

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	10202000006511
Data Deposito	27/03/2020
Data Pubblicazione	27/09/2021

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	N	25	34

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	N	37	46

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	7	06

Titolo

Peptidi antimicrobici

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo: "Peptidi antimicrobici"

Di: Materias s.r.l., nazionalità italiana, corso N. Protopisani, 50, c/o
Campus San Giovanni a Teduccio, 80146 Napoli

Inventori designati: PALMIERI, Gianna; BALESTRIERI, Marco;
NICOLAIS, Luigi

Depositata il: 27 marzo 2020

* * *

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è relativa a peptidi ad attività battericida ed al loro utilizzo come agenti antimicrobici.

STATO DELLA TECNICA

Il trattamento delle infezioni batteriche con antibiotici è uno dei pilastri della medicina umana. Purtroppo, l'efficacia degli antibiotici è diventata limitata a causa di un aumento della resistenza batterica e di un diminuito successo nella ricerca di nuovi antibiotici. Oggi, le malattie infettive sono la seconda principale causa di morte in tutto il mondo e la più grande causa di decessi prematuri e perdita di produttività nel lavoro nei paesi industrializzati.

Una grande limitazione allo sviluppo di antibiotici consiste nella difficoltà di trovare nuovi composti aventi proprietà equivalenti agli antibiotici convenzionali, vale a dire bassa tossicità per l'ospite e ampio spettro di azione contro i patogeni batterici.

Un gruppo promettente di composti sono i peptidi antimicrobici, un gruppo di molecole attive nella risposta immunitaria innata che costituisce la prima linea di difesa contro i patogeni (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Innate immunity, in *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002). Tali molecole sono definite anche AMP (“*antimicrobial peptides*”) e sono prodotte in molti tessuti e tipi di cellule di organismi quali piante, insetti, anfibi e dagli organismi superiori. La loro composizione amminoacidica e le loro caratteristiche chimico-fisiche correlate alla struttura consentono loro di interagire in maniera selettiva con il doppio strato lipidico della membrana batterica causando la morte dei microrganismi. I peptidi antimicrobici sembrano avere un alto potenziale d’attività su molti ceppi batterici patogeni per l’uomo, sia Gram negativi che Gram positivi; inoltre tali peptidi, al contrario dei farmaci attualmente in uso, non selezionano facilmente i mutanti e non inducono fenomeni di antibiotico-resistenza; infine mostrano un effetto sinergico con antibiotici convenzionali e spesso possono attivare la risposta immunitaria innata dell’ospite senza mostrare immunogenicità.

Negli ultimi anni sono stati identificati numerosi peptidi antimicrobici attraverso diverse tecniche che vanno dall’analisi *in silico* allo screening di librerie peptidiche.

In particolare, la domanda di brevetto WO2015038339 descrive la struttura di 753 peptidi che vengono indicati come aventi una attività antibiofilm e/o attività immunomodulatoria. In tale contesto, viene

descritto anche il peptide avente 12 amminoacidi (aa) denominato IDR-1018-K6 o 2001, avente sequenza VRLIVKVRIWRR. Alcune dei peptidi ivi descritti vengono testati per la loro capacità di inibire biofilm formati rispettivamente da *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica ssp. Typhimurium*, *Burkholderia cenocepacia*.

La domanda di brevetto WO2019012158 descrive l'uso di alcuni peptidi antimicrobici, tra i quali IDR-1018-K6, come agenti batterici per la prevenzione e/o il trattamento della contaminazione di un prodotto o una superficie ad opera di uno specifico batterio, *Listeria monocytogenes*; tale documento descrive inoltre l'uso di tali peptidi nel trattamento delle infezioni provocate in un soggetto da *Listeria monocytogenes*.

Ad oggi, gli studi effettuati e la mole di dati disponibili in numerose banche dati (Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education, *Nucleic Acids Research* 44, D1087-D1093) mostrano che i peptidi antimicrobici possono presentare strutture diverse ed hanno come target una varietà di microorganismi. Inoltre in molti casi i peptidi tendono ad assumere la struttura cui è associata l'attività solo dopo il contatto con le membrane cellulari. In base alla presenza o assenza di due elementi chiave della struttura secondaria (α -elica e β -foglietto), gli AMP sono comunemente divisi in quattro classi principali: (i) peptidi con struttura α -elicoidale lineare, che rappresentano il gruppo più

ampio e meglio studiato; (ii) peptidi con strutture estese lineari (prive di elementi α -elica o β -foglietto); (iii) peptidi contenenti β -foglietti e (iv) peptidi contenenti elementi α -elica e β -foglietto. Centinaia di sequenze diverse sono state identificate da fonti naturali e sono stati prodotti una moltitudine di analoghi e derivati sintetici, le cui dimensioni e diversità sono in continua espansione (Johannes Koehbach and David J. Craik. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides, Trends in Pharmacological Sciences, July 2019, Vol. 40, No. 7). Appare quindi evidente che, ad oggi, non esiste una chiara relazione struttura/funzione per questa categoria di molecole antimicrobiche e che pertanto è estremamente difficile prevederne l'attività.

La maggior parte degli AMP noti possiede dimensioni contenute, generalmente comprese fra 12 e 50 residui amminoacidi. Quelli di maggiore lunghezza, come la Nisina (34 aa) o LL37 (37 aa), sono almeno in parte strutturati, grazie anche alla catena amminoacidica più lunga. Al contrario, quelli di lunghezza inferiore hanno percentualmente una minore probabilità di strutturarsi ed è quindi altrettanto difficile prevederne l'attività (Ralf Mikut, Serge Ruden, Markus Reischl, Frank Breitling, Rudolf Volkmer, Kai Hilpert. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity Biochimica et Biophysica Acta 1858 (2016) 1024–1033).

Sebbene l'azione antibatterica della Nisina sia nota da decenni, il suo meccanismo di azione richiede ancora ulteriori indagini. Ciò può essere dovuto al fatto che la Nisina esplica la sua azione attraverso

diversi meccanismi a seconda delle proprietà strutturali delle membrane dei batteri bersaglio. La Nisina è di per sé attiva solo contro i batteri Gram positivi, tuttavia la sua combinazione con trattamenti destabilizzanti della membrana cellulare la rende attiva anche contro batteri Gram negativi (Sukrita Punyaappa-path, Parichat Phumkhachorn, Pongsak Rattanachaikunsopon NISIN: PRODUCTION AND MECHANISM OF ANTIMICROBIAL ACTION, Int J Cur Res Rev | Vol 7 • Issue 2 • January 2015). Diversi studi mostrano che alcuni *motifs* strutturali della Nisina sono essenziali per la formazione del “poro” nelle membrane batteriche, mentre altre porzioni del peptide contribuiscono all’azione battericida inibendo la sintesi della parete cellulare. Ciò dimostra che la Nisina possiede almeno due diversi meccanismi di azione nei confronti dei batteri (H Brotz and HG Sahl New insights into the mechanism of action of lantibiotics – diverse biological effects by binding to the same molecular target, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46 1-6).

Anche LL-37 modula il suo meccanismo d’azione in base alla struttura dei diversi lipidi che formano la membrana cellulare: induce la formazione di pori nei doppi strati di fosfolipidi insaturi e interferisce con le funzioni di membrana in presenza di fosfolipidi saturi, producendo sovrastrutture fibrose peptidiche-lipidiche ricche di strutture ad α -elica. (Mahdi Shahmiri, Marta Enciso, Christopher G. Adda, Brian J. Smith, Matthew A. Perugini & Adam Mechler Membrane Core-Specific Antimicrobial Action of Cathelicidin LL-37 Peptide

Switches Between Pore and Nanofibre Formation, Scientific Reports volume 6, Article number: 38184 (2016).

Appare chiaro quindi che peptidi di dimensioni maggiori possano tendenzialmente presentare una maggiore variabilità e complessità di *folding*, in altre parole che essi hanno maggiore possibilità di assumere svariate strutture secondarie anche in porzioni diverse della catena amminoacidica. Pertanto, è estremamente difficile comprendere e controllare i meccanismi con cui un peptide con una sequenza amminoacidica più lunga sia in grado di esplicare la propria attività biologica, dal momento che le variabili che possono influenzarla e/o inficiarla sono più numerose. Inoltre, in caso di utilizzo di un peptide per la funzionalizzazione di una superficie polimerica attraverso un legame covalente, una sequenza amminoacidica più lunga aumenterebbe statisticamente i siti con cui il peptide può essere legato al materiale di interesse (PET; PVC; PL; ecc..) rendendo imprevedibili le conformazioni che la molecola può assumere dopo il legame (o i legami in più punti della sequenza) e di conseguenza anche le possibilità di conservare l'attività antimicrobica. D'altra parte, molecole di dimensioni ridotte si prestano meglio ad essere progettate e/o modificate mirando a conservare o ad amplificare una specifica attività. In aggiunta, le dimensioni ridotte di un peptide antimicrobico abbattano notevolmente i costi di sintesi e purificazione.

Per anni, l'obiettivo principale della ricerca scientifica è stato quello di valutare l'efficacia e il potenziale terapeutico degli AMP

contro le infezioni batteriche. Recentemente tuttavia, alcuni studi hanno evidenziato come gli AMP, ad esempio quelli appartenenti alla famiglia delle catelicidine e defensine, possano essere degli strumenti terapeutici particolarmente promettenti anche contro patogeni virali infettivi emergenti per i quali attualmente non esistono vaccini o trattamenti approvati [Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections, *Viruses* 2019, 11, 704].

Alla luce di quanto riportato, appare evidente che è sentita l'esigenza di identificare nuovi peptidi antimicrobici, aventi capacità battericida su un ampio spettro di microrganismi, ivi inclusi batteri Gram negativi e Gram positivi, funghi e lieviti, e aventi eventualmente anche azione antivirale. Un'ulteriore esigenza è che i suddetti peptidi antimicrobici presentino una catena amminoacidica di lunghezza contenuta, possibilmente inferiore rispetto a quella dei peptidi antimicrobici attualmente noti.

SINTESI DELL'INVENZIONE

Tale esigenza è stata ora soddisfatta dalla presente invenzione, che mette a disposizione una nuova serie di peptidi antimicrobici aventi caratteristiche di basicità, carica netta ed idrofobicità analoghe a quelle dei peptidi antimicrobici finora conosciuti ma una sequenza amminoacidica più corta. I peptidi antimicrobici della presente invenzione sono caratterizzati da una specifica sequenza che li distingue da altri peptidi antimicrobici noti, e da un ampio spettro di attività battericida, nonché da una efficiente attività antimicrobica

contro funghi e lieviti. È inoltre plausibile che i peptidi antimicrobici della presente invenzione presentino altresì un'attività antivirale, in quanto molecole appartenenti alle categorie di peptidi cationici, alla quale appartengono i peptidi dell'invenzione, hanno dimostrato proprietà antivirali, in particolare nei confronti di virus dotati di pericapside, sia a DNA sia a RNA. L'attività antivirale appare spesso correlata all'inibizione dei processi di adsorbimento e di ingresso dei virus nelle cellule, oppure è il risultato di un effetto diretto sul pericapside virale, mentre alcuni peptidi che vengono internalizzati possono influenzare i meccanismi antivirali cellulari e bloccare l'espressione di geni virali.

I peptidi antimicrobici della presente invenzione consistono nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D.

Nell'ambito dell'invenzione rientrano altresì i sali e i solvati dei suddetti peptidi.

Nell'esempio 1 della parte sperimentale che segue è riportata la sintesi del peptide denominato RiLK1, rientrante nella formula generale di cui sopra, che è rappresentativo della nuova serie di peptidi AMP che forma oggetto dell'invenzione.

Nell'esempio 2 è stata valutata la massima solubilità del peptide RiLK1 con tutti gli amminoacidi in configurazione D o in configurazione L in tre diversi solventi, ossia acqua ultrapura, DMSO e *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS), verificando che il peptide, sia in configurazione L che in configurazione D, si dissolve completamente fino ad una concentrazione ≤ 10 mg/mL nelle tre condizioni prese in esame.

Nell'esempio 3, il peptide RiLK1 è stato sciolto in acqua (Figura 1) o in una soluzione tampone di sodio acetato pH 4 (Figura 2) in presenza o assenza di SDS. Le diverse soluzioni sono state analizzate mediante spettroscopia di Dicroismo Circolare (CD). L'aggiunta di SDS in soluzione è una condizione che simula la presenza di membrane batteriche. Tale analisi mostra che il peptide è destrutturato (linea nera continua) ma che in presenza di SDS (linea nera tratteggiata) esso si struttura assumendo una conformazione mista di tipo α -elica/ β -foglietto, in cui il contributo dell'uno o dell'altro elemento di struttura secondaria varia in funzione delle diverse condizioni ambientali (in questo caso il pH).

Una ulteriore analisi strutturale del peptide RiLK1 è stata effettuata mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), una tecnica particolarmente efficace per la caratterizzazione strutturale di molecole organiche, che ha permesso di disegnare modelli tridimensionali del peptide RiLK1 della presente invenzione, tali risultati confermano che il peptide tende a strutturarsi solo in presenza di una soluzione micellare di SDS (Figura 3).

Nell'esempio 4, la cinetica dei riarrangiamenti strutturali del peptide, monitorata nel corso delle 24 ore utilizzando spettroscopia di dicroismo circolare (CD), mostra che la conformazione mista α -elica/ β -foglietto viene mantenuta e che l'elemento di struttura secondaria β -foglietto è predominante rispetto a quello α -elica (Figura 4-5).

Negli esempi da 5 a 8 viene illustrato che il peptide RiLK1 della presente invenzione è stabile a diverse temperature, a diversi valori di pH, ed in possibili condizioni di uso come per esempio ad elevata concentrazione salina (Figure 6-7-8-9). Pertanto è molto interessante notare che il peptide in accordo all'invenzione, caratterizzato dalla presenza di solo 10 aa, possiede elevata attività battericida. Come mostrato nell'esempio 9, il nuovo peptide rappresentativo dell'invenzione, denominato RiLK1, presenta infatti una potente attività battericida sia nei confronti di batteri Gram positivi, quali *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sia nei confronti di batteri Gram negativi, quali *S. Typhimurium* ed *E. coli* (Figure 10-11).

Nell'esempio 10 si evidenzia che il peptide RiLK1 oggetto dell'invenzione non risulta citotossico nei confronti di un pannello di linee cellulari umane (Figura 12) e nell'esempio 11 si dimostra che esso possiede una efficiente attività antimicrobica contro funghi e lieviti, quali *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans* (Figura 13.)

Infine nell'esempio 12 il peptide RiLK1 è stato legato covalentemente ad una superficie polimerica con elevate rese di reazione (Figura 14) ed è stato dimostrato che il polimero così

funzionalizzato mostra una elevata stabilità in termini di rilascio del peptide ed un'attività preservante mirata all'aumento della conservabilità alimentare, riducendo significativamente la proliferazione di batteri mesofili e lieviti in un prodotto lattiero caseario con cui è messo a contatto.

Nell'ambito dell'invenzione rientra altresì un peptide antimicrobico come definito dalla formula generale di cui sopra, per l'uso come medicamento.

Un'applicazione terapeutica specifica dei peptidi antimicrobici dell'invenzione riguarda il trattamento terapeutico di una infezione provocata da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, funghi, lieviti e/o virus.

Rientra altresì nell'ambito dell'invenzione una formulazione farmaceutica comprendente un peptide antimicrobico come definito dalla formula generale di cui sopra e almeno un eccipiente e/o un veicolo farmaceuticamente accettabile.

L'attenzione del consumatore riguardo ai possibili effetti sulla propria salute legati alla qualità degli alimenti sta avendo un grande impatto sulle industrie di trasformazione e conservazione alimentare. Rispetto al passato, oggi il consumatore è sempre più consapevole ed attento alla quantità e alla qualità dei conservanti chimici presenti nel cibo ed all'efficacia sia dei metodi convenzionali che delle tecnologie innovative di conservazione per estendere la durata e migliorare la sicurezza di un'ampia gamma di prodotti alimentari pur preservandone

il gusto/aroma. Diversi sono i microorganismi riconosciuti oggi quali responsabili di infezioni alimentari connesse al consumo di alimenti; tra questi vi sono certamente la *Listeria monocytogenes*, un batterio Gram-positivo, agente patogeno della Listeriosi, e la *Salmonella typhimurium*, un batterio Gram-negativo, agente patogeno della salmonellosi. Tali microorganismi possono svilupparsi in un'ampia varietà di cibi, usualmente crudi, ad esempio carni non ben cotte, verdure crude, prodotti ittici, formaggi preparati con latte non pastorizzato, o in prodotti alimentari pronti all'uso che vengono lavorati industrialmente e richiedono conservazione a basse temperature. La listeriosi di origine alimentare è una malattia piuttosto rara ma grave, con un tasso di mortalità (20-30%) paragonabile o superiore a quello di altre malattie alimentari, quali ad esempio la salmonellosi.

Pertanto, la presente invenzione include anche l'uso di un peptide antimicrobico come definito dalla formula generale di cui sopra, come agente antimicrobico per la prevenzione della contaminazione e/o per la decontaminazione di un articolo (ad esempio un alimento, un materiale, un contenitore o un utensile) da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, funghi, lieviti e/o virus.

Una composizione antimicrobica comprendente un peptide antimicrobico come definito dalla formula generale di cui sopra ed almeno un veicolo è altresì inclusa nell'ambito dell'invenzione.

