

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247266 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442687**

(22) Data zgłoszenia: **2022.10.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.05.06 BUP 19/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.09 WUP 23/2025**

(51) MKP:

C07K 14/00 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA RZESZOWSKA IM. IGNACEGO
ŁUKASIEWICZA, Rzeszów, PL
PODKARPACKIE CENTRUM INNOWACJI
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Rzeszów, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
ALEKSANDRA BOCIAN, Rzeszów, PL
EWA CISZKOWICZ, Rzeszów, PL
KONRAD HUS, Rzeszów, PL
KATARZYNA LECKA-SZLACHTA,
Chmielnik, PL
JUSTYNA BUCZKOWICZ, Iwonicz, PL
ANDRZEJ ŁYSKOWSKI, Rzeszów, PL

(74) Pełnomocnik:
recz. pat. Henryk Pisiński, Rzeszów, PL

(54) Tytuł:

Peptyd antybakteryjny oraz jego zastosowanie

PL 247266 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest peptyd antybakteryjny oraz jego zastosowanie.

W ostatnim czasie, jednym z ważnych problemów klinicznych, jest występowanie oporności bakterii na klasyczne antybiotyki. Lekooporne bakterie są niezwykle groźnym wyzwaniem dla mikrobiologów i lekarzy, a także przedmiotem intensywnych badań naukowych skupionych na poszukiwaniu nowych czynników, które mogłyby tę oporność przełamać. Z drugiej strony zbyt duży stopień przetworzenia żywności i dążenia do stosowania w jej produkcji substancji pochodzenia naturalnego powodują, że poszukiwane są nowe, bezpieczne i skuteczne substancje antybakteryjne, które mogą być stosowane jako konserwanty żywności.

Głównym problemem w przemyśle spożywczym jest kontaminacja patogenami takimi jak: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* 0157:H7 i *Clostridium botulinum*, co znane jest z publikacji Rai M, Pandit R, Gaikwad S, Kövics G. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. J Food Sci Technol. 2016 Sep; 53(9):3381–3394. doi: 10.1007/s 13197-016-2318-5. Obecnie jedynym, stosowanym na szeroką skalę w przemyśle spożywczym, peptydem antybakteryjnym jest nisin, znany pod nazwą handlową nisaplin™ i sprzedawany w zliofilizowanej formie, co zostało ujawnione w publikacji Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. Ann Rev Food Sci Technol. 2011; 2:299–329. Stosowany jest on jako naturalny konserwant w produkcji serów, co przedstawiono w publikacji Upendra RS, Khandelwal P, Jana K, Ajay Kumar N, Gayathri Devi M, Stephaney ML. Bacteriocin production from indigenous strains of lactic acid bacteria isolated from selected fermented food sources. Int J Pharma Res Health Sci. 2016; 4(1):982–990, jogurtów, co zostało ujawnione w publikacji D'Amato D, Sinigaglia M (2010) Antimicrobial agents of microbial origin: Nisin. In: Bevilacqua A, Rosaria M, Sinigaglia M (Ed) Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability, 1st edn. Bentham Science, USA, pp. 83–91, warzyw w puszkach i soków, co znane jest z publikacji Suganthi V, Selvaranjan E, Subathradevi C, Mohansrinivasan V. Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. Int J Res Pharma. 2012; 3(1): 13–19, piwa, produktów mięsnych i ryb, co zostało ujawnione w publikacji Suganthi V, Selvaranjan E, Subathradevi C, Mohansrinivasan V. Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. Int J Res Pharma. 2012; 3(1): 13–19. W wąskim zakresie stosowane są także inne peptydy AMP takie jak na przykład Pediocin PA-bakteriocyna występująca pod komercyjną nazwą Alta™ 2341, stosowana jako inhibitor wzrostu *L. monocytogenes*, która powoduje psucie się mięsa. Enterocin AS-48 jest stosowany do konserwacji cydru oraz soków owocowych i warzywnych, natomiast Enterocin CCM4231 jest stosowany do konserwacji mleka sojowego, co znane jest z publikacji Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2008; 121:123–138.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe AMP reprezentują cząsteczki obronne rozpowszechnione we wszystkich formach życia, od komórek bakteryjnych do organizmów wielokomórkowych, które odgrywają podstawową rolę w zabijaniu inwazyjnych patogenów, takich jak bakterie, grzyby, pasożyty i wirusy. Ostatnie badania pokazują, że niektóre AMP są aktywne wobec patogenów opornych na konwencjonalne antybiotyki, przez co znajdują one szerokie zastosowanie w medycynie, konserwacji żywności i rolnictwie. Peptydy antybakteryjne AMP to krótkie sekwencje zbudowane z liniowo ułożonych aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Większość znanych peptydów AMP jest wytwarzana przez organizmy zwierząt, ponieważ są jednym z elementów immunologicznej obrony nieswoistej. Jednakże peptydy takie znajdowane są także w jadach zwierząt a także w bakteriach, grzybach lub roślinach. Znane są również sekwencje syntetyczne, zaprojektowane *in silico*. Zdecydowana większość AMP to peptydy o długości od 20 do 50 aminokwasów, ładunku wypadkowym pomiędzy 0 a +5 i stopniu hydrofobowości od 40 do 70%, co zostało przedstawione w publikacji Wang, G. Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. Pharmaceuticals 2013, 6, 728–758.

