik tortuları ve anyonik bileşenleri arasındaki hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Negatif mikrobiyal yüzey yükü, fosfatidilgliserol, kardiyolipin veya fosfatidilserin gibi fosfolipid baş grupları tarafından sağlanabilir (Robertson vd., 2018). Ökaryotik membranlar, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin ve sfingomyelin gibi zwitteriyonik fosfolipidlere sahiptir. Bu fosfolipidler, fizyolojik pH'da membran net yüküne katkıda bulunur. Zwitteriyonik fosfolipidlere ek olarak, zar boyunca kolesterol moleküllerinin varlığı da membran akışkanlığında ve esnekliğinde azalmaya katkıda bulunabilir ve bu da genellikle AMP aktivitesini azaltabilir (Canepa vd., 2022). Bu nedenle, AMP'ler genellikle terapötik kullanımları

için çekici bir özellik olan memeli hücreleri için toksik değildir (Browne vd., 2020). AMP'lerin etki mekanizması hala büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, negatif yüklü hücre bileşenleri ile pozitif yüklü AMP'ler arasındaki elektrostatik çekimin, güçlü etkileşim ve daha fazla hedef hücre zarlarının bozulması ile sonuçlanan ilk adım olarak önemli olduğu anlaşılmaktadır (Lei vd., 2019). İlk elektrostatik etkileşimlerden sonra, bakteri membran yüzeyinde kendiliğinden oluşan peptit birikimi, belirli konsantrasyonlara ulaştıktan sonra membran bütünlüğü kaybına ve hücre içi bileşen sızıntısına neden olabilir (Canepa vd., 2022). Ayrıca, genellikle bakteriyel sitoplazmik membran bütünlüğünün birçok şekilde bozulmasını içeren, yaygın olarak kabul edilen birkaç eylem modeli vardır. Bunlar arasında, diğerlerinin yanı sıra, barrel-stave gözenek, deterjan miselizasyonu, toroidal gözenek, düzensiz toroidal gözenek, membran inceltme/kalınlaşma yüklü lipid kümelenmesi, iki tabakalı olmayan ara oluşum, oksitlenmiş fosfolipid hedefleme, anyon taşıyıcı litik olmayan membran depolarizasyonu ve diğerleri yer alır (Getahun vd., 2022). Barrel-stave modelinde, AMP'ler, kendilerini zarlara dik bir şekilde yerleştiren silindirik demetler halinde kendi kendine organize olabilirler. Sulu gözenek lümen oluşumu, hidrofobik bölümlerin hidrofobik çift tabakanın iç kısmına doğru yönlendirilmesiyle meydana gelebilir. Gözenek, sitomembran geçirgenliğine, ozmotik dengesizliğe ve daha fazla hücre ölümüne neden olabilir (Hadjicharalambous vd., 2022). Toroidal modelde, gözenek oluşumu, AMP'ler kendilerini bakteriyel plazmatik membranlara dik olarak yerleştirdiğinde meydana gelir, bu mekanizma, barrel-stave modeline benzer bir mekanizmadır. Ancak bu modelde, polar olmayan AMP amino asit kalıntıları lipid baş gruplarıyla etkileşime girerek membran sapsmasına neden olur ve ayrıca torus gözenekleri oluşturur (Matthyssen vd., 2022; Kim vd., 2023). Diğer bir olasılık ise, polar fosfolipid başlarının hidrofilik amino asit etkileşimleri yoluyla, başlangıçtaki yırtılmış membranlarla miseller oluşur ve bu da sitomembran bozulmasına neden olur (Liu vd., 2022; Matthyssen vd., 2022). Ayrıca peptitler, proteinler ve karbonhidratlar da dahil olmak üzere çeşitli hedeflerle etkileşime girerek sadece yüzeyde değil hücre içinde de hareket edebilir (Robertson vd., 2018). AMP'ler, bakteri zarlarını destabilize etmeye ve yırtılmalarına (membran etkili peptitler) ek olarak, hücre bölünmesi, protein, nükleik asit ve hücre duvarı sentezi gibi normal hücresel süreçleri destabilize ederek membranı geçebilirler (Kim vd., 2023). Membran yıkımı yoluyla hareket eden AMP'ler, diğer AMP'lerle bağımsız veya sinerjistik olarak hareket etmenin yanı sıra, zarar görmeyen membranlar aracılığıyla da hareket edebilir (Canepa vd., 2022). Bununla birlikte, AMP'ler, antimikrobiyal aktivitelerinin ötesine geçen bir terapötik potansiyele sahiptir. Bazı AMP'ler ayrıca tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivite sergileyebilir

(Răileanu vd., 2023). Çoğu tümör hücresi, fosfatidilserin gibi moleküllerin aşırı anyonik ekspresyonu nedeniyle membran üzerinde yüzey negatif yüküne de sahiptir. Bu özellik katyonik AMP'ler ile etkileşime izin verir (Răileanu vd. 2023). AMP'ler ayrıca inflamatuvar yanıtları inhibe etme ve bağışıklık modülatörleri olarak hareket ederek bağışıklık sistemi hücrelerinin proliferasyonunu uyarma yeteneğine de sahiptir (Drayton vd., 2020). Makrofajların, nötrofillerin, eozinofillerin çoğalmasını, T lenfositlerin aktivasyonunu ve dendritik hücrelerin farklılaşmasını, proinflamatuvar sitokinleri indükleme veya modüle etme ve kemokinler, kemotaksi, apoptoza neden olma ve inflamatuvar yanıtı inhibe etmenin yanı sıra uyarma yeteneğine sahiptirler. Bu, bağışıklıkla ilgili hastalıklara karşı potansiyel terapötik moleküller olarak kullanımlarını destekler. AMP'ler bu nedenle birkaç hücre hedefi üzerinde hareket edebilir ve belirli durumlarda rastgele moleküller olarak kabul edilir (Zhang vd., 2021). Yıllar önce peptitlerin belirli bir fonksiyonla doğrudan ilişkili koşulsuz bir yapıya sahip olduğunu savunan varsayımın aksine, çoklu işlevler tek bir peptit yapısıyla ilişkilendirilebilir. AMP'lerin karışıklığı hakkında bilgi, antibiyotik geliştirme gibi çeşitli araştırma alanlarında zemin kazanmaktadır (Zhang vd., 2021). Bu nedenle, doğal AMP'ler, tek başına veya geleneksel ilaçlarla sinerji içinde hareket ederek yeni tedavilerin geliştirilmesi için alternatif bir yaklaşım olarak muazzam bir potansiyele sahiptir. Birkaç çalışma AMP'lerin terapötik etkinliğini zaten göstermiştir (Almeida vd., 2020; Xuan vd., 2023). Diğer bir önemli özellik ise, AMP'lerin evrimsel olarak korunmuş hücre zarı bileşenleri üzerinde hareket ettikleri için mikrobiyal direnç daha az duyarlı olmalarıdır (Getahun vd., 2022). AMP'ler antibiyotik adjuvanları için büyük bir potansiyele sahip gibi görünmektedir, bu da antibiyotik direnci oluşumunu azaltmayı veya önlemeyi mümkün kılar. AMP'ler ve antibiyotikler arasındaki sinerji, daha düşük dozlarda, bir ilacın toksisitesinde veya olumsuz yan etkilerinde bir azalma sağlayabilir (Browne vd., 2020). Daha az yaygın olmasına rağmen, amfibilerden izole edilen anyonik AMP maximin-H5 ve insan ekrin ter bezleri tarafından salgılanan dermcidin gibi bazı anyonik AMP'ler bildirilmiştir (Huan vd., 2020). Net negatif yükü 1 ila 7 arasında değişen negatif yüklü glutamik ve aspartik asit kalıntılarından oluşurlar. Tam olarak negatif yükü nedeniyle, etki şekli katyonik AMP'lerden farklıdır. Bununla birlikte, bazı anyonik AMP'ler bakteri hücre zarlarını bozabilir. Bu peptitler, hücre penetrasyonunu sağlayan negatif mikrobiyal membran bileşenleri ile katyonik tuz köprüleri oluşturmak için metal iyonlarını kullanma yeteneğine sahiptir. Sitoplazmaya ulaştıklarında ribozomlar gibi hücre içi bileşenlere bağlanabilir veya ribonükleaz aktivitesini inhibe ederek hücre ölümünü indükleyebilirler (Răileanu vd., 2023; Huan 2020; Kim vd., 2023).

4. SINIFLANDIRMA

AMP'ler yapısal yönlerine göre üç ana alt gruba ayrılabilir: α -sarmal, β -tabaka ve genişletilmiş peptitler (Lei vd., 2019; Kim vd., 2023). α -sarmal peptitler, bakteri zarlarıyla etkileşim içindeyken esnek bir amfipatik yapı halinde organize edilebilir (Jung vd., 2023). α -sarmal AMP'lerin örnekleri arasında magainin, temporins ve melittin bulunur (Raja vd., 2017). β -tabakalarındaki peptitler, korunan ve proteinaz bozunmasını en aza indiren disülfid bağları oluşturan sistein kalıntıları nedeniyle çözeltide daha fazla yapısal stabiliteye sahip olabilir. Bu sınıf, katelisin ailesinden protegrinler, defensinler ve taşıplesinler gibi AMP'leri içerir (Robertson vd., 2018; Hadjicharalambous vd., 2022). Genişletilmiş peptitler, büyük oranda prolin ve glisin kalıntılarında oluşur ve belirli bir ikincil yapıya sahip değildir, ancak membranlarla temas ettiğinde genellikle amfipatik bir sarmal yapı oluştururlar (Jung vd., 2023). İndolisidin ve tritriptisin gibi prolin bakımından zengin kısa zincirli uzatılmış peptitler, memelilerden ve apidaesin gibi böceklerden izole edilebilir. Glisin açısından zengin genişletilmiş peptitler böceklerden izole edilebilir ve 8 ila 30 kDa arasında değişen boyutlara sahiptir (Răileanu vd., 2023).