Infine, l'invenzione riguarda inoltre un articolo, come ad esempio alimento, un materiale, un contenitore o un utensile, recante

un peptide antimicrobico legato covalentemente su una propria superficie, oppure recante un peptide antimicrobico contenuto in un rivestimento adeso a detta una superficie, in cui detto peptide antimicrobico è come definito dalla formula generale di cui sopra.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1 e la Figura 2 mostrano gli spettri di Dicroismo Circolare (CD) del peptide RiLK1 ottenuti, rispettivamente, in acqua e tampone di sodio acetato a pH 4, in assenza (linea nera continua) o in presenza (linea nera tratteggiata) di 3mM SDS, come descritto nell'Esempio 2. Sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di ellitticità media molare per residuo $\times 10^{-3}$, espressa in gradi $\text{cm}^2/\text{dmol}^{-1}$.

La Figura 3a e la Figura 3b mostrano le strutture del peptide RiLK1 ottenute mediante ^1H NMR rispettivamente in H_2O e in soluzione micellare di SDS 150mM. In Figura 3a si evidenzia una struttura disordinata compatibile con una conformazione del peptide strutturalmente non definita e casuale (random coil) (A, B). In Figura 3b si evidenzia come la presenza di SDS induca una iso-orientazione delle catene laterali con la formazione di una struttura α -elica centrale (A, B). R1 e R10 rappresentano rispettivamente l'amminoacido iniziale e finale del peptide RiLK1.

La Figura 4 e la Figura 5 mostrano rispettivamente gli spettri di Dicroismo Circolare (CD) e di fluorescenza del peptide RiLK1 ottenuto in assenza (linea 1) o in presenza (linee 2-8) di 3mM SDS monitorando

il campione per 24 ore (linea 2 al tempo=0; linea 3 al tempo=5min; linea 4 al tempo=30min; linea 5 al tempo=1 ora; linea 6 al tempo=2 ore; linea 7 al tempo =5 ore; linea 8 al tempo=24 ore) per evidenziare la cinetica dei riarrangiamenti strutturali come descritto nell'esempio 3. Nella Figura 4, sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di ellitticità media molare per residuo $\times 10^{-3}$, espressa in gradi $\text{cm}^2/\text{dmol}^{-1}$. Nella Figura 5, sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di intensità di Fluorescenza.

La Figura 6 mostra lo spettro di Dicroismo Circolare (CD) del peptide RiLK1 ottenuto in Tris HCL a pH 7 e in presenza di 3mM SDS monitorando il campione per 24 ore (linea 1 al tempo=0; linea 2 a 4°C e tempo=24 ore; linea 3 a 25°C e tempo=24 ore), come descritto nell'esempio 4. Sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di ellitticità media molare per residuo $\times 10^{-3}$, espressa in gradi $\text{cm}^2/\text{dmol}^{-1}$.

La Figura 7 mostra gli spettri di Dicroismo Circolare (CD) del peptide RiLK1 ottenuto monitorando il campione per 24 ore (linea nera continua al tempo=0; linea nera tratteggiata al tempo=24 ore) in soluzioni a differenti pH, rispettivamente a pH 2 (A), pH 4 (B), pH 7 (C) e pH 9 (D), come descritto nell'esempio 5. Sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di ellitticità media molare per residuo $\times 10^{-3}$, espressa in gradi $\text{cm}^2/\text{dmol}^{-1}$.

La Figura 8 mostra gli spettri di fluorescenza del peptide RiLK1 registrati in presenza di una soluzione micellare di SDS (150 mM) monitorando il campione fino a 24 ore in soluzioni a differenti pH, rispettivamente a pH 2 (A) e pH 9 (B) e a diverse temperature di incubazione, rispettivamente 4 °C e 25 °C, per evidenziarne la stabilità, come descritto nell'esempio 6. Nella Figura, sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda (nm), sull'asse delle ordinate è riportato il valore di intensità di Fluorescenza.

La Figura 9 mostra la sovrapposizione dei cromatogrammi ottenuti mediante cromatografia RP-HPLC eseguita su campioni del peptide RiLK1 incubati in presenza di una elevata concentrazione salina (1 M NaCl) monitorati per 9 giorni (linea 1-8 tempi 0; 5h; 24h; 29h; 48h; 53h; 6gg; 9gg) come descritto nell'esempio 7.

La Figura 10 mostra le curve dose-risposta ottenute con il peptide RiLK1 nei confronti di *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B), *S. Typhimurium* (C) ed *E. coli* (D); sull'asse delle ascisse sono riportate le concentrazioni di peptide (μM), sull'asse delle ordinate è riportata la % di cellule che sopravvivono, come descritto nell'esempio 8a.

Le Figure 11a, 11b, 11c e 11d mostrano per ogni batterio testato, rispettivamente *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ed *E. coli*, le immagini fotografiche di una piastra di controllo incubata con il batterio senza aggiunta di peptide RiLK1 (1), di una piastra incubata con il batterio e trattata con una concentrazione di peptide RiLK1 inferiore alla sua MBC (2), di una piastra incubata

con il batterio e trattata con una concentrazione di peptide RiLK1 corrispondente alla sua MBC (3), come descritto nell'esempio 8b.

In Figura 12, le colonne A, B e C mostrano rispettivamente le immagini fotografiche di una piastra di controllo con cellule HaCat, WI38 e TIG3-20 incubate per 24 ore in assenza di peptide (Ctrl), e in presenza di una concentrazione di peptide RiLK1 pari a 1 μ M (RiLK_1), 2,5 μ M (RiLK_2,5), 5 μ M (RiLK_5) e 10 μ M (RiLK_10).

La Figura 13a mostra le immagini fotografiche acquisite dopo 7 giorni di crescita di una piastra controllo incubata con il fungo *Aspergillus brasiliensis* in assenza del peptide RiLK1 (1) e di una piastra incubata con il fungo trattato per 6 h con il peptide RiLK1 ad una concentrazione pari a 25 μ M corrispondente alla sua *minimal fungicidal concentration* MFC (2), come descritto nell'esempio 10.

La Figura 13b mostra le immagini fotografiche acquisite dopo 7 giorni di una piastra controllo incubata con il lievito *Candida albicans* in assenza del peptide RiLK1 (1), di una piastra incubata con il fungo trattato per 6h con il peptide RiLK1 ad una concentrazione pari a 25 μ M corrispondente alla sua MFC (2), come descritto nell'esempio 10.

La Figura 14 mostra i profili cromatografici ottenuti mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) a seguito della procedura di funzionalizzazione per 24 ore di dischetti di polipropilene (PP) pre-attivati al corona con il peptide RiLK1 ad una concentrazione di 50 μ M. La resa di immobilizzazione è stata calcolata

effettuando il rapporto tra le aree del picco relativo al peptide al tempo $t=24h$ ed al tempo $t=0$.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Un primo oggetto della presente invenzione è un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D, o un sale o un solvato dello stesso.

Va notato che tutte le sequenze di aminoacidi sono rappresentate nella presente descrizione mediante formule il cui orientamento da sinistra a destra è nella direzione convenzionale, ossia dall'ammino-terminale al carbossi-terminale.

Secondo una forma di realizzazione preferita, gli aminoacidi nella formula generale di cui sopra sono tutti in configurazione D o in configurazione L.

Secondo un'altra forma di realizzazione preferita, nella formula generale di cui sopra almeno uno fra X_1 , X_3 , X_4 e X_5 ha il significato di R; più preferibilmente, X_4 ed X_5 hanno il significato di R; ancor più preferibilmente, X_3 , X_4 ed X_5 hanno il significato di R; ancor più preferibilmente, X_1 , X_3 , X_4 ed X_5 hanno il significato di R.

In un'altra forma di realizzazione preferita, X_2 ha il significato di K.

In un'altra forma di realizzazione preferita, almeno uno fra X₁, X₃, X₄ e X₅ ha il significato di R e X₂ ha il significato di K; più preferibilmente, X₄ e X₅ hanno il significato di R e X₂ ha il significato di K; ancor più preferibilmente, X₃, X₄ ed X₅ hanno il significato di R e X₂ ha il significato di K; ancor più preferibilmente, X₁, X₃, X₄ ed X₅ hanno il significato di R e X₂ ha il significato di K.

Le seguenti sequenze aminoacidiche sono particolarmente preferite:

RLX ₂ WVRIWX ₄ X ₅ ,	RLX ₂ WVRIWRX ₅ ,	RLX ₂ WVRIWX ₄ K,
RLKX ₂ WVRIWKK,	X ₁ LKWVX ₃ IWRR,	X ₁ LKWVRIWRR,
RLKWVX ₃ IWRR,	X ₁ LRWVX ₃ IWKK,	X ₁ LRWVKIWKK,
KLRWVX ₃ IWKK,		

in cui X₁, X₂, X₃, X₄ e X₅ sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D.

Le seguenti sequenze aminoacidiche specifiche sono ulteriormente preferite:

RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 1), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 2),
RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 3), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 4),
RLKWVKIWRR (SEQ ID NO: 5), KLRWVKIWRR (SEQ ID NO: 6),
RLRWVKIWRR (SEQ ID NO: 7), KLRWVKIWRR (SEQ ID NO: 8),
RLKWVRIWKR (SEQ ID NO: 9), KLRWVRIWKR (SEQ ID NO: 10),
RLRWVRIWKR (SEQ ID NO: 11), KLRWVRIWKR (SEQ ID NO: 12),
RLKWVKIWKR (SEQ ID NO: 13), KLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 14),

RLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 15), KLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 16),
RLKWVRIWRK (SEQ ID NO: 17), KLRWVRIWRK (SEQ ID NO: 18),
RLRWVRIWRK (SEQ ID NO: 19), KLRWVRIWRK (SEQ ID NO: 20),
RLKWVKIWKR (SEQ ID NO: 21), KLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 22),
RLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 23), KLRWVKIWKR (SEQ ID NO: 24),
RLKWVRIWKK (SEQ ID NO: 25), KLRWVRIWKK (SEQ ID NO: 26),
RLRWVRIWKK (SEQ ID NO: 27), KLRWVRIWKK (SEQ ID NO: 28),
RLKWVKIWKK (SEQ ID NO: 29), KLRWVKIWKK (SEQ ID NO: 30),
RLRWVKIWKK (SEQ ID NO: 31), KLRWVKIWKK (SEQ ID NO: 32),
in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D.

Nell'ambito della presente invenzione, con il termine "solvato" o "solvati" si intendono complessi dei peptidi dell'invenzione con i solventi in cui avviene la reazione di sintesi o in cui sono precipitati o cristallizzati. Ad esempio, un complesso con acqua è conosciuto come un "idrato".

Sali e solvati idonei alle finalità dell'invenzione sono quelli che non portano ad una modifica conformazionale o della stabilità dei peptidi secondo l'invenzione e, pertanto, non interferiscono con la loro attività biologica.

Sali preferiti in accordo all'invenzione sono sali farmaceuticamente accettabili che non portano ad una modifica conformazionale o della stabilità dei peptidi secondo l'invenzione. A titolo di esempi illustrativi e non limitativi, sali di addizione acida farmaceuticamente accettabili comprendono quelli formati con acidi

cloridrico, bromidrico, acetico, fosforico, lattico, piruvico, acetico, trifluoroacetico, succinico, perclorico, fumarico, maleico, glicolico, lattico, salicilico, ossalacetico, metanesolfonico, etansolfonico, p-toluensolfonico, formico, benzoico, malonico, naftalen-2-solfonico, benzensolfonico e acidi isetionico. Altri acidi, come quello ossalico, pur non essendo di per sé farmaceuticamente accettabili, possono essere utili come intermedi per ottenere i peptidi dell'invenzione e i loro sali farmaceuticamente accettabili. Sali di basi, ritenuti accettabili comprendono i sali di ammonio, sali di metalli alcalino, ad esempio sali di potassio e sodio, sali di metalli alcalino terrosi, ad esempio sali di calcio e magnesio e sali con basi organiche, ad esempio dicicloesilammina e N-metil-D-glucosamina.

Un secondo oggetto della presente invenzione è un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D, o un sale o un solvato dello stesso, per l'uso come medicamento.

Un terzo oggetto della presente invenzione è un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D,

o un sale o un solvato dello stesso,

per l'uso nel trattamento terapeutico di una infezione provocata da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, lieviti, funghi e/o virus.

Nell'ambito dell'invenzione, preferibilmente il batterio Gram negativo è scelto tra *Campylobacter*, come per esempio *Campylobacter coli*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter C. rectus*; *Arcobacter*, come per esempio *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*; *Citrobacter*, come per esempio *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter koseri*; *Enterobacter*, come per esempio *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter gergoviae*; *Escherichia*, come per esempio *Escherichia coli*; *Klebsiella*; *Morganella*, come per esempio *Morganella Morganii*; *Proteus*, come per esempio *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*; *Shigella* come per esempio *Shigella dysenteriae*; *Salmonella* come per esempio *Salmonella Typhi*, *Salmonella Typhimurium*; *Yersinia*, come per esempio *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*; *Serratia marcescens*; *Aerobacter aerogenes*; *Enterobacter sakazakii*; *Acinetobacter*, come

per esempio *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter beijerinckii*, *Acinetobacter bereziniae*, *Acinetobacter boissieri*; *Moraxella*, come per esempio *Moraxella catarrhalis* (sinonimo *Branhamella catarrhalis*); *Neisseria*, come per esempio *Neisseria meningitidis*; *Haemophilus*, come per esempio *Haemophilus influenzae*; *Pasteurella*, come per esempio *Pasteurella multocida*; *Pseudomonas*, come per esempio *Pseudomonas aeruginosa*; *Vibrio*, come per esempio *Vibrio cholerae*, *Vibrio fischeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Più preferibilmente, il batterio Gram negativo è scelto tra *Salmonella Typhimurium* ed *Escherichia coli*.

Nell'ambito dell'invenzione, preferibilmente il batterio Gram positivo è scelto tra: *Actinobacteria*, come per esempio *Tropheryma whipplei*; *Bacillus*; *Carnobacterium*; *Clostridium*; *Corynebacterium diphtheria*; *Enterococcus*, come per esempio *Enterococcus faecalis*; *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Listeria*, come per esempio *Listeria monocytogenes*; *Micrococcus*; *Staphylococcus*, come per esempio *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus*, come per esempio *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*. Più preferibilmente, il batterio Gram positivo è scelto tra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Nell'ambito dell'invenzione, preferibilmente il fungo è *Aspergillus brasiliensis* e il lievito è *Candida albicans*.

Nell'ambito dell'invenzione, preferibilmente il virus è dotato di capsidi e di un ulteriore rivestimento chiamato pericapside e presenta un materiale genetico costituito da DNA o RNA. Preferibilmente il virus è un adenovirus, papilloma virus (HPV), virus erpetico, coronavirus, virus influenzale, citomegalovirus (CMV), virus HIV o virus Ebola.

Un quarto oggetto della presente invenzione è una formulazione farmaceutica comprendente un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D,

o un sale o un solvato dello stesso,

ed almeno un eccipiente e/o un veicolo farmaceuticamente accettabile.

Le formulazioni farmaceutiche secondo l'invenzione comprendono, a titolo esemplificativo, quelle adatte per uso orale, parenterale (compreso sottocutaneo, intradermico, intramuscolare, intravenoso e intra-articolare), o per inalazione (comprese polveri di particelle particolarmente piccole o nebbie che possono essere generati per mezzo di vari tipi di misuratori di aerosol pressurizzati, nebulizzatori o insufflatori). La via di somministrazione più idonea può comunque dipendere, ad esempio, dalla condizione del soggetto e

dalla patologia da trattare. La persona esperta del settore è in grado di identificare la via di somministrazione più adatta alle specifiche circostanze del caso.

Le formulazioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere convenientemente presentate in forma di dosaggio unitario e possono essere preparate con uno qualsiasi dei protocolli ben noti nella tecnica farmaceutica. Tutti i metodi prevedono la fase di associazione dell'ingrediente attivo (ossia il peptide) con un veicolo, che comprende uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. In generale le formulazioni farmaceutiche vengono preparate in modo uniforme associando l'ingrediente attivo con supporti liquidi o supporti solidi finemente divisi o entrambi e poi, se necessario, modellando il prodotto nella formulazione desiderata.

Le formulazioni farmaceutiche della presente invenzione adatte per somministrazione orale possono essere presentate in unità discrete, ad esempio come capsule, cachets o compresse, ciascuna contenente una quantità prestabilita dell'ingrediente attivo; come polvere o granuli; come soluzione o sospensione in un liquido acquoso o in un liquido non acquoso; o come emulsione liquida olio in acqua o emulsione liquida acqua in olio. L'ingrediente attivo può anche essere presentato come bolus, elettuario o pasta. Diversi eccipienti e veicoli farmaceuticamente accettabili sono descritti nei trattati standard di formulazione, ad esempio Remington's Pharmaceutical Sciences di E.

W. Martin. Vedi anche Wang, Y.J. e Hanson, M. A., Journal of Parenteral Science and Technology, rapporto tecnico n. 10, Supp.

Formulazioni per somministrazione per via orale comprendono ad esempio sospensioni che possono contenere, ad esempio, cellulosa microcristallina per impartire massa, acido alginico o alginato di sodio come agente sospensivo, metilcellulosa come viscosizzante e dolcificanti o agenti aromatizzanti come quelli già noti nel settore farmaceutico; compresse di rilascio immediato che possono contenere, ad esempio, cellulosa microcristallina, fosfato di calcio, amido, magnesio stearato e/o lattosio e/o altri eccipienti, leganti, estensori, disintegranti, diluenti e lubrificanti come quelli noti nelle tecniche farmaceutiche.