Peptydy AMP były szeroko testowane na wielu różnych gatunkach bakterii. W zależności od gatunku bakterii, wobec którego aktywność wykazuje peptyd można zaplanować jego wykorzystanie. W publikacji Morais TP, Zaini PA, Chakraborty S, Gouran H, Carvalho CP, Almeida-Souza HO, Souza JB, Santos PS, Goulart LR, Luz JMQ, Nascimento R, Dandekar AM. The plant-based chimeric antimicrobial protein S1P14a-PPC20 protects tomato against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Sci. 2019 Mar; 280:197–205. Doi: 10.1016/j.plantsci.2018.11.017. Epub 2018 Nov 29.

PMID: 30823998 wykazano, że chimeryczne peptydy zastosowane przeciwko *Ralstonia solanacearum*, patogenowi pomidorów wykazywały minimalne stężenie hamujące – wartość MIC – w zakresie od 25 do 100 μM . Z kolei AMP pochodzące z jadu węży mają szeroki zakres wartości MIC w zależności od gatunku bakterii, na którym dany peptyd testowano. Dla *E. coli* były to wartości zaczynające się od 0,25 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla *Staphylococcus aureus* 4 $\mu\text{g/ml}$, co wykazano w publikacji Pérez-Peinado, C.; Defaus, S.; Andreu, D. Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs. *Toxins* 2020, 12, 255. Natomiast w publikacji Huang, Y.-T., Kumar, S. R., Chan, H.-C., Jhan, Z.-H., Chen, D. W., & Lue, S. J. (2021). *Efficacy of antimicrobial peptides (AMPs) against Escherichia coli and bacteria morphology change after AMP exposure. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 126, 307–312 wykazano, że syntetyczne AMP miały właściwości hamujące względem *E. coli* a wartość MIC najefektywniejszego z nich wynosiła 3 $\mu\text{g/ml}$. Syntetyczne AMP testowano także względem *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus*, dla których uzyskano wartość MIC 125 $\mu\text{g/ml}$, co przedstawiono w publikacji Kampshoff, F.; Willcox, M.D.P.; Dutta, D. A Pilot Study of the Synergy between Two Antimicrobial Peptides and Two Common Antibiotics. *Antibiotics* 2019, 8, 60. Zgodnie z wytycznymi AMP Database, bazy, która deponuje peptydy antybakteryjne i antydrobnoustrojowe, za peptyd z potwierdzonymi wspomnianymi właściwościami uważa się peptyd, którego MIC jest niższe niż 100 μM lub 100 $\mu\text{g/ml}$.

