

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 965**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2012 PCT/AU2012/000112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12106759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012 E 12744866 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2673365**

54 Título: **Defensinas vegetales modificadas útiles como agentes antipatógenos**

30 Prioridad:

**07.02.2011 US 201161440309 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**HEXIMA LIMITED (100.0%)  
La Trobe Institute for Molecular Science, Level 4,  
LIMS 2, La Trobe University  
Melbourne, Victoria, 3086, AU**

72 Inventor/es:

**VAN DER WEERDEN, NICOLE y  
ANDERSON, MARILYN, ANNE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 660 965 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Defensinas vegetales modificadas útiles como agentes antipatógenos

## 5 Datos de presentación

Esta solicitud está asociada con y reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Americana N.º 61/440.309 presentada el 7 de febrero de 2011, titulada "Anti-patogenic agents"

## 10 Campo

Esta descripción se refiere generalmente al campo de los agentes antipatógenos, incluyendo una molécula de defensina modificada con actividad antipatógena. También se proporcionan plantas genéticamente modificadas y su progenie o partes que expresan o contienen la defensina modificada y composiciones antipatógenas para su uso en horticultura y agricultura y como medicamentos para animales y seres humanos.

## Antecedentes

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidos por autor en esta memoria se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria no es, y no se debería tomar como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

Una de las principales dificultades que afronta las industrias hortícolas y agrícolas es el control de infestación y daño resultante por patógenos tales como patógenos fúngicos. Los patógenos de plantas suponen millones de toneladas de pérdida de producción anualmente. Aunque los fungicidas y otros agentes químicos antipatógenos se han empleado con éxito, hay un rango de asuntos ambientales y reguladores relacionados con el uso continuado de agentes químicos para controlar las plagas vegetales. Además, el uso creciente de pesticidas químicos está proporcionando presión selectiva para el surgimiento de la resistencia en poblaciones de plagas. Hay una clara necesidad de desarrollar mecanismos alternativos de inducción de resistencia en plantas a patógenos tales como hongos, insectos, microorganismos, nematodos, arácnidos, protozoos y virus.

El sistema inmunitario innato vegetal comprende tanto componentes constitutivos o preformados como inducibles. La inmunidad preformada incluye diversas barreras físicas tales como capas de cera sobre las hojas y paredes celulares rígidas así como la expresión de diversas proteínas antimicrobianas (Numberger y col. (2004) *Immunol Rev.* 198:249-266). La respuesta inducible puede incluir fortificación de la pared celular (Showalter (1993) *Plant Cell* 5(1):9-23) así como la regulación al alza de metabolitos secundarios (Metten y col. (2009) *Plant Cell Environ.* 32(6):641-653) y proteínas antimicrobianas (Berrocal-Lobo y col. (2002) *Plant Physiol.* 128(3):951-961; Li y Asiegbu (2004) *J. Plant Res.* 117(2):155-162) que se dan en respuesta a diversos estímulos bióticos y abióticos. Estas respuestas se pueden dar localmente en el sitio de infección o en partes distantes no infectadas de la planta para producir una respuesta sistémica. La inmunidad inducible también se puede dar por una respuesta gen a gen por la cual se reconocen los patrones moleculares asociados a patógeno (PMAP) mediante receptores de reconocimiento de patrón (RRP) específicos dando como resultado una respuesta hipersensible que previene además la propagación del patógeno (véase Jones y Dangl (2006) *Nature* 444(7117):323-329).

Las proteínas ricas en disulfuro pequeñas juegan un gran papel en tanto los aspectos constitutivos como inducibles de la inmunidad vegetal. Se pueden categorizar en familias basadas en sus disposiciones de la cisteína e incluyen las tioninas, esnakinas, proteínas similares a taumatina, proteínas tipo haveína y knotina, proteínas de transferencia de lípidos y ciclótidos así como defensinas.

Las defensinas vegetales son pequeñas (45 a 54 aminoácidos), proteínas básicas con cuatro a cinco enlaces disulfuro (Janssen y col. (2003) *Biochemistry* 42(27):8.214-8.222). Comparten un patrón de unión disulfuro común y un pliegue estructural común, en el que una  $\beta$ -lámina antiparalela de cadena triple se une a una hélice  $\alpha$  por tres enlaces disulfuro, formando un motivo  $\alpha\beta$  estabilizado con cisteína (CS $\alpha\beta$  [véase la Figura 1]). Un cuarto enlace disulfuro también se une a los terminales N y C conduciendo a una estructura extremadamente estable. Se han atribuido una diversidad de funciones a las defensinas, incluyendo actividad antibacteriana, inhibición de la síntesis de proteína e inhibición de la  $\alpha$ -amilasa y proteasa (Colilla y col. (1990) *FEBS Lett* 270(1-2):191-194; Bloch y Richardson (1991) *FEBS Lett* 279(1):101-104). Las defensinas vegetales se han expresado en plantas transgénicas, dando como resultado resistencia incrementada a patógenos objeto. Por ejemplo, patatas que expresan la defensina de alfalfa (MsDefl, previamente conocida como alfAFP) mostraron resistencia significativa frente al patógeno fúngico *Verticillium dahliae* en comparación con los controles no transformados (Gao y col. (2000) *Nat. Biotechnol* 18(12):1.307-1.310). La expresión de una defensina de Dahlia (DmAMP1) en arroz era suficiente para proporcionar protección frente a dos patógenos de arroz principales, *Magnaporthe oryzae* y *Rhizoctonia solani* (Jha y col. (2009) *Transgenic Res.* 18(1):59-69).

A pesar de su estructura conservada, las defensinas vegetales comparten muy poca secuencia de identidad, con solamente los ocho restos de cisteína completamente conservados. Los restos de cisteína se denominan normalmente “restos de cisteína invariantes”, ya que su presencia y localización están conservadas entre las defensinas. En base a la similitud de secuencia, las defensinas vegetales se pueden categorizar en grupos diferentes (véase la Figura 2). Dentro de cada grupo, la homología de secuencia es relativamente alta mientras que la similitud de aminoácidos intergrupo es baja. Las defensinas antifúngicas de distintos grupos parecen actuar por diferentes mecanismos.

Las defensinas vegetales se pueden dividir en dos clases principales. Las defensinas Clase I consisten en una secuencia señal del retículo endoplasmático (RE) seguido de un dominio de defensina maduro. Las defensinas Clase II se producen como precursores mayores con prodominios o propéptidos C-terminales (PPCT) de aproximadamente 333 aminoácidos. La mayoría de las defensinas Clase II identificadas hasta la fecha se han encontrado en especies vegetales solanáceas. Una alineación de defensinas solanáceas Clase II se proporciona en la Figura 3. NsD1 y NsD2 referidas en la Figura 3 representan novedosas defensinas identificadas según la presente descripción. Su inclusión en la Figura 3 no es para suponer que forman parte de la técnica anterior.

Las defensinas solanáceas Clase II muestran actividad antifúngica y se expresan en los tejidos florales. Incluyen NaD1, que se expresa en altas concentraciones en las flores de tabaco ornamental *Nicotiana glauca* (Lay y col. (2003) *Plant Physiol.* 131(3):1.283-1.293). NaD1 es la única defensina solanácea Clase II para la que se ha investigado el mecanismo de actividad antifúngica. La actividad de este péptido implica la unión a la pared celular, permeabilización de la membrana plasmática y entrada del péptido en el citoplasma de la hifa (van der Weerden y col. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(21):14.445-14.452). A diferencia de muchas otras defensinas, NaD1 parece ser específica para hongos filamentosos y no tiene efecto sobre el crecimiento de levadura, bacterias o células de mamíferos.

La expresión de NaD1 en algodón aumenta la resistencia a los patógenos fúngicos *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* y *Verticillium dahliae*. Bajo condiciones de campo, las plantas que expresan NaD1 son dos veces tan probable de supervivencia como las plantas control no transformadas y el rendimiento de pelusa (*lint yield*) por hectárea era doble. A pesar de esto, aún había un nivel significativo de enfermedad en las plantas que expresaban NaD1.

La estructura de las defensinas consiste en siete “bucles”, definidos como las regiones entre los restos de cisteína. El bucle 1 abarca la primera cadena  $\beta$  (1A) así como la mayoría de la región flexible que conecta esta cadena  $\beta$  con la hélice  $\alpha$  (IB) entre los dos primeros restos de cisteína invariantes. La Figura 5 muestra la estructura bucle de NaD1 que incluye los restos de cisteína conservados. Los bucles 2, 3 y el comienzo de 4 (4A) componen la hélice  $\alpha$ , mientras los bucles restantes (4B-7) componen las cadenas  $\beta$  2 y 3 y la región flexible que los conecta (región horquilla  $\beta$ ). Esta región horquilla de las defensinas vegetales forma un motivo núcleo y que se encuentra en muchos péptidos antimicrobianos de diversas clases (Yount y Yeaman (2005) *Protein Pept. Lett* 12(1):49-67).

Esta región horquilla  $\beta$  parece ser fundamental para la actividad biológica de las defensinas vegetales. Las mutaciones en esta región de la defensina del rábano RsAFP2 (véase Figura 2) generalmente tenía un impacto negativo sobre su actividad antifúngica. De hecho, ocho de cada doce restos identificados como fundamentales para la actividad antifúngica se localizan en esta región (De Samblanx y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(2):1.171-1.179). Además, un péptido químicamente sintetizado que corresponde a esta región de la molécula también tiene actividad antifúngica solo (Schaaper y col. (2001) *J. Pept. Res.* 57(5):409-418). En un estudio separado, se demostró que los seis restos localizados en el bucle 5 de VrD2, una defensina de *Vigna radiata*, son fundamentales para su actividad inhibidora de la  $\alpha$ -amilasa (Lin y col. (2007) *Proteins* 68(2):530-540). Un tercer estudio investigó la actividad de las proteínas quiméricas que contienen regiones de una defensina con actividad antifúngica (MsDef1) y una sin (MtDef2). Las defensinas quiméricas que contenían la región horquilla  $\beta$ 2- $\beta$ 3 de MsDef1 tenían casi la misma actividad que la proteína MsDef1 completa y las defensinas quiméricas que contenían esta región de MtDef2 no tenían actividad (Spelbrink y col. (2004) *Plant Physiol.* 135(4):2.055-2.067).

Se ha publicado que un bucle flexible que conecta la primera cadena  $\beta$  y la hélice  $\alpha$  localizadas adyacentes y el N-terminal del segundo resto de cisteína invariante (Bucle IB) juega un papel menor en la actividad antifúngica en algunas defensinas cuando se asocian como un parche con restos del Bucle5. Un estudio de mutagénesis de RsAFP2 identificó dos aminoácidos importantes para la actividad que estaban localizadas en esta región (De Samblanx y col, 1997 *supra*). Sin embargo, cuando esta región de la defensina antifúngica MsDef1 se reemplazó por la correspondiente región de la defensina no antifúngica, hubo solamente un modesto cambio en la actividad antifúngica (Spelbrink y col, 2004 *supra*).

Las defensinas solanáceas Clase II tienen grados variables de actividad frente a hongos. Algunas defensinas Clase I presentan muy baja actividad antifúngica. Los intentos de modificar las defensinas para mejorar y ampliar su actividad antipatógena no han sido hasta ahora en gran parte exitosos. El desarrollo de la resistencia a algunas defensinas es también un problema potencial. Hay una necesidad de desarrollar protocolos para manipular el nivel y el espectro de la actividad antipatógena de las defensinas. La creación de un rango de defensinas novedosas con actividad antipatógena también facilita combatir el desarrollo de la resistencia.

El documento US 7.728.190 describe una mutación D8R en el Bucle 1B de la defensina de alfalfa AlfAFP. De Samblanx y col., 1997 (*Journal of Biological Chemistry* 272:1.171-9) describe mutaciones G9R y S12R en el mismo bucle de AFP2 de rábano. Sotchenkov y col., 2005 (*Russian Journal of Genetics* 41:1.194-1.201) enseña una secuencia de defensina SD2 de girasol modificada con sustituciones en las posiciones 8 y 9 o Bucle 1B. El documento WO 2008/128289 enseña la producción de defensinas quiméricas mediante el intercambio del dominio de propéptido C-terminal presente en las defensinas solanáceas para el correspondiente dominio de otras defensinas.