Le formulazioni per somministrazione parenterale comprendono ad esempio soluzioni per iniezione a base acquosa e non acquosa sterile che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici e soluti che rendono la formulazione isotonica; sospensioni sterili acquose e non acquose che possono includere tensioattivi e addensanti. Le formulazioni possono essere presentate in contenitori a dose unitaria o in contenitori multi-dose, ad esempio fiale e fiale sigillati e possono essere conservati in forma liofilizzata che richiede solo l'aggiunta del supporto liquido sterile, immediatamente prima dell'uso.

Formulazioni per somministrazione di aerosol nasale o inalazione comprendono ad esempio soluzioni saline che possono

contenere, ad esempio, alcool benzilico o altri conservanti appropriati, che promuovono l'assorbimento per migliorare la biodisponibilità e/o altri agenti solubilizzanti come quelli noti nella tecnica farmaceutica. In formulazioni per somministrazione di aerosol nasale o di inalazione, il peptide dell'invenzione viene somministrato sotto forma di aerosol da un contenitore pressurizzato o da un nebulizzatore, con l'impiego di un idoneo propellente, ad esempio diclorodifluoro metano, trichlorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, anidride carbonica o altro gas idoneo. Nel caso di un aerosol pressurizzato, l'unità di dosaggio può essere determinata fornendo una valvola per fornire una quantità misurata. Le formulazioni di dosaggio unitario preferite sono quelle contenenti una dose efficace, come precedentemente descritto, o una frazione appropriata, dell'ingrediente attivo.

È necessario sottolineare che, oltre agli ingredienti specificamente sopra menzionati, le formulazioni della presente invenzione possono includere altri agenti convenzionali in uso nelle tecniche farmaceutiche tenendo conto del tipo di formulazione in questione; per esempio, quelli idonei per somministrazione orale possono includere agenti aromatizzanti.

I peptidi antimicrobici dell'invenzione sono anche appropriatamente somministrati come sistemi a rilascio continuo e controllato. Esempi appropriati di sistemi a rilascio continuo utilizzabili con i peptidi dell'invenzione includono materiali polimerici idonei, come matrici polimeriche semi-permeabili ad esempio film o microcapsule;

specifici materiali idrofobici, come emulsioni in olii idonei o resine di scambio ionico; e derivati dei peptidi dell'invenzione, come per esempio, un sale o solvato.

Un quinto oggetto della presente invenzione è una composizione antimicrobica comprendente un veicolo ed un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D, o un sale o un solvato dello stesso.

Secondo una forma di realizzazione dell'invenzione, la composizione antimicrobica comprende almeno un ulteriore peptide antimicrobico secondo l'invenzione e/o almeno un ulteriore agente antimicrobico.

Un sesto oggetto della presente invenzione è l'uso di un peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D, o un sale o un solvato dello stesso,

come agente antimicrobico per la prevenzione della contaminazione e/o la decontaminazione di un articolo (ad esempio un alimento, un materiale, un contenitore o un utensile) da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, funghi, lieviti e/o virus.

Un settimo oggetto dell'invenzione è un articolo recante un peptide antimicrobico legato covalentemente su una propria superficie, oppure recante un peptide antimicrobico contenuto in un rivestimento adeso a detta una superficie, in cui detto peptide antimicrobico consiste nella sequenza amminoacidica rappresentata dalla seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R, ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione L o D, o un sale o un solvato dello stesso.

Nel caso in cui il peptide sia legato covalentemente alla superficie dell'articolo, il legame avviene con gruppi reattivi presenti sulla superficie stessa.

Preferibilmente, l'articolo è un contenitore, un utensile o un materiale per la conservazione o la lavorazione di prodotti alimentari, oppure è un alimento.

Secondo una forma di realizzazione preferita, il peptide antimicrobico è contenuto in un rivestimento applicato sulla superficie dell'articolo. In questo caso, l'applicazione prevede che una

composizione antimicrobica liquida contenente il peptide secondo l'invenzione venga applicata sulla superficie di detto articolo e poi lasciata essiccare. Tale composizione può comprendere opzionalmente agenti filmogeni che formano un film sulla superficie dell'articolo e che favorisce la permanenza del peptide sulla stessa. Pertanto, il suddetto rivestimento comprende preferibilmente un polimero filmogeno.

In alternativa, preferibilmente, secondo una diversa forma di realizzazione, il peptide è legato con un legame chimico covalente alla superficie dell'articolo. In questo caso, il peptide viene legato tramite la formazione di un legame covalente con gruppi reattivi presenti sulla superficie dell'articolo. Questo permette di ottenere una superficie caratterizzata da una attività battericida stabile per lunghi periodi di tempo.

Tecniche per eseguire il legame di peptidi o proteine a supporti solidi sono note all'esperto del ramo e variano a seconda del materiale utilizzato.

Ad esempio, nel caso di materiali aventi superfici in metallo (oro, argento platino) e semiconduttori (titanio, zinco, stagno, zirconio, germanio) può essere utilizzato un processo di silanizzazione. Questo prevede, ad esempio, la reazione con il materiale da trattare di una miscela di acido solforico (H_2SO_4) e perossido di ossigeno (H_2O_2), che sono in grado di attivare le suddette superfici con la creazione di legami di atomi di superficie e gruppi ossidrilici (-OH) facilmente

sostituibili da legami più stabili quali Si-C o Au-S. Le superfici attivate possono legare covalentemente i peptidi dell'invenzione in seguito al trattamento con un agente silanizzante, come l'amminopropildimetiletossisilano o l'amminopropiltritossisilano e con un composto che presenta due gruppi funzionali in grado di formare il legame covalente peptidico con i gruppi amminici del peptide, quali la gluteraldeide o il bis-succinimide. Questi trattamenti sono tipici della chimica delle soluzioni acquose e per questo sono chiamati processi ad umido, vantaggiosi perché non richiedono attrezzature tecnologiche particolari ma limitate a materiali preferibilmente rigidi che possano essere bagnati ed asciugati senza difficoltà.

Nel caso di superfici plastiche o polimeriche, queste possono invece essere funzionalizzate per agganciare i peptidi dell'invenzione sia applicando i processi ad umido descritti precedentemente, oppure applicando radiazione ad alta energia elettromagnetica (ad esempio mediante laser, radiazione ultravioletta, raggi gamma). Per i cosiddetti materiali soffici come le plastiche non rigide i processi ad umido possono essere non completamente efficaci, quindi sono preferiti i cosiddetti processi di funzionalizzazione a secco basati sull'interazione della superficie con un plasma gassoso o una radiazione elettromagnetica. L'interazione della superficie di un polimero con radiazioni elettromagnetiche provoca attivazione superficiale attraverso la rottura dei legami polimerici accessibili, quindi i legami C=C diventano -C-C- permettendo la successiva

modifica chimica della superficie stessa. Analogo principio di funzionamento vale per l'altro metodo di attivazione delle superfici polimeriche, che consiste nel trattamento delle stesse con gas ionizzato (plasma gassoso). Questo procedimento è particolarmente vantaggioso in quanto, essendo il plasma freddo, la temperatura del materiale trattato non raggiunge valori elevati rispetto alla temperatura ambiente. Questo metodo richiede bassa pressione (0,1-100 Pa) e la presenza di un gas di lavoro (di solito N₂, O₂ o Ar, CF₄). [Hegemann, Dirk, Herwig Brunner, and Christian Oehr. "Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement." Nuclear instruments and methods in physics research section B: Beam interactions with materials and atoms 208 (2003): 281-286].

Ulteriori applicazioni antimicrobiche dei peptidi antimicrobici dell'invenzione includono ad esempio, la sanitizzazione di impianti o macchinari destinati alla lavorazione di prodotti alimentari, oppure l'impiego come conservante in prodotti alimentari, ad esempio per la prevenzione e/o l'eliminazione di contaminazione degli stessi da *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*. Tale uso prevede l'utilizzo del peptide sulla superficie e/o all'interno dell'alimento oppure sulla superficie dei materiali di imballaggio dello stesso.

Preferibilmente, il peptide antimicrobico viene utilizzato come agente conservante nei prodotti alimentari. In alternativa, il peptide

viene utilizzato per applicazione sulla superficie dei materiali per l'imballaggio di alimenti, ad esempio per la prevenzione e/o l'eliminazione di contaminazione da *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans* di detti materiali e degli alimenti in essi contenuti.

ESEMPI

Esempio 1 – Sintesi del peptide RiLK1

Il peptide rappresentativo dell'invenzione RiLK1 avente sequenza RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 1) è stato sintetizzato mediante sintesi peptidica in fase solida utilizzando il gruppo protettivo Fluorometossicarbonile (Fmoc).

È stato utilizzato come supporto solido la resina Rink-Amide MBHA con un grado di sostituzione di 0.5 mmol/g. La resina è dotata di un "linker" che fornisce un legame ammidico e rilascia il peptide ammidato al C-terminale.

Alla fine della sintesi il gruppo protettivo è stato rimosso tramite trattamento con una soluzione di 40% (v/v) piperidina in DMF mentre il distacco dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori sulle catene laterali degli amminoacidi è stato ottenuto mediante trattamento con soluzione acida composta da 95% acido trifluoroacetico, 2.5% Triisopropilsilano) e 2.5% H₂O (v/v/v).

Dopo il distacco dal supporto solido il peptide è stato precipitato in etere etilico freddo, a -20°C. Per recuperare il precipitato il campione

è stato centrifugato a 3500 rpm per 5 minuti. Il precipitato è stato sciolto in una miscela di CH₃CN/H₂O (95:5), congelato e liofilizzato.

Esempio 2 – Analisi di solubilità del peptide RiLK1 in configurazione D o L

Nell'ambito della definizione delle proprietà chimiche del peptide RiLK1 in configurazione L o D sono state effettuate prove di solubilizzazione in differenti solventi e in un intervallo di concentrazioni compreso tra 1 e 11 mg/ml, al fine di individuare il limite di solubilità e cioè la massima concentrazione di peptide disciolto nella soluzione. Le prove sono state effettuate nei tre dei più comuni solventi impiegati nelle applicazioni biologiche quali: acqua ultrapura; DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), ovvero un tampone salino contenente Potassio cloruro (KCl), Potassio fosfato monobasico (KH₂PO₄), Sodio cloruro (NaCl) e Sodio fosfato bibasico (Na₂HPO₄·7H₂O) ed infine in un solvente organico quale Dimetilsolfossido (DMSO). I dati riportati in Tabella 1 mostrano che il peptide RiLK1 in entrambe le configurazioni L o D è in grado di dissolversi completamente nei diversi solventi presi in esame fino ad una concentrazione massima di 10 mg/ml.

Le medesime analisi effettuate per le configurazioni L o D del peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) hanno dimostrato che la configurazione L ha un limite di solubilità molto inferiore in acqua e DPBS (≤ 5 mg/ml) del peptide oggetto della presente invenzione RiLK1, mentre la configurazione D risulta totalmente insolubile.

Tabella 1

	Solvente	Risultato	Limite di solubilità
RiLK1(L)	Acqua ultrapura	Dissolto	10 mg/ml
	1X DPBS * (pH 7.1±0.1)	Dissolto	10 mg/ml
	DMSO	Dissolto	10 mg/ml
RiLK1(D)	Acqua ultrapura	Dissolto	10 mg/ml
	1X DPBS * (pH 7.1±0.1)	Dissolto	10 mg/ml
	DMSO	Dissolto	10 mg/ml
IDR-1018-K6(L)	Acqua ultrapura	Dissolto	5 mg/ml
	1X DPBS * (pH 7.1±0.1)	Dissolto	5 mg/ml

	DMSO	Dissolto	10 mg/ml
IDR-1018-K6 (D)	Acqua ultrapura	NON dissolto	0
	1X DPBS * (pH 7.1±0.1)	NON dissolto	0
	DMSO	Dissolto	10 mg/ml

Esempio 3 – Caratterizzazione strutturale e conformazionale di RiLK1

La caratterizzazione strutturale e conformazionale del peptide RiLK1 è stata valutata mediante lo studio della sua struttura secondaria con spettroscopia di Dicroismo Circolare (CD) in assenza e in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS) ad una concentrazione di 3mM per mimare la condizione della membrana cellulare batterica.

Le analisi CD sono state effettuate con spettropolarimetro Jasco J-810 dotato di un compartimento per cuvetta termostata. I campioni sono stati caricati in una cuvetta al quarzo da 0,1 cm di lunghezza (Hellma Analytics) e lo spettro è stato analizzato nell'intervallo da 190 nm a 250 nm a temperatura ambiente per ciascun campione.

Gli spettri CD sono stati acquisiti ad una velocità di scannerizzazione di 20 nm/min, e i risultati registrati rappresentano una media di 5 scannerizzazioni.

L'ellitticità media dei residui ($[\theta]$, gradi $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) è stata calcolata mediante la seguente equazione:

$$[\theta] = 100 \theta / cn$$

in cui θ rappresenta l'ellitticità (m gradi), c è la concentrazione (mM) del peptide, n è il numero di residui.

La struttura secondaria è stata calcolata mediante il sito DICHROWEB (Whitmore L and Wallace BA, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 668-673, Whitmore L and Wallace BA, 2008, *Biopolymers* 89:392-400, Lobley et al, 2002, *Bioinformatics* 18:211-212), usando tre algoritmi diversi (SELCON3, CONTIN-LLe CDSSTR) (Sreerema N and Woody RW, 1993, *Analytical Biochemistry* 287:252-260) e scegliendo come set di dati confronto la proteina SMP180, che include un alto numero di spettri di proteine solubili e di membrana (Abdul-Gader A et al, 2011, *Bioinformatics* 27:1630-1636).

La struttura secondaria è stata calcolata anche mediante il sito BETSEL (Micsonai A. et al, 2018, *Nucleic Acids Res.* 46: W315–W322; Micsonai A. et al, 2015, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 112: E3095–E3103).

Come mostrato in Figura 1, lo spettro CD del peptide RiLK1 in acqua in assenza (linea nera continua) o in presenza (linea nera tratteggiata) di SDS presenta due bande negative rispettivamente a

200 nm e a 215 nm. In assenza della soluzione di SDS, il peptide è destrutturato; in presenza di tale soluzione che mima la presenza di un batterio, il peptide si struttura assumendo una conformazione mista α -elica/foglietto.

Come mostrato in Figura 2, lo spettro CD del peptide RiLK1 in tampone di sodio acetato a pH 4 in assenza o in presenza di SDS presenta ancora due bande negative. In assenza della soluzione di SDS, il peptide è destrutturato (linea nera continua); in presenza di tale soluzione, il peptide si struttura (linea nera tratteggiata) assumendo una conformazione mista α -elica/ β -foglietto.

Come si evince confrontando gli spettri della Figura 1 con quelli della Figura 2, la conformazione del peptide e di conseguenza il profilo degli spettri, variano in funzione delle condizioni ambientali, in questo caso a seconda del pH dell'acqua diverso rispetto al pH del tampone sodio acetato.

La caratterizzazione strutturale e conformazionale del peptide RiLK1 è stata valutata mediante lo studio della sua struttura secondaria con spettroscopia ^1H NMR in H_2O e in soluzione micellare di SDS ad una concentrazione di 150mM per mimare la condizione della membrana cellulare batterica.

Gli spettri ^1H NMR in acqua e i segnali NOEs intra-residui (NH_i - αCH_i) e sequenziali (αCH_i - NH_{i+1}) hanno rivelato la presenza di strutture isoenergetiche disordinate (random coil) in rapida interconversione sulla scala temporale dell'analisi NMR, compatibili

con una conformazione casuale del peptide. Infatti le strutture rappresentative del peptide RiLK1 in acqua mostrano un orientamento casuale delle catene laterali sia amminoacidiche sia polari che idrofobiche.

Questa analisi di struttura è stata ulteriormente validata dalla mancanza di qualsiasi segnale NOE long-range. Le strutture del peptide RiLK1 ottenute mediante ^1H NMR incluse nei 3 cluster più popolati di molecole scelti come rappresentativi dello stato conformazionale del peptide sono rappresentate in Figura 3a (A, B) modello a *cartoon*.

Gli spettri ^1H NMR in presenza di SDS hanno rilevato l'induzione di una specifica iso-orientazione delle catene laterali amminoacidiche cariche positivamente con la formazione di una struttura α -elica centrale anfipatica. La struttura ad elica appare ben definita e stabilizzata da interazioni idrofobiche di residui amminoacidici localizzati sulla faccia opposta. È importante notare che, in questa disposizione, tutte le catene laterali cariche sono iso-orientate e ben inclini ad interagire con la superficie caricata negativamente delle micelle SDS. Inoltre, i due residui di triptofano all'interno della sequenza di RiLK1 sono posizionati ad una distanza ottimale per il loro reciproco impilamento, contribuendo così alla stabilizzazione dell'elica. Da evidenziare che per il peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) non è stato possibile acquisire gli spettri ^1H NMR in presenza di soluzioni micellari di SDS

in quanto alle concentrazioni richieste per effettuare tali analisi non risulta solubile. Per confrontare i due peptidi, le strutture sono state modellate come alfa-elica utilizzando specifici software ed i risultati ottenuti hanno evidenziato che il peptide IDR-1018-K6 non è in grado di assumere strutture iso-orientate in presenza di soluzioni micellari di SDS vista la sua sequenza amminoacidica e soprattutto la mancanza dei due residui di triptofano correttamente distanziati. Quindi è possibile asserire che l'analisi NMR in presenza di SDS ha dimostrato che il peptide RiLK1 oggetto della presente invenzione è in grado di adottare la conformazione dell'elica, mentre il peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) presenta una scarsa solubilità ed un sistema eterogeneo non adatto alla caratterizzazione strutturale NMR (Tabella 2).