5. AMP-NPLER'İN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

5.1 İnorganik Nanosistemler

5.1.1 Metal nanopartiküller

Metal nanopartiküller nanoboyutlarda altın, gümüş ve bakır gibi pozitif yüklü metaller ile 0.1 ile 100 nm boyutlarında hazırlanmış nanotaşıyıcı sistemlerdir. Özellikle küçük boyutları, büyük kimyasal stabilite ve inertlikleri, geniş yüzey alanları ve sonuç olarak yüksek ilaç yükleme kapasitesi, düşük sitotoksikite ve biyouyumlulukları nedeniyle AMP'lerin hazırlanması için en çok kullanılan metal nanopartiküllerden birisi altın nanopartiküllerdir (AuNPs) (de Alteriis vd., 2018). Antimikrobiyal etkinliğin ortaya çıkmasındaki en önemli noktalardan bir tanesi hücre içerisine aktif bileşiğin taşınabilmesidir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, Lee ve ark. HeLa hücrelerine yalnızca DNA aptamerlerine (AuNP-Apt) konjuge edilmiş AuNP'ye yüklenen sentetik peptid HPA3PHis'in enkapsüle edilmesi durumunda nüfuz edebildiği göstermişlerdir (Lee vd., 2017). Bir diğer çalışmada çoklu ilaç direncine neden olan *Acinetobacter baumannii* insnalarda ölümcül enfeksiyonları üzerine etkileri incelenmiştir. Park ve ark. tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada, *Acinetobacter baumannii* ile enfekte edilmiştir. Ardından DNA aptamer işlevselleştirilmiş

altın nanopartiküllerine (AuNP-Apt) yüklenen bir antimikrobiyal peptidin (AMP) heksahistidin etiketli bir formu olan Lys AB2 P3-His'in intraperitoneal olarak uygulandığında organlardaki bakteri kolonizasyonunun ciddi oranda azaldığı ve bu farelerin hayatta kalma oranları ve süreleri artmıştır (Park vd., 2022).

5.1.2 Karbon nanotüpler

Karbon nanotüpler düşük yoğunluk, mükemmel mekanik mukavemet, iyi adsorbsiyon kapasitesi, elektriksel ve termal iletkenlik özellikleri nedeni ile ilaçların ve terapötik moleküllerin taşınmasında önemli rolleri vardır (Zarghami Dehaghani vd., 2022) Karbon nanotüpler oksidasyon, yıkıcı reaksiyon, gerilim ve ilaç direnci gibi problemlere karşı çeşitli avantajlar sağlarken hidrofobik doğası biyokapsüllenmeyi önlerken agregasyona enden olabilir (Zarrintaj vd., 2020). Karbon nanotüpler ile ilgili yapılan bir çalışmada antimikrobiyal özelliklere sahip indolicidin peptidlerini -COOH grupları ile fonksiyonelleştirdikleri karbon nanotüplerine EDC NHS protokolü kullanarak yüklemişlerdir. Serbest formülasyonlara göre karbon nanotüpler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar 1000 kat daha az konsantrasyonda konakçı hücreleri bakterilere karşı koruyabildikleri sonucunu elde etmişlerdir (Sur vd., 2015).

5.2 Organik Nanosistemler

5.2.1 Polimer sistemler

5.2.1.1 Polimerler

Monor olarak adlandırılan temel yapıların bir araya gelmesi ile oluşan makro moleküler yapılara polimerler denilir. Polimerler elde edildikleri kaynaklara göre doğal olanlara selüloz, kitosan, sodyum alginat iken sentetik kaynaklardan elde edilenlere metil selüloz (ME), poli(lactid-ko- glikolide) (PLGA), polivinilalkol (PVA) ve polietilenglikol (PEG) örnek olarak verilebilir. Casciaro ve ark. yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu kistik fibrozis (KF) hastalarının akciğer infeksiyonlarının tedavisi için Esc(1-21) ve Esc(1-21)-1c (Esc peptidler) PLGA nanopartiküllerine yüklenmiş ve yapay KF mukus ve simüle bakteriyel matriks tabakasına in vitro ortamda taşınmasının gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Casciaro vd., 2019). İn vitro ve in vivo koşullarda *P. aeruginosa* büyümesi inhibe edilmiştir. Sonuç olarak PLGA nanopartiküllerinin MAPler'in akciğerlere ilaç taşınmasında potansiyel taşıyıcılar olduğu gösterilmiştir.

5.2.1.2 Hidrojeller

Hidrojeller, farklı etmenler (su, manyetik alan, ısı, vb.) ile temas ettiğinde şişme özelliğine sahip çapraz bağı polimerler olarak tanımlanabilir. Feng ve Ark. yapmış oldukları çalışmada yara iyileşmesi için RADA16(kendinden birleşebilen) bir peptid ile antibakteriyel peptid(AMP) birleşmesinden meydana gelen RA-Amp'ler üretmişler ve MGF E peptide içeren bir PNIPAM hidrojeli içerisine dahil ederek termal ve mekanik özelliklere sahip biyo uyumlu kompazit hidrojeller geliştirmişlerdir(Feng vd., 2022). Bir diğer çalışmada Wei ve ark., kronik diyabet yaralarının iyileşmesi için AMPler ile enfalamasyonun düzenlenmesi ve trombsit zengin plazma (PRP) ile kollejen birikimini ve fibroblast aktivitesini artırmışlardır. Bunun için okside dekstran (ODEX), Hyaluronik asit-AMP (HA-AMP) ve PRP hidrojellerini hazırlamışlardır. Sonuçta olarak *E.coli*, *S. aureus* ve *Pa.aeruginosa* ya karşı inhibisyon alanları gözlenmiş ve L929 hücrelerinin migrasyonları ve proliferasyonları başarılmıştır(Wei vd., 2021).

5.3 Lipid Bazlı Sistemler

5.3.1 Liposomlar

1965 yılında ilk kez Bengham ve ark. tarafından tanımlanan, veziküler nanotaşıyıcı sistemler olan liposomlar, kolesterol ve fosfolipidler meydana getirdiği bir veya daha fazla çift tabakadan oluşan tabakalar arasında hidrofobik bir alan ve iç kısmında hidrofilik bir alan bulduran taşıyıcı sistemlerdir. Hemmingsen ve ark. Amp'lerin anti-biofilm aktivitesini değerlendirmek için 7e-SMAMP-lipsom (~280 nm) formülasyonlarını geliştirmişlerdir. Sonuçlara göre *S.aureus* ve *E. Coli* nin oluşturduğu biofilmlerin, 6.25µg/mL konsantrasyonda 7e-SMAMP-lipsom tarafından tamamen yok edilmesini gerçekleştirmiştir(Hemmingsen vd., 2023). Bir diğer çalışmada Javai ve ark., 12 aminoasitten meydana gelen, sentetik bir katyonik peptid olan Omigananile hazırladıkları liposomal jeller (72% enkasülasyon, 7.8% yükleme kapasitesi, 120nm boyut ve 17.2 mv Zeta potansiyeli) ile atopik dermatit ve psoriasis lezyonlarının azalmasını sağlamışlardır(Javia vd., 2022).

6. MİKROBİYAL HÜCRELERDE REKOMBİNANT AMP ÜRETİMİ

Bakteriyel ekspresyon sistemleri, yüksek düzeyde rekombinant molekül üretebilmeleri, hızlı çoğalma gösterebilmeleri ve basit bir ortam gereksinimine sahip olmaları nedeniyle heterolog gen ekspresyonu için en çok kullanılan tiptir. Bunlar arasında, Gram-negatif bakteri *E. coli*, rekombinant

peptitlerin gen ekspresyonunu yükseltmek için en yaygın olarak kullanılandır (Pouresmaeil vd., 2023). Bu bağlamda, Protein Veri Bankasında (PDB) depolanan proteinlerin ve peptitlerin ~%99'u *E. coli* ekspresyon sisteminde üretildi (Xuan vd., 2023). İdeal kültür koşulları altında, bakteri hücre sayısı her 20 dakikada bir pratik olarak iki katına çıkar ancak doğada bunun yalnızca her 15 saatte bir ikiye katlandığını tahmin edilmektedir (Gibson vd., 2018). Ek olarak, bu konak aynı zamanda yerleşik genetik ve ekspresyon protokolleri, ticari ekspresyon vektörlerinin geniş kullanılabilirliği ve maliyet etkinliği nedeniyle de çekicidir (Sinha ve Shukla 2019). Literatürde *E. coli* hücrelerinin rekombinant AMP ekspresyonu için kullanımı hakkında birkaç rapor vardır. Son zamanlarda, prolin-arginin açısından zengin katyonik peptit PR-39, ekspresyon seviyesini karşılaştırmayı amaçlayan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS'de SUMO veya intein-kitin bağlama alanına (CBD) kaynaşmış olarak eksprese edildi. Füzyon protein konsantrasyonu ve tek aşamalı saflaştırma yöntemleri karşılaştırıldığında, benzer miktarlarda saf PR-39 geri kazanılmasına rağmen ($250 \mu\text{g L}^{-1}$ SUMO ve $280 \mu\text{g L}^{-1}$ intein) intein sistemi daha iyiydi (Azari vd., 2020). Ayrıca *E. coli* BL21'i (DE3) kullanan bir grup bilim insanı, *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen lantibiyotik miracidia'yı (*Bacillus spp.* tarafından ribozomal olarak üretilen 20 amino asitten oluşan antimikrobiyal bir peptiddir) eksprese etmek için modüler bir sistem oluşturdu. Mersacidin, metisiline dirençli *S. aureus* dahil olmak üzere birçok Gram bakteri türüne karşı bakterisidal aktiviteye sahiptir (Vasait vd., 2023). Son yıllarda, *B. subtilis*, rekombinant AMP üretimi için *E. coli* ekspresyon sistemine alternatif olarak kullanılmıştır. *B. subtilis* endospor oluşturan Gram-negatif bir toprak bakterisidir ve endotoksin içermediği için genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilir, bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliği endüstrileri için bir üretim konakçısı olarak kullanılmıştır (Chen vd., 2023). Bu bakterinin en büyük avantajlarından biri, rekombinant peptidi (akış aşağı sürecini kolaylaştırarak) doğal olarak salgılama ve hücre ile ilişkili proteinlerin hidrolizini azaltma olasılığıdır. Ayrıca hedef molekülün tespit ve saflaştırma işlemlerini kolaylaştırır (Zhang vd., 2020). Ayrıca *B. subtilis*, lipopolisakkaritler (LPS) üretmediği için insanlarda ve hayvanlarda bazı dejeneratif bozuklukların önüne geçer (Pouresmaeil vd., 2023). Bakteri hücre bazlı ekspresyon sistemleri çoğunlukla rekombinant moleküllerin üretimi için kullanılsa da, katyonik peptitlerin bozulmasına daha yatkındırlar (Pinilla vd., 2022). Ek olarak, *E. coli* hücreleri, rekombinant AMP ekstraksiyonu ve saflaştırma sürecini engelleyen çözünmeyen protein agregatları tarafından oluşturulan inklüzyon cisimcikleri üretebilir (Pouresmaeil vd., 2023). Tasarlanmış *E. coli* sitoplazmada veya periplazma rekombinant peptidi ihraç ederek peri-plazmik disülfid bağı izomerazını (DsbC) eksprese etmesine