## Sumario

Por toda esta memoria, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que supone la inclusión de un elemento indicado o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de método pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de método.

Como se usa en la memoria sujeto, las formas del singular “un”, “una” y “el”, “la” incluyen aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una defensina” incluye una única defensina, así como dos o más defensinas; la referencia a “una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos” incluye una única sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos, así como dos o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos; la referencia al “aspecto” incluye un único aspecto, así como dos o más aspectos como los enseñados en la memoria; y demás.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos son referidas por un número identificador de secuencia (SEQ ID NO). Los SEQ ID NO corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc. Un compendio de los identificadores de secuencia se proporciona en la Tabla 1. Después de las reivindicaciones se proporciona un listado de secuencia.

La presente descripción enseña defensinas solanáceas Clase II artificialmente modificadas que constituyen una nueva familia de defensinas con actividad antipatógena. En una realización, la actividad antipatógena se aumenta en las defensinas solanáceas Clase II modificadas con respecto a *inter alia* una o más del nivel y/o espectro de actividad, estabilidad y/o capacidad de permeabilización de membrana en comparación con la defensina solanácea Clase II antes de la modificación. En la presente memoria se enseña que las defensinas modificadas son útiles en horticultura y agricultura para controlar la infestación por patógeno control y el crecimiento así como en la fabricación de los medicamentos para animales y seres humanos. Se pueden usar solas o en combinación con un patogenicida químico, una proteína antipatógena y/o un inhibidor de proteinasa o forma precursora del mismo. La disponibilidad de la nueva familia de defensinas también ayuda a combatir la resistencia del patógeno a una defensina particular.

Una defensina solanácea Clase II se usa como una cadena principal en la que la región bucle entre la primera cadena  $\beta$  (cadena  $\beta$  1) y la hélice  $\alpha$  en la porción del extremo N-terminal de la defensina (también descrita como el primer bucle flexible) está modificada en la que una región bucle de otra defensina, o una forma modificada de la misma, se injerta sobre la defensina solanácea Clase II para reemplazar toda esta región bucle. La defensina cadena principal también puede comprender opcionalmente mutaciones adicionales fuera de esta región bucle. Cuando existen, de 1 a aproximadamente 50 mutaciones adicionales en la forma de una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se pueden realizar a una o más regiones fuera de la región Bucle 1B.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido de defensina artificialmente modificada aislado con una región bucle (Bucle 1B) entre una primera cadena  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  en su porción del extremo N-terminal y que tiene actividad antifúngica, y en el que dicho Bucle 1B está reemplazado por un bucle 1B de otra defensina, teniendo dicho polipéptido una porción del extremo C-terminal con al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:52 después de alineación óptima.

La descripción incluye convertir un Bucle 1B de defensina solanácea Clase II a una secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio bucle de una defensina Clase I. Alternativamente, otra región Bucle 1B de defensina Clase II se usa para reemplazar un Bucle 1B en una defensina Clase II. La defensina solanácea Clase II modificada también puede contener una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos adicionales fuera de esta región bucle. Si existen, de 1 a aproximadamente 50 mutaciones adicionales pueden estar localizadas fuera de la región bucle. En una realización, la actividad antifúngica está aumentada en comparación con la defensina Clase II antes de la modificación. Por “aumentada” se quiere decir un mejoramiento en uno o más de nivel y/o espectro de actividad, estabilidad y/o capacidad de permeabilización de membrana en comparación con la defensina Clase II no modificada.

Las defensinas solanáceas Clase II para su uso como cadena principal incluyen una defensina que tiene al menos 70 % de similitud de secuencia de aminoácidos sobre una secuencia de resto de aproximadamente 20 aminoácidos contiguos en el extremo C-terminal del dominio maduro de NaD1 que incluye el resto de cisteína (C) invariante más C-terminal (SEQ ID NO:52). Ejemplos de defensinas solanáceas Clase II incluyen NaD1, NsD1, NsD2, PhD1, PhD2,

TPP3, FST, NeThiol, NeThio2, NpThio1, Na-gth y Cc-gth. Otras defensinas cadena principal incluyen C20 de *Capsicum* y SL549 de *Nicotiana*. NsD1 y NsD2 son de *Nicotiana suaveolens*, con secuencias de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO:49 y 51, respectivamente.

5 La referencia al "dominio bucle" se refiere a la región bucle que comienza en el extremo de la primera cadena  $\beta$  y que termina en el lateral N-terminal del segundo resto de aminoácidos de cisteína invariante. Esta región se denomina "LIB" [Bucle 1B] en la Figura 5. En NaD1, un ejemplo de una defensina solanácea Clase II, esta región o dominio comprende la secuencia de aminoácidos, en código de una letra, NTFPGL (véase Figura 5). Las primeras regiones bucle de otra defensina solanácea Clase II se muestran en la Figura 3. La Figura 4 es una representación de alineaciones de secuencia de aminoácidos de diferentes clases de defensinas que muestran los ocho restos de cisteína conservados.

10 Por consiguiente, la región Bucle 1B de la cadena principal de defensina solanácea Clase II se puede reemplazar por una región Bucle 1B de otra defensina tal como una defensina Clase I u otra defensina Clase II, la cual se puede injertar en su lugar para generar una secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ , en la que:

15  $X_1$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos;  
 $X_2$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos;  
20  $X_3$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos;  
 $X_4$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos;  
25  $X_5$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos; y/o  
 $X_6$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V o una forma modificada de origen natural de los mismos;

30 usando nomenclatura de aminoácidos de una letra, en la que la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  en la defensina solanácea Clase II mutada no corresponde a una secuencia de aminoácidos de la región Bucle 1B de la defensina solanácea Clase II que forma la cadena principal antes de la modificación.

35 En una realización, la región bucle 1B de la cadena principal de defensina solanácea Clase II se reemplaza por una región Bucle 1B de otra defensina tal como de una defensina Clase I que se injerta en su lugar para generar una secuencia de aminoácidos de  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ , en la que:

40  $X_1$  es N, G, D, H, K, A, E, Q, T, P, L, M, S, o R;  
 $X_2$  es K, R, G, H, L, N, F, I, S, T o Y;  
 $X_3$  es W, Y, H, L, G, F o P;  
 $X_4$  es P, K, S, R, H, T, E, V, N, Q, D o G;  
 $X_5$  es S, K, Y, F, G o H; y/o  
 $X_6$  es P, V, L, T, A, F, N, K, R, M, G, H, I o Y;

45 usando nomenclatura de aminoácidos de una letra, en la que la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  no corresponde a una secuencia de aminoácidos de la región Bucle 1B de la defensina solanácea Clase II que forma la cadena principal antes de la modificación.

50 En otra realización, la región bucle 1B de la cadena principal de la defensina solanácea Clase II se reemplaza por una región Bucle 1B de otra defensina tal como de una defensina Clase I que se injerta en su lugar para generar una secuencia de aminoácidos de  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ , en la que:

55  $X_1$  es N, H, Q, D, K o E;  
 $X_2$  es R, H, T, K o G;  
 $X_3$  es F, H, Y o W;  
 $X_4$  es P, K, S o R;  
 $X_5$  es G o F; y/o  
 $X_6$  es P, V, I, N;

60 usando nomenclatura de aminoácidos de una letra, en la que la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  no corresponde a una secuencia de aminoácidos de la región Bucle 1B de la defensina solanácea Clase II antes de la modificación.

65 En una realización, la defensina artificialmente modificada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:57. En esta secuencia, la región Bucle 1B se define como  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  en la que:

X<sub>1</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: L, F, S, I, A, H, Y, Q, D, K, G;  
 X<sub>2</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: S, V, F, I, K, L, A, P, N, T, R, H, G;  
 X<sub>3</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: A, F, W, N, I, S, Y, P, L, H;  
 X<sub>4</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: K, G, E, R, A, P, F, Q, V, S;  
 X<sub>5</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: M, G, K, D, S, Y, P, E, N, F; y  
 X<sub>6</sub> es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: V, T, M, S, W, A, P, G, E, K, L, H, I, N.

SEQ ID NO:39 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia Bucle 1B de NaD2 (HRFKGP) en una cadena principal de NaD1 para crear HXP4. La presente descripción no incluye NaD1 sino una NaD1 modificada en la que se ha alterado la secuencia del Bucle 1B. La presente descripción además no incluye FST, NeThiol, NeThio2, C20, SL549, PhD1, PhD2, TPP3, Na-gth ni Cc-gth sino una forma modificada de FST, NeThiol, NeThio2, C20, SL549, PhD1, PhD2, TPP3, Na-gth o Cc-gth en la que se ha alterado su secuencia del Bucle 1B.

La secuencia de 20 aminoácidos contiguos en la región del extremo C-terminal del dominio maduro de NaD1 está definida por SEQ ID NO:52.

En una realización, la región Bucle 1B en la secuencia de aminoácidos de la cadena principal se modifica a HRFKGP (SEQ ID NO:29), QHHSFP (SEQ ID NO:30), DTYRGV (SEQ ID NO:31), o a una cualquiera de SEQ ID NOs:67 a 79, PTWEGI (SEQ ID NO:32), DKYRGP (SEQ ID NO:33), KTFKGI (SEQ ID NO:34), KTWSGN (SEQ ID NO:35), EGWVK (SEQ ID NO:36), GTWGSV (SEQ ID NO:37) o AGFKGP (SEQ ID NO:38) [usando la nomenclatura de aminoácidos de una letra]. Convenientemente, esto se efectúa injertando la región Bucle 1B de NaD2 (HRFKGP),  $\gamma$ -zeationinaa2 (QHHSFP), PsD1 (DTYRGV), MsDefl (DKYRGP), SoD2 (KTFKGI) o DmAMP1 (KTWSGN) o un Bucle 1B definido por SEQ ID NOs:67 a 79 sobre la cadena principal de la defensina solanácea Clase II en el sitio de su secuencia de aminoácidos del Bucle 1B o modificando una región Bucle 1B existente para generar una secuencia de aminoácidos del Bucle 1B seleccionada de HRFKGP, QHHSFP, DTYRGV, DKYRGP, KTFKGI y KTWSGN. La defensina solanácea Clase II puede comprender la región bucle modificada sola o en combinación con una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos a la cadena principal de la defensina fuera de la región bucle. Como se indicó anteriormente, también se puede usar un Bucle 1B como se define en los SEQ ID NO:67 a 79 o se puede sustituir un Bucle 1B solanáceo Clase II sobre otra cadena principal de defensina solanácea Clase II.

En una realización, la defensina Clase II solanácea artificialmente modificada que tiene actividad antifúngica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:57 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:57 después de alineación óptima.

En una realización, se aumenta la actividad antifúngica con respecto a *inter alia* una o más de nivel y/o espectro de actividad, estabilidad y/o permeabilización de membrana en comparación con la defensina solanácea Clase II, antes de la modificación.

En una realización, se proporciona una defensina artificialmente modificada que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena principal de una defensina solanácea Clase II que tiene una región bucle entre la primera cadena  $\beta$  y la hélice  $\alpha$  en la porción del extremo N-terminal de la defensina solanácea Clase II, la defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD1, NsD1, NsD2, PhD1, PhD2, TPP3, FST, NeThio1, NeThio2, NpThio1, Na-gth, Cc-gth, C20 y SL549 en la que la región bucle en la cadena principal de la defensina está reemplazada por una región bucle de una defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD2 (HRFKGP), Zea2 (QHHSFP), PsD1 (DTYRGV), MsDefl (DKYRGP), SoD2 (KTFKGI) y DmAMP1 (KTWSGN) o una forma modificada de la misma o una secuencia Bucle 1B seleccionada de SEQ ID NO:67 a 79, para generar una defensina que tiene actividad antifúngica.