Le strutture del peptide RiLK1 ottenute mediante ^1H NMR incluse nel cluster più popolato di molecole scelto come rappresentativo dello stato conformazionale del peptide sono rappresentate in Figura 3b (A, B) modello a *cartoon*.

E' da evidenziare che nelle condizioni sperimentali utilizzate per acquisire gli spettri NMR è stato possibile valutare solo la presenza degli elementi di struttura secondaria ad alfa-elica adottate dal peptide RiLK1.

Tabella 2

Peptide	H ₂ O/D ₂ O	H ₂ O/SDS-d ₂₅ 150 mM, pH
RiLK1	1 mM	0.9 mM

structura	random coil	α -elica centrale
IDR-	1 mM	insolubile
structura	random	ND

Esempio 4- cinetica dei riarrangiamenti strutturali di RiLK1

La cinetica dei riarrangiamenti strutturali del peptide RiLK1 nel corso delle 24 ore è stata valutata mediante spettroscopia di Dicroismo Circolare (CD) e mediante spettroscopia di fluorescenza.

0,1 g/L di peptide RiLK1 sono stati sciolti in tampone di sodio acetato 10 mM a pH 4, in assenza o presenza di 3mM SDS.

Come mostrato in Figura 4, lo spettro CD del peptide RiLK1 in presenza di SDS mantiene nelle 24 ore una banda negativa compresa tra 210-215 nm (linee 2-8), vale a dire il peptide nelle 24 ore rimane strutturato e mantiene la conformazione mista α -elica/foglietto.

Come mostrato in Figura 5, lo spettro a fluorescenza del peptide RiLK1 in presenza di SDS mantiene nelle 24 ore un picco a lunghezza d'onda più bassa, compreso tra 320-340 nm (linee 2-8), rispetto alla lunghezza d'onda del picco in assenza di SDS, compresa tra 340-360 nm (linea1). Lo spettro a fluorescenza conferma che il peptide in presenza di SDS 3 mM nelle 24 ore subisce dei riarrangiamenti conformazionali in seguito all'interazione del triptofano con gli amminoacidi del suo intorno, senza compromettere gli elementi di struttura secondaria come evidenziato nella stessa analisi condotta mediante dicroismo circolare (Figura 4).

I dati riportati nella successiva Tabella 3, ottenuti mediante l'analisi *in silico* della cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore utilizzando due diversi server, BESTSEL e Dichroweb, mostrano che a seguito dell'aggiunta della soluzione di SDS 3 mM in entrambi i server si osserva una predominanza dell'elemento di struttura secondaria β -foglietto rispetto a quello α -elica (53,6% Vs 8,4% in BESTSEL; 47% Vs 29% in DICHROWEB).

Tabella 3

RiLK1						
	Bestsel			DichroWeb CONTIN-LL		
	α - helix	β - sheet	Random	α - helix	β - sheet	Random
senza SDS 3mM	1,2%	47,3%	51,5%	4%	35%	61%
t=0 con SDS 3mM	7,4%	51,4%	41,3%	22%	38%	40%
t=5min con SDS 3mM	4,4%	53,4%	42,2%	22%	42%	36%

t=30min con SDS 3mM	11%	48,7%	40,3%	25%	38%	37%
t=1h con SDS 3mM	9,8%	51,1%	39,1%	23%	38%	39%
t=5h con SDS 3mM	6,7%	54%	39,3%	19%	43%	38%
t=6h con SDS 3mM	8%	52%	40,1%	19%	44%	37%
t=24h con SDS 3mM	8,4%	53,6%	38%	29%	47%	24%

Nella successiva Tabella 4 sono riportati i dati ottenuti mediante l'analisi *in silico* dalla cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore utilizzando il server Dichroweb; tali dati mostrano che a seguito dell'aggiunta della soluzione di SDS il peptide RiLK1 dopo 24 ore manifesta una predominanza dell'elemento di struttura secondaria β -foglietto del 47%. Inoltre il peptide RiLK1 dopo 24 ore

manifesta una bassa porzione random, che passa da 61% in assenza di SDS a 24% in presenza di SDS 3 mM dopo 24h.

Tabella 4

RiLK1			
	DichroWeb CONTIN-LL		
	α -helix	β -sheet	Random
senza SDS 3mM	4%	35%	61%
t=0 con SDS 3mM	22%	38%	40%
t=5 min con SDS 3mM	22%	42%	36%
t=30 min con SDS 3mM	25%	38%	37%
t=60 min con SDS 3mM	23%	38%	39%
t=300 min con SDS 3mM	19%	43%	38%
t=360 min con SDS 3mM	19%	44%	37%
t=24 ore con SDS 3mM	29%	47%	24%

Esempio 5- Analisi di stabilità strutturale alla temperatura di

RiLK1

0,1 g/L di peptide RiLK1 sono stati sciolti in Tris HCL 10mM a pH 7 e 3mM SDS. I campioni preparati sono stati incubati per 24 ore a 4 °C o 25 °C e analizzati al tempo zero e dopo 24 ore.

Come mostrato in Figura 6, lo spettro CD del peptide RiLK1 in presenza di SDS 3 mM mantiene nelle 24 sia alla temperatura di 4 °C (linea 2) che alla temperatura di 25 °C (linea 3) una banda negativa compresa tra 210-215 nm, vale a dire il peptide nelle 24 ore a tali temperature rimane strutturato e mantiene la conformazione mista α -elica/foglietto.

I dati riportati nella successiva Tabella 5, ottenuti mediante l'analisi *in silico* della cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore utilizzando due diversi server, BESTSEL e Dichroweb, mostrano che RiLK1 risulta essere notevolmente stabile alle diverse condizioni ambientali investigate con una predominanza del β -foglietto rispetto all' α -elica.

Tabella 5

RiLK1						
	Bestsel			DichroWeb CONTIN-LL		
	α - helix	β - sheet	Random	α - helix	β -sheet	Random

t=0	17,9%	37,1%	44,9%	21%	43%	36%
4°C; t=24 ore	6,5%	46%	47,5%	25%	37%	38%
25°C; t=24 ore	6,8%	49,7%	43,6%	24%	39%	37%

Nella successiva Tabella 6 sono riportati rispettivamente i dati ottenuti mediante l'analisi *in silico* dalla cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore, utilizzando il server Dichroweb; tali dati mostrano che il peptide RiLK1 dopo 24 ore manifesta anche a 90 °C una predominanza dell'elemento di struttura secondaria β -foglietto.

Tabella 6

RiLK1			
	CONTIN-LL		
	α -helix	β -sheet	Random
t=0	21%	43%	36%
4°C; t=24h	25%	37%	38%
25°C; t=24h	24%	39%	37%

Nel complesso, questi dati dimostrano che RiLK1 mantiene pressoché inalterata la sua struttura nell'intervallo da 4°C a 25°C ed è pertanto caratterizzato da una buona termostabilità.

Esempio 6- Analisi di stabilità strutturale al pH di RiLK1

0,1 g/L di peptide RiLK1 sono stati sciolti in soluzioni a concentrazione 10 mM a differentipH , in particolare: tampone glicina-HCL (pH 2); tampone acetato sodico (pH 4); tampone tris-HCL (pH 7); tampone glicina-NaOH (pH 9). Dopo un'ora di incubazione a 25 °C, sono stati preparati campioni di ogni soluzione contenenti SDS alla concentrazione di 3mM. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 7. In tale figura si osserva che lo spettro CD del peptide RiLK1 ottenuto monitorato il campione per 24 ore (linea nera continua al tempo=0; linea nera tratteggiata al tempo=24 ore) in presenza di SDS mantiene nelle 24 ore h alle diverse condizioni di pH testate, i.e. pH 2 (A); pH 4 (B); pH 7 (C); pH 9 (D), una banda negativa compresa tra 210-215 nm, vale a dire il peptide nelle 24 ore a tali condizioni di pH rimane strutturato e mantiene la conformazione mista α -elica/foglietto.

I dati riportati nella successiva Tabella 6, ottenuti mediante l'analisi *in silico* della cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore alle diverse condizioni di pH testate utilizzando due diversi server, BESTSEL e Dichroweb, mostrano che RiLK1 risulta essere notevolmente stabile alle diverse condizioni di pH investigate con una predominanza del β -foglietto e riduzione della componente α -elica.

Tabella 7

RiLK1						
	Bestsel			DichroWeb CONTIN-LL		
	α - helix	β - sheet	Random	α - helix	β - sheet	Random
pH2; t=0	18,5	37	44,4	22%	39%	39%
pH2; t=24 ore	13,2	42,5	44,3	17%	44%	39%
pH4; t=0	7,7	39,8	52,4	23%	41%	36%
pH4; t=24 ore	13,3	45,5	41,2	24%	41%	35%
pH7; t=0	15	39,5	45,4	25%	39%	36%
pH7; t=24 ore	15,5	43,8	40,8	19%	44%	37%
pH 9; t=0	13,7	42	44,4	19%	42%	39%
pH 9; t=24 ore	13,4	43,8	42,9	29%	47%	24%

Nella successiva Tabella 8 sono riportati i dati ottenuti mediante l'analisi *in silico* dalla cinetica di riarrangiamento strutturale del peptide RiLK1 nelle 24 ore, utilizzando il server Dichroweb; tali dati mostrano che il peptide RiLK1 dopo 24 ore di incubazione ai diversi pH testati e

in presenza di SDS 3 mM mantiene una predominanza dell'elemento di struttura secondaria β -foglietto rispetto a quella ad α -elica.

Tabella 8

RiLK1			
	CONTIN-LL		
	α -helix	β -sheet	Random
pH 2	22%	39%	39%
pH 4	23%	41%	36%
pH 7	25%	39%	36%
pH 9	19%	42%	39%

Esempio 7 - Analisi di stabilità strutturale al pH ed alla temperatura di RiLK1 in soluzione micellare

Il peptide RiLK1 (ad una concentrazione di 50 μ M) è stato sciolto in soluzioni tampone 10 mM a due diversi pH, in particolare: tampone glicina-HCL (pH 2) e tampone glicina-NaOH (pH 9). Dopo un'ora di incubazione a 25 °C, sono stati preparati campioni di ciascuna soluzione in presenza di SDS alla concentrazione di 150 mM ed incubati per 24 ore a 25 °C.

Come mostrato in Figura 8 A-B, gli spettri a fluorescenza del peptide RiLK1 nelle 24 ore si mantengono pressoché invariati alle due condizioni di pH analizzate indice di una notevole stabilità del peptide, con leggere differenze nell'intensità massima di fluorescenza da

attribuire al diverso riarrangiamento conformazionale del peptide indotto dal pH che si riflette in una maggiore o minore esposizione dei residui di Triptofano al solvente.

Inoltre il peptide RiLK1 è stato sciolto in acqua ad una concentrazione di 50 μ M in presenza di una soluzione micellare di SDS 150 mM. I campioni preparati sono stati incubati per 24 ore a 4 °C o 25 °C ed analizzati mediante spettroscopia di fluorescenza. Come mostrato in Figura 8 C-D, gli spettri a fluorescenza sono sovrapponibili nelle 24 h dimostrando che RiLK1 è caratterizzato anche da una elevata stabilità strutturale a 4°C e 25°C in soluzione micellare di SDS.

Esempio 8 - Analisi di stabilità di RiLK1 in condizioni di uso

L'analisi della stabilità del peptide RiLK1 in presenza di soluzione salina ad elevata concentrazione (NaCl 1M) è stata determinata mediante cromatografia HPLC a fase inversa (RP), eseguita su colonna μ Bondpack C18. 50 μ M di peptide RiLK1 sono stati sciolti in NaCl 1 M e i campioni sono stati incubati a 25 °C e monitorati per 9 giorni.

Come si evidenzia dalla Figura 9, tutti i tracciati cromatografici ottenuti, i.e. al tempo=0; tempo=5 ore; tempo=24 ore; tempo=29 ore; tempo=48 ore; tempo=53 ore; tempo=6 giorni; tempo=9 giorni, sono praticamente sovrapponibili, dimostrando che durante l'incubazione del peptide RiLK1 non si verificano né fenomeni di precipitazione né di degradazione ed il peptide risulta essere estremamente stabile in

tali condizioni fino ad un massimo di 9 giorni. Pertanto RiLK1 oggetto di tale invenzione presenta caratteristiche e proprietà strutturali tali da essere utilizzato nell'industria alimentare nelle preparazioni a base di salamoia, tipiche dei prodotti lattiero-caseari come per esempio la mozzarella.

I dati riportati nella successiva Tabella 9 confermano la stabilità del peptide RiLK1 fino a 9 giorni.

Tabella 9

50 μ M RiLK1/ NaCl 1M	
tempo	resa
0	-
5 ore	+6%
24 ore	+6%
29 ore	+3%
48 ore	-1,5%
53 ore	+4,3%
6 giorni	-6,3%
9 giorni	-8%

Esempio 9 – Analisi attività battericida di RiLK1

Esempio 9a - valutazione della concentrazione in grado di inibire il 50% della crescita batterica (IC₅₀)

L'attività battericida del peptide RiLK1 è stata valutata sia contro batteri patogeni Gram positivi (*Listeria monocytogenes* LM2 e

Staphylococcus aureus) che Gram negativi (*Salmonella Typhimurium* ed *Escherichia coli*).

Per le quattro specie batteriche scelte sono stati utilizzati ceppi certificati e caratterizzati, indicati nelle successive Tabelle 10 e 11. La valutazione della concentrazione in grado di inibire il 50% della crescita batterica (IC₅₀) dei due peptidi è stata effettuata con il saggio delle micro-diluizioni del brodo secondo quanto descritto in Wang HX e Ng TB (2003, Peptides 24:969–972).

Le deviazioni standard per triplici incubazioni di ogni piatto e la valutazione IC₅₀, sono state determinate usando GraphPad Prism versione 6.00 (Graph-Pad Software, La Jolla California USA).

Staphylococcus aureus

È stata preparata una sospensione madre controllo in cui 10³ CFU di *S. aureus* sono state inoculate in 10 ml di BPW. Sono state poi preparate soluzioni madre 5 mM dei due peptidi ed eseguite diluizioni in serie (da 100 a 1 μM) in BPW, che sono state inoculate con 10³ CFU di *S. aureus* e incubate per 6 ore a 37 °C. Parallelamente sono stati preparati campioni di controllo trattati allo stesso modo ma senza l'aggiunta dei due peptidi.

50 μl of ogni sospensione batterica sono stati versati su piastre di petri con agar di sangue o agar di fibrinogeno da plasma di coniglio e incubati per 20 ore a 37 °C.

In tutte le condizioni sperimentali investigate, è stato usato il metodo di conta delle piastre per stimare l'attività battericida dei

peptidi. Specificamente, è stato contato e confrontato il numero di colonie cresciute su piastre con agar seminate con le sospensioni batteriche in assenza o in presenza delle singole diluizioni di peptidi. Le deviazioni standard delle incubazioni in triplicato di ogni piastra sono state determinate usando software statistici.

Listeria monocytogenes

È stata preparata una sospensione madre controllo in cui 10^3 CFU di *L. monocytogenes* è stata inoculata in 10 ml di Half Fraser Broth e sono state eseguite diluizioni in serie (da 100 a $0.01\mu\text{M}$) della sospensione. Sono state poi preparate soluzioni madre 5mM dei due peptidi in DMSO e sono state eseguite diluizioni in serie (da 100 a $0.01\mu\text{M}$) in Fraser Broth, che sono state inoculate con 10^3 CFU (unità formanti colonie) di *L. monocytogenes* e incubate per 6 ore a 37 °C. Parallelamente sono stati preparati campioni di controllo trattati allo stesso modo ma senza l'aggiunta dei due peptidi. 50 μl of di ogni sospensione batterica è stata seminata in differenti piastre di coltura: agar sangue e ALOA (Oxoid, Basingstoke, UK), che sono quindi state incubate per 24-48 ore a 37 °C. Ogni serie di diluizioni includeva piastre di controllo con i soli batteri e DMSO senza il peptide.

Salmonella Typhimurium

È stata preparata una sospensione madre controllo in cui 10^3 CFU di *S. Typhimurium* sono state inoculate in 10 ml di BPW (Oxoid, Basingstoke, UK). Sono state poi preparate soluzioni madre 5mM dei due peptidi ed eseguite diluizioni in serie (da 100 a $1\mu\text{M}$) in BPW,

inoculate con 10^3 CFU *S. Typhimurium* e incubate per 6 ore a 37 °C. 50 µl of ogni sospensione batterica è stata seminata in piastre Petri con agar di sangue o agar cromogenico (Oxoid, Basingstoke, UK) e incubati per 20 ore a 37 °C. Ogni serie di diluizioni includeva piastre di controllo inoculate con DMSO senza il peptide e piastre di controllo con i soli batteri.

Escherichia coli

È stata preparata una sospensione madre controllo in cui 10^3 CFU di *E. coli* sono state inoculate in 10 ml di BPW (Oxoid, Basingstoke, UK). Sono state poi preparate soluzioni madre 5mM dei due peptidi ed eseguite diluizioni in serie (da 100 a 1µM) in BPW, inoculate con 103 CFU *E. coli* e incubate per 6 ore a 37 °C. 50 µl of ogni sospensione batterica è stata seminata in piastre Petri con agar di sangue o agar cromogenico (Oxoid, Basingstoke, UK) e incubati per 20 ore a 37 °C. Ogni serie di diluizioni includeva piastre di controllo inoculate con DMSO senza il peptide e piastre di controllo con i soli batteri

La Figura 10 rappresenta la curva dose-risposta ottenuta con il peptide RiLK1 nei confronti di *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B), *S. Typhimurium* (C), e *Escherichia coli* (D).