rağmen (Karyolaimos vd., 2021), bu bakteri diğer karmaşık translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirmez (Roshanak vd., 2023). Bu nedenle, post-translasyonel modifikasyonlara ihtiyaç duyulan durumlarda, bu amaç için tasarlanmış mayalar veya bakteri suşları gibi başka sistemler seçilmelidir. Post-translasyonel modifikasyonlara ek olarak, mayalar doğru protein katlanmasını gerçekleştirebilir. Bununla birlikte, bir dezavantaj olarak hiperglikosillenmiş mekanizmalara ve büyüme hızını azaltan ve daha düşük bir rekombinant protein verimine neden olan aerobik fermentasyon ihtiyacına sahiptirler (Juturu ve Wu 2018). *S. cerevisiae* (ekmek mayası), hücre biyolojisi, genetiği ve biyokimyası iyi tanımlandığı için heterolog ekspresyon için model bir organizmadır (Pouresmaeil vd., 2023). Bu maya, bir grup bilim insanı tarafından gösterildiği gibi, rekombinant peptit üretimi için uygun bir ifade sistemidir (Li vd., 2022). *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* ve *Pasteurella sp.*'ye karşı aktivite gösteren nematod *Ascaris suum*'dan izole edilen pozitif yüklü a-sarmal bir peptit olan cecropin P1'i eksprese ettiler. Ek olarak, bu peptit ayrıca PRRSV NADC30 benzeri suşa karşı antiviral aktiviteye sahiptir (Li vd., 2022). Defensinler ayrıca *S. cerevisiae*'de başarıyla ifade edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, MET17 promotörünü kullanarak, *S. cerevisiae* hücrelerinde β -defensin-2'yi eksprese etti (Møller vd.,2017). Son yıllarda, *Pichia pastoris* mayası (*Komagataella phaffii* olarak yeniden sınıflandırılmıştır) disülfid köprüleri, O- ve N-glikosilasyon ve sinyal dizilerinin doğru bir şekilde işlenmiştir (Askri vd., 2022). Bir *Komagataella phaffii* sisteminde birkaç peptit ifade edilmiştir (Răileanu vd., 2023; Zhao vd., 2015; Zhang vd., 2018). Japon yengeci (*Tachypleus tridentatus*) hemositlerinden izole edilen ve bakteriyel lipopolisakariti inhibe eden katyonik bir peptit olan Tachyplesin I (TP-I), bu sistemde eksprese edildi. Başka bir örnek, immünomodülatör ve anti-inflamatuar hibrit peptit (IAHP) LL-37Ta1'in ifadesidir. Bu peptit, *Komagataella phaffii* hücrelerinde verimli bir şekilde üretildi ve bu hücrelerin rekombinant biyoaktif peptitler üretme yeteneklerini gösterdi (Pouresmaeil vd., 2023). İfade sisteminin seçimi rekombinant molekül özellikleri dikkate alınarak yapılmalı olsa da prokaryotik ve ökaryotik hücrelere dayalı sistemlerin hem güçlü hem de zayıf yönleri vardır. Dezavantajlar, rekombinant molekül üretimini artırmayı amaçlayan çoklu stratejilerle aşılabılır. Spesifik organizmalar veya tasarlanmış suşlar için kodon optimizasyonu, güçlü promotörlerin kullanımı ve multimerik AMP ekspresyonu, art arda veya daha yüksek moleküler kütleli bir proteine kaynaştırılarak, stabil ve yüksek düzeyde rekombinant üretime izin veren stratejilerdir (Liu vd., 2022).

7. HETEROLOG İFADE DÜZEYİNİ ARTIRMA STRATEJİLERİ

7.1. Hücre Hattı

Rekombinant protein üretimi için çeşitli *E. coli* türleri kullanılır. *E. coli* K12 ve BL21 (DE3) ve bunların türevlerinin çoğu, heterolog ekspresyon için en yaygın kullanılan konakçılardır (Pouresmaeil vd., 2023). *E. coli* BL21 (DE3) sisteminin bir avantajı olarak, eksojen protein bozulmasını önleyen, Lon proteazında bir eksikliğe sahiptir. Ek olarak, dış membran proteazı OmpT'yi kodlayan gen, *E. coli* BL21 (DE3) genomunda bulunmaz, bu da hücre dışı proteinlerin bozulmasını önler (Snappyan vd., 2021). BL21 suşunun bir başka avantajı, lac, tac, trc, ParaBAD, PrhaBAD, T5 ve T7 gibi RNA polimeraz promotörlerinin kontrolü altındaki genleri eksprese etmesidir (Du vd., 2021). BL21(DE3), insan tükürük proteini histatin 5'ten türetilen peptit P-113'ün veriminin 4 mg L⁻¹ bakteri süspansiyonu olduğu bir çalışmada gözlemlendiği gibi yüksek bir AMP ekspresyon seviyesi sağlanmıştır (Gan vd., 2021). Ayrıca, araştırmacılar, *B. subtilis* (WB800) suşunu bir rekombinant plazmit pHT-CI-CBF ile dönüştürerek, intein ile kaynaşmış yılan zehirinden (*Bungarus fasciatus*) izole edilmiş bir peptit olan katelididin-BF³'yi (CBF) eksprese ettiler (Liu vd., 2019). Veriler, salgılanan füzyon CBF verimi ~0,5 mg L⁻¹'e ulaştığından, intein ekspresyon sisteminin *B. subtilis*'te rekombinant proteinler üretmek için güvenli ve etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (He vd., 2015). Salgı kapasitesine ek olarak, bu sistem biyofilm yüzeyinde açığa çıkan rekombinant moleküller üretmek için kullanılabilir. Bir çalışmada araştırmacılar *Echinococcus granulosus* parazitinden tropomiyozin ve paramiyozinden, sırasıyla EgTrp ve EgA31 peptitlerini üreten peptidik bölgeler seçtiler. Bu peptitleri doğrudan önemli bir matris proteini olan TsaA C-terminaline kaynaştırdılar (Liu vd., 2019). *B. subtilis* hücreleri, küçük bir Tütün mozaik virüsü (TEV) proteazı ve daha önce *Apis mellifera*'dan izole edilen ve daha sonra TEV ile kaynaştırılan abaccin'in iki cistron ekspresyon vektörü geninin eklenmesiyle genetik olarak modifiye edilmiştir (Li vd., 2017). *B. subtilis* hücrelerine dayalı bir ekspresyon sisteminin, enniatin molekülünün biyosentezini kodlayan bir ökaryotik ribozomal olmayan peptit sentetaz (esyn) genini eksprese edebildiği de gösterilmiştir (Zobel vd., 2015). Belirli gen transkripsiyonundan veya promotöründen sorumlu DNA bölgesi, rekombinant AMP üretimi için önemli bir bileşendir. Bazı ana bilgisayarların farklı türde destekleyicilerle uyumluluğu vardır. Şu anda ticari olarak temin edilebilen çok sayıda destekleyici bulunmaktadır. Promotörler (genlerin transkripsiyonunu başlatan, DNA'parçası) lac, tac, lacUV5 ve T5 de günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır ve yeni ve daha verimli

promotörlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar geliştirilmeye devam etmektedir. İndüklenebilir promotörler, *E. coli* $\sigma 70$ 'ın RNAP'ı tarafından tanınabilen kurucu faj promotörleri T5 (T5N25) ve A1'den (T7A1) geliştirilmiş ve türetilmiştir. Destekleyiciler sadece bazal ekspresyonu azaltmakla kalmamış, aynı zamanda rekombinant proteinin üretimini de arttırmıştır (Schuller vd., 2020). Bakteri sistemlerinde gen ekspresyon seviyelerini arttırmaya yönelik başka bir strateji, ikili promotörlerin kullanılmasıdır. İki ayrı ekspresyon kasetine sahip ökaryotik sistemlerin aksine, prokaryotik organizmalarda kullanılan ikili promotörler kimeriktir ve eksprese edilecek genin yukarısında, ardışık olarak yer alır (Parapouli vd., 2020). Optimize edilmiş bir çift promotör (PHpaII–PamyQ0) sistemi kullanan bir grup bilim insanı, *B. subtilis* (CTCCC M 2016536) suşunda β -CGTase, pullulanaz ve α -CGTase'nin artan hücre dışı ifadesini göstermiştir. Bu suş, srfC, spoIIAC, nprE, aprE ve amyE genlerini silmek için genetik olarak manipüle edilmiştir (Zhang vd., 2017). Mayalarda, kurucu ve indüklenebilir promotörlerin kullanımı yaygındır. Yapıcı promotörlerle karşılaştırıldığında, indüklenebilir promotörler daha fazla kullanılır, çünkü gen ekspresyonu üzerinde belirli bir kontrole izin verirler, bu da daha yüksek bir rekombinant peptit verimi ile sonuçlanır. Yapıcı TEF1 ve GPD promotörleri, *S. cerevisiae* ekspresyonu için en çok kullanılanlardır. ADH1, GAPDH, PGK1, TPI, ENO, PYK1 promotörleri katlanmış proteinlerin agregasyonuna neden olarak salgılanmalarını zorlaştırsalar da bir alternatif sunarlar (Du vd., 2021). Promotörlerin etkinliğini etkileyebilecek bir diğer faktör, halihazırda değerlendirilmekte olan polimorfizmdir (Kahraman vd., 2019). Güçlü promotörlerin kullanımı heterolog ekspresyon seviyelerini arttırabilse de rekombinant peptit ekspresyonunu arttırmak için kodon kullanımı optimizasyonu gibi alternatif stratejiler kullanılabilir. Kodon kullanım yanlılığı, organizmaların genomunda belirli kodonların diğerlerine göre mevcudiyetini ifade eder (Hanson ve Coller 2018), ve heterolog ifade için bir meydan okuma olabilir. Farklı türler, bir DNA dizisinde karşılık gelen tRNA ile pozitif olarak ilişkili bir kodon frekansına sahiptir ve bir hücredeki tRNA konsantrasyonu, protein translasyon uzantısı için erişilebilir amino asitlerin sayısı için belirleyicidir (Fu vd., 2020). Kodon Optimizasyonu yaklaşımı, sentetik biyolojide ve metabolik ve hücrel mühendislik alanlarında, heterolog gen ekspresyon seviyelerini arttırmak için bir alternatif olarak kullanılmıştır. Başka bir deyişle, kodon optimizasyonu, gen ifadesinde çok önemli bir faktör olarak önerilmektedir, çünkü genetik mühendisliği teknikleri yoluyla eş anlamlı kodonların değiştirilmesinden oluşur, bu da artan protein up-regülasyonu ve RNA seviyeleri ile sonuçlanır. Kodon optimizasyonu, mRNA stabilitesine katkıda bulunmanın yanı sıra,

translasyon, uzama ve bozunma süreçlerini birbirine bağlayarak ribozom translokasyonunu da etkileyebilir (Alexaki vd., 2019). Heterolog gen ekspresyonundaki önemi nedeniyle, bilim adamları son yıllarda sentetik genlerin kodon optimizasyonunu kolaylaştıracak yeni araçlar geliştirdiler. Bu tür yaklaşımlar yapay zekanın kendi kendine öğrenme kapasitesini (Tian vd., 2017; Fu vd., 2020), hesaplama prosedürlerini (Chung ve Lee 2012) ve matematiksel algoritmaları (Taneda ve Asai 2020) araştırır.

7.2 Hibridizasyon

AMP'lerin hibridizasyonu, geliştirilmiş bir güvenlik profiline dönüşen değiştirilmiş fizikokimyasal özelliklere sahip yeni bir AMP oluşturmak için iki ayrı aktif doğal peptid fragmanını birleştirmesidir (Tall vd., 2023). Yeni bir hibrit AMP, güçlü antimikrobiyal aktivitesini korumak ve memeli hücrelerine karşı sitotoksik profili azaltmak amacıyla peptid H4'ü üreterek BMAP-27 ve OP-145 peptitlerinden a-sarmal parçalarını birleştirdi. Peptid H4, çok ilaca dirençli bakteri suşları dahil olmak üzere, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerin geniş bir spektrumuna karşı 2.5–25 μM aralığında aktivite göstermiştir (Masdeh vd., 2023). Ayrıca, iki peptidin kombinasyonu, “ana” peptidin plazma zarı geçirgenliğini artırabilir. Hibrit peptitlerin potansiyel aktivite artışı değerlendirilmek için, membran geçirgen peptitlerin (parasin veya magainin 2) membran translokasyonlu peptitlerle (DesHDAP1 veya BF2) birleştirilmesiyle hibritler geliştirildi. Sonuçlar, ana geçirgenleştirici peptid N-terminaline yerleştirildiğinde ve iki ana peptidin dizileri arasında bir alanın ayırıcı eklenmesi yoluyla geçirgenleştirici aktivitenin arttığını göstermektedir (Wade vd., 2019). Hibrit AMP'ler ayrıca doğal olarak oluşan peptitlerle karşılaştırıldığında molekülün hem seçiciliğini hem de stabilitesini artırabilir (Yang vd., 2020). Biyoinformatik analiz yoluyla, 3.35 kDa hibrit magainin-taumatın (MT) peptidi tasarlanmış ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ifade edilmiştir. Rekombinant MT, sırasıyla 6,5, 20 ve 9 μM MIC'de *S. aureus*, *E. coli* DH5 α ve *B. subtilis*'e karşı inhibitör etki gösterdi (Tian vd., 2019). Bazı hibrit peptitleri, diğer ekspresyon sistemlerinin kullanılmasını gerektiren bakteri konakçılara karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu bağlamda hibridize plantarisin E (PInE) ve plantarisin (PInF), tip IIb bakteriyosinlerden ~5 kDa EF-1 hibrit peptid geliştirilmiştir (Li vd., 2020). Bu peptid, *E. coli* hücrelerinin hücre zarı geçirgenliğini doğrudan indükleyebilir. *K. phaffii* konakçısında rekombinant EF-1'i eksprese ederek, %94,9 saflıkta 32,65 mg L-1 verim elde ettiler. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (MIC $\frac{1}{4}$ 6.25 μM) ve *E. coli* K88 (MIC $\frac{1}{4}$ 3.125 μM) hücrelerine karşı bakterisidal aktiviteye ek olarak, rekombinant EF-1 hemolitik aktiviteye sahip değildir (Li vd., 2020) hibridizasyon

yaklaşımı bazı dezavantajların üstesinden gelmek için büyük bir potansiyele sahiptir ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Agbale vd., 2019). Bu stratejilerin sınırlamaları olsa da tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanımları, tıbbi ve farmasötik açıdan ilgi çekici biyomoleküllerin üretiminde devrim yaratarak rekombinant AMP'lerin verimini artırabilir.

7.2.1 Toplu işlemler

Basit süresiz yığınlar, mikroorganizmanın fizyolojisi ve kinetik parametrelerinin incelenmesi için ilk biyo-işleme uygulamalarında faydalı olabilir. 24 ila 30 saat arasında süren bu faz sırasında, substratın eklenmesi, belirli bir hücre konsantrasyonuna ulaşana kadar veya işlem sırasında ilk substrat tamamen tüketilene kadar uzanan kültivasyonun başlangıcında gerçekleşir. İşlem sırasında başka bir substrat ilavesi olmadığı için hücre yoğunluğu ve verimi sınırlıdır. Diğer bir dezavantaj, bu aşamada konakçı mikroorganizma için toksik olabilen ve ilgilenilen ürünün elde edilmesinde bir sınırlamaya neden olabilen sekonder metabolitlerin birikiminin meydana gelebilmesidir (Amit vd., 2017; Elhamouly vd., 2022).

7.2.2 Besleme

Kesintili kesikli besleme işlemi, yüksek bir biyokütle konsantrasyonunun elde edilmesini sağlar ve ilgilenilen ürün, işlem süresinin uzatılması olasılığının yanı sıra seçilen substratın kesin miktarlarda kademeli olarak beslenmesinden kaynaklanır. Genel olarak, düşük bir substrat konsantrasyonu ile başlar ve tamamen tüketildiğinde, ideal seviyeyi aşmadan fermantasyon sürecini sürdürmek için daha fazla substrat eklenir. Ürün toplama işlemi yalnızca işlemin sonunda gerçekleşir ve işlem için iyi sterilizasyon koşulları sağlar (Ferrazzano vd., 2022). Bu yetiştirme stratejisi *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* ve *K. phaffii* gibi birçok mikroorganizma için avantajlıdır (Kumar vd., 2023). Beslemeli toplu modda, substrat tüketiminin ve biyokütle birikiminin gerçekleşeceği basit bir yığın aşaması gerçekleştirilir (Christmann vd., 2023). İlk karbon kaynağı bittiğinde, rekombinant protein üretiminin gerçekleşeceği beslemeli topluyu değiştirilir. Genellikle kullanılan substratlar, ihtiyaç duyulan mineraller ve eser elementler ile birlikte karbon kaynağıdır (Malairuang vd., 2020). Sürekli ve üstel besleme teknikleri sırasında, substrat beslemesi, basit toplu biyoprosesten sonra sürekli olarak gerçekleştirilir. Sürekli besleme, tüm süreç boyunca sürekli bir oranda besin ilavesine dayanır. Üstel besleme, önceden tanımlanmış bir seviyede belirli büyüme hızının korunmasına izin verir. Hücrelerin hedef konsantrasyona ulaşması için gereken substrat miktarı önceden hesaplanabilir ve süreç boyunca substratlar sürekli olarak sağlanır (Malairuang vd., 2020). İşlem sırasında

besin eklenmesi nedeniyle, biyoreaktörün içinde hücre konsantrasyonunun seyrelmesine neden olan bir hacim artışı olur (D'Anjou ve Daugulis 2000). Geri besleme sistemde çözülmüş oksijen veya karbondioksit gibi dolaylı değişkenlerin izlenmesi veya metanol veya etanol gibi karbon kaynağının konsantrasyonu ile gerçekleşir (Malairuang vd., 2020). Bu nedenle, substrat tükenmesine bağlı bir metabolizma azalmasına işaret eden çözülmüş oksijen artış hızına göre darbeler yoluyla beslenme gerçekleştirilebilir (Christmann vd., 2023). Bir plektasin türevi olan peptit NZX, NZX üretimini artırmayı amaçlayan 5 L'lik bir biyoreaktörde *K. phaffii* (X-33) olarak ifade edildi. Glikoz üzerinde hücre büyümesinden sonra, NZW ekspresyonunun indüksiyonu, 120 saat boyunca metanol ile beslenen bir partide gerçekleştirildi. Sonuçlara göre elde edilen toplam biyokütle konsantrasyonu 268 g L⁻¹ ve salgılanan protein 2820 mg L⁻¹ idi. Rekombinant peptit, hem in vitro hem de in vivo deneylerde *Staphylococcus hyicus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye ek olarak yüksek stabilite ve düşük sitotoksosite gösterdi (Liu vd., 2020).