Różne szczepy bakteryjne mogą stanowić przyczynę zatruc pokarmowych: *Escherichia coli*, występujący w niedogotowanym mięsie, surowych warzywach, *Klebsiella pneumoniae*, występujący w surowym mięsie, warzywach i owocach, co zostało wskazane w publikacji Hartantyo SHP, Chau ML, Koh TH, Yap M, Yi T, Cao DYH, Gutierrez RA, Ng LC. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety. *Journal of Food Protection* 2020, Vol 83, No. 7, pp: 1096–1103, *Listeria monocytogenes*, występująca w miękkich serach, wędlinach, co zostało przedstawione w publikacji Shamloo E, Hosseini H, Moghadam ZA, Larsen MH, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. 2019, Iranian Journal Veterinary Research. 2019 20(4): 241–254, *Pseudomonas aeruginosa*, występująca w mleku, mięsie, rybach, owocach i warzywach, *Salmonella enterica*, występująca w surowych jajach, niedogotowanym drobiu, co przedstawiono w publikacji Kim YK, Roy PK, Ashrafudoulla M, Nahar S, Tousehik SH, Hossain MI, Mizan MFR, Park SH, Ha SD. Antibiofilm effects of quercetin against *Salmonella enterica* biofilm formation and virulence, stress response, and quorum-sensing gene expression. 2022 Volume 137, Article Number 108964, *Shigella flexneri*, występująca w niedogotowanych warzywach, skorupiakach i produktach mlecznych, co przedstawiono w publikacji Shahin K, Bouzari M, Wang R, Khoroshani MR. Distribution of antimicrobial resistance genes and integrons among *Shigella* spp. isolated from water sources. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2019, 19, 122–128, *Staphylococcus aureus*, występująca w mięsie, drobiu, mleku, warzywach, co zostało przedstawione w publikacji Oniciuc EA, Cerca N, Nicolau AI. Frontiers in Microbiology 2016, Compositional Analysis of Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources. *Frontiers in Microbiology* 7:390.

Celem wynalazku jest opracowanie peptydu antybakteryjnego, który będzie wykorzystywany do zabezpieczenia żywności przed negatywnym wpływem bakterii na świeżość produktów, a jednocześnie będzie bezpieczny dla zdrowia człowieka.

Istota wynalazku jest określona w sposób następujący.

Peptyd antybakteryjny o sekwencji KLIPLFSLKLIPLFSLKLIPLFSL-NH₂.

Zastosowanie peptydu antybakteryjnego według wynalazku jako środka konserwującego dla produktów żywnościowych względem bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych.

Korzystne zastosowanie peptydu antybakteryjnego według wynalazku jako środka konserwującego względem bakterii *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* lub *Listeria monocytogenes*.

Peptyd antybakteryjny według wynalazku wykazuje właściwości antybakteryjne względem bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* ATCC10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Shigella flexneri* ATCC12022, *Salmonella enterica* ATCC 12325 oraz Gram-dodatniej *Listeria monocytogenes* ATCC 2249. Ten peptyd stosowany do konserwacji żywności może przedłużyć okres przydatności do spożycia dzięki właściwościom antybakteryjnym, hamując zasadniczo wzrost i reprodukcję mikroorganizmów. Jest on biokompatybilny i biodegradowalny *in vivo*, a ponadto jest nieszkodliwy dla konsumenta i nie wpływa na jakość produktów spożywczych. Dodatek peptydu według wynalazku do produktów spożywczych nie wpływa na ich smak, konsystencję i zapach, a także

nie zmienia jego właściwości fizycznych, chemicznych ani biologicznych. Jest on nietoksyczny dla ludzi i termoodporny. Dzięki swoim właściwościom znajduje zastosowanie jako alternatywa dla chemicznych konserwantów.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia wyniki analizy właściwości antybakteryjnych peptydu antybakteryjnego według wynalazku przeprowadzonej metodą mikrorozcieńczeń na 96-dołkowej płytce.