Sulla base delle curve dose-risposta ottenute sono stati determinati i valori di IC₅₀ (concentrazione di peptide in grado di inibire il 50% della crescita batterica) verso i ceppi batterici sopra citati.

I dati riportati in Tabella 10 evidenziano che per il peptide RiLK1 si osserva una potente attività battericida nei confronti di tutti i batteri testati ($IC_{50} < 2 \mu M$); in particolare si osserva più potente attività battericida nei confronti di *S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes* ($IC_{50} < 1,5 \mu M$) e ancora più potente attività battericida nei confronti di *L. monocytogenes* ($IC_{50} 0,46 \mu M$).

Tabella 10

Batterio	RiLK1 $IC_{50} [\mu M]$
<i>S. aureus</i>	1,98
<i>L. monocytogenes (LM2)</i>	0,46
<i>S. Typhimurium</i>	1,30
<i>E. coli</i>	1,20

Esempio 9b – valutazione della concentrazione battericida minima (MBC)

La valutazione della concentrazione battericida minima (MBC) ovvero la più bassa concentrazione di agente antimicrobico in grado di inibire del 99,9% la crescita batterica in piastra è stata effettuata secondo quanto descritto in Bilikova et al, (2015, Peptides 68:190–196).

I dati riportati nella successiva Tabella 11 evidenziano che il peptide RiLK1 possiede una potente attività battericida nei confronti di tutti i batteri testati ($MBC < 20 \mu M$); in particolare si osserva una elevata attività battericida nei confronti di *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ed *E. coli*

(MBC < 5 μ M) e ancora più potente attività battericida nei confronti di *L. monocytogenes* e *E. coli* (MBC 2 μ M). Da evidenziare che il peptide oggetto della presente invenzione risulta essere più potente ed efficiente del peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) verso i batteri patogeni *L. monocytogenes* e *S. typhimurium* con valori di concentrazione battericida inferiori rispettivamente di 4 e 7 volte rispetto a quelli evidenziati da IDR-1018-K6.

Tabella 11

Batterio	RiLK1 MBC [μ M]	IDR-1018-K6 MBC [μ M]
<i>S. aureus</i>	16	15
<i>L. monocytogenes (LM2)</i>	2	8
<i>S. Typhimurium</i>	4	25
<i>E. coli</i>	2	2

Le immagini della Figure 11a rappresentano immagini fotografiche (1) della piastra di controllo incubata con *S. aureus* senza aggiunta di peptide RiLK1, (2) della piastra incubata con *S. aureus* e trattata con 2 μ M di peptide RiLK1, (3) della piastra incubata con *S. aureus* e trattata con 16 μ M di peptide RiLK1 da cui si evince che alla concentrazione di 16 μ M tale peptide è grado di inibire pressoché il 100% della crescita batterica.

Le immagini della Figure 11b rappresentano immagini fotografiche (1) della piastra di controllo incubata con *L. monocytogenes* senza aggiunta di peptide RiLK1, (2) della piastra incubata con *L. monocytogenes* e trattata con 0,8 μ M di peptide RiLK1, (3) della piastra incubata con *L. monocytogenes* e trattata con 2 μ M di peptide RiLK1 da cui si evince che alla concentrazione di 2 μ M tale peptide è grado di inibire pressoché il 100% della crescita batterica.

Le immagini della Figure 11c rappresentano immagini fotografiche (1) della piastra di controllo incubata con *S. Typhymurium* senza aggiunta di peptide RiLK1, (2) della piastra incubata con *S. Typhymurium* trattata con 0,8 μ M di peptide RiLK1, (3) della piastra incubata con *L. monocytogenes* e trattata con 2 μ M di peptide RiLK1 da cui si evince che alla concentrazione di 2 μ M tale peptide è grado di inibire pressoché il 100% della crescita batterica.

Le immagini della Figure 11d rappresentano immagini fotografiche (1) della piastra di controllo incubata con *E. coli* senza aggiunta di peptide RiLK1, (2) della piastra incubata con *E. coli* e trattata con 0,8 μ M di peptide RiLK1, (3) della piastra incubata con *E. coli* e trattata con 2 μ M di peptide RiLK1 da cui si evince che alla concentrazione di 2 μ M tale peptide è grado di inibire pressoché il 100% della crescita batterica.

Esempio 10 – Analisi della citotossicità vs linee cellulari umane

La eventuale citotossicità del peptide RiLK1 per le cellule eucariotiche è stata testata effettuando esperimenti di crescita e conta cellulare utilizzando tre differenti linee cellulari umane: HaCat (Primary Epidermal Keratinocytes, cheratinociti isolati da epidermide), WI-38 (Diploid human cell line composed of fibroblasts derived from lung tissue, fibroblasti diploidi di polmone umano), e TIG-3-20 (Fibroblast cell line derived from Japanese fetal lung, fibroblasti di polmone fetale).

Gli esperimenti sono stati condotti in assenza o in presenza del peptide a differenti concentrazioni: 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M.

Come mostrato nelle immagini di Figura 12, tutti i campioni di linee cellulari umane testati dopo 24 ore di incubazione in presenza di RiLK1 alle diverse concentrazioni (RiLK1_1, RiLK1_2,5, RiLK1_5 e RiLK1_10) non mostrano segni di modifiche morfologiche né una variazione del numero di cellule rispetto al campione di cellule non trattate (Ctrl).

Esempio 11 – Analisi di attività contro funghi e lieviti

Esempio 11a - valutazione della concentrazione di peptide RiLK1 in grado di inibire la crescita del fungo *Aspergillus brasiliensis*

L'attività antifungina del peptide RiLK1 è stata determinata nei confronti di *Aspergillus brasiliensis*. A tal fine, è stata preparata una coltura madre in cui 10^5 CFU di *A. brasiliensis* sono state inoculate in 10 ml di acqua peptonata tamponata. Per questa specie fungina è stato

utilizzato un ceppo di riferimento (ATCC 9341). La coltura è stata incubata per 6 h a 37 °C con il peptide RiLK1 a concentrazioni di 25 µM.

Parallelamente, sono stati incubati campioni controllo senza l'aggiunta del peptide. 100 µl dei campioni così preparati sono stati seminati su piastre di DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar - ISO 21527-2) ed incubati a 25°C per 7gg.

In tutte le condizioni sperimentali investigate, è stato usato il metodo di conta delle piastre per stimare l'attività fungicida del peptide. Specificamente, è stato contato e confrontato il numero di colonie cresciute su piastre con agar seminate con le sospensioni fungine in assenza o in presenza delle singole diluizioni di peptide. Le deviazioni standard delle incubazioni in triplicato di ogni piastra sono state determinate usando software statistici. La valutazione della Minimal Fungicidal Concentration (MFC) ovvero la concentrazione più bassa di agente antifungino in grado di inibire del 99,9% la crescita fungina in piastra è stata effettuata secondo quanto descritto in Bílikova et al, (2015, Peptides 68:190–196).

Come riportato nella Figura 13a il peptide RiLK1 possiede una potente attività fungicida nei confronti del fungo testato con un valore di MFC minore o uguale di 25 µM. È da evidenziare che nei confronti dello stesso fungo e nelle stesse condizioni sperimentali il peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) non risulta attivo con una riduzione dopo trattamento della carica fungina di 0 Log

rispetto alla riduzione significativa indotta da RiLK1 (5 Log di riduzione)

Esempio 11b - valutazione della concentrazione di peptide RiLK1 in grado di inibire la crescita del lievito *Candida albicans*

L'attività inibente del peptide RiLK1 è stata determinata nei confronti del lievito *Candida albicans*. È stata preparata una coltura madre in cui 10^5 CFU di *C. albicans* sono state inoculate in 10 ml di acqua peptonata tamponata. Per questa specie è stato utilizzato un ceppo di riferimento (ATCC 14053). La coltura è stata incubata per 6 h a 37 °C con il peptide RiLK1 a concentrazioni di 25 µM. Parallelamente, sono stati incubati campioni controllo senza l'aggiunta del peptide. 100 µl dei campioni così preparati sono stati seminati su piastre di DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar - ISO 21527-2) ed incubati a 25 °C per 7 gg.

In tutte le condizioni sperimentali investigate, è stato usato il metodo di conta delle piastre per stimare l'attività antimicotica del peptide. Specificamente, è stato contato e confrontato il numero di colonie cresciute su piastre con agar seminate con le colture in assenza o in presenza delle singole diluizioni di peptide. Le deviazioni standard delle incubazioni in triplicato di ogni piastra sono state determinate usando software statistici. La valutazione della Minimal Fungicidal Concentration (MFC) ovvero la concentrazione più bassa di agente antifungino in grado di inibire del 99,9% la crescita fungina

in piastra è stata effettuata secondo quanto descritto in Bílikova et al, (2015, Peptides 68:190–196)

Come riportato nella Figura 13b il peptide RiLK1 possiede una potente attività antimicotica nei confronti di *C. albicans* con un valore di MFC minore o uguale di 25 µM. È da evidenziare che, come mosrtrato in Tabella 12, nei confronti dello stesso fungo e nelle stesse condizioni sperimentali il peptide IDR-1018-K6 (oggetto del brevetto WO2019012158) risulta poco efficiente con una riduzione dopo trattamento della carica fungina di 1.0 Log rispetto alla riduzione significativa indotta da RiLK1 (5 Log di riduzione).

Tabella 12

Fungo	RiLK1 Abbattimento Log CFU/ml	IDR-1018-K6 Abbattimento Log CFU/ml
<i>A. brasiliensis</i>	5	0
<i>C.albicans</i>	5	1,0

Esempio 12: effetti del trattamento dei dischetti PP funzionalizzati con RiLK1 su mozzarella

Esempio 12a: Attivazione e funzionalizzazione di superfici polimeriche con il peptide RiLK1

Un supporto solido di polipropilene (PP) dello spessore di 800 µm è stato inizialmente sottoposto al trattamento corona, una tecnica

che ha la funzione di migliorare l'adesione e la bagnabilità di materiali apolari quali le materie plastiche che sono costituite da lunghe catene polimeriche, attraverso la creazione di gruppi chimici reattivi sulla superficie polimerica che ne favoriscono poi la funzionalizzazione con molecole bioattive come RiLK1.

A seguito dell'attivazione avvenuta su entrambe le facce, dischi di PP aventi un diametro di 5 cm, sono stati incubati per 18h a 25 °C in 5 ml di una soluzione 50µM in dimetilsolfossido (DMSO) del peptide RiLK1 in presenza di *molecular sieves* con porosità del diametro di 4 Å, alluminosilicati cristallini in grado di adsorbire le molecole d'acqua prodotte nella formazione del legame peptidico, in un numero pari a circa 10 per ml di soluzione.

Esempio 12b: Resa di immobilizzazione e rilascio

Terminata la reazione di funzionalizzazione, la soluzione incubata è stata prelevata ed analizzata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC). Tale tecnica ha consentito di valutare la resa di legame del peptide, determinando la quantità di RiLK1 che non ha reagito rispetto a quella inizialmente messa in contatto con la superficie polimerica.

Come evidenziato nella Figura 14, l'efficienza di immobilizzazione è risultata essere pari al 91,5%, valore calcolato effettuando il rapporto tra le aree del picco relativo al peptide al tempo $t=18h$ ed al tempo $t=0$.

Lo studio del rilascio del peptide RiLK1 dalla superficie polimerica funzionalizzata è stato condotto immergendo la stessa in 5 mL di H₂O per 24h e ad una temperatura di 25 °C. Al termine dell'incubazione, il liquido è stato recuperato, concentrato ed analizzato mediante cromatografia RP-HPLC per quantificare il rilasciato.

Tale analisi ha mostrato una elevata stabilità in soluzione acquosa del sistema polimerico funzionalizzato, non essendo stato evidenziato alcun rilascio del peptide dopo 24h di incubazione.

Esempio 12c: Effetti del trattamento dei dischetti PP funzionalizzati con RiLK1 sulla *shelf-life* della mozzarella

I dischetti PP (PPs) funzionalizzati con RiLK1 sono stati utilizzati per effettuare prove di *shelf-life* sulla mozzarella di bufala, che risulta estremamente ridotta in particolare quando è prodotta con latte crudo o solo termizzato, a seguito di alterazioni chimico-fisiche e biochimiche indotte da microrganismi di deterioramento e da attività enzimatiche. Allo stesso tempo, la possibilità di ottenere derivati di latte di bufala partendo da latte non “stressato” termicamente consente di salvaguardare la cosiddetta flora non starter che conferisce caratteristiche di peculiarità e tipicità all'alimento. Normalmente la *shelf-life* di una tipologia di prodotto cosiddetto “da banco” è di 4/5 giorni. Per i protocolli analitici sono stati utilizzati bocconcini di mozzarella da 50 g pesati in sterilità, il quali sono stati poi conservati in presenza di PPs funzionalizzati e non. Nello

specifico, si è preceduto come segue per l'allestimento dei campioni: in recipienti a base circolare, il cui diametro risulta pari a quello del disco, contenenti 200 ml di liquido di governo e un bocconcino di mozzarella, sono stati posti due dischi di PP uno al di sotto e l'altro al di sopra della matrice alimentare, chiusi con parafilm e conservati ad una temperatura di refrigerazione di 4 °C fino alla scadenza dei tempi stabiliti (5, 8 e 10 giorni). Per le analisi microbiologiche, ai diversi intervalli sono stati pesati 10 g di campione e posti in una busta sterile con filtro, il tutto è stato diluito con acqua peptonata (*Buffered Peptone Water*) in rapporto 1:10 ed omogeneizzato tramite *Stomacher*, 1 ml del campione così ottenuto è stato posto su piastra e proceduto alla conta seguendo le metodiche ISO 4833-1 per la CBT e la ISO 21527-1 per i lieviti. Come si evince dai dati riportati nelle Tabelle 13 e 14 la mozzarella conservata per 10 giorni in presenza dei PPs leganti il peptide RiLK1 presenta un'inibizione della carica batterica totale del 52% e dei lieviti pari all'80,4% se confrontata con la mozzarella conservata per gli stessi giorni in presenza dei PPs non funzionalizzati. Tale condizione si traduce in un aumento della conservabilità di 5 giorni, che nelle dinamiche aziendali inerenti la commercializzazione di un prodotto da banco risulterebbe in un intervallo significativo.

Tabella 13

CBT (Carica Batterica mesofila Totale)

Tempo di contatto dischetti PP funzionalizzati e mozzarella-	% di inibizione CBT rispetto al controllo
<i>5 gg</i>	82%
<i>8 gg</i>	50%
<i>10 gg</i>	52%

Tabella 14

Lieviti	% di inibizione
<i>5 gg</i>	46.7%
<i>8 gg</i>	80%
<i>10 gg</i>	80,4%

RIVENDICAZIONI

1. Peptide antimicrobico consistente nella sequenza amminoacidica avente la seguente formula generale:



in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione D o L,

o un sale o un solvato dello stesso.

2. Peptide antimicrobico secondo la rivendicazione 1, in cui almeno uno fra X_1 , X_3 , X_4 e X_5 ha il significato di R; più preferibilmente X_4 e X_5 hanno il significato di R; ancor più preferibilmente X_3 , X_4 ed X_5 hanno il significato di R; ancor più preferibilmente X_1 , X_3 , X_4 ed X_5 hanno il significato di R.

3. Peptide antimicrobico secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui X_2 ha il significato di K.

4. Peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, scelto dal gruppo che consiste di $RLX_2WVRIWX_4X_5$, $RLX_2WVRIWRX_5$, $RLX_2WVRIWX_4K$, $RLKX_2WVRIWKK$, X_1LKWVX_3IWRR , $X_1LKWVRIWRR$, $RLKWVX_3IWRR$, X_1LRWVX_3IWKK , $X_1LRWVKIWKK$ e $KLRWVX_3IWKK$,

in cui X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 sono scelti indipendentemente uno dall'altro tra K e R ed in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione D o L.

5. Peptide antimicrobico secondo la rivendicazione 1, scelto dal gruppo che consiste di RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 1), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 2), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 3), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 4), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 5), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 6), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 7), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 8), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 9), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 10), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 11), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 12), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 13), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 14), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 15), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 16), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 17), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 18), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 19), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 20), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 21), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 22), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 23), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 24), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 25), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 26), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 27), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 28), RLKWVRIWRR (SEQ ID NO: 29), KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 30), RLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 31) e KLRWVRIWRR (SEQ ID NO: 32),

in cui ciascun aminoacido è indipendentemente in configurazione D o L.

6. Peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, per l'uso come medicamento, preferibilmente nel trattamento terapeutico di una infezione provocata da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, funghi, lieviti e/o virus.

7. Formulazione farmaceutica comprendente un peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 e almeno un eccipiente e/o veicolo farmaceuticamente accettabile.
8. Composizione antimicrobica comprendente un veicolo ed almeno un peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, facoltativamente in combinazione con almeno un ulteriore peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 e/o con almeno un ulteriore agente antimicrobico.
9. Uso di un peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 come agente antimicrobico per la prevenzione della contaminazione e/o per la decontaminazione di un articolo da batteri Gram negativi, batteri Gram positivi, funghi, lieviti e/o virus, in cui detto articolo è preferibilmente scelto fra un alimento, un materiale, un contenitore o un utensile.
10. Articolo recante un peptide antimicrobico legato covalentemente su una propria superficie, oppure recante un peptide antimicrobico contenuto in un rivestimento adeso a detta una superficie, in cui detto peptide antimicrobico è un peptide antimicrobico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 ed in cui detto articolo è preferibilmente scelto fra un alimento, un materiale, un contenitore e un utensile.