7.2.3 Sürekli işlemler

Kesintili beslemeli mod hakkında ilgili çalışmalar zaten yayınlanmış olsa da bunlar daha zaman alıcı olabilir. Sürekli mod, stabil kültür koşullarına izin verirken, kültür ortamındaki tüm hücreler için benzer bir fizyolojik durum sağlar ve bu nedenlerle fizyolojik veri elde etmek için en yaygın kullanılan stratejilerden biri olmuştur (Ferrazzano vd., 2022). Sürekli modda, sabit fazda sistem bakımı nedeniyle hedef bileşik büyük miktarlarda üretilebilir. Taze kültür ortamı biyoreaktöre eklenir ve kültürün bir kısmı sabit bir değerde sürekli olarak çıkarılır. Bu biyoproses, reaktör içindeki koşullar (substrat, hücre ve ürün konsantrasyonları) stabil olabileceğinden, bir kemostat (kimyasal ve statik ortam) olarak da bilinir (Elhamouly vd. 2022; Amit vd., 2017). PH değeri, oksijen oranı, çalışma hacmi ve besin kaynağı gibi diğer parametreler de sabit tutulur (Christmann vd., 2023). Sürekli işlemler, büyüme oranını uzun süreler boyunca orta ve sabit tutabilir, bu da yeni bir besiyeri hazırlama, kültürü kesintili bir proseste sterilize etme ve soğutmaya harcanan üretken olmayan zamandan kaçınarak daha yüksek ortalama verim üretir (Amit vd., 2017). Sürekli kültürlerle olan ilgi, mikrobiyal fizyoloji ve süreç geliştirme çalışmaları ile sınırlı değildir. Hücrelerin üretim durumlarında daha uzun süre kalmasına izin verdiği ve sonuç olarak maliyetler düşerken sürecin verimi önemli ölçüde arttığı için rekombinant proteinlerin üretimi için de büyük ilgi görmektedir (Khanal ve Lenhoff 2021; Sun vd., 2023). Bilimsel literatürde farklı mikroorganizmalarda rekombinant proteinler üretmek için sürekli işlemlerin çeşitli örnekleri bildirilmiştir. Ancak, sürekli süreçlerle ilgili bazı eksiklikler bunların ticarileştirilmesini sınırlı kılmaktadır (Rathore vd.,

2015; Sun vd., 2023). Bu biyoproses yönteminin sınırlamaları, hem uzun bir yetiştirme periyodu boyunca stabilite ve sterilite, hem de kısa vadede esneklik eksikliği (uzun uygulama periyotlarına duyulan ihtiyaçtan kaynaklanan), hücrelerin genetik yetersizliği ile bağlantılı olarak bazıları olarak belirtilebilir (Rathore vd., 2015; Sun vd., 2023). Esas olarak bu sorunlardan dolayı, özellikle yüksek talep gören biyofarmasötiklerin üretimi için rekombinant proteinlerin sürekli üretimi kullanılmaktadır. 1990'larda *S. cerevisiae*'de üretilen rekombinant insülin, mikroorganizmaların kullanıldığı sürekli bir endüstriyel rekombinasyon işleminin bilinen tek örneğidir (Madhavan vd., 2021).

7.3 AMP'lerin Saflaştırılması: Aşağı Yönde Süreç Geliştirme

Sonraki süreç, maliyetleri düşürmeyi amaçlayan rekombinant peptitlerin geri kazanılması ve saflaştırılmasından oluşur (Ferrazzano vd., 2022). Bu bağlamda, sonraki ilaç endüstrisinin saflaştırma tekniklerinde yenilikçi yaklaşımlar uygulanmıştır (Chaudhary vd., 2023). Bu teknikler üç farklı aşamaya ayrılır: (a) ilk geri kazanım ekstraksiyonu veya izolasyonu, (b) saflaştırma (c) belirli kirleticilerin uzaklaştırılması için cilalamasıdır (Chaudhary vd., 2023; Park vd., 2023). Birlikte ele alındığında, tüm bu adımlar terapötik peptitlerin aranmasını, üretilmesini ve uygulanmasını iyileştirir (Agyei vd., 2017).

7.4 Geri Kazanma

Geri kazanım aşamasında, endüstrilerde uygulanan en yaygın teknikler santrifüjleme, yüzeysel akışlı mikrofiltreleme (MF-TFF) veya derinlik filtrelemedir. Amaç, ilk saflaştırma adımlarından önce hücreleri, ince partikülleri, kolloidleri ve çözünür safsızlıkları uzaklaştırmaktır (Pieracci vd., 2018). Genel olarak, mayalar gibi organizmalar, rekombinant peptitleri hücre dışı boşluğa ihraç ederken, bakteriyel sistemlerde heterolog moleküller periplazmik aralığa gönderilir. Hücre dışı rekombinant peptidi geri kazanmak için, onu bir santrifüjleme veya ultrasantrifüjleme işlemi ile konsantre etmek gereklidir. Kromatografiye ek olarak, konsantrasyonlarını iyileştirmek için numunelerin çöktürülmesi de yapılabilir (Jozala vd., 2016). C veya N-terminal bölgesinde yer alan bir sinyal peptidinin varlığı, rekombinant peptidin hücre dışı (*K. phaffii*'de) veya periplazmik (*E. coli*'de) aralığa aktarılmasına izin verir (Weinacker vd., 2013). Periplazmik aralığa saflaştırılmış peptitler için hücreler parçalanmaya (sonikasyon, yüksek basınçlı homojenleştirici, değirmenlerden geçirme, vb.) tabi tutulur ve hücre kalıntılarını gidermek için berraklaştırma kullanılabilir. Bu nedenle berraklaştırılmış ürün, çöktürme ve/veya kromatografi kullanılarak saflaştırılır. Bazı durumlarda, periplazmik

boşlukta üretilen rekombinant peptitler, aktif olmayan inklüzyon cisimcikleri (IB'ler) olarak birikebilir, bu da peptitleri doğal konformasyonlarına yeniden katlamak için ekstra bir adım gerektirir (Ehgartner vd., 2017; Park vd., 2021).

7.5 Saflaştırma

Rekombinant peptit geri kazanımından sonraki adım, kromatografi teknikleriyle saflaştırma işlemidir (Park vd., 2021). Boyut dışlama kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, düşük basınçlı hidrofobik etkileşim kromatografisi, ters akım dağılımı, bölme kromatografisi ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) gibi çeşitli kromatografi türleri vardır. Kromatografi teknikleri köklü süreçler olmasına rağmen, diğer saflaştırma yaklaşımlarıyla karşılaştırıldığında daha pahalıdır (Park vd., 2021). Bu sınırlamaların bazılarının üstesinden gelmek için, saflaştırma stratejisinin her bir vaka için değerlendirilmesi önemlidir ve belirli uygulamaya göre değişebilir (Murugaiyan vd., 2022). Bu bağlamda, kromatografi teknikleri kullanılarak birkaç AMP hali hazırda saflaştırılmıştır. Konak Savunma peptitleri (HDP'ler) 2 aşamalı yöntemle saflaştırıldı. *E. coli* suşu BL21 kullanılarak yüksek verimlerde rekombinant üretimden sonra, peptitler bir Ni-NTA Sepharose kolonu kullanılarak saflaştırıldı (Pinilla vd., 2022).

8. ENDÜSTRİYEL SÜREÇLERİN OPTİMİZASYONU

Son zamanlarda, yüksek verimli cihazlar, deney tasarımı ve proses analitik teknolojisi gibi endüstriyel süreci optimize etmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Yüksek verimli yöntemi, tarama, süreç geliştirme ve deneme olmak üzere ikiye ayrılır. Bu süreçler birlikte, küçük ölçekte testler yaparak, düşük laboratuvar alanı kullanımıyla oluşturulacak çok sayıda veri noktası üreterek ve zamandan tasarruf etmenin yanı sıra hızlı ve güvenilir bir şekilde veri elde etmeyi amaçlar (Silva vd., 2021). Tarama, 384 ve 1536 kuyulu mikrotitre plakaları kullanarak günde yüz binlerce veri noktası üretmekten sorumludur (Lyu vd., 2018). Diğer bir seçenek ise, çok az miktarda sıvı kullanan, hızlı analiz ile birden fazla veri noktası oluşturan ve böylece zaman ve laboratuvar alanını azaltan mikroakışkanlardır (Al-wdan vd., 2023). Taramanın amacı, sürecin optimizasyonu ve nihai ürünün aktif ve hızlı bir şekilde teslim edilmesidir (Shukla vd., 2017; Silva vd., 2021). Süreç geliştirme, sürecin daha iyi bir tasarımını ve anlaşılmasını sağlamak için karmaşık hesaplama araçlarını kullanır (Bhambure vd., 2011). Deneme, minyatürleştirme ve otomasyon sürecine genel bir bakış sağlayan ve biyofarmasötik endüstrisinde uygulanabilirliği sağlayan yüksek verimli yöntemi ve süreç geliştirme