En una realización, la defensina solanácea Clase II comprende tanto una región bucle modificada como una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos en una región de la cadena principal fuera de la región bucle. Cuando existe, de 1 a aproximadamente 50 sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos se pueden hacer fuera de la región bucle.

El patógeno es un hongo que incluye un hongo de planta y un hongo de animal. Un "hongo de animal" incluye un hongo que infecta mamíferos incluyendo seres humanos, tales como un basidiomicete y un ascomicete.

En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden la molécula de defensina artificialmente creada así como moléculas de ácido nucleico que codifican la misma. Las composiciones pueden ser para su uso en o sobre las plantas o en o sobre animales, tales como mamíferos incluyendo los seres humanos. Las composiciones pueden contener agentes adicionales tales como patogenicida químico, patogenicida proteico y/o un inhibidor de serina o cisteína proteinasa o un precursor del mismo.

Además, se proporcionan protocolos para generar plantas resistentes a patógeno. En la presente memoria se enseñan métodos de tratamiento de plantas y animales incluyendo mamíferos tales como los seres humanos, dichos métodos pueden tratar o prevenir infestación, crecimiento y/o mantenimiento de patógeno. Un patogenicida químico o proteico y/o inhibidor de proteinasa o precursor del mismo se pueden usar en combinación con la defensina



modificada. Una construcción genética sencilla descrita en la presente memoria puede codificar una defensina modificada que comprende una región Bucle 1B alterada y un inhibidor de proteinasa o precursor del mismo tal como NaPin1A (de *Nicotiana glauca*), inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPT1), cistatina de tomate, inhibidor, S1Cys9, o cistatina de cebada, HvCPI6. En otra realización, las construcciones múltiples se usan cada una por separado codificando una o más de una defensina modificada y un inhibidor de proteinasa o forma precursora del mismo.

Cuando se usa la defensina modificada en combinación con otro agente tal como un inhibidor de proteinasa o una cistatina, se puede usar una construcción genética sencilla que codifica todas las proteínas para transformar una célula vegetal o construcciones múltiples, codificando cada una una proteína. Alternativamente, una planta modificada para expresar una defensina, se puede someter a la aplicación tópica de un inhibidor de proteinasa o patogenicida químico.

En la Tabla 1 se proporciona un compendio de identificadores de secuencia usados por toda la memoria objeto.

TABLA 1

Compendio de identificadores de secuencia	
SEQ ID N°	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de aminoácidos genérica de la región Bucle 1B
2	Secuencia de aminoácidos de la porción de NaD1 ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B
3	Secuencia de aminoácidos de la porción de PhD1 ( <i>Petunia hybrida</i> ) que contiene el Bucle 1B
4	Secuencia de aminoácidos de la porción de PhD2 ( <i>Petunia hybrida</i> ) que contiene el Bucle 1B
5	Secuencia de aminoácidos de la porción de TPP3 ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) que contiene el Bucle 1B
6	Secuencia de aminoácidos de la porción de FST ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B
7	Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B [NaThio1]
8	Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B [NeThio2]
9	Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B [Na-gth]
10	Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina ( <i>Nicotiana glauca</i> ) que contiene el Bucle 1B [NpThio1]
11	Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina ( <i>Capsicum chinense</i> ) que contiene el Bucle 1B [Cc-gth]
12	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de NaD1, NsD1 y NsD2
13	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PhD1
14	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PhD2
15	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de TPP3
16	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de FST
17	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina ( <i>N. glauca</i> ) [NeThio1]
18	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina ( <i>N. glauca</i> ) [NeThio2]
19	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina ( <i>N. glauca</i> ) [Na-gth]
20	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina ( <i>N. glauca</i> ) [NpThio1]
21	Secuencia de aminoácidos del Bucle de 1B g-tionina ( <i>C. chinense</i> ) [Cc-gth]
22	Secuencia de aminoácidos de defensina NaD2 que contiene Bucle 1B
23	Secuencia de aminoácidos de defensina g1-H que contiene Bucle 1B
24	Secuencia de aminoácidos de defensina Psd1 que contiene Bucle 1B
25	Secuencia de aminoácidos de defensina MsDefl que contiene Bucle 1B
26	Secuencia de aminoácidos de defensina DmAMP1 que contiene Bucle 1B
27	Secuencia de aminoácidos de defensina RsAFP2 que contiene Bucle 1B
28	Secuencia de aminoácidos de defensina g-zeationina2 ( <i>Zea2</i> ) que contiene Bucle 1B
29	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de NaD2
30	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de Zea2
31	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PsD1
32	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PsD2
33	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de MsDefl
34	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de SoD2
35	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de DmAMP1
36	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de VrD1
37	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de RsAFP2
38	Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g1-H
39	Secuencia de aminoácidos de HXP4 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en NaD1)
40	Secuencia de aminoácidos de HXP34 (Bucle 1B de Zea2 [Zea2L1B] en NaD1)

ES 2 660 965 T3

Compendio de identificadores de secuencia	
SEQ ID N°	DESCRIPCIÓN
41	Secuencia de aminoácidos de HXP35 (Bucle 1B de PsD1 [PsDL1B] en NaD1)
42	Secuencia de aminoácidos de HXP91 (Bucle 1B de MsDeF1 [MsDef1L1B] en NaD1)
43	Secuencia de aminoácidos de HXP92 (Bucle 1B de SoD1 [SoD1L1B] en NaD1)
44	Secuencia de aminoácidos de HXP58 (Bucle 1B de DmAMP1 [DMAMPL1B] en NaD1)
45	Secuencia de aminoácidos de HXP37 (Bucle 1B de VrD1 [VrD1L1B] en NaD1)
46	Secuencia de aminoácidos de HXP72 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en PhD2)
47	Secuencia de aminoácidos de HXP95 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en NsD1)
48	Secuencia de nucleótidos que codifica defensiva de <i>Nicotiana suaveolens</i>
49	Secuencia de aminoácidos de NsD1
50	Secuencia de nucleótidos que codifica NsD2 de <i>Nicotiana suaveolens</i>
51	Secuencia de aminoácidos que codifican NsD2
52	Secuencia de aminoácidos de secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de NaD1 que termina e incluye el resto de cisteína invariante más C-terminal
53	Secuencia de aminoácidos de cola C-terminal de NaD1
54	Secuencia de aminoácidos de región variable de la región Bucle 1B
55	Secuencia de aminoácidos de región variable de la región Bucle 1B
56	Secuencia de aminoácidos de región variable de la región Bucle 1B
57	Secuencia de aminoácidos de cadena principal de NaD1 que tiene un Bucle 1B definida por X <sub>1</sub> a X <sub>6</sub>
58	Secuencia de aminoácidos de C20
59	Secuencia de aminoácidos de SL549
60	Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de C20
61	Secuencia de aminoácidos de NaPin1A
62	Secuencia de aminoácidos de BPT1
63	Secuencia de aminoácidos de CI-1B
64	Secuencia de aminoácidos de HVCPI6
65	Secuencia de aminoácidos de S1Cys9
66	Secuencia de aminoácidos de Osla
67	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
68	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
69	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
70	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
71	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
72	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
73	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
74	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
75	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
76	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
77	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
78	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
79	Secuencia de aminoácidos en Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento
80	Secuencia de nucleótidos de construcción que expresa HvCPI6 para la expresión de maíz
81	Secuencia de aminoácidos de HvCPI6
82	Secuencia de nucleótidos de construcción que comprende HvCPI6-L-HXP4-PPCT (NaD1)
83	Secuencia de aminoácidos de HvCPI6-L-HXP4-PPCT (NaD1)
84	Secuencia de aminoácidos de cadena principal de NaD1 que tiene un Bucle 1B definida por X <sub>1</sub> a X <sub>6</sub>



Compendio de identificadores de secuencia	
SEQ ID N°	DESCRIPCIÓN
85	Secuencia de aminoácidos de cadena principal de TPP3 que tiene un Bucle 1B de NaD2 (HXP107)

La Tabla 2 proporciona un compendio de la nomenclatura usada para describir la defensina modificada ilustrada.

TABLA 2

Compendio de nomenclatura de defensinas modificadas	
Nomenclatura	Descripción
HXP4	Bucle 1B de NaD2 en cadena principal de NaD1
HXP34	Bucle 1B de Zea2 en cadena principal de NaD1
HXP35	Bucle 1B de PSD1 en cadena principal de NaD1
HXP37	Bucle 1B de VrD1 en cadena principal de NaD1
HXP91	Bucle 1B de MsDeF1 en cadena principal de NaD1
HXP92	Bucle 1B de SoD2 en cadena principal de NaD1
HXP58	Bucle 1B de DmAMP1 en cadena principal de NaD1
HXP72	Bucle 1B de NaD2 en cadena principal de PhD2
HXP95	Bucle 1B de NaD2 en cadena principal de NsD1
HXP107	Bucle 1B de NaD2 en cadena principal de TPP3

5 La Tabla 3 es una lista del código de una y tres letras para los restos de aminoácidos usados en la presente memoria.







TABLA 3

Lista de abreviaturas de una y tres letras para los restos de aminoácido

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

10 Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es una representación esquemática de las defensinas, NaD1, RsAFP1, VrD2 y Brazeína que muestran el patrón de unión disulfuro común y pliegue estructural común en el que se une una lámina  $\beta$  antiparalela de triple cadena a una hélice  $\alpha$  por tres enlaces disulfuro, formando un motivo  $\alpha\beta$  estabilizado con cisteína (CS $\alpha\beta$ ). Un cuarto enlace disulfuro también se une a los terminales N y C conduciendo a una estructura estable. La Figura 2 es una representación esquemática que muestra el desglose de las defensinas en 16 grupos basados en similitud de secuencia.

	Antifúngico		Reconocimiento de polen
	Inhibidor de síntesis de proteína		Sabor dulce
	Antibacteriano		Tolerancia a zinc

Inhibidor de  $\alpha$ -amilasa

Inhibidor de tripsina



Bloqueador del canal de sodio

Las Figuras 3A y B son representaciones de las alineaciones de secuencia de las defensinas solanáceas Clase II NaD1, NsD1, NsD2, PhD1, PhD2, TPP3, FST, NeThiol, NeThio2, Na-gth, NpThiol y Cc-gth. El sombreado en la Figura 3A representa el alto nivel de la conversación entre las secuencias.

5 La Figura 4 es una representación de la alineación de secuencia de defensinas de diferentes clases que revela que, aparte de los ocho restos de cisteína que están conservados, solamente los aminoácidos en las posiciones 7 y 10 están altamente conservados. La numeración se basa en relación con NaD1.

La Figura 5 es una representación esquemática de la estructura bucle de NaD1 que muestra la localización del Bucle 1B que conecta la cadena  $\beta$  1 y la hélice  $\alpha$ .

10 La Figura 6A es una representación de una inmunotransferencia que representa la expresión y purificación del NaD1 recombinante (rNaD1). El medio de expresión de *P. pastoris* recogido a las 48 horas (30  $\mu$ l) así como las muestras de diversas fases de purificación con SP Sepharose incluyendo la fracción no unida (30  $\mu$ l), la fracción de lavado (30  $\mu$ l) y las primeras cinco fracciones de elución de 1,5 ml (30  $\mu$ l de cada una) se separaron por SDS-PAGE y se examinaron por inmunotransferencia con el anticuerpo  $\alpha$ -NaD1. La NaD1 de flores (200 ng) se usó como control positivo. La rNaD1 se podría detectar en los medios de expresión de 48 horas así como las fracciones de elución de Sepharose SP.

15 La Figura 6B es una representación de una traza de HPLC de fase inversa que ilustra la pureza de rNaD1 purificada de *P. pastoris* usando SP Sepharose. Las fracciones de elución con SP Sepharose que contienen rNaD1 se cargaron en una columna de RP-HPLC C8 analítica y se eluyeron usando un gradiente lineal de 40 min (tampón B al 0 a 100 %). Las proteínas se detectaron por absorbancia a 215 nm. Se detectó una proteína principal sencilla indicando que la proteína era altamente pura.