Peptyd antybakteryjny, według wynalazku, o sekwencji KLIPLFSKLKLIPLFSKLKLIPLFSK-NH₂ ma wzór chemiczny C₁₅₃H₂₅₉N₃₃O₂₉. Masa molowa tego peptydu wynosi 3024,89 Da. Peptyd wykazuje hydrofobowość rzędu 54% a jego ładunek netto wynosi + 6.

Inne parametry peptydu antybakteryjnego według wynalazku:

- uśredniona hydropatia peptydu GRAVY – the Grand Average hydropathy value of the peptide = 0,83461538461538;
- hydrofobowość peptydu według Wimleya-White'a – The Wimley-White whole-residue hydrophobicity of the peptide = -1,12;
- Indeks Bomana, współczynnik oddziaływań białko-białko – Protein-binding Potential – Boman index = -0,75 kcal/mol.

Peptyd antybakteryjny według wynalazku zawiera aminokwasy w następujących ilościach:

- Aminokwasy hydrofobowe: I: 3 V: 0 L: 8 F: 3 C: 0 M: 0 A: 0 W: 0
- Glicyna i Prolina: G: 0 P: 3
- Ujemnie naładowane aminokwasy: E: 0 D: 0
- Dodatnio naładowane aminokwasy: K: 6 R: 0 H: 0
- Inne aminokwasy: T: 0 S: 3 Y: 0 Q: 0 N: 0

Udział procentowy poszczególnych aminokwasów w peptydzie antybakteryjnym według wynalazku jest następujący:

- Ile = 12%
- Val = 0%
- Leu = 31%
- Phe = 12%
- Cys = 0%
- Met = 0%
- Ala = 0%
- Trp = 0%
- Gly = 0%
- Pro = 12%
- Thr = 0%
- Ser = 12%
- Tyr = 0%
- Gln = 0%
- Asn = 0%
- Glu = 0%
- Asp = 0%
- His = 0%
- Lys = 23%
- Arg = 0%

Zastosowanie peptydu antybakteryjnego, według wynalazku, który ma sekwencję KLIPLFSKLKLIPLFSKLKLIPLFSK-NH₂ i wzór chemiczny C₁₅₃H₂₅₉N₃₃O₂₉, jako środka konserwującego dla produktów żywnościowych względem bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* lub *Listeria monocytogenes*.

Ocenę *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej peptydu przeprowadzono wg metodologii Clinical & Laboratory Standards Institute.

Roztwór wyjściowy bakterii przygotowano przez inkubację pierwszej lub drugiej hodowli bakteryjnej w pożywce Mueller Hinton Broth MHB przez czas od 12 do 18 godzin w 37°C na wytrząsarce orbitalnej. Hodowlę prowadzono do momentu uzyskania gęstości 10⁸ komórek/mL. Z tak przygotowanej hodowli w wyniku 1000-krotnego rozcieńczenia uzyskano hodowlę roboczą o gęstości 10⁵ komórek/mL, którą wykorzystano w kolejnych etapach. W każdym dniu badania przygotowywano seryjne 2-krotne

rozcieńczenie związków na mikrotitracyjnych płytkach 96-dołkowych i dodawano bakterie z hodowli roboczej. Wyjściowe stężenie peptydu wynosiło 3 mg/mL, a zakres badanych stężeń wynosił od 0,046 µg/mL do 1,5 mg/mL. Płytki następnie inkubowano w 37°C w otaczającym powietrzu przez czas od 18 do 24 godzin. Następnie analizowano stopień zmętnienia hodowli w dołkach zawierających określone stężenie badanego związku i sprawdzano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm. Najniższe stężenie związku, które całkowicie hamowało wzrost hodowli bakteryjnej zostało określone jako minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*. Uzyskane wyniki pokazano w tabeli 1 oraz na fig. 1, na której biała ramka wskazuje na najniższe stężenie peptydu, które całkowicie hamuje wzrost bakterii, najwyższe stężenie peptydu znajduje się w najwyższym rzędzie, a w niższych rzędach znajdują się seryjne 2-krotne rozcieńczenia peptydu. W tabeli 1 przedstawiono natomiast wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii uzyskane dla peptydu antybakteryjnego według wynalazku.