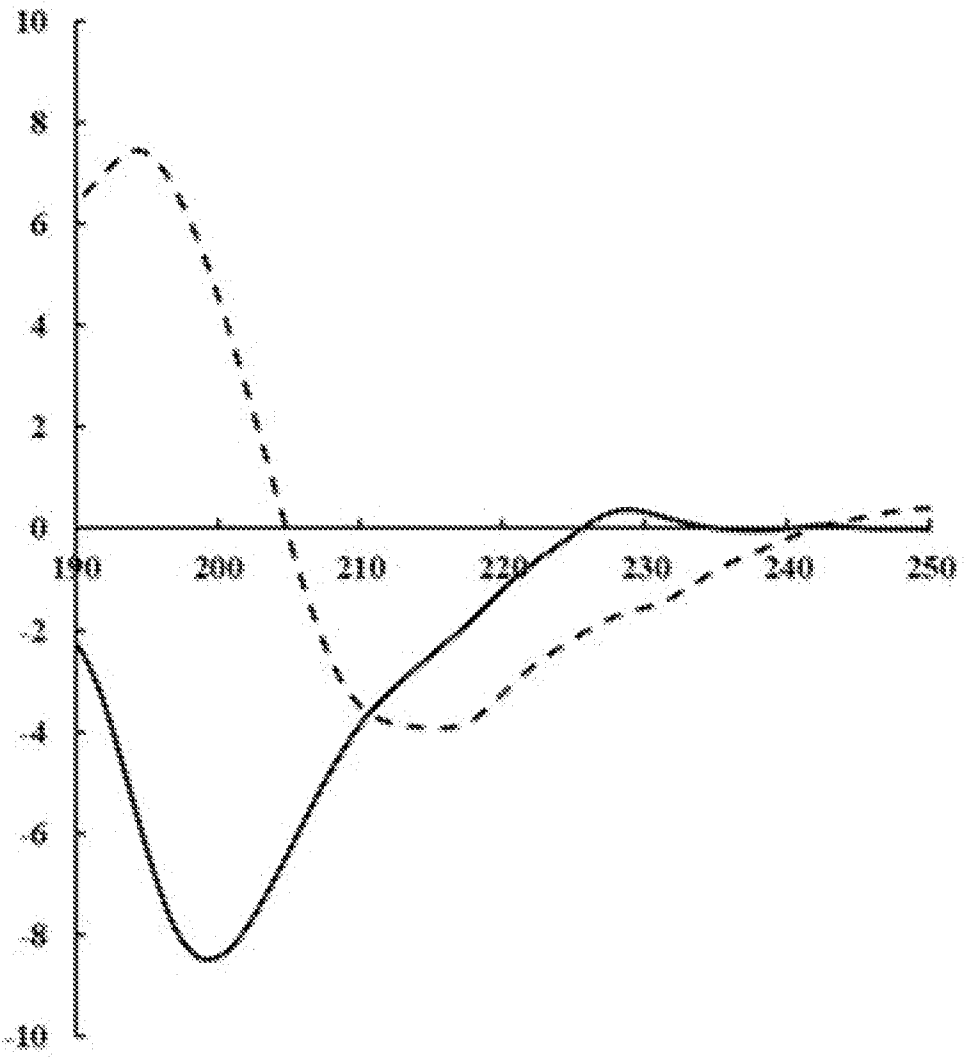


FIG. 1

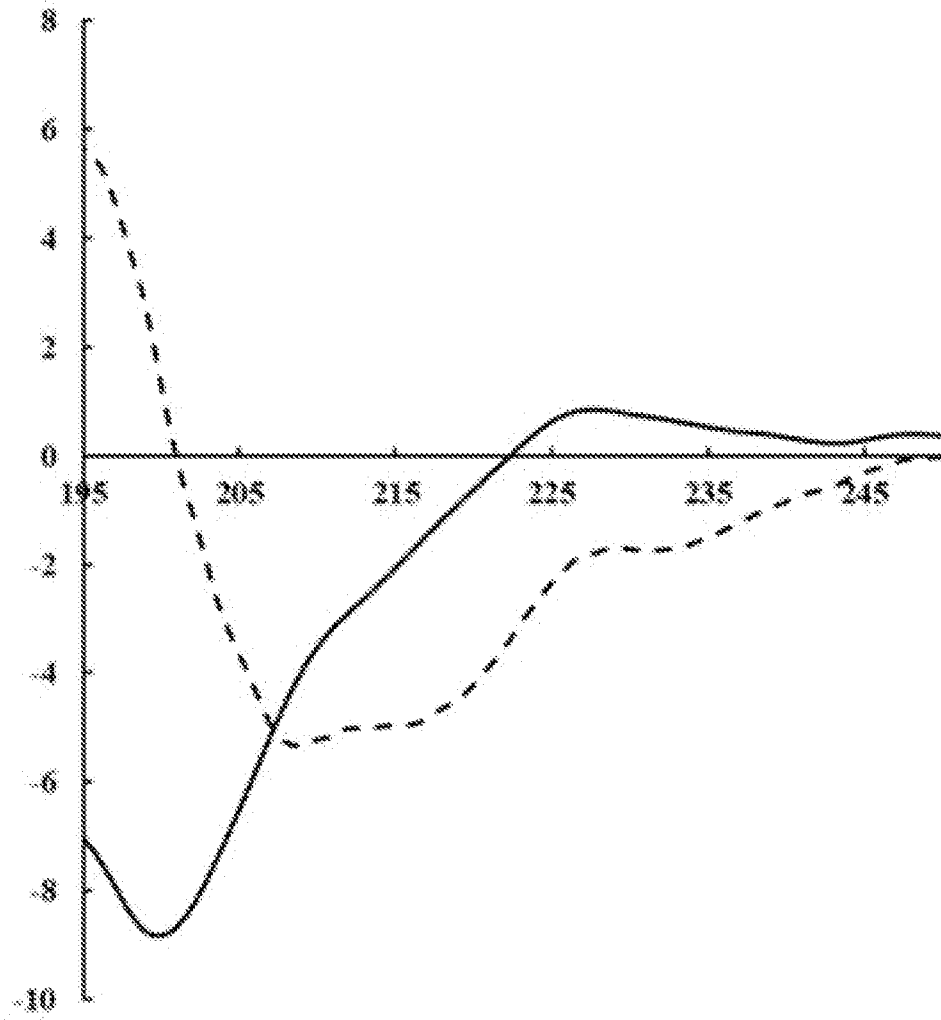


FIG.2

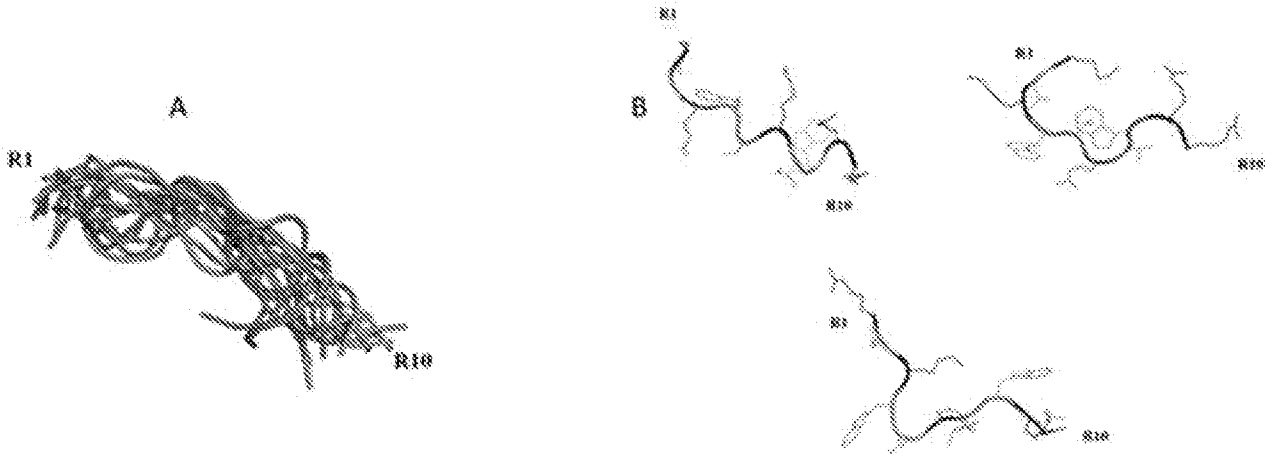


FIG. 3a

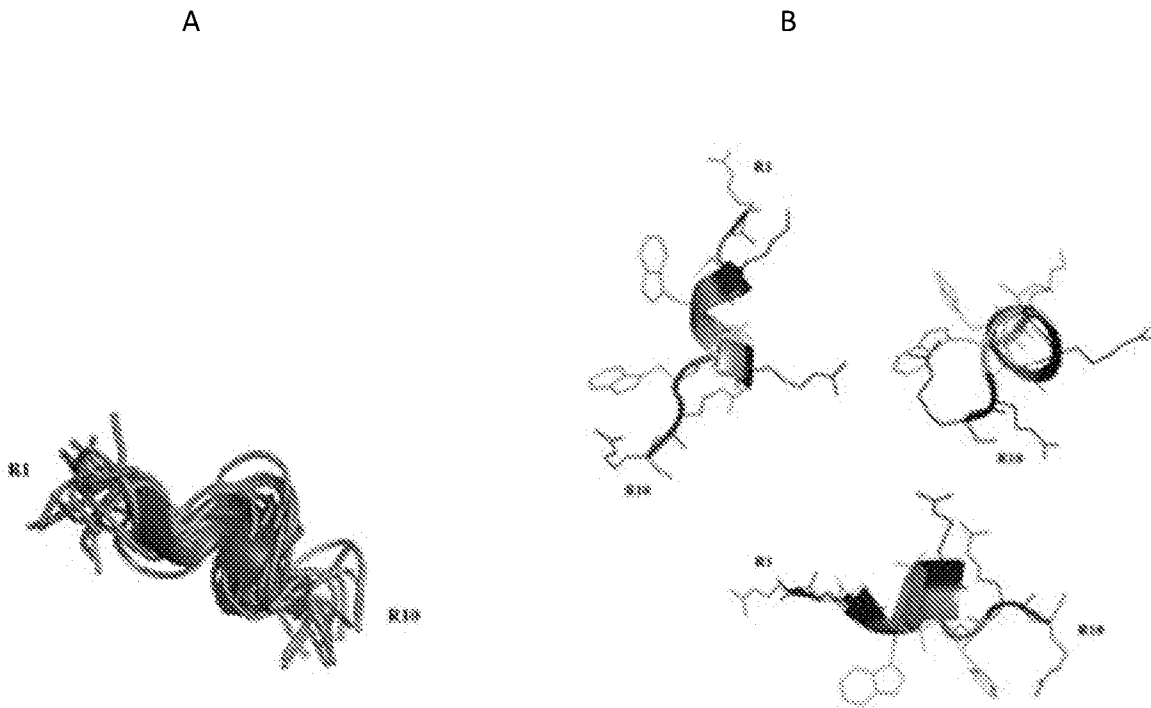


FIG. 3b

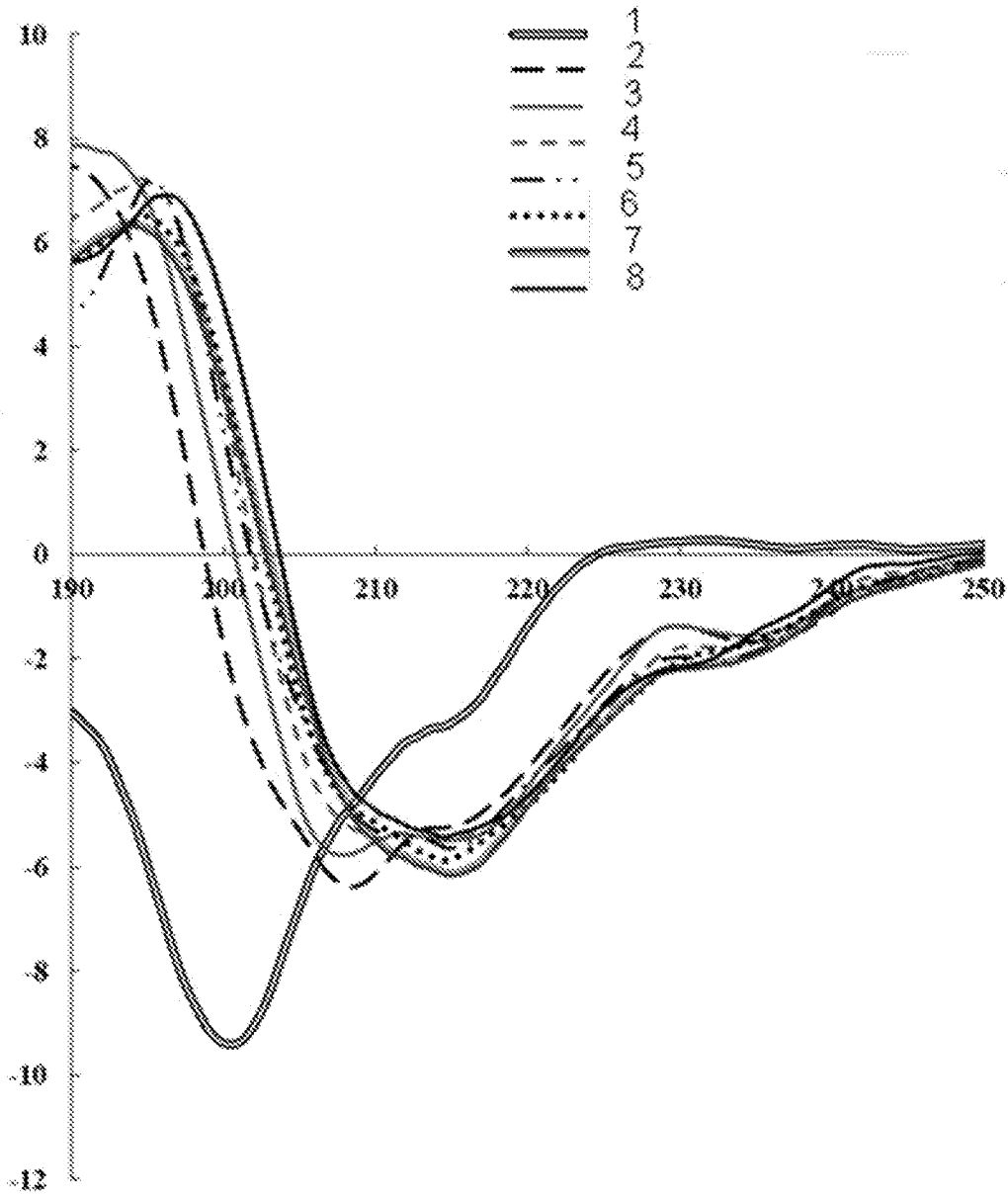


FIG.4

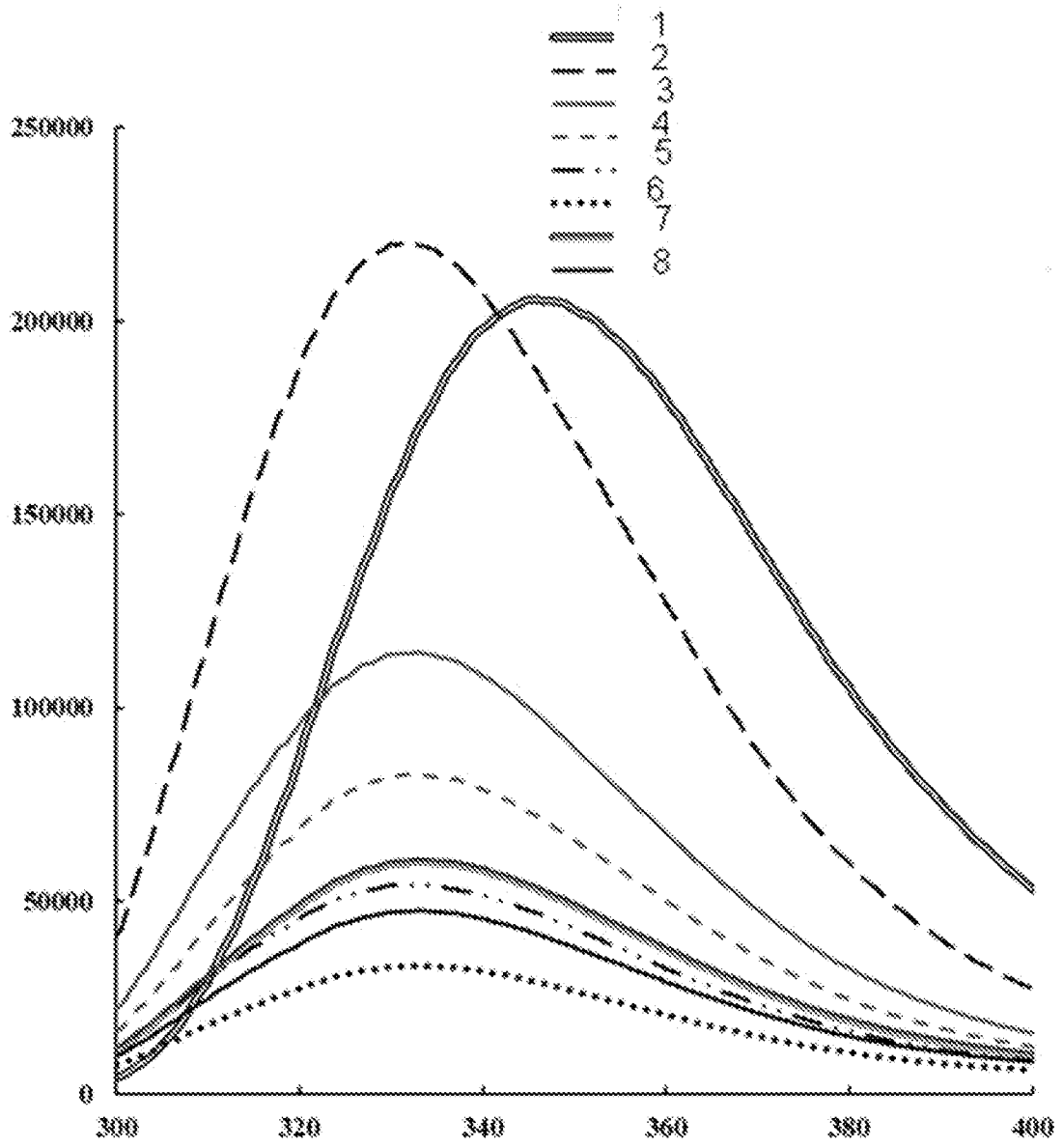


FIG. 5