20 La Figura 6C es una representación de la estructura de rNaD1 a NaD1 nativa purificada de flores. El espectro de dicroísmo circular en UV lejano de rNaD1 (cuadrados abiertos) y NaD1 nativa (diamantes cerrados) se compara y demuestra no diferencias significativas indicando que rNaD1 estaba correctamente plegada.

25 La Figura 6D es una representación de la actividad antifúngica de rNaD1 a NaD1 nativa purificada de flores. El crecimiento hifal de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* en presencia de rNaD1 (cuadrados abiertos) o NaD1 nativa (diamantes cerrados) se traza en una gráfica en relación con el crecimiento de un control no proteico durante el mismo periodo. La gráfica representa los datos de tres experimentos separados realizados por cuadruplicado. Las barras de error representan el error típico de la media.

30 La Figura 7 es una representación gráfica de la actividad antifúngica frente a *Fusarium graminearum* de defensinas Clase I usadas para los intercambios de bucle en comparación con NaD1 y NsD1.

La Figura 8 es una representación gráfica de la actividad antifúngica relativa de variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *F. graminearum* (Fgr).

35 La Figura 9 es una representación gráfica de la actividad antifúngica relativa de variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *F. verticilloides* (Fve).

La Figura 10 es una representación gráfica de la actividad antifúngica relativa de variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *C. graminicola* (Cgr).

40 La Figura 11 es una representación esquemática de la construcción pHEX138. El ADN se insertó entre los bordes izquierdo y derecho del vector binario pBIN19 (Bevan (1984) *Nucleic Acids Research* 12:8.711-8.721). El ADN se produjo modificando el gen de NaD1. Las abreviaturas en sentido horario son:

oriV: origen de replicación vegetativa

ColE1 ori: origen de replicación derivado de colicina E1;

BD ADNT: borde derecho de ADNT de *Agrobacterium tumefaciens*;

45 Promotor Nos: promotor del gen Nos de nopalina sintasa;

NPTII: secuencia genética que codifica fosfotransferasa de neomicina II;

Terminador Nos: secuencia terminadora del gen Nos;

lacZ alterado: segmento de ADN que codifica la secuencia parcial de B-galactosidasa;

50 Promotor CaMV 35S: promotor de la proteína del virus del mosaico de coliflor (CaMV) 35S;

HXP4: ADN que codifica el Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en NaD1 más la PPCT;

Terminador de CaMV 35S: secuencia terminadora de los genes que codifican la proteína CaMV 35S;

M13 ori: origen de la replicación del virus M13;

BI ADNT: borde izquierdo de ADNT;

Todas las flechas indican la dirección de la transcripción.

55 La Figura 12 es una representación gráfica de la actividad antifúngica relativa de la variante de bucle HXP4 en comparación con NaD1 frente a *Aspergillus niger*.

Las Figuras 13A a C son representaciones gráficas de la actividad antifúngica relativa de HXP4 en comparación con NaD1 frente a *Cryptococcus* spp.

La Figura 14A a C son representaciones gráficas de los efectos de HXP4 sobre la germinación (24 horas, A), estructura de apresorio (24 horas, B) y postapresorio (48 horas, C) sobre la roya de la soja asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) en comparación con NaD1.

La Figura 15 es una representación de las secuencias de nucleótidos de una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica HvCPI6 (una cistatina de cebada) para su uso en maíz. También se proporciona la secuencia de aminoácidos de HvCPI6.

La Figura 16 es una representación de la secuencia de nucleótidos de una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica HvCPI6 (una cistatina de cebada) y la HXP4 de defensina modificada para su uso en maíz. También se proporciona la secuencia de aminoácidos de HvCPI6 y HXP4.

#### Descripción detallada

Se proporciona una molécula de defensina modificada con actividad antifúngica. Los términos “defensina modificada”, “defensina variante”, “defensina mutada” y “defensina química” todos se pueden usar para describir las defensinas solanáceas clase II modificadas descritas en la presente memoria. La defensina solanácea Clase II se modifica en la región bucle entre la primera cadena  $\beta$  (cadena  $\beta$  1) y la hélice  $\alpha$  en la porción del extremo N-terminal de la defensina. La región bucle comprende los 6 aminoácidos N-terminales del segundo resto de cisteína invariante o su equivalente. Esta región se define como “Bucle 1B” (véase la Figura 5). Una defensina solanácea Clase II se distingue de otras defensinas por una porción del extremo C-terminal relativamente conservada del dominio maduro. La referencia a una “defensina solanácea Clase II” incluye cualquier defensina que tiene al menos 70 % de similitud de secuencia de aminoácidos a la porción del extremo C-terminal del dominio maduro de NaD1, la porción C-terminal de NaD1 que comprende aproximadamente 20 restos de aminoácido contiguos que finalizan e incluyen la cisteína invariante más C-terminal en el dominio maduro de NaD1 (por ejemplo, SEQ ID NO:52). Por “al menos 70 %” se quiere decir al menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 or 100 %. La Tabla 4 proporciona las identidades en porcentaje entre la secuencia de aminoácidos C-terminal de NaD1 y un número de dominios maduros de defensinas solanáceas Clase II.

La referencia a “ $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ ” significa 6 restos de aminoácido contiguos que corresponden a una región Bucle 1B.

En una realización, la defensina artificialmente modificada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:57. En esta secuencia, la región Bucle 1B se define como  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  en la que:

- $X_1$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: L, F, S, I, A, H, Y, Q, D, K, G;
- $X_2$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: S, V, F, I, K, L, A, P, N, T, R, H, G;
- $X_3$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: A, F, W, N, I, S, Y, P, L, H;
- $X_4$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: K, G, E, R, A, P, F, Q, V, S;
- $X_5$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: M, G, K, D, S, Y, P, E, N, F; y
- $X_6$  es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en: V, T, M, S, W, A, P, G, E, K, L, H, I, N.

En el caso de NaD1, una defensina solanácea Clase II, la secuencia de aminoácidos Bucle 1B es NTFPGI (SEQ ID NO:12).

La defensina artificialmente modificada representa una nueva familia de defensinas. En la presente memoria se enseña que las defensinas modificadas se usan en horticultura y/o agricultura para controlar infestación y crecimiento de patógeno y como medicamentos para su uso en animales o seres humanos. Las defensinas modificadas se pueden usar solas o en combinación con un patogenicida químico, un agente antipatógeno proteico y/o un inhibidor de serina o cisteína proteinasa o una forma precursora del mismo.

Cuando se usa en combinación con un inhibidor de proteinasa o agente antipatógeno, estos se pueden aplicar tópicamente por separado o uno se expresa en una planta genéticamente modificada y otro se aplica tópicamente o todos de la defensina modificada e inhibidor de proteinasa y/o agente antipatógeno se expresan en una única o múltiples construcciones genéticas.

Por “Bucle 1B” se quiere decir los 6 restos de aminoácido N-terminales del segundo resto de cisteína invariante o su equivalente como se representa en la Figura 5. Algunas defensinas tales como VrD1 y NeThio1 solamente tienen cinco restos de aminoácido. Sin embargo, en ese caso, la región Bucle 1B comprende los cinco restos. También se describe como la primera región bucle flexible entre la cadena  $\beta$  1 y la hélice  $\alpha$ . El Bucle 1A (véase la Figura 5) es la cadena  $\beta$ .

Una sustitución de un Bucle 1B con un Bucle 1B de otra defensina se denomina en la presente memoria como un intercambio de dominio, intercambio de bucle, injerto u otra expresión similar. La referencia a “otra defensina” incluye cualquier defensina sea una defensina Clase I o Clase II (véase también la Figura 2). La cadena principal de defensina Clase II se modifica más opcionalmente por separación de una cola C-terminal (es decir, el PPCT) o por intercambio de un PPCT existente con otra cola y/o la cadena principal puede tener una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos única o múltiple en una localización en la cadena principal fuera de la región bucle referida

anteriormente. Una “defensina solanácea Clase II” incluye cualquier defensina que tenga al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:52 después de alineación óptima. La SEQ ID NO:52 representa los 20 restos de aminoácido contiguos que terminan en e incluyen el resto de cisteína más C-terminal en el dominio maduro de NaD1. Los ejemplos de tales defensinas solanáceas Clase II que tienen al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:52 se enumeran en la Tabla 4.

En una realización, se enseña en la presente memoria una defensina Clase II solanácea artificialmente modificada aislada que tiene actividad antifúngica que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:39 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de similitud a SEQ ID NO:39.

En la presente memoria también se enseña una defensina Clase II solanácea artificialmente modificada aislada que tiene actividad antifúngica que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:57 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:57 después de alineación óptima.

La referencia a “al menos 70 % de similitud” incluye 70, 71, 72, 73, 74,75,76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 % de similitud. En una realización, esto puede denominarse identidad.

Ejemplos de secuencias de Bucle 1B de una defensina solanácea Clase II incluyen NTFPGI de NaD1 (*N. alata*), NsD1 (*N. suaveolens*), NsD2 (*N. suaveolens*), NeThio2 (*N. excelsior*) y FST (*N. tabacum*); PTWDSV de PhD1 (*P. hybrida*); PTWEGI de PhD2 (*P. hybrida*); QTFPGL de TPP3 (*S. lycopersicum*); NTFEGF de Na-gth (*N. attenuata*); NTFPGL de Np-Thio1 (*N. paniculata*); IFTGL de NeThio1 (*N. excelsior*) y KHFKGL de Cc-gth (*C. chinense*). Otra secuencia de Bucle 1B es KYFKGL (SEQ ID NO:60).

Otro aspecto más enseñado en la presente memoria se refiere a una defensina artificialmente modificada aislada que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena principal de una defensina solanácea Clase II que tiene una región bucle entre la cadena  $\beta$  1 y la hélice  $\alpha$  sobre la porción del extremo N-terminal de la defensina solanácea Clase II, la defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD1, NsD1, NsD2, PhD1, PhD2, TPP3, FST, NeThiol, NeThio2, NpThio1, Na-gth y Cc-gth en la que la región bucle en la cadena principal de defensina está reemplazada por una región bucle de una defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD2 (HRFKGP), Zea2 (QHHSFP), PSD1 (DTYRGV), MsDefl (DKYRGP), SoD2 (KTFKGI) y DmAMP1 (KTWSGN) o una forma modificada de la misma, o una secuencia Bucle 1B seleccionada de SEQ ID NO:67 a 79 para generar una defensina que tiene actividad antifúngica.

En una realización, la actividad antifúngica se aumenta en comparación con la defensina solanácea Clase II antes de la modificación. Los parámetros para determinar la actividad aumentada incluyen nivel y/o espectro de grado de actividad de estabilidad y/o nivel de actividad de permeabilización.

Como se indicó anteriormente, la región Bucle 1B en la defensina solanácea Clase II comprende la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ , cada X como se definió anteriormente en la presente memoria, en la que todos los 6 (o 5 correspondientes) restos de aminoácido están reemplazados por la secuencia correspondiente a un Bucle 1B o un derivado del mismo de otra defensina tal como una defensina Clase I u otra defensina Clase II.

La secuencia de aminoácidos de la cadena principal puede comprender además una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos a una región fuera de la región Bucle 1B. Si existe, se pueden hacer de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la cadena principal fuera de la región Bucle 1B. Por “1 a 50” se quiere decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50. En una realización, la mutación adicional está en la cola C-terminal (la PPCT) de la defensina solanácea Tipo II.