birliğıdir (Silva vd., 2021; São Pedro vd., 2021). Bu bağlamda, bir grup bilim insanı iki farklı yöntemin (yüksek verimli süreçler ve akış aracılı sentez kombinasyonunu bildirdi. Yeni peptitler hakkında büyük miktarda bilgiyi hızla elde ettiler. *P. aeruginosa*'ya karşı potansiyelini test ettiler ve sonuçlar, en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidi tanımlamalarına izin verdi. İş akışı, biyomedikal uygulamalar için yeni antimikrobiyal ajanlar olarak peptit yapılarının keşfine ve optimizasyonuna katkıda bulunur (Judzewitsch vd., 2020). Hem difüzyon kendi kendine etkileşim parametrelerinin (kDa) hem de ozmotik ikinci viral katsayılarının (B22) uygunluğu, peptitlerin formülasyon agregasyon riskini araştırmayı amaçlayan yüksek verimli tarama kullanılarak araştırıldı. Bu çalışmada, termal stresin kolloidal stabilite üzerindeki etkileri, ayrıca seçilen iki PH değerinde altı tamponlama sistemi, dört tonisite maddesi ve ortak bir koruyucu değerlendirilmiştir. Gliserol veya mannitol ile birleştirilmiş pH 4.5'te asetat ve süksinat tamponu, peptitlerin daha yüksek stabilitesini göstermiştir. Veriler, yüksek verimli yöntemlerinin, peptit bazlı sıvı formülasyonların erken gelişimi sırasında kolloidal stabilitenin optimizasyonu hakkında önemli bilgiler gösterdiğini göstermektedir (Dauer vd., 2021). Tarama yöntemine ek olarak, deney tasarımı ayrıca deneyin izlenmesi ve kontrolü yoluyla biyoproseslerin optimize edilmesini sağlar. Deney tasarımı, çok sayıda değişkenin aynı anda değerlendirilmesini sağlar. Böylece, bu metodoloji, süreç hakkında maksimum bilgi elde eder, yüksek kaliteli bir ürün elde etmek için zaman ve finansal kaynaklardan tasarruf sağlar (Kasemiire vd., 2021). Bu metodoloji, *E. coli* BL21'de (DE3) AMP insan β -defensin 2 ekspresyon verimlerini optimize etmek için kullanıldı. Yazarlar, hücre yoğunluğu, sıcaklık, indüksiyon periyodu ve indükleyici konsantrasyonu gibi aşağıdaki değişkenleri değerlendirmek için 24 faktörlü deney tasarımı kullandılar. 19 farklı kombinasyona sahipler ve en iyi koşul, 37 °C ön indüksiyon sıcaklığı, 600 nm hücre yoğunluğu, 20 °C indüksiyon sıcaklığı ve 0.1 mM gen ekspresyon indükleyicisi idi. Araştırmacılar, bu koşulların HBD2 peptidini daha önce test edilenden daha yüksek oranda ürettiği sonucuna varmıştır (Corrales-García vd., 2020).

9. SONUÇ

Tedavisi zor enfeksiyonlardan kaynaklanan ölümlerin dünya çapında artması, dünya sağlık otoriteleri arasında ciddi endişelere neden oldu. DSÖ bir süredir yeni ilaçların geliştirilmesi gerektiği konusunda uyarılarda bulunuyor. AMR'nin yayılması yeni bir olay değildir ancak yine de yeterli tedaviyi sağlayacak araç eksikliği mevcuttur (Luong vd., 2022). Antibiyotiklerin altın çağından bu yana, yeni moleküllere ilişkin herhangi bir rapor bulunmamaktadır ve MDR organizmalarının neden olduğu

enfeksiyonlarla mücadele edebilecek yeni antimikrobiyal madde sınıflarının acilen keşfedilmesi gerekmektedir. Antimikrobiyal peptitler, MDR ajanlarıyla mücadele edebilen yeni bir biyoaktif bileşik kaynağı olarak ortaya çıkarak büyük bir potansiyel göstermiştir. AMP'ler kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve yıllar geçtikçe bazıları klinik deneyler için kabul edilmiş, diğerleri ise bazı tedavilerde kullanılmıştır. AMP'lerin düşük toksisiteyi teşvik ettiği ve bu moleküllerin yüksek özgüllüğü nedeniyle AMP'lere karşı direnç gelişiminin nadir olduğu bilinmektedir; bu, AMP'lerin AMR'lere karşı mücadelede güçlü bir silah olduğunu doğrulamaktadır (Luong vd., 2022). Öyle bile olsa, geleneksel antibiyotiklerde gözlemlendiği gibi patojenin birlikte evrimi AMP'lerde de meydana gelebilir, bu nedenle hazırlıklı olunması gerekir. Birçok bakterinin geleneksel antibiyotiklere direnç göstermesine neden olan seçici baskı, AMP tedavileri kullanılarak da gözlemlenebilir. AMP'lere direnç daha nadir olmasına rağmen bazı izolatlar bu tür bir direnç göstermiştir. İki veya daha fazla antibiyotiğin kullanıldığı kombinasyon tedavisi stratejisi klinik uygulamada yaygındır ancak riskler ve faydalar dikkatle tartışılmalıdır (Fatsis-Kavalopoulos vd., 2022). Antibiyotik kombinasyonu başarılı oldu ancak halihazırda çoklu ilaca dirençli olduğu kanıtlanmış klinik izolatlar mevcut. Geleneksel kombinasyon tedavisine (antibiyotikler arasında) ek olarak AMP-antibiyotik kombinasyonunun da olumlu etkileri rapor edilmiştir. Bu kombinasyonun temel avantajları enfeksiyonların neden olduğu yıllık maliyetleri azaltabilir ve aynı zamanda AMR ajanlarının ortaya çıkmasını da önleyebilir (Răileanu vd., 2023). Bu AMP-antibiyotik kombinasyonu, sahip olabileceği faydalar nedeniyle dikkat çekti. Son yıllarda AMP-antibiyotik kombinasyonlarından umut verici sonuçlar veren birçok çalışma rapor edilmiştir. Bu kombinasyonla yapılan çeşitli kavram kanıtlama çalışmaları standartlaştırılmış yöntemlere sahiptir. Ayrıca AMP kombinasyonlarındaki etki mekanizması ve sinerji mekanizmalarının belirlenmesini de kolaylaştırmışlardır. (Pizzolato-Cezar vd., 2019). Bununla birlikte, AMP-antibiyotik kombinasyonlarının olumlu etkisini gösteren sonuçlara rağmen, özellikle AMP'lerin geçirgenliği/stabilitesi ile ilgili olarak hala bazı zorluklarla karşılaşmaktadır (Pizzolato-Cezar vd., 2019). Biyoişleme teknolojisi, büyük ölçekte rekombinant terapötik AMP'ler geliştirmek için harika bir fırsattır. Bu moleküllerin karışıklığı, onları bir dizi bulaşıcı hastalığa karşı yeni biyofarmasötiklerin geliştirilmesinde umut verici alternatifler haline getiriyor. Mikroorganizmaların kullanımı ve farklı fermantasyon süreçleri, büyük ölçekli yüksek kaliteli AMP üretimine izin verir. Bu nedenle, biyolojik olarak aktif ve kararlı moleküller üretmek için proses koşullarının optimizasyonu son derece önemli görünmektedir. Promotörler ve kodon kullanım optimizasyonu, füzyon protein üretimi ve

AMP hibridizasyonu gibi hücre hattı mühendislikleri için farklı stratejiler uygulanabilir. AMP biyoişleminin genel optimizasyonu, bileşiklerin üretimi ve geri kazanılması için en iyi ifade sistemini ve koşulları arar. Ancak ideal bir üretim sisteminin olmadığı ve hepsinin avantaj ve dezavantajlarının olduğu vurgulanmalıdır. AMP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin analizi, kararlı ve aktif moleküllerin yanı sıra büyük miktarlarda üretmek için en yararlı koşulları bulmak için esastır. Aynı, küçük veya büyük ölçekte rekombinant suş ekimi sırasında meydana gelir. Yetiştirme koşulları ve biyoproses stratejileri, rekombinant AMP'lerin ifadesini doğrudan etkilediklerinden dikkatli bir şekilde analiz edilmelidir. Bir AMP için üretildikten sonra uygun bir geri kazanım yönteminin seçimi de çok önemlidir, çünkü yüksek derecede saflık derecesine sahip AMP'lerin elde edilmesini sağlayabilir. Özetle, endüstriyel prosesler için optimizasyon yöntemleri bu alan için önemli gelişmelerdir. En iyi çalışma koşulları sayesinde, bu optimize edilmiş yöntemler üretim hızını arttırır ve hem yukarı hem de aşağı süreç geliştirmede maliyetleri düşürür. Bu tür iyileştirmeler önemlidir, çünkü AMP'leri yüksek miktarlarda ve saflıkta üretmemize izin verebilirler ve bunlar daha sonra ilaç endüstrisinde, araştırmalarda ve klinik öncesi ve klinik deneylerde uygulanacaktır.

10. KAYNAKÇA

1. Pizzolato-Cezar, LR, Okuda-Shinagawa, NM ve Machini, MT (2019). Combinatory Therapy Antimicrobial Peptide-Antibiotic to Minimize the Ongoing Rise of Resistance. *Front.Microbiol* 10:1703.
2. Wall S. (2019) Prevention of antibiotic resistance – an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps. *Glob Health Action* 12: 1756191.
3. Răileanu M, Bacalum M (2023) Cancer Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial Peptides), a New Strategy against Colorectal Cancer. *Toxins* 2023, 15, 459.
4. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, vd. (2021) Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health* 14: 1750–1766.
5. Denissen J, Rekneke B, Wosa-Reyneke M, vd. (2022) Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 244 (2022) 114006
6. Kraker MEA, Stewardson AJ, Harbarth S (2016) Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med.* 2016 Nov; 13(11): e1002184.
7. Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS vd. (2022) Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* 11, 200.
8. Mba IE, Nweze EI (2022) Antimicrobial Peptides Therapy: An Emerging Alternative for Treating Drug-Resistant Bacteria. *Yale J Biol Med* 95(4): 445–463.
9. Kiki MJ (2023) Biopigments of Microbial Origin and Their Application in the Cosmetic Industry. *Cosmetics* 10(2), 47.
10. Roshanak S, Yarabb H, Shahidi F, vd. (2023) Effects of adding poly-histidine tag on stability, antimicrobial activity and safety of recombinant buforin I expressed in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 13:5508.
11. Chaudhary S, Ali Z, Tehseen M, vd. (2023) Efficient in planta production of amidated antimicrobial peptides that are active against drug-resistant ESKAPE pathogens. *Nature Communications* 14:1464.
12. Xu J, Ou J, McHugh KP (2022) Upstream cell culture process characterization and in-process control strategy development at pandemic speed. *MABS* 14, 1, e2060724.