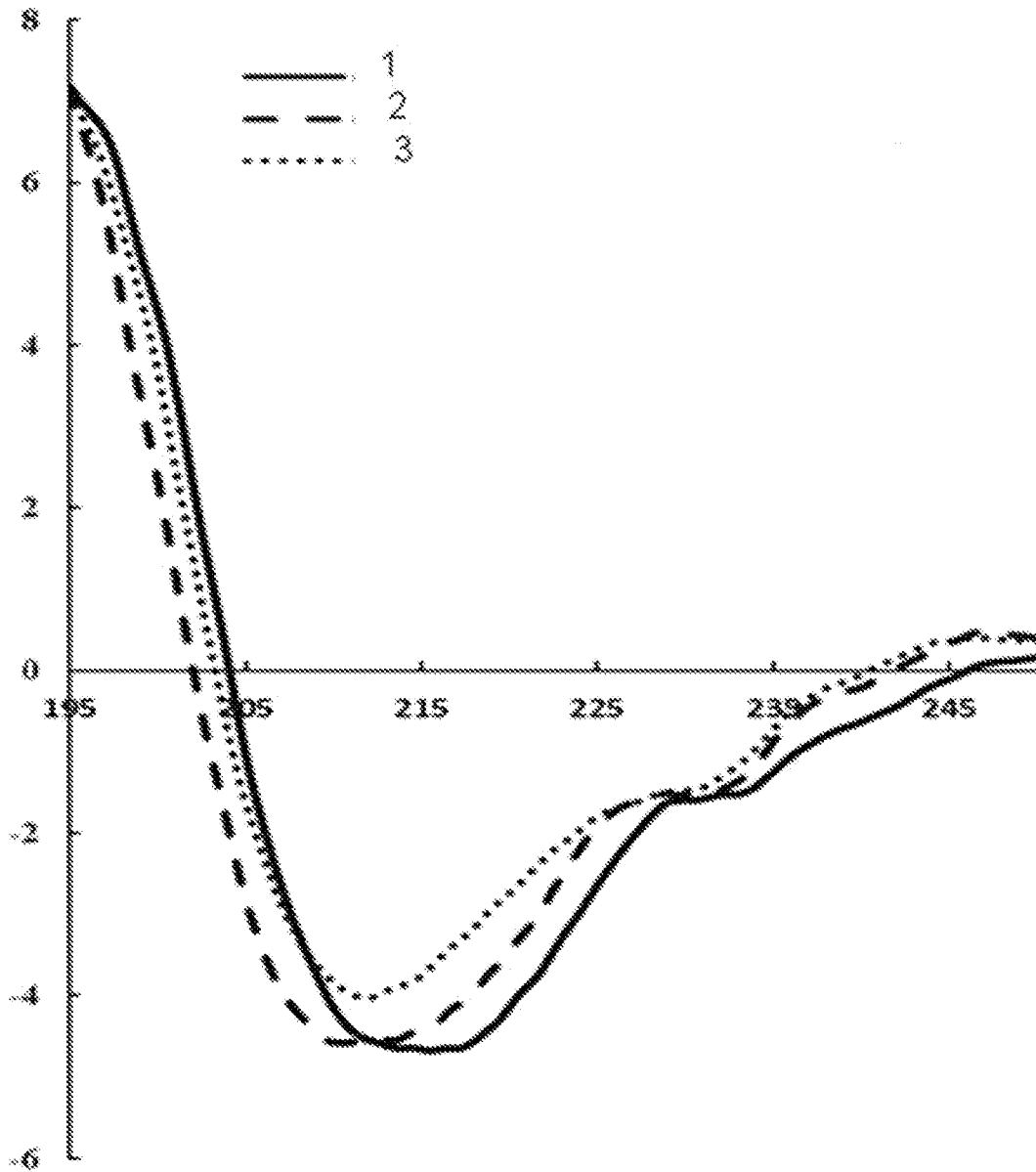


FIG. 6

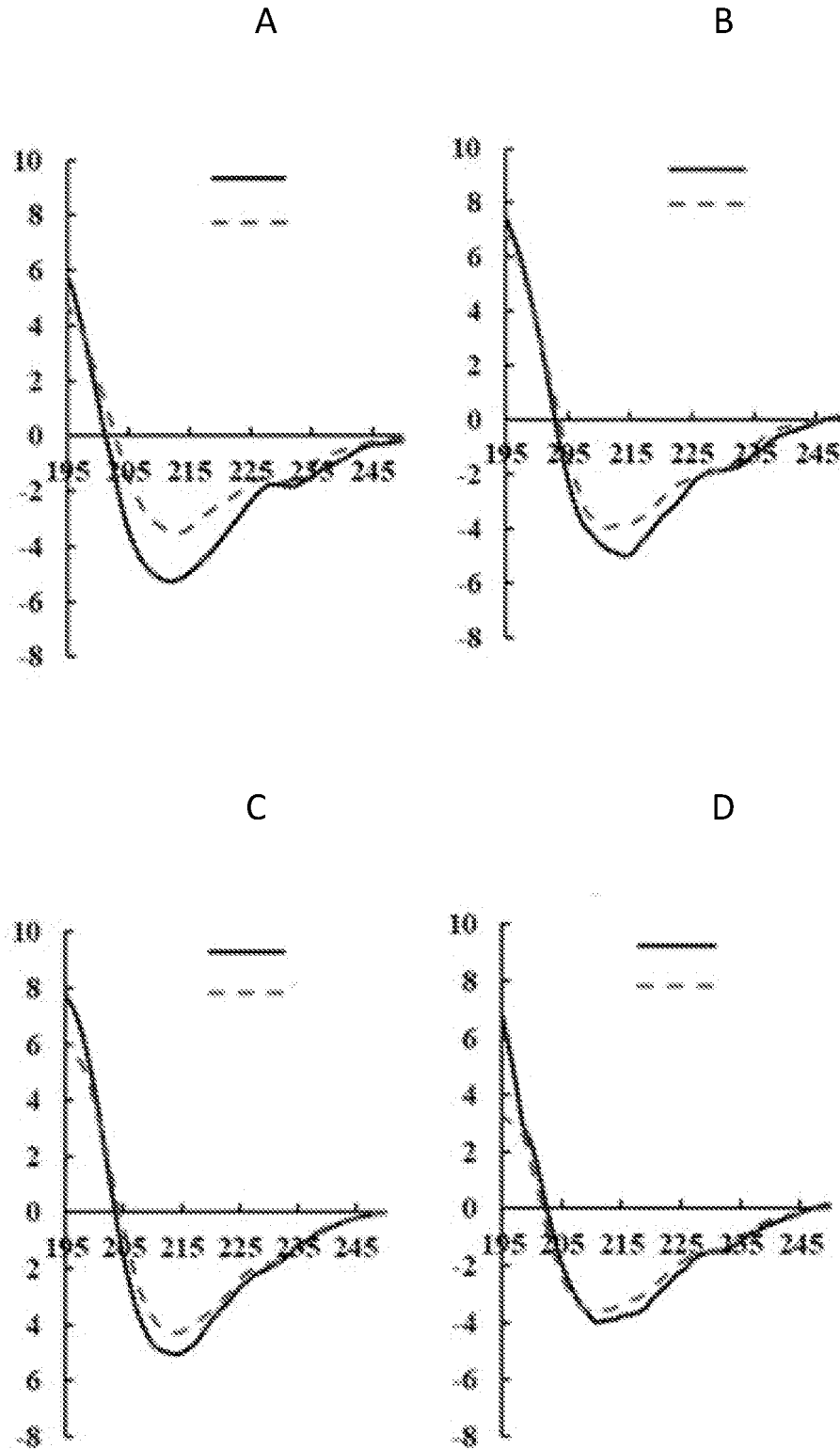


FIG. 7

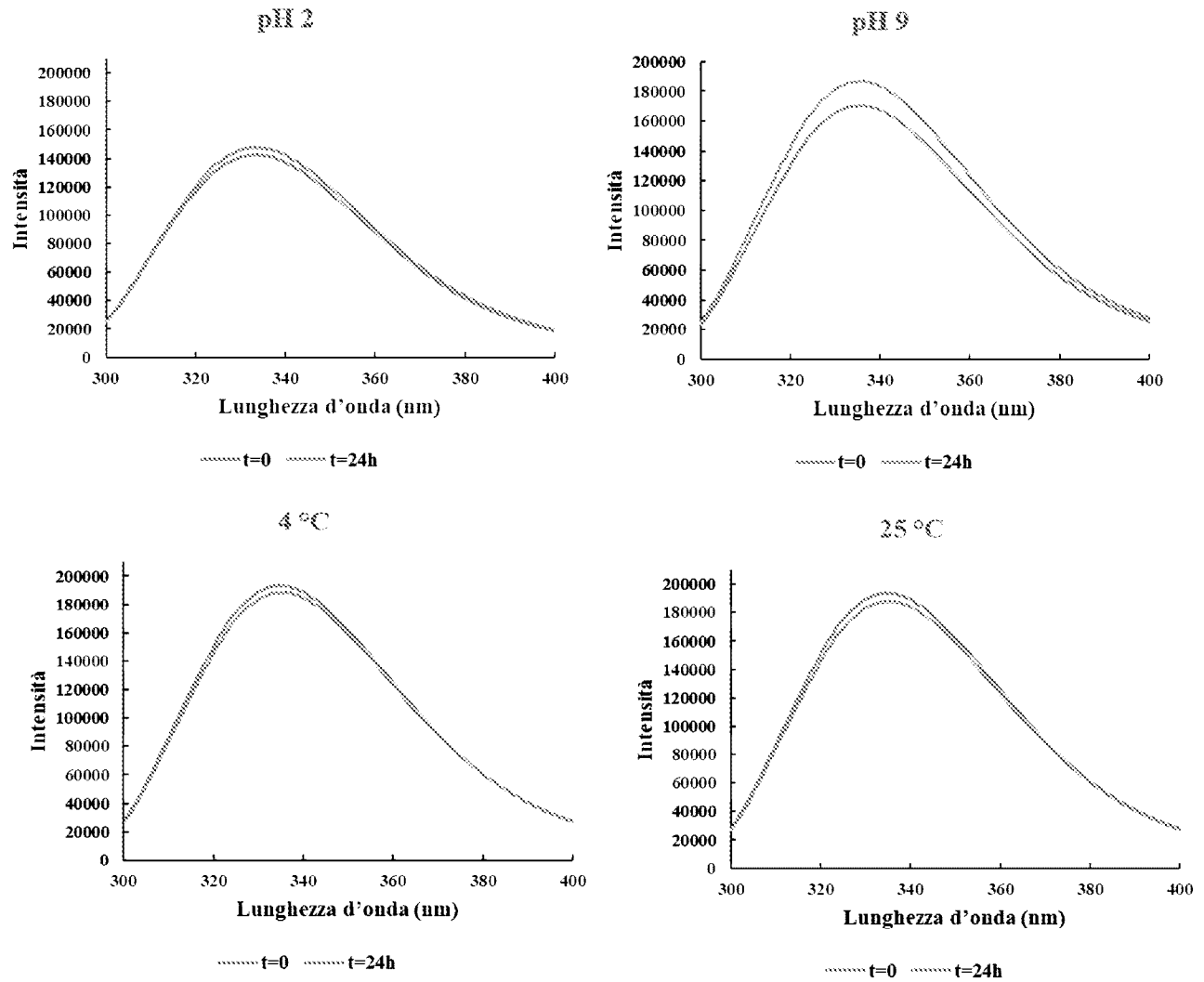


FIG. 8

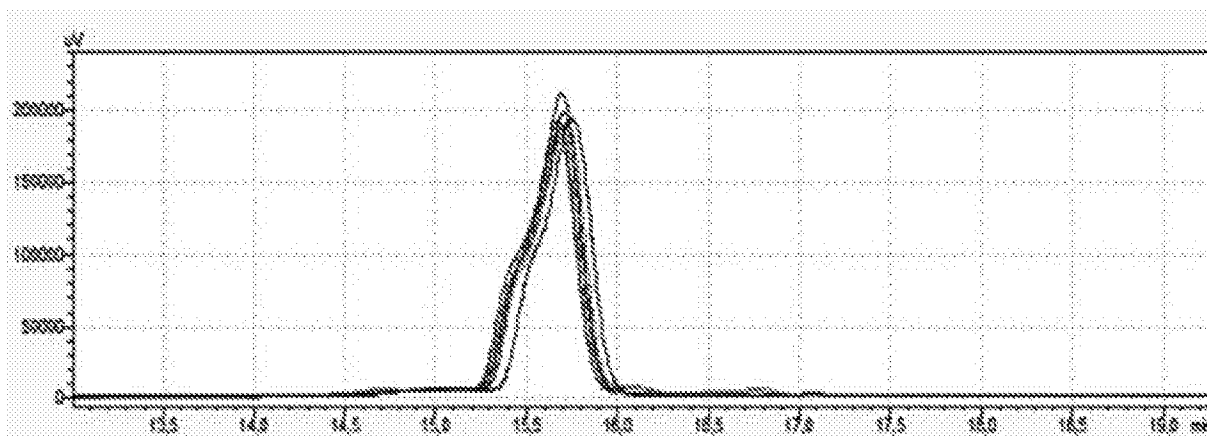


FIG. 9

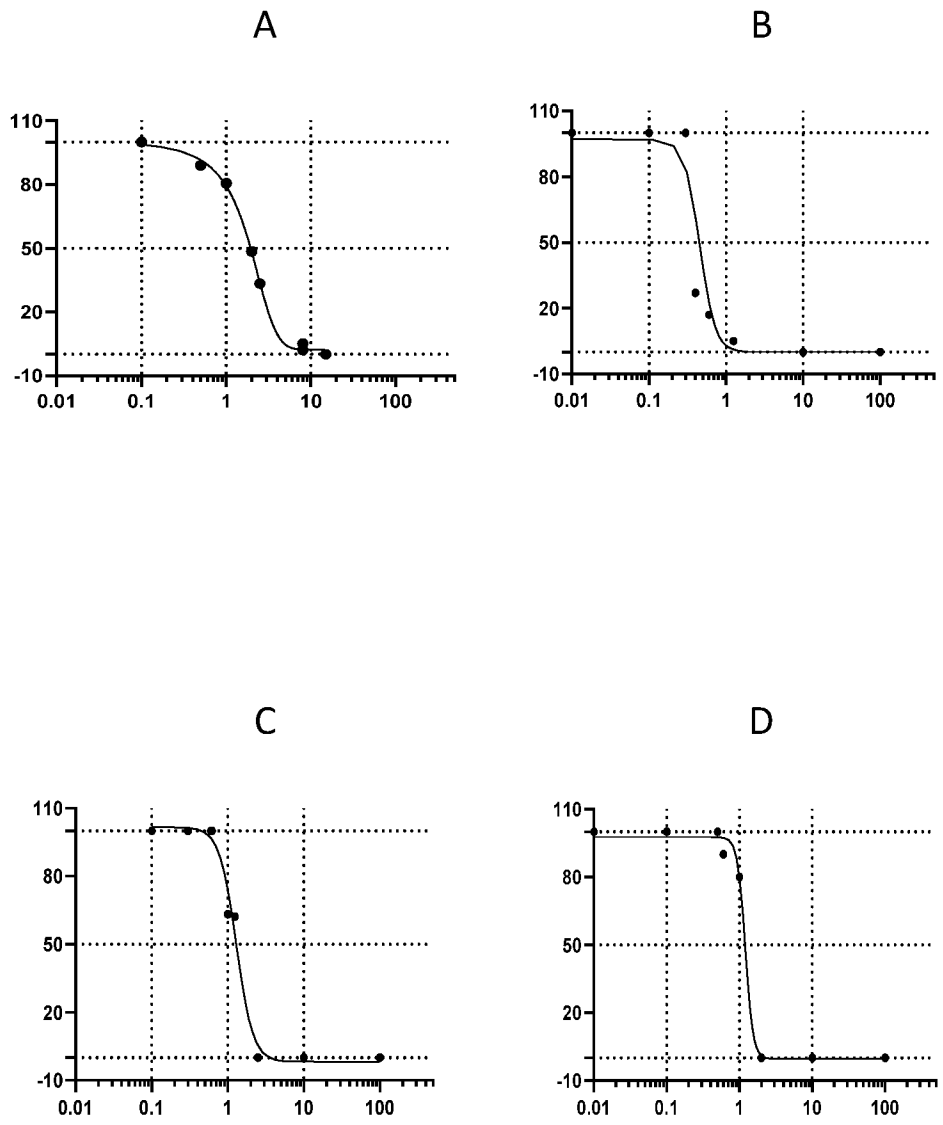


FIG. 10

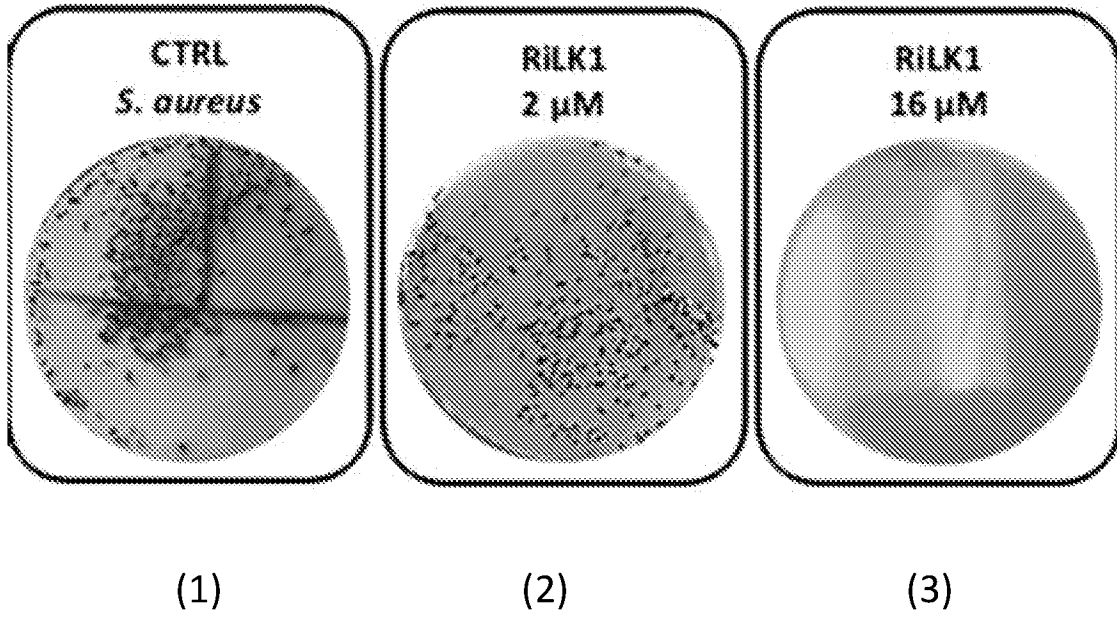


FIG. 11a