La referencia a un “hongo” incluye hongos que infectan y son de otro modo patógenos de plantas o animales. Patógenos fúngicos de animal incluyen patógenos fúngicos de mamíferos incluyendo los seres humanos. Patógenos fúngicos particulares incluyen *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, *Fusarium graminearum* y *Fusarium verticilloides*. Patógenos específicos para los cultivos principales incluyen: Maíz: *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium verticilloides*, *Bipolaris maydis* O, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Exserohilum turcicum* I, II y III, *Cercospora zeae-maydis*, *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus* spp, *Aspergillus flavus*, *Helminthosporium carbonum* I, II y III (*Cochliobolus carbonum*), *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Ustilago zeae*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarium*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Trichoderma viride*, *Claviceps sorghi*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Sphacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*; Sojas: *Fusarium virguliforme*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*,



*Fusarium tucumaniae*, *Phakopsora pachyrhizi* *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, *Glomerella glycines*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*; Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*; Algodón: *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae*, *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria macrospora*, *Cercospora gossypina*, *Phoma exigua* (*Ascochyta gossypii*), *Pythium* spp *Rhizoctonia solani*, *Puccinia schedardii*, *Puccinia cacabata*, *Phymatotrichopsis omnivore*; Canola: *Leptosphaeria maculans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, *Plasmiodiophora brassicae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Alternaria* spp, *Peronospora parasitica*, *Mycosphaerella capsellae* (*Pseudocercospora capsellae*), *Albugo candida*, *Phytophthora megasperma* var. *megasperma*, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe cruciferarum*; Trigo: *Cochliobolus sativus*, *Drechslera wirreganensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Phaeosphaeria avenaria* f.sp. *triticea*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia triticina*, *Sclerophthora macrospora*, *Urocystis agropyri*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyrenophora semeniperda*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* spp, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Claviceps purpurea*, *Tapesia yallundae*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia caries*, *Tilletia indica*, *Ustilago tritici*, *Wojnowicia graminis*, *Cochliobolus sativus*; Sorgo: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum sublineolum*, *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara saccari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*; Girasol: *Plasmopara halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthe*, *Verticillium dahliae*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*; Alfalfa: *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichia medicaginis*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*, *Colletotrichum trifolii*, *Leptosphaerulina briosiana*, *Uromyces striatus*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Stagonospora meliloti*, *Stemphylium botryosum* y *Leptotrichia medicaginis*.

En una realización, los patógenos fúngicos en maíz incluyen *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Fusarium verticilloides*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora zeamaydis*.

En una realización, los patógenos fúngicos en soja incluyen: *Fusarium virguliforme*, *Fusarium solanai*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tucumaniae*, *Phakopsora pachyrhizi*.

Patógenos fúngicos de animal incluyendo mamíferos y en particular ser humano incluyen especies de *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Fusarium* spp, *Trypophyton* spp, *Cryptococcus* spp, *Microsporium* spp, *Penicillium* spp, *Trichosporon* spp, *Scedosporium* spp, *Paecilomyces* spp, *Acremonium* spp y mohos Dermatiaceous. Patógenos fúngicos de animal específicos incluyendo mamífero y en particular ser humano incluyen *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus paraciticus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida haemulonii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida norvegensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solanai*, *Fusarium moniliforme*, *Trypophyton rubrum*, *Trypophyton mentagrophytes*, *Trypophyton interdigitales*, *Trypophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus grubii*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Penicillium marneffelii*, *Trichosporon beigellii*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon domesticum*, *Trichosporon mucoides*, *Trichosporon ovoides*, *Trichosporon pullulans*, *Trichosporon loubieri*, *Trichosporon japonicum*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans*, *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Acremonium strictum*, *Cladophialophora bantiana*, *Wangiella dermatitidis*, *Ramichloridium obovoideum*, *Chaetomium atrobrunneum*, *Daclaria gallopavum*, *Bipolaris* spp, *Exserohilum rostratum* así como *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Mucor indicus*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Cokeromyces recurvatus*, *Saksenea vasiciformis*, *Syncephalastrum racemosum*, *Basidiobolus ranarum*, *Conidiobolus coronatus*/*Conidiobolus incongruus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides*



*immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*.

5 La referencia a un "hongo" también incluye oomicetes tales como *Pythium* spp y *Phytophthora* spp. El término "hongo" también abarca una roya.

10 En la presente memoria también se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la defensina solanácea Clase II modificada. En una realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:57.

15 Por consiguiente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de defensina Clase II solanácea artificialmente modificada con una región bucle (Bucle 1B) entre una primera cadena  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  en su porción del extremo N-terminal y que tiene actividad antifúngica, y en la que dicho Buclé 1B se reemplaza por un Buclé 1B de otra defensina, teniendo dicho polipéptido una porción del extremo C-terminal con al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:52 después de alineación óptima.

20 En otra realización más, la molécula de ácido nucleico aislada codifica una defensina artificialmente creada que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena principal de una defensina solanácea Clase II que tiene una región Buclé 1B entre la cadena  $\beta$  1 y la hélice  $\alpha$  en la porción del extremo N-terminal de la defensina solanácea, la defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD1, NsD1, NsD2, PhD1, PhD2, TPP3, FST, NeThio1, NeThio2, NpThio1, Na-gth, Cc-gth, C20 y SL549 en la que la región Buclé 1B en la cadena principal de defensina solanácea Clase II se reemplaza por una región Buclé 1B de una defensina seleccionada de la lista que consiste en NaD2 (HRFKGP), Zea2 (QHHSFP), PsD1 (DTYRGV), MsDef1 (DKYRGP), SoD2 (KTFKGI) y DmAMP1 (KTWSGN) o una secuencia de Buclé 1B seleccionada de SEQ ID NO:67 a 79 para generar una defensina que tiene actividad antifúngica.

25 El término "similitud" como se usa en la presente memoria incluye identidad exacta entre secuencias comparadas en el nivel de nucleótido o aminoácido. Cuando hay no identidad en el nivel de nucleótido, "similitud" incluye diferencias entre las secuencias que dan como resultado diferentes aminoácidos que sin embargo se refieren uno a otro en los niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. Cuando hay no identidad en el nivel de aminoácido, "similitud" incluye aminoácidos que sin embargo están relacionados uno a otro en los niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. En una realización particularmente preferida, las comparaciones de nucleótido y secuencia se hacen a nivel de identidad en vez de similitud.

30 Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "similitud de secuencia", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente similar" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es al menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y con frecuencia al menos 25 o por encima, tal como 30 unidades de monómero, incluidos los restos de nucleótido y aminoácido, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos cada uno pueden comprender (1) una secuencia (es decir, solamente una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos generalmente se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos durante una "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de generalmente 12 restos contiguos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede conducir por ejecuciones computerizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en "the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0", Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o por inspección y la mejor alineación (es decir, dando como resultado la más alta homología en porcentaje sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. La referencia también se puede hacer a la familia BLAST de programas como, por ejemplo, los descritos por Altschul y col. (1997) *Nucl. Acids. Res.* 25:3.389). Se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel y col. (1998) En: "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc. 1994-1998.

35 Los términos "similitud de secuencia" e "identidad de secuencia" como se usa en la presente memoria se refiere al grado en el que las secuencias son idénticas o funcionalmente o estructuralmente similares sobre una base nucleótido-a-nucleótido o una base de aminoácido-a-aminoácido sobre una ventana de comparación. Por tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia", por ejemplo, se calcula comparando dos secuencias opcionalmente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en la que la base de ácidos nucleicos idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácidos idénticos (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se da en ambas secuencias para dar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de la comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100

para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Para los propósitos de la presente descripción, "identidad de secuencia" se entenderá que quiere decir el "porcentaje de emparejamiento" calculado por el programa de ordenador DNASIS (Versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) usando valores por defecto estándar usados en el manual de referencia adjunto al programa informático. Comentarios similares se aplican en relación con la similitud de secuencia. Por "al menos 70 %" se quiere decir 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 %.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones de baja rigurosidad con la molécula de ácido nucleico que codifica la defensina modificada.

Las condiciones de rigurosidad se pueden definir por, por ejemplo, las concentraciones de sal o formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación, o por la temperatura de hibridación, y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la rigurosidad se puede incrementar reduciendo la concentración de sal, incrementando la concentración de formamida, o subiendo la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, como se describe en detalle, más adelante. En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos de la presente descripción se definen por su capacidad de hibridar bajo diversas condiciones de rigurosidad (por ejemplo, alta, media y baja).

La referencia en la presente memoria a una "rigurosidad baja" incluye y abarca de al menos aproximadamente 0 a al menos aproximadamente 15 % v/v de formamida y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para condiciones de lavado. Generalmente, la baja rigurosidad es a de aproximadamente 25 a 30 °C a aproximadamente 42 °C. La temperatura se puede alterar y se pueden usar mayores temperaturas para reemplazar la formamida y/o para dar condiciones de rigurosidad alternativas. Las condiciones de rigurosidad alternativas se pueden emplear cuando sea necesario, tal como "rigurosidad media", que incluye y abarca de al menos aproximadamente 16 % v/v a aproximadamente 30 % de formamida y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 0,5M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para condiciones de lavado, o "alta rigurosidad", que incluye y abarca de al menos aproximadamente 31 % v/v a al menos aproximadamente 50 % v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo a  $T_m=69,3 + 0,41 (G+C)\%$  (Marmur y Doty (1962) *J. Mol. Biol.* 5:109-118). Sin embargo, la  $T_m$  de una molécula de ácido nucleico doble disminuye 1 °C con cada incremento de 1 % en el número de pares de bases mal emparejadas (Bonner y Laskey (1974) *Eur. J. Biochem* 46:83-88). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Por consiguiente, los niveles particularmente preferidos de rigurosidad se definen como sigue: baja rigurosidad es 6x SSC tampón, SDS al 0,1 % p/v a 25 a 42 °C; una rigurosidad moderada es 2 x SSC tampón, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura en el intervalo de 20 °C a 65 °C; alta rigurosidad es 0,1 x SSC tampón, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura de al menos 65 °C.

Los términos "similitud de secuencia" e "identidad de secuencia" como se usan en la presente memoria se refieren al grado en que las secuencias son idénticas o funcionalmente o estructuralmente similares en una base de nucleótido-a-nucleótido o una base de aminoácido-a-aminoácido sobre una ventana de comparación. Por tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia", por ejemplo, se calcula comparando dos secuencias opcionalmente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para dar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Para los propósitos de la presente descripción, "identidad de secuencia" se entenderá que significa "el porcentaje de emparejamiento" calculado por el programa de ordenador DNASIS (Versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) usando los valores por defecto estándar usados en el manual de referencia adjunto al programa informático. Comentarios similares se aplican en relación con la similitud de secuencia.

Las moléculas de ácido nucleico enseñadas en la presente memoria también son capaces de hibridar con otras moléculas genéticas. La referencia en la presente memoria a "hibrida" se refiere al proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de emparejamiento de bases. Las reacciones de hibridación pueden ser sensibles y selectivas de manera que se puede identificar una secuencia particular de interés incluso en muestras en las que está presente a bajas concentraciones. Se pueden definir condiciones estrictas mediante, por ejemplo, las concentraciones de sal o formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación, o mediante la temperatura de hibridación, y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la rigurosidad se puede incrementar reduciendo la concentración de sal, incrementando la concentración de formamida, o subiendo la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, como se describe en detalle, más adelante. En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos presentes se definen por su capacidad de hibridar bajo diversas condiciones de rigurosidad (por ejemplo, alta, media y baja).

La molécula de ácido nucleico aislada también puede estar en un vector incluyendo un vector de expresión o transferencia adecuado para su uso en las células vegetales, células microbianas y células animales no humanas. La referencia a un "vector" incluye un vector de expresión multigen (MGEV) tal como se describe por el documento PCT/AU02/00123.

5 En la presente memoria se describe un vehículo de expresión multigen (MGEV), comprendiendo dicho MGEV un polinucleótido que tiene 2 a 8 segmentos dominio codificando cada dominio una proteína funcional, estando cada dominio unido con el próximo en una secuencia lineal mediante un segmento conector, estando todos el dominio y los segmentos en el mismo marco de lectura, y en el que al menos uno de los dominios es una defensina solanácea Clase II modificada como se describe en la presente memoria. Al menos otro dominio puede ser un inhibidor de proteinasa o precursor del mismo. Al menos un dominio puede ser una defensina solanácea Clase II modificada, y al menos un dominio puede ser un inhibidor de proteinasa o forma precursora del mismo. Por "inhibidor de proteinasa" se incluye un inhibidor de serina proteinasa y un inhibidor de cisteína proteinasa.