13. Park SY, Park CH, Choi DH, vd. (2021) Bioprocess digital twins of mammalian cell culture for advanced biomanufacturing. *Current Opinion in Chemical Engineering* 2021, 33:100702
14. Carreón-Rodríguez OE, Gosset G, Escalante A, vd. (2023) Glucose Transport in *Escherichia coli*: From Basics to Transport Engineering. *Microorganisms* 11, 1588.
15. Parapouli M, Vasileiadis A, Sofia Afendra A, vd. (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6 (1): 131.
16. Dini I, Biasi MG, Mancusi A (2022) An Overview of the Potentialities of Antimicrobial Peptides Derived from Natural Sources. *Antibiotics* 2022, 11(11), 1483
17. Chen J, Yu B, Cong H, vd. (2023) Recent development and application of membrane chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 415:45–65.
18. Ryan A, Patel P, O'Connor P M, vd. (2021). Pharmaceutical design of a delivery system for the bacteriocin lacticin 3147. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(4), 1735-1751
19. Zarrintaj P, Ramsey J D, Samadi A, (2020) Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 110, 37-67.
20. Zarghami Dehaghani M, Yousefi F, Seidi F, vd. (2022). Dynamics of Antimicrobial Peptide Encapsulation in Carbon Nanotubes: The Role of Hydroxylation. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 125-136.
21. Sinha R, Shukla P (2019) Antimicrobial peptides: recent insights on biotechnological interventions and future perspectives. *Protein Pept Lett* 26:79–87.
22. Kim J, Cho BH, Jang YS (2023) Understanding the Roles of Host Defense Peptides in Immune Modulation: From Antimicrobial Action to Potential as Adjuvants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2023. 33(3): 288–298.
23. Browne K, Chakraborty S, Chen R vd. (2020) A new era of antibiotics: the clinical potential of antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci* 21:7047.
24. Jeong H, Choi SK, Ryu CM, etal (2019) Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *frontiers in Microbiology* 10: 467.
25. Matthyssen T, Li W, Holden JA (2022). The Potential of Modified and Multimeric Antimicrobial Peptide Materials as Superbug Killers. *Front. Chem.* 9:795433.
- 26 Canepa E, Relini A, Bochicchio D, vd. (2022) Amphiphilic Gold Nanoparticles: A Biomimetic Tool to Gain Mechanistic Insights into Peptide-Lipid Interactions. *Membranes* 2022, 12(7), 673

27. Lee B, Park J, Ryu M, vd. (2017) Antimicrobial peptide-loaded gold nanoparticle-DNA aptamer conjugates as highly effective antibacterial therapeutics against *Vibrio vulnificus*. *Scientific Reports*, 7(1): 1.
28. Lei J, Sun L, Huang S, vd. (2019) The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res*. 2019; 11(7): 3919–3931.
29. Getahun YA, Ali DA, Taye BW, vd. (2022) Multidrug-Resistant Microbial Therapy Using Antimicrobial Peptides and the CRISPR/Cas9 System. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 2022;13 173–190.
30. Hadjicharalambous A, Bournakas N, Newman H, vd. (2022) Antimicrobial and Cell-Penetrating Peptides: Understanding Penetration for the Design of Novel Conjugate Antibiotics. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Nov; 11(11): 1636.
31. Liu H, Timko MP (2022) Improving Protein Quantity and Quality—The Next Level of Plant Molecular Farming. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb; 23(3): 1326.
32. Robertson NS, Spring DR (2018) Using Peptidomimetics and Constrained Peptides as Valuable Tools for Inhibiting Protein–Protein Interactions. *Molecules* 2018, 23(4), 959
33. Drayton M, Kizhakkedathu JN, Straus SK (2020) Towards robust delivery of antimicrobial peptides to combat bacterial resistance. *Molecules* 25:3048.
34. Zhang L, Wei D, Zhan N vd. (2020) Heterologous expression of the novel α -helical hybrid peptide PR-FO in *Bacillus subtilis*. *Bioprocess Biosyst Eng* 43:1619–1627.
35. ZZhan N, Zhang L, Yang H vd. (2021) Design and heterologous expression of a novel dimeric LL37 variant in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Factories* 20:143.
36. Xuan J, Feng W, Wang J, vd. (2023) Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates* 68 (2023) 100954.
37. Almeida LHO, de Oliveira CFR, Rodrigues MS vd. (2020) Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. *Arch Biochem Biophys* 691:108487.
38. Zhang OY, Yan ZB, Meng YM, vd. (2021) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Med Res* 8:48.
39. Huan Y, Kong Q, Mou H, vd. (2020) Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11:582779.
40. Jung B, Yun. H, Min HJ, vd. (2023) Discovery of structural and functional transition sites for membrane-penetrating activity of sheep myeloid antimicrobial peptide-18. *Sci Rep*. 2023; 13: 1238.

41. Raja Z, André S, Abbassi F vd. (2017) Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. PLoS One 12: e0174024.
42. Casciaro B, d'Angelo I, Zhang X, vd. (2019). Poly (lactide- co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1'a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: In Vitro and in Vivo Studies. Biomacromolecules, 20(5), 1876-1888.
- 43 Park J, Shin E, Yeom J-H, vd. (2022). Gold nanoparticle-DNA aptamer-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively inhibits *Acinetobacter baumannii* infection in mice. Journal of Microbiology, 60(1), 128-136.
- 44 Gibson B, Wilson DJ, Feil E, vd. (2018) The distribution of bacterial doubling times in the wild. Proc Biol Sci 13; 285(1880): 20180789.
45. Azari M, Asad S, Mehrnia MR (2020) Heterologous production of porcine derived antimicrobial peptide PR-39 in *Escherichia coli* using SUMO and intein fusion systems. Protein Expr Purif 169:105568.
46. Sur A, Pradhan B, Banerjee A, vd. (2015). Immune Activation Efficacy of Indolicidin Is Enhanced upon Conjugation with Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles. PLOS ONE, 10(4), e0123905.
47. Vasait R, Bhamare S, Jamdhade S, vd. (2023) Antibacterial compound of *Bacillus Amyloliquefaciens* and *Bacillus Siamensis*: screening, characterization, and evaluation. Int. J. Sec. Metabolite 10, 2, pp. 175-189.
48. Chen M, Lin N, Liu X, vd. (2023) A novel antimicrobial peptide screened by a *Bacillus subtilis* expression system, derived from *Larimichthys crocea* Ferritin H, exerting bactericidal and parasitocidal activities. Front. Immunol. 14:1168517
49. Pinilla RR, Lisowski L, Aris A, vd. (2022) The future of recombinant host defense peptides. Microb Cell Fact. 2022; 21: 267.
50. Karyolimos A, Gier JW vd. (2021) Strategies to Enhance Periplasmic Recombinant Protein Production Yields in *Escherichia coli*. Front. Bioeng. Biotechnol. 9:797334.
51. Juturu V, Wu JC (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. Chembiochem 19:7–21.
52. Møller TSB, Hay J, Saxton MJ vd. (2017) Human β -defensin-2 production from *S. cerevisiae* using the repressible MET17 promoter. Microb Cell Factories 16:11
53. Li F, Chen Y, Qi Q, vd. (2022) Improving recombinant protein production by yeast through genome-scale modeling using proteome constraints. Nature Communications 13:2969.
54. Askri H, Akrouti I, Rourou S, vd. (2022) Production, purification, and characterization of recombinant rabies virus glycoprotein expressed in *PichiaPink™* yeast. Biotechnology Reports 35, e00736

55. Zhao H, Tang J, Cao L vd. (2015) Characterization of bioactive recombinant antimicrobial peptide parasin I fused with human lysozyme expressed in the yeast *Pichia pastoris* system. *Enzym Microb Technol* 77:61–67.
56. Zhang X, Jiang A, Qi B vd. (2018) Secretion expression of human neutrophil peptide 1 (HNP1) in *Pichia pastoris* and its functional analysis against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:4817–4827.
57. Pouresmaeil M, Dargahlou SA (2023) Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. *Archives of Microbiology* 205:212.
58. Snapyan M, Robin S, Yeretssian G, vd. (2021) Cell-Free Protein Synthesis by Diversifying Bacterial Transcription Machinery. *BioTech* 10(4): 24.
59. Du F, Liu YQ, Xu YS, vd.. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact.* 2021; 20: 189.
60. Gan BH, Gaynord J, Rowe SM, vd. (2021) The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions. *Chem. Soc. Rev* 50, 7820-7880.
61. Liu Z, Zheng W, Ge C, vd. (2019) High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 89.
62. He Q, Fu A, Li T (2015) Expression and one-step purification of the antimicrobial peptide cathelicidin-BF using the intein system in *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42: 647–653.
63. Li L, Mu L, Wang X vd. (2017) A novel expression vector for the secretion of abaecin in *Bacillus subtilis*. *Braz J Microbiol* 48:809–814.
64. Zobel S, Kumpfmüller J, Süßmuth RD, Schweder T (2015) *Bacillus subtilis* as heterologous host for the secretory production of the non-ribosomal cyclodepsipeptide enniatin. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:681–691.
65. Schuller A, Cserjan-Puschmann M, Tauer C vd. (2020) *Escherichia coli* σ 70 promoters allow expression rate control at the cellular level in genome-integrated expression systems. *Microb Cell Factories* 19:58.
66. Kahraman R, Iplik ES, Cakmakoglu B (2019) Evaluation of TNF alpha G308A promoter gene polymorphism and serum TNF alpha levels in patients with inflammatory bowel disease in Turkish population. *Medicine Science* 2019;8(4):1006-10.
67. Hanson G, Collier J (2018) Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:20–30.
68. Fu H, Liang Y, Zhong X vd. (2020) Codon optimization with deep learning to enhance protein expression. *Sci Rep* 10:17617.