Tabela 1

Szczep bakteryjny	AMPAB10
	MIC [µg/mL]
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	2,93
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	5,86
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	1,46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	187,50
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 12325	93,75
<i>Listeria monocytogenes</i> SID 2249	5,86

Wykazano, że peptyd antybakteryjny, według wynalazku, ma aktywność inhibicji wzrostu bakterii powodujących zatrucia pokarmowe i może być powszechnie stosowany jako związek przeciwbakteryjny, zwłaszcza jako konserwant żywności. Najwyższą średnią aktywność wykazał wobec *S. flexneri* ATCC 12022, zaś najniższą wobec *P. aeruginosa* ATCC, natomiast zróżnicowaną wobec pozostałych szczepów bakteryjnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Peptyd antybakteryjny o sekwencji KLIPLF~~SK~~KLIPLF~~SK~~KLIPLF~~SK~~-NH₂.
2. Zastosowanie peptydu antybakteryjnego określonego w zastrz. 1 jako środka konserwującego dla produktów żywnościowych względem bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych.
3. Zastosowanie peptydu antybakteryjnego według zastrz. 2 jako środka konserwującego względem bakterii *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* lub *Listeria monocytogenes*.

Rysunek

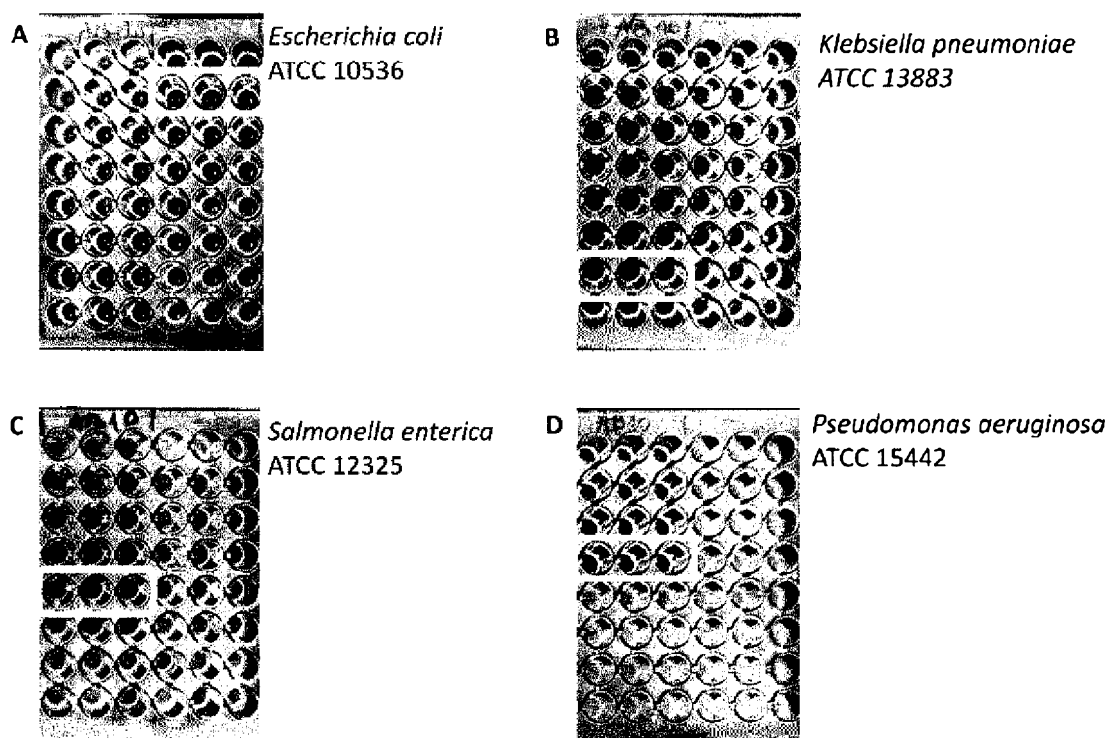


Fig. 1