15 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la defensina modificada se puede incorporar en una construcción de ADN o vector en combinación con secuencias reguladoras adecuadas (promotor, terminador, péptido tránsito, etc.). El ácido nucleico también puede estar ligado de forma operativa a un promotor heterólogo. Para algunas aplicaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica la defensina modificada puede estar insertada dentro de una región codificadora que expresa otra proteína para formar una proteína de fusión de defensina o se puede usar para reemplazar un dominio de una proteína para proporcionar esa actividad antipatógena proteica. La secuencia de ácido nucleico se puede colocar bajo el control de un promotor homólogo o heterólogo que puede ser constitutivo o un promotor inducible (estimulado por, por ejemplo, condiciones ambientales, presencia de un patógeno, presencia de un compuesto químico). El péptido tránsito puede ser homólogo o heterólogo a la defensina modificada y se elige para asegurar la secreción al orgánulo deseado o al espacio extracelular. El péptido tránsito se puede asociar de forma natural con una defensina particular. Tal construcción de ADN se puede clonar o transformar en un sistema biológico que permite la expresión de la defensina modificada codificada o una parte activa de la defensina. Los sistemas biológicos adecuados incluyen microorganismos (por ejemplo, el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, endófitos tales como *Clavibacter xyli subsp. cynodontis* (Cxc); levadura; virus; bacteriófagos; etc.) células cultivadas (tales como células de insecto, células de mamífero) y plantas. En algunos casos, la defensina expresada se extrae posteriormente y se aísla para su uso.

La defensina modificada enseñada en la presente memoria es útil para combatir enfermedades por patógeno en plantas y animales incluyendo mamíferos tales como seres humanos. Por consiguiente, las defensinas solanáceas Clase II modificadas tienen aplicaciones hortícolas y agrícolas así como aplicaciones como medicamentos para uso animal incluyendo mamífero tal como humano. Además, en la presente memoria se enseña un proceso para combatir patógenos por el cual se exponen a la defensina modificada descrita en la presente memoria. La defensina modificada se puede usar en forma de una composición. La defensina modificada se puede usar sola o en combinación con un patogenicida químico, una proteína antipatógeno y/o un inhibidor de serina o cisteína proteinasa Tipo II o forma precursora del mismo.

Mientras que la defensina modificada descrita en la presente memoria es útil para proteger plantas frente a infestación, crecimiento, mantenimiento o propagación de patógeno, la defensina modificada también tiene aplicación como medicamentos, incluyendo medicamentos tópicos, para no plantas tales como animales incluyendo mamíferos tales como los seres humanos.

Por consiguiente, otro aspecto enseñado en la presente memoria es una composición que comprende la defensina modificada como se describe en la presente memoria junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente u hortícolamente aceptables y/o uno u otros más agentes antipatógenos tales como patogenicida químico, un agente antipatógeno proteico y/o un inhibidor de proteinasa o una forma precursora del mismo. La composición descrita en la presente memoria puede estar en forma de un rociado, agua nebulizada, micro o nanopartículas, solución acuosa, polvo, crema, pomada, gel, vendaje impregnado, líquido, formulación, pintura u otro medio de distribución adecuado incluyendo formas orales de la composición.

Para aplicaciones farmacéuticas, la defensina modificada (incluyendo cualquier producto derivado de la misma) se puede usar como un patogenicida o un patogenoestato para tratar infecciones de mamíferos (por ejemplo, para combatir levaduras tales como *Candida*).

La defensina modificada (incluyendo cualquier producto derivado de la misma) según la presente descripción también se puede usar como conservante (por ejemplo, como aditivo alimentario) o como parte de un programa de preparación del suelo o medio de crecimiento.

Para aplicaciones agrícolas, la defensina modificada se puede usar para mejorar la resistencia a enfermedad o tolerancia a enfermedad de cultivos o bien durante la vida de la planta o para la protección del cultivo después de la cosecha. Se inhiben los patógenos expuestos a los péptidos. La defensina modificada puede erradicar un patógeno ya establecido sobre la planta o puede proteger la planta del futuro ataque patógeno. El efecto de erradicación del péptido es particularmente ventajoso. La referencia a una "planta" incluye una planta de cultivo tal como sorgo, trigo,

cebada, maíz, algodón, arroz, canola, maíz, abacá, alfalfa, almendra, manzana, espárrago, plátano, judía-*phaseolus*, zarzamora, haba, anacardo, yuca, garbanzo, cítrico, coco, café, higo, lino, uvas, cacahuete, cáñamo, lavanda, setas, aceituna, cebolla, guisante, maní, pera, mijo en grano, patata, colza, césped inglés, soja, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, taro, té, tabaco, tomate, triticales, trufa y flame.

5 La exposición de un patógeno de planta a la defensina modificada se puede alcanzar de diversos modos, por ejemplo:

10 (a) La defensina modificada se puede aplicar a partes de la planta o al suelo u otro medio de crecimiento alrededor de las raíces de las plantas o a la semilla de la planta antes de que se siembre usando técnicas agrícolas estándar (tales como rociado). La defensina se puede haber sintetizado químicamente o extraído de los microorganismos o plantas genéticamente modificadas para expresar la proteína. La proteína se puede aplicar a las plantas o al medio de crecimiento vegetal en la forma de una composición que comprende la defensina en mezcla con un diluyente sólido o líquido y opcionalmente diversos adyuvantes tales como agentes tensioactivos.

15 (b) Una composición que comprende un microorganismo genéticamente modificado para expresar la defensina antipatógeno se puede aplicar a una planta o al suelo en el que crece una planta.

20 (c) Se puede introducir un endófito genéticamente modificado para expresar la defensina antipatógeno en el tejido vegetal (por ejemplo, por un proceso de tratamiento de semilla). Un endófito se define como un microorganismo que tiene la capacidad de entrar en relaciones endosimbióticas no patógenas con un hospedador vegetal. Se ha descrito un método de protección aumentada por endófito de plantas en una serie de solicitudes de patente de "Crop Genetics International Corporation" (por ejemplo, el Número de Publicación de Publicación de Solicitud Internacional WO90/13224, Número de Publicación de Patente Europea EP-125468-B1, Número de Publicación de Solicitud Internacional WO91/10363, Número de Publicación de Solicitud Internacional WO87/03303). El endófito se puede modificar genéticamente para producir compuestos químicos agrícolas. El Número de Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO94/16076 (ZENECA Limited) describe el uso de endófitos que se han modificado genéticamente para expresar un péptido antifúngico derivado de planta.

25 (d) El ADN que codifica una defensina antipatógeno se puede introducir en el genoma vegetal de manera que el péptido se expresa dentro del cuerpo de la planta (el ADN puede ser ADNc, ADN genómico o ADN fabricado usando un sintetizador de ácido nucleico estándar).

35 Para composiciones que comprenden la defensina modificada descrita en la presente memoria, generalmente se incluye un vehículo, excipiente, diluyente, conservante, estabilizador y/o un aditivo sólido o líquido. Opcionalmente, también se puede incluir otro agente antipatógeno.

40 La composición puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo del método de administración previsto. Generalmente, pero no exclusivamente, se usan composiciones tópicas para planta y animales. En la preparación de las composiciones, se pueden emplear medios habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, conservantes y/o agentes colorantes. Las composiciones pueden tomar la forma de una preparación líquida tal como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones. También se pueden usar vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. La composición también puede estar en forma de polvo, cápsula y comprimido.

45 Las defensinas modificadas en la presente memoria se pueden administrar directamente a una planta o parte de la misma o al sistema radicular o suelo o medio circundante del sistema radicular o a la piel, pelo o pelaje de un animal incluyendo un mamífero tal como un ser humano.

50 Cuando se administra por aerosol o rociado, las composiciones se preparan según las técnicas bien conocidas en la técnica de formulación agrícola y farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizadores o dispersantes conocidos en la técnica.

55 La dosis eficaz de las defensinas modificadas puede variar dependiendo de la defensina particular empleada, el modo de administración, el patógeno a tratar y la rigurosidad de la infestación por patógeno. Por tanto, la posología que utiliza la defensina modificada se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica de la planta o sujeto; la rigurosidad de la afección a tratar; la ruta de administración; y su defensina particular empleada. Un experto en horticultor, físico, médico o veterinario experto puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la defensina requerida para prevenir, hacer frente o detener el progreso de la infestación patógena. En la presente memoria también se contemplan formulaciones de liberación lenta.

60 Se proporcionan núcleos de gragea con revestimientos adecuados. Con este propósito, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de gragea para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones de defensina incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores.

La composición de defensina modificada o vector de expresión que codifica la misma también puede comprender otra sustancia patógena tal como otra defensina o una proteína o péptido antipatógeno, o un patogenicida químico o un inhibidor de la proteinasa o forma precursora del mismo.

Otro aspecto enseñado en la presente memoria incluye un protocolo o método para tratar o prevenir una planta infestada con un patógeno, el protocolo o el método que comprende aplicar a la planta o parte de la misma o al suelo o medio soporte del crecimiento alrededor de la planta una cantidad eficaz antipatógena de una composición que comprende la defensina modificada como se describe en la presente memoria, sola o junto con otro agente antipatógeno.

En la presente memoria se enseña un protocolo o método para tratar o prevenir un animal incluyendo un mamífero tal como un sujeto humano infectado o infestado con un patógeno, comprendiendo el protocolo o método aplicar al sujeto una cantidad eficaz patógena de una composición que comprende la defensina modificada como se describe en la presente memoria.

El término "aplicar" incluye poner en contacto y exponer. La defensina modificada se puede usar sola o junto con otros agentes antipatógenos o agentes que facilitan la defensina modificada que entra en un patógeno.

En una realización adicional, las células vegetales se pueden transformar con construcciones de ADN recombinantes según una diversidad de métodos conocidos (plásmidos Ti de *Agrobacterium*, electroporación, microinyección, pistola de microproyectiles, etc.). Las células transformadas se pueden regenerar en algunos casos adecuados en plantas completas en las que el nuevo material nuclear se incorpora de forma estable en el genoma. Las plantas tanto monocotiledóneas transformadas como dicotiledóneas se pueden obtener de este modo, aunque las últimas generalmente se regeneran más fácilmente. Alguna de la progenie de estos transformantes primarios heredan el ADN recombinante que codifica la defensina antipatógeno.

La presente descripción proporciona además una planta que tiene resistencia mejorada a un hongo y que contiene ADN recombinante que expresa una defensina solanácea Clase II modificada. Tal planta se puede usar como el progenitor en los cruces de reproducción vegetal estándar para desarrollar híbridos y líneas que tienen resistencia fúngica.

El ADN recombinante es ADN, generalmente heterólogo, que se ha introducido en la planta o sus ancestros mediante transformación. El ADN recombinante codifica una defensina solanácea Clase II modificada expresada para la administración a un sitio del ataque patógeno (tal como las hojas).

Cuando se expresa la presente defensina modificada dentro de una planta transgénica o su progenie, el hongo se expone a la defensina en el sitio de o remoto al sitio del ataque fúngico sobre la planta. En particular, mediante el uso de secuencias reguladoras de gen apropiadas, la defensina se puede producir *in vivo* cuando y donde sea más eficaz. Por ejemplo, la defensina se puede producir dentro de partes de la planta en las que no se expresa normalmente en cantidad pero en las que la resistencia a enfermedad es importante (tal como en las hojas).

Ejemplos de plantas genéticamente modificadas que se producen incluyen cultivos de campo, cereales, fruta y vegetales tales como: maíz, soja, sorgo, trigo, cebada, maíz, algodón, canola, arroz, abacá, alfalfa, almendra, manzana, espárrago, plátano, judía-*phaseolus*, zarzamora, haba, canola, anacardo, yuca, garbanzo, cítrico, coco, café, higo, lino, uvas, cacahuete, cáñamo, lavanda, aceitunas, cebolla, guisante, maní, pera, mijo en grano, patata, colza, césped inglés, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, taro, té, tabaco, tomate, triticale y ñame.