69. Alexaki A, Hettiarachchi GK, Athey JC, vd. (2019) Effects of codon optimization on coagulation factor IX translation and structure: Implications for protein and gene therapies. *Sci Rep.* 2019; 9: 15449.
70. Tian J, Yan Y, Yue Q vd. (2017) Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in *E. coli*. *Sci Rep* 7:9926.
71. Chung BKS, Lee DY (2012) Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst Biol* 6:134.
72. Taneda A, Asai K (2020) COSMO: a dynamic programming algorithm for multicriteria codon optimization. *Comput Struct Biotechnol J* 18:1811–1818.
73. de Alteriis E, Maselli V, Falanga A, vd. (2018). Efficiency of gold nanoparticles coated with the antimicrobial peptide indolicidin against biofilm formation and development of *Candida* spp. Clinical isolates. *Infection and Drug Resistance*, 11, 915-925.
72. Tall YA, AL-Nassar B, Abualhajjaa A, vd. (2023) The design and functional characterization of a novel hybrid antimicrobial peptide from Esculentin-1a and melittin. *Pharmacia* 70(1): 161-170.
73. Masdeh MM, Laila SA, Haddad R, vd. (2023) The Antimicrobial Effect Against Multi-drug Resistant Bacteria of the SK4 Peptide: A Novel Hybrid Peptide of Cecropin-A and BMAP-27. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 24 (8): 1070- 1078.
74. Wade HM, Darling LEO, Elmore DE (2019) Hybrids made from antimicrobial peptides with different mechanisms of action show enhanced membrane permeabilization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861:182980.
75. Yang Y, Wu D, Wang C vd. (2020) Hybridization with insect cecropin a (1–8) improve the stability and selectivity of naturally occurring peptides. *Int J Mol Sci* 21:1470.
76. Tian L, Zhang D, Su P vd. (2019) Design, recombinant expression, and antibacterial activity of a novel hybrid magainin–thanatin antimicrobial peptide. *Prep Biochem Biotechnol* 49:427–434.
77. Li Z, Cheng Q, Guo H vd. (2020) Expression of hybrid peptide EF-1 in *Pichia pastoris*, its purification, and antimicrobial characterization. *Molecules* 25:5538.
78. Agbale CM, Sarfo JK, Galyuon IK vd. (2019) Antimicrobial and antibiofilm activities of helical antimicrobial peptide sequences incorporating metal-binding motifs. *Biochemistry* 58:3802– 3812.
79. Elhamouly NA, Hewedy OA, Zaitoon A, vd. (2022) The hidden power of secondary metabolites in plant-fungi interactions and sustainable phytoremediation. *Front. Plant Sci.* 13:1044896.

80. Amit SK, Uddin M, Rahman R, vd. (2017) A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Amit vd.. Agric & Food Secur* 6:5.
81. Ferrazzano L, Catani M, Cavazzini A, vd. (2022) Sustainability in peptide chemistry: current synthesis and purification technologies and future challenges. *Green Chem.*, 2022, 24, 975-1020
82. Kumar S, Tissopi T, Mutturi S, vd. (2023). The successful synthesis of industrial isomaltooligosaccharides lies in the use of transglycosylating α -glucosidases: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 5, 100325.
83. Christmann J, Cao P, Becker J, vd. (2023) High-efficiency production of the antimicrobial peptide pediocin PA-1 in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* using a microaerobic process at acidic pH and elevated levels of bivalent calcium ions. *Microb Cell Fact.* 2023; 22: 41.
84. Malairuang K, Krajang M, Sukna J, vd. (2020) High Cell Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a Novel Technique of Fed-Batch at Cell Level (FBC). *Processes* 2020, 8, 1321.
85. D'Anjou MC, Daugulis AJ (2000) Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnol Lett* 22:341–346.
86. Liu H, Yang N, Mao R vd. (2020) A new high-yielding antimicrobial peptide NZX and its antibacterial activity against *Staphylococcus hyicus* in vitro/ vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:1555–1568.
87. Corrales-García LL, Serrano-Carreón L, Corzo G (2020) Improving the heterologous expression of human β -defensin 2 (HBD2) using an experimental design. *Protein Expr Purif* 167:105539.
88. Christmann J, Gao P, Becker J, vd. (2023) High-efficiency production of the antimicrobial peptide pediocin PA-1 in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* using a microaerobic process at acidic pH and elevated levels of bivalent calcium ions. Christmann vd.. *Microbial Cell Factories* 22:41
89. Sun M, Gao AX, Liu X, vd. (2023) High-throughput process development from gene cloning to protein production. *Microbial Cell Factories* 22:182.
90. Khanal O, Lenhoff AM (2021) Developments and opportunities in continuous biopharmaceutical manufacturing. *MAbs* 13:1903664.
91. Rathore AS, Agarwal H, Sharma AK vd. (2015) Continuous processing for production of biopharmaceuticals. *Prep Biochem Biotechnol* 45:836–849.

92. Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, vd. (2021) Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. Madhavan vd.. *Microb Cell Fact* 20:124.
93. Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz, M E (2020) Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 587997.
94. Agyei D, Ahmed I, Akram Z vd. (2017) Protein and peptide biopharmaceuticals: an overview. *Protein Pept Lett* 24:94–101.
95. Pieracci JP, Armando JW, Westoby M, Thommes J (2018) Industry review of cell separation and product harvesting methods. In: *Biopharmaceutical processing*. Elsevier, Amsterdam, pp 165–206.
96. Jozala AF, Geraldes DC, Tundisi LL vd. (2016) Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Braz J Microbiol* 47:51–63.
97. Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB vd. (2013) Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol* 44:1043–1048.
98. Ehgartner D, Sagmeister P, Langemann T vd. (2017) A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage Φ X174-derived lysis protein E. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:5603–5614.
99. Murugaiyan J, Kumar PA, Rao Gs, vd. (2022). Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* 2022, 11, 200.
100. Pinilla RR, Lisowski L, Aris A, vd. (2022) The future of recombinant host defense peptides. Roca-Pinilla vd.. *Microbial Cell Factories* 21:267.
101. Silva TC, Eppink M, Ottens M (2021) Automation and miniaturization: enabling tools for fast, high-throughput process development in integrated continuous biomanufacturing. *J Chem Technol Biotechnol* jctb6792.
102. Lyu W, Deng Z, Sunkara LT, vd. (2018) High Throughput Screening for Natural Host Defense Peptide-Inducing Compounds as Novel Alternatives to Antibiotics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:191.
103. Al-wdan OA, Sharallah OA, Abdelwahab NA, vd. (2023) Insights into microfabrication and implementation of microfluidics in pharmaceutical drug delivery and analysis. *OpenNano* 12 (2023) 100156.
104. Shukla AA, Rameez S, Wolfe LS, Oien N (2017) High-throughput process development for biopharmaceuticals. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Nature, Berlin, pp 401–441.
105. Bhambure R, Kumar K, Rathore AS (2011) High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances. *Trends Biotechnol* 29:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.001>.

106. São Pedro MN, Silva TC, Patil R, Ottens M (2021) White paper on high-throughput process development for integrated continuous biomanufacturing. *Biotechnol Bioeng* 118:3275–3286.
107. Judzewitsch PR, Corrigan N, Trujillo F, vd. (2020) High-throughput process for the discovery of antimicrobial polymers and their upscaled production via flow polymerization. *Macromolecules* 53:631–639.
108. Dauer K, Pfeiffer-Marek S, Kamm W, Wagner KG (2021) Microwell plate-based dynamic light scattering as a high-throughput characterization tool in biopharmaceutical development. *Pharmaceutics* 13:172.
109. Kasemiire A, Avohou HT, De Bleye C vd. (2021) Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization. *Eur J Pharm Biopharm* 166:144–154.
110. Luong, HX, Ngan, HD, Thi Phuong, HB, Quoc, TN ve Tung, TT (2022) Multiple roles of ribosomal antimicrobial peptides in tackling global antimicrobial resistance. *R. Soc. Open Sci.* 9: 211583.
111. Fatsis-Kavalopoulos N, Roelofs L, Andersson DI (2022). Potential risks of treating bacterial infections with a combination of β -lactam and aminoglycoside antibiotics: A systematic quantification of antibiotic interactions in *E. coli* blood stream infection isolates. *EBioMedicine* 78, 103979.
112. Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM vd. (2018) Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 144:12–18.
113. Zhang K, Su L, Duan X vd. (2017) High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microb Cell Factories* 16:32.
114. Makowski M., Silva Í C, Amaral C, vd. (2019) Advances in Lipid and Metal Nanoparticles for Antimicrobial Peptide Delivery. *Pharmaceutics*, 11(11): 11.
115. Han W, Camesano TA (2023) LL37-Derived Fragments Improve the Antibacterial Potential of Penicillin G and Ampicillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2023, 12(9), 1398.
116. Feng T, Wu H, Ma W, vd. (2022). An injectable thermosensitive hydrogel with a self-assembled peptide coupled with an antimicrobial peptide for enhanced wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(32), 6143-6157.
117. Wei S, Xu P, Yao Z, vd. (2021). A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes. *Acta Biomaterialia*, 124, 205-218.
118. Hemmingsen L M, Giordani B, Paulsen M H, vd. (2023). Tailored anti-biofilm activity – Liposomal delivery for mimic of small antimicrobial peptide. *Biomaterials Advances*, 145, 213238.

119. Javia A, Misra A, Thakkar H (2022). Liposomes encapsulating novel antimicrobial peptide Omiganan: Characterization and its pharmacodynamic evaluation in atopic dermatitis and psoriasis mice model. *International Journal of Pharmaceutics*, 624, 122045.