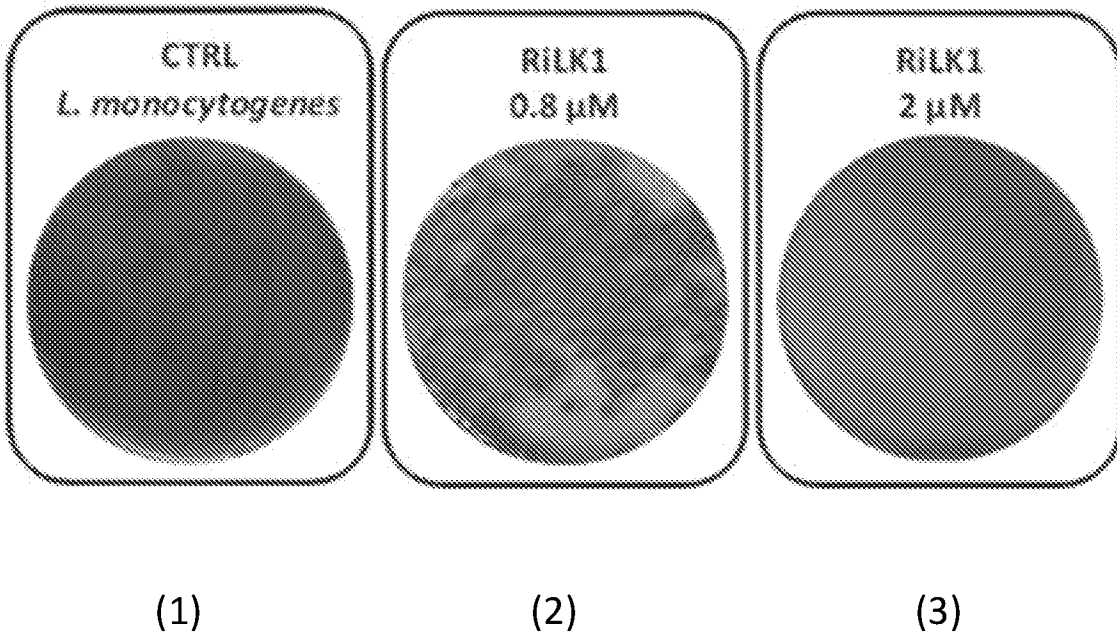


FIG. 11b

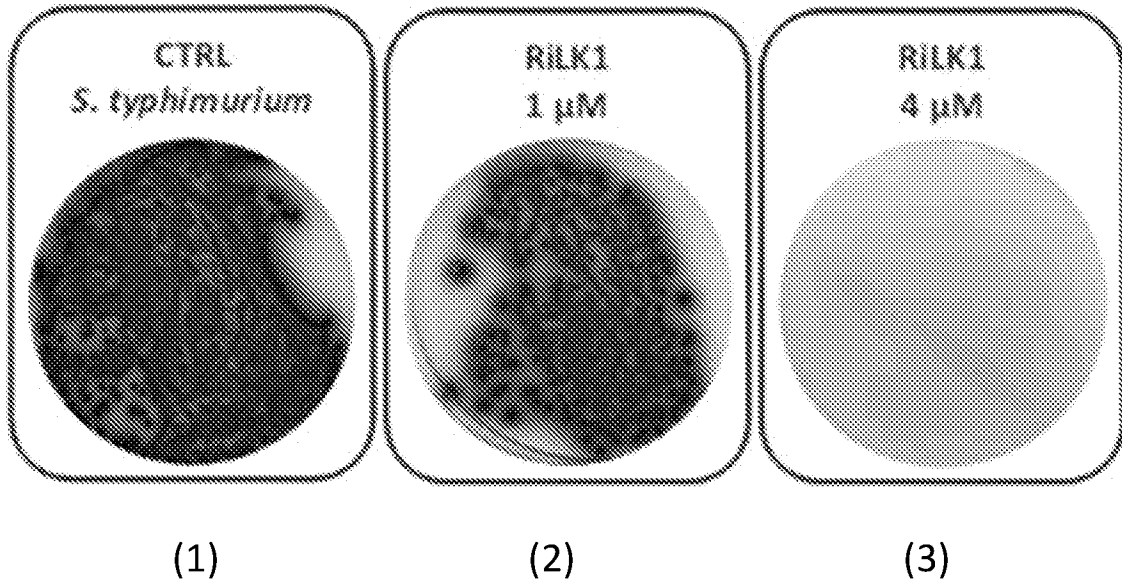


FIG. 11c

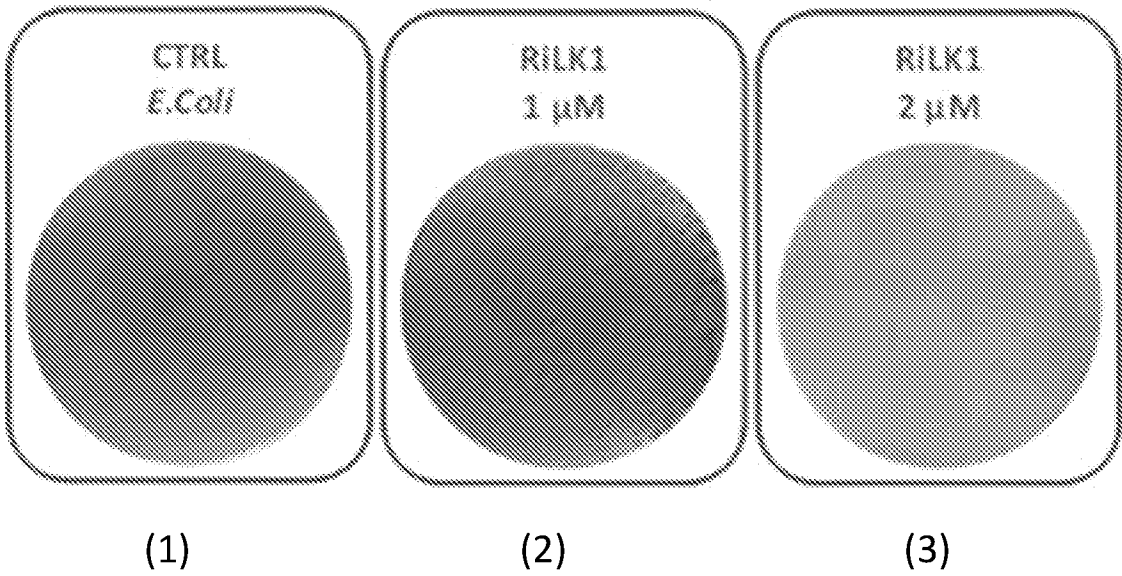


FIG. 11d

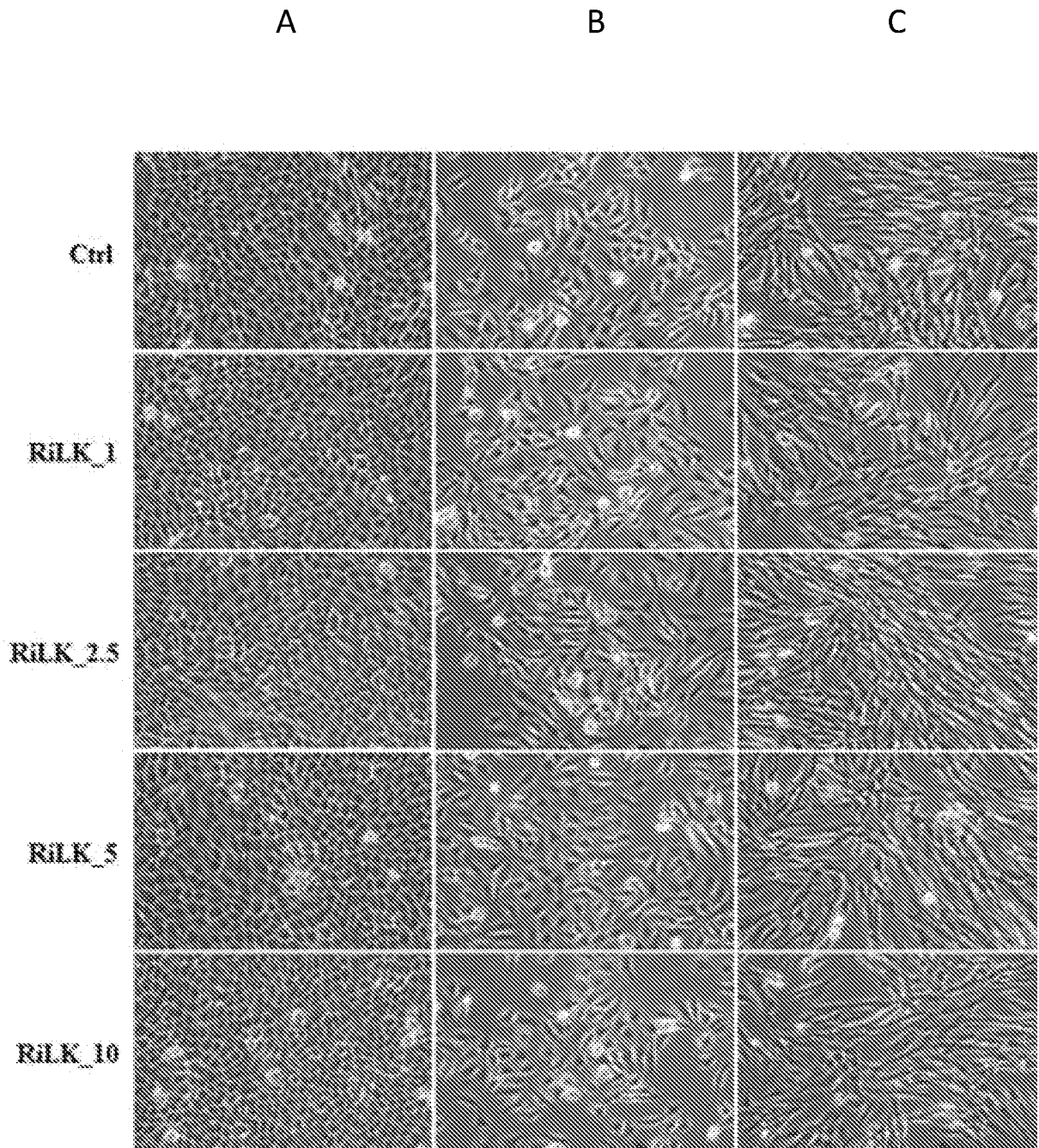


FIG. 12

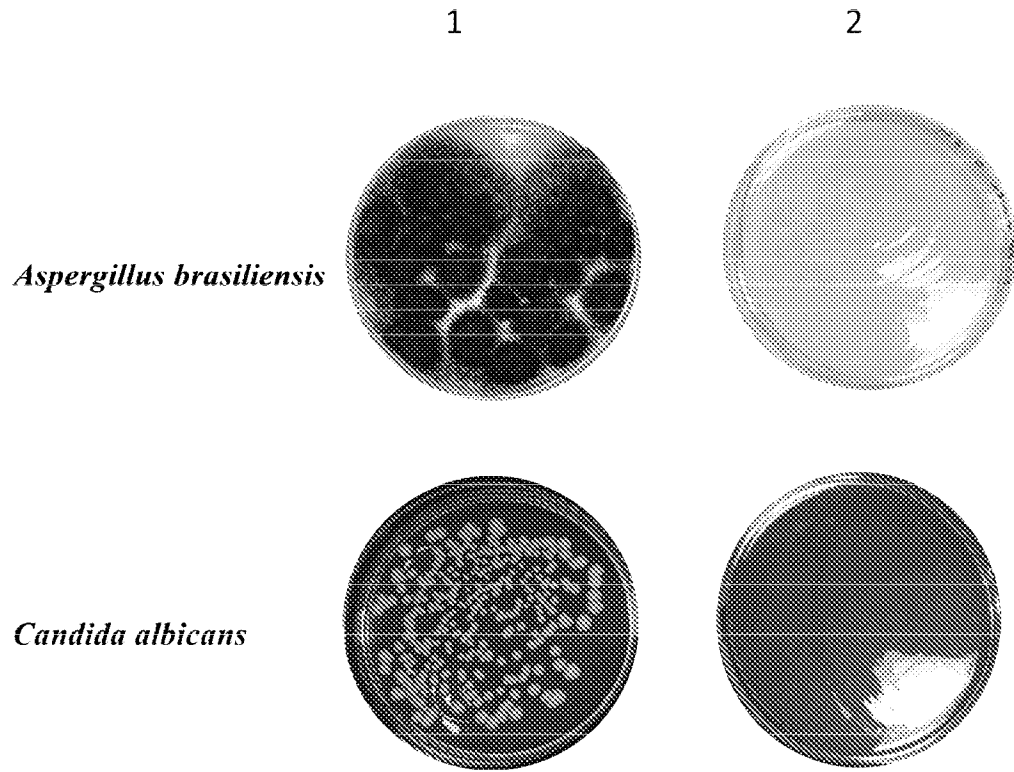


FIG. 13

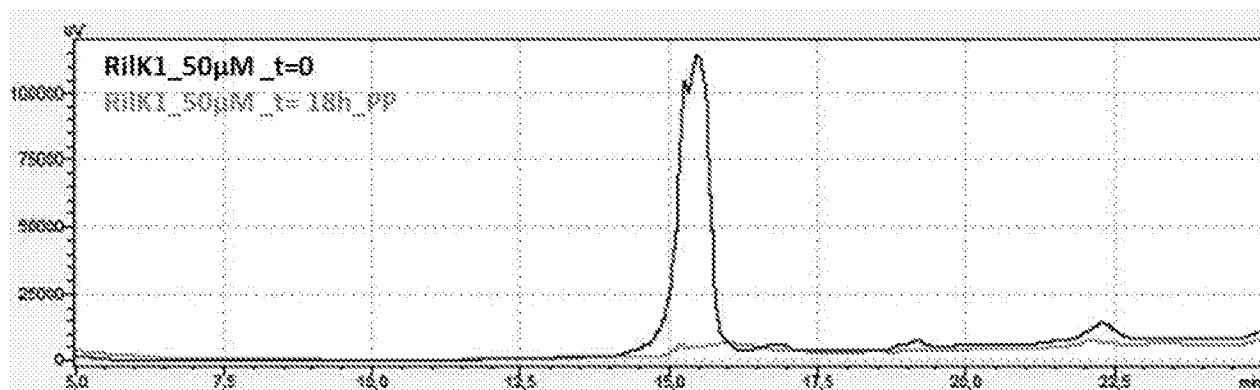


FIG. 14