Un hongo puede ser cualquier hongo que crece sobre, en o cerca de la planta. En este contexto, la resistencia incluye una tolerancia aumentada a un hongo cuando se compara con una planta silvestre. La resistencia puede variar de un incremento ligero en la tolerancia a los efectos del hongo (cuando el hongo se inhibe parcialmente) a resistencia total de manera que la planta no está afectada por la presencia del hongo (cuando el hongo se inhibe seriamente o se mata). Un nivel incrementado de resistencia frente a un hongo particular o resistencia frente a un espectro más amplio de hongos pueden ambos constituir un mejoramiento en la resistencia. Las plantas transgénicas (o plantas derivadas de las mismas) que muestran resistencia mejorada se seleccionan siguiendo transformación vegetal o posterior cruzamiento.

La presente descripción proporciona un método para generar una planta genéticamente modificada que presenta actividad antifúngica como resultado de la modificación genética, comprendiendo el método crear una planta que



comprende células que expresan el ácido nucleico codificador de la defensina solanácea Clase II artificialmente modifica como se enseña en la presente memoria, el nivel de expresión en la planta suficiente para que la defensina modificada presente un efecto protector frente a un patógeno fúngico de planta.

5 Las presentes defensinas modificadas se pueden usar solas o en combinación con una u otras defensinas más de cualquier grupo de las defensinas. Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona un método para generar una planta que presenta propiedades antifúngicas, comprendiendo el método crear una planta genéticamente modificada que comprende células que expresan la defensina solanácea Clase II modificada enseñada en la presente memoria en combinación con otra defensina. Tal planta ha reducido el riesgo de fomentar resistencia por los patógenos. La referencia a "sinergia" incluye combatir la resistencia a una defensina sencilla fusionando dos o más defensinas.

15 La presente defensina modificada se puede fabricar basándose en su secuencia de aminoácidos usando adición gradual estándar de uno o más restos de aminoácido usando, por ejemplo, un sintetizador de péptido o proteína. Alternativamente, la defensina modificada se puede hacer por medios recombinantes. La defensina modificada se puede usar sola o en combinación con otros agentes antipatógenos sean proporcionados por una célula o aplicados tópicamente o sistemáticamente.

20 Como se indicó anteriormente, la presente defensina modificada presenta actividad antifúngica mejorada o aumentada.

25 En la presente memoria se enseña un método para reducir o controlar la infestación por patógeno sobre o en una planta o en el suelo circundante a una planta o sus raíces, comprendiendo el método aplicar tópicamente la defensina modificada de la presente descripción a la planta o raíces de la planta o al suelo.

30 En la presente memoria se enseña un método para reducir o controlar la infestación por patógeno sobre o en un animal, comprendiendo dicho método aplicar tópicamente la presente defensina solanácea Clase II modificada a una región de superficie potencialmente infectada sobre el animal. El animal puede ser un mamífero incluyendo un ser humano. Por consiguiente, en la presente memoria se describen medicamentos antipatógenos para animal y en particular para mamífero tal como ser humano. El medicamento puede estar en forma de polvo, rociador, atomizador, nanopartícula, gel, pasta, vendaje impregnado, pintura, aerosol, brebaje (*drench*) u otro líquido. La formulación antipatógena también puede ser una composición de liberación lenta. La formulación se puede usar para tratar un sujeto infectado o como conservante.

35 Como se usa en la presente memoria, "que comprende" es sinónimo "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" y es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de método adicionales no enumerados. Como se usa en la presente memoria, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no específico en el elemento de la reivindicación. Como se usa en la presente memoria, "que consiste básicamente en" no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. Cualquier recitación en la presente memoria del término "que comprende", particularmente en una descripción de componentes de una composición o en una descripción de elementos de un dispositivo, se entiende que abarca aquellas composiciones y métodos que consisten básicamente en y que consisten en los componentes o elementos enumerados. La presente descripción descrita de manera ilustrativa en la presente memoria adecuadamente se puede poner en práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no están específicamente descritos en la presente memoria.

50 Cuando en la presente memoria se describe un grupo de sustituyentes, se entiende que todos los miembros individuales de esos grupos y todos los subgrupos, incluyendo cualquier isómero y enantiómero de los miembros del grupo, y clases de compuestos que se pueden formar usando los sustituyentes se describen por separado. Cuando se reivindica un compuesto, se debería entender que no se pretende que estén incluidos los compuestos conocidos en la técnica que incluyen los compuestos descritos en las referencias descritas en la presente memoria. Cuando en la presente memoria se usa un grupo Markush u otra clasificación, se pretende que se incluyan individualmente en la descripción todos los miembros individuales del grupo y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles del grupo.

55 Cuando en la presente memoria se enumera un intervalo, se pretende que todos los subintervalos dentro del intervalo indicado, y todos los valores de números enteros dentro del intervalo indicado, estén previstos, como si cada subintervalo y valor entero estuvieran enumerados.

## 60 Ejemplos

Los aspectos se describen además mediante los siguientes Ejemplos no limitantes. Los métodos usados en estos Ejemplos se describen a continuación.

65

## Purificación de defensinas de flores solanáceas

Para aislar defensinas clase II de su fuente natural, flores completas de *N. alata* (NaD1, NaD2) o *N. suaveolens* (NsD1, NsD2) hasta la fase de coloración de pétalo del desarrollo floral se trituraron hasta un polvo fino y se extrajeron en ácido sulfúrico diluido como se describió previamente (Lay y col. 2003 *supra*). En pocas palabras, se congelaron flores (760 g de peso húmedo) en nitrógeno líquido, se trituraron hasta un polvo fino en un mortero, y se homogenizaron en ácido sulfúrico 50 mM (3 ml por g de peso fresco) durante 5 min usando un homogenizador Ultra-Turrax. Después de agitar durante 1 h a 4 °C, los restos celulares se separaron por filtración a través de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA) y centrifugación (25.000 xg, 15 min, 4 °C). A continuación, se ajustó el pH a 7,0 mediante la adición de NaOH 10 M y el extracto se agitó durante 1 h a 4 °C antes de centrifugación (25.000 xg, 15 min, 4 °C) para separar las proteínas precipitadas. El sobrenadante (1,8 l) se aplicó a una columna (2,5 x 2,5 cm) de Flujo Rápido (GE Healthcare Bio-Sciences) con SP Sepharose (Marca comercial) precalibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM. Las proteínas no unidas se separaron lavando con 20 volúmenes de columna tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) y las proteínas unidas se eluyeron en 3x fracciones de 10 ml con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 500 mM. Las fracciones de la columna de SP Sepharose se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).

Purificación de NaD1 de *Pichia pastoris*

El sistema de expresión de *Pichia pastoris* es bien conocido y está comercialmente disponible en Invitrogen (Carlsbad, CA; véase el Manual de Expresión de *Pichia* del proveedor que describe la secuencia del vector de expresión pPIC9).

Se usó una colonia sencilla GS115 de *P. pastoris* pPIC9-NaD1 para inocular 10 ml de medio BMG (descrito en el Manual de Expresión de *Pichia* de Invitrogen) en un matraz de 100 ml y se incubó durante la noche en una incubadora con agitación a 30 °C (140 rpm). El cultivo se usó para inocular 500 ml de BMG en un matraz con deflector de 2 l que se colocó en una incubadora con agitación a 30 °C (140 rpm). Una vez que se alcanzó la DO600 de 2,0 (aproximadamente 18 h), las células se recogieron por centrifugación (2.500 xg, 10 min) y se resuspendieron en 1 l de medio BMM (DO600=1,0) en un matraz con deflector de 5 l y se incubaron en una incubadora con agitación a 28 °C durante 3 días. El medio de expresión se separó de las células por centrifugación (4.750 rpm, 20 min) y se diluyó con un volumen igual de tampón fosfato de potasio 20 mM (pH 6,0). El medio se ajustó a pH 6,0 con NaOH antes de se aplicara a una columna de SP Sepharose (1 cm x 1 cm, Amersham Biosciences) precalibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 6,0. A continuación, se lavó la columna con 100 ml de tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 6,0 y la proteína unida se eluyó en 10 ml de tampón fosfato de potasio 10 mM que contenía NaCl 500 mM. Las proteínas eluidas se sometieron a RP-HPLC usando un gradiente lineal de 40 minutos como se describe a continuación en la presente memoria. Los picos de proteína se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con el anticuerpo anti-NaD1. Las fracciones que contenían NaD1 se liofilizaron y resuspendieron en agua ultrapura Milli-Q estéril. La concentración de proteína de NaD1 expresada en *Pichia* se determinó usando el ensayo de proteína por ácido bicinónico (BCA) (Pierce Chemical Co.) con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína patrón.

## Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa

Se realizó cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) en un "System Gold HPLC" (Beckman) acoplado a un detector (modelo 166, Beckman) usando una columna C8 preparativa (22 x 250 mm, Vydac) con una columna de guarda unida. Las muestras de proteína se cargaron en tampón A (ácido trifluoroacético al 0,1 % [v/v]) y se eluyeron con un gradiente lineal de tampón B de 0 a 100 % [v/v] (acetonitrilo al 60 % [v/v] en ácido trifluoroacético al 0,089 % [v/v]) a un caudal de 10 ml/min durante 40 min. Las proteínas se detectaron haciendo un seguimiento de la absorbancia a 215 nm. Los picos de proteína se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE.

Las muestras de cada fase de las purificaciones de NaD1 (30 µl) se añadieron a tampón de carga de muestra LDS NuPAGE (Marca Comercial Registrada) (10 µl, Invitrogen) y se calentaron a 70 °C durante 10 min. A continuación, las muestras se cargaron en geles de Bis-Tris poliacrilamida al 4 a 12 % [p/v] prefabricados NuPAGE (Marca Comercial Registrada) (Invitrogen) y las proteínas se separaron usando un aparato de electroforesis XCell-Surelock (Invitrogen) que funcionó a 200 V. Las proteínas se visualizaron por tinción con Azul Coomassie o se transfirieron sobre nitrocelulosa para inmunotransferencia con los anticuerpos anti-NaD1.

## Espectro de dicroísmo circular de rNaD1

Para examinar si NaD1 purificada de *P. pastoris* (rNaD1) estaba correctamente plegada, se registró su espectro de dicroísmo circular (DC) con UV lejano y se comparó con el de NaD1 nativa. La similitud de los dos espectros indica que la estructura de rNaD1 no estaba significativamente alterada en comparación con la NaD1 nativa.

65

## Mutagénesis por PCR de NaD1

5 La mutagénesis dirigida a sitio de NaD1 se llevó a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Phusion (Marca Comercial Registrada) (Finnzymes). Los cebadores de oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' se diseñaron para incorporar la mutación deseada. Se amplificó el plásmido molde entero (pPIC9-NaD1) en una reacción de PCR de 30 ciclos con el siguiente perfil de temperatura; 98 °C, 30 s; 55 °C, 20 s; 72 °C, 4 min con un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 min. A continuación, el producto de PCR lineal se circularizó usando la T4 ADN Ligasa Quick durante 5 min a TA y se transformó dentro de las células TOP10 competentes según las instrucciones del fabricante. Las construcciones se secuenciaron usando el cebador AOX3' para asegurar que la mutación se había incorporado correctamente.

Preparación de *P. pastoris* electrocompetente

15 Las células de *P. pastoris* GS115 electrocompetentes (Invitrogen) se prepararon como se describe en Chang y col. (2005) *Mol. Biol. Cell* 16(10):4.941-4.953. En pocas palabras, las células cultivadas durante la noche en YPD (extracto de levadura Bacto al 1 % p/v, extracto de peptona Bacto al 2 % p/v, y dextrosa al 2 % p/v) se recogieron y se trataron con YPD que contenía DTT 10 mM, HEPES 25 mM, pH 8, durante 15 min a 30 °C con agitación. Las células se lavaron dos veces en agua y una vez en sorbitol 1M helado, antes de que se resuspendieran en sorbitol 1 M y se dividieran en alícuotas de 80 µl para almacenamiento a -80 °C.

Transformación de *P. pastoris* GS115 con construcciones pPIC9

25 Se usaron colonias TOP10 de *E. coli* sencillas transformadas con cada construcción pPIC9 para inocular 10 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C en una incubadora con agitación. El ADN plásmido se aisló usando el kit miniprep Qiaprep (Marca Comercial Registrada) (Qiagen) y se sometió a linearización durante la noche usando la enzima de restricción *SalI*. Se descongelaron células de *P. pastoris* GS115 competentes (80 µl) sobre hielo y 1 µg de ADN sometido a linearización se añadió en una cubeta de electroporación Gene Pulser (Marca Comercial Registrada) helada con un hueco de 0,2 cm. El ADN se introdujo por electroporación a 1,5 kV, 25 µF, 400 Ω (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories). Se añadió sorbitol 1 M helado (1 ml) a las células antes de que se sembraran en placa sobre placas MD (base de nitrógeno de levadura al 1,34 % p/v, sin aminoácidos y con sulfato de amonio [US Biological, YNB], biotina al  $4 \times 10^{-5}$  % p/v, dextrosa al 2 % p/v) y se incubaron a 30 °C durante 5 días. A continuación, las colonias positivas se seleccionaron y se sembraron de nuevo en placa sobre placas MD frescas.

## 35 Caracterización de rNaD1

Las figuras 6A a D muestran una inmunotransferencia, traza de HPLC de fase inversa, estructura de rNaD1 aislada de flores y actividad de rNaD1 frente a crecimiento hifal.

## 40 Comparaciones de secuencia de aminoácidos

45 Las figuras 3A y 3B proporcionan una representación de secuencias de aminoácidos de diversas defensinas solanáceas Clase II incluyendo NaD1. La Figura 4 muestra defensinas Clase I y II. La región Bucle 1B en estas alineaciones comprende aminoácidos 10 a 15 en la Figura 3 y los aminoácidos 9 a 14 en la Figura 4. La presente descripción incluye una defensina que tiene los 20 restos de aminoácido contiguos C-terminales con al menos 70 % de similitud a aminoácidos 32 a 51 (Figura 3) de NaD1 (SEQ ID NO:52). Se proporcionan Ejemplos en la Tabla 4.

## Mapas de vector

50 La Figura 11 muestra un mapa de vector para pHEX138.

Método de bioensayo para estudios *in planta*:Preparación de inóculo de *C. graminicola*:

55 Se aisló *Colletotrichum graminicola* (US isolate Carroll-1A-99) de *Zea mays* (Pioneer Hi-Bred International, Inc. Johnston, Iowa, USA). Las esporas se aislaron de cultivos formadores de esporas que crecen sobre agar V8 durante aproximadamente 2 a 3 semanas. Las esporas de *C. graminicola* se recogieron arañando la superficie de las placas en agua estéril y se separaron esporas del material hifal por filtración a través del tejido facial. La concentración de esporas en el filtrado se midió usando un hemocitómetro.

Preparación de inóculo de *F. graminearum*:

65 Se aisló *Fusarium graminearum* (73B1A) de *Zea mays* (Pioneer Hi-Bred International, Inc. Johnston, Iowa, USA). Las esporas se aislaron de cultivos formadores de esporas que crecen sobre agar SNP durante aproximadamente 2

a 3 semanas. Las esporas de *F. graminearum* se recogieron arañando la superficie de las placas en agua estéril. La concentración de esporas dentro se midió usando un hemocitómetro.

Inoculación de plantas de maíz:

5 Las plantas para el bioensayo se cultivaron en el invernadero durante aproximadamente 9 a 10 semanas después de sacarlas del matraz.  
Inoculación de *C. graminicola*

10 Se hicieron dos heridas, 2,0 mm de longitud sobre lados opuestos de la vaina de la hoja de maíz y, a continuación, se echaron sobre las mismas  $1 \times 10^6$  esporas de *C. graminicola*/ml. A continuación, las heridas se sellaron con Glad Press'n'Seal durante tres días. El área de infección se midió por fotografía digital 10 días después de la inoculación.

Inoculación de *F. graminearum*

15 Se hicieron dos heridas, 2,0 mm de longitud sobre lados opuestos de la vaina de la hoja de maíz. Se echaron sobre las heridas discos de papel de 6 mm de diámetro sumergidos en  $1 \times 10^6$  esporas de *F. graminearum*/ml. A continuación, las heridas se sellaron con Glad Press'n'Seal durante tres días. El área de infección se midió por fotografía digital 10 días después de la inoculación.

20 Método ELISA

25 Extracto de proteína: se escindieron vainas de la hoja de plantas cultivadas en el invernadero. El tejido (50 mg) se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en un molinillo mezclador (Retsch MM300) durante 2x15 s a frecuencia de  $30 \text{ s}^{-1}$ . Los extractos de proteína se hicieron añadiendo 450  $\mu\text{l}$  de PVPP insoluble al 2 % (Polyclar)/PBS/Tween 20 al 0,05 % y agitando en vórtex durante 20 s. Las muestras se centrifugaron durante 10 min y se recogió el sobrenadante.

30 Las placas ELISA (Nunc Maxisorp N° 442404) se incubaron con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de anticuerpo primario en PBS (100 ng/pocillo de anti-NaD1 (anticuerpo policlonal se realizó mediante un método estándar para NaD1 purificada de flores de *Nicotiana glauca*)). Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C en una caja húmeda. A continuación, se lavaron durante 2 min x 4 con PBS/Tween 20 al 0,05 % v/v. Las placas se bloquearon con 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de BSA al 3 % p/v (Sigma A-7030: calidad ELISA 98 %) en PBS y se incubaron durante 2 h a 25 °C. A continuación, se lavaron las placas durante 2 min x 4 con PBS/Tween 20 al 0,05 % v/v.

35 A continuación, se aplicaron extractos de proteína de vaina de maíz (100  $\mu\text{l}$ /pocillo diluidos en PBS/Tween 20 al 0,05 % v/v) a las placas que se incubaron a continuación durante 2 h a 25 °C. A continuación, se lavaron las placas durante 2 min x 4 con PBS/Tween 20 al 0,05 % y, a continuación, se aplicó 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de anticuerpo secundario en PBS (75 ng/pocillo de anticuerpo NaD1 marcado con biotina). El anticuerpo marcado con biotina se preparó usando el kit de biotilación EZ-link Sulfo-NHS-LC (Pierce); se usaron 2 ml de anticuerpo purificado de proteína A y 2 mg del reactivo de biotina. Las placas se incubaron durante 1 h a 25 °C y, a continuación, se lavaron durante 2 min x 4 con PBS/Tween 20 al 0,05 % v/v, y se aplicó 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de conjugado NeutriAvidin HRP (Pierce N° 31001; 1:1000 dilución; 0,1 ml/pocillo) en PBS. Las placas se incubaron durante 1 h a 25 °C y, a continuación, se lavaron durante 2 min x 2 con PBS/Tween 20 al 0,05 % v/v, seguido de 2 min x 2 con H<sub>2</sub>O. Justo antes de su uso, el sustrato se preparó disolviendo 1 comprimido ImmunoPure OPD (Pierce N° 34006) en 9 ml de H<sub>2</sub>O, a continuación, añadiendo 1 ml de tampón de peróxido estable (10x Pierce N° 34062). El sustrato se aplicó a 100  $\mu\text{l}$ /pocillo y las placas se incubaron a 25 °C hasta que se desarrolló el color. La reacción se paró aplicando 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 2,5 M. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placa (Molecular Devices).

50 Análisis de inmunotransferencia

55 Se escindieron vainas de la hoja de plantas cultivadas en el invernadero. Se congeló el tejido de la vaina de la hoja (50 mg) en nitrógeno líquido y se trituró hasta un polvo fino en un molinillo mezclador (Retsch MM300) durante 2 x 15 s a frecuencia de  $30 \text{ s}^{-1}$ . Las muestras se extrajeron añadiendo PVPP insoluble al 2 % p/v (Polyclar)/PBS/ Tween 20 al 0,05 % v/v (75  $\mu\text{l}$ ) y se agitaron con vórtex. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se conservaron. Al sobrenadante (21  $\mu\text{l}$ ), se añadieron 4X tampón muestra LDS Novex NuPAGE (7,5  $\mu\text{l}$ ) y  $\beta$ -mercaptoetanol (1,5  $\mu\text{l}$ ) y se calentaron a 70 °C durante 10 min.

60 Las proteínas de la vaina de la hoja sometida a extracción se separaron por SDS-PAGE sobre geles de gradiente de poli(acrilamida) al 4 a 12 % p/v preformados (Novex, NuPAGE bis-tris, tampón MES) durante 35 min a 200 V en un aparato de electroforesis Novex X Cell II mini-cell. Se incluyeron marcadores de peso molecular preteñidos (Novex SeeBlue Plus 2) como patrones. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Osmonics 0,22 micras NitroBind) durante 60 min a 30 V usando el aparato de electroforesis Novex X Cell mini-cell en tampón de transferencia NuPAGE con metanol al 10 % v/v. Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 min en isopropanol, seguido de un lavado de 5 min en TBS.

65

## ES 2 660 965 T3

- 5 La membrana se bloqueó durante 1 h en BSA al 3 % p/v a temperatura ambiente seguido de incubación con anticuerpo primario durante la noche a temperatura ambiente (NaD1 madura o anticuerpo HVCPI6 diluido 1:1.000 en TBS/BSA al 1 % p/v de 1 mg/ml de reserva). La membrana se lavó 5 x 10 min en TBST antes de la incubación con anti-IgG de conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 60 min a TA (Pierce, dilución 1:50.000 en TBS). Se realizaron cinco lavados con TBST de 10 min adicionales antes de que la membrana se incubara con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se expusieron a ECL Hyperfilm (Amersham).



TABLA 4

Seq->	NaD1.	NsD1.	NsD2.	PhD1.	PhD2.	TPP3.	FST.	NeThio1.	NeThio2.	Na-gth.	NpThio1.	Cc gth	Fuente	Número de acceso
NaD1.	ID	100 %	95 %	90 %	100 %	80 %	95 %	100 %	100 %	85 %	85 %	75 %	Nicotiana alata	Q8GTM0
NsD1.	100 %	ID	95 %	90 %	100 %	80 %	95 %	100 %	100 %	85 %	85 %	75 %	Nicotiana suaveolens	ninguno
NsD2.	95 %	95 %	ID	90 %	95 %	75 %	90 %	95 %	95 %	80 %	80 %	75 %	Nicotiana suaveolens	ninguno
PhD1.	90 %	90 %	90 %	ID	90 %	70 %	85 %	90 %	90 %	75 %	75 %	75 %	Petunia hybrida	Q8H6Q1
PhD2.	100 %	100 %	95 %	90 %	ID	80 %	95 %	100 %	100 %	85 %	85 %	75 %	Petunia hybrida	Q8H6Q0
TPP3.	80 %	80 %	75 %	70 %	80 %	ID	85 %	80 %	80 %	65 %	65 %	85 %	Solanum lycopersicum	AAA80496
FST.	95 %	95 %	90 %	85 %	95 %	85 %	ID	95 %	95 %	80 %	80 %	80 %	Nicotiana tabacum	P32026
NeThio1.	100 %	100 %	95 %	90 %	100 %	80 %	95 %	ID	100 %	85 %	85 %	75 %	Nicotiana excelsior	BAA21114
NeThio2.	100 %	100 %	95 %	90 %	100 %	80 %	95 %	100 %	ID	85 %	85 %	75 %	Nicotiana excelsior	BAA21113
Na-gth.	85 %	85 %	80 %	75 %	85 %	65 %	80 %	85 %	85 %	ID	100 %	60 %	Nicotiana attenuata	AAS13496
NpThio1.	85 %	85 %	80 %	75 %	85 %	65 %	80 %	85 %	85 %	100 %	ID	60 %	Nicotiana paniculata	O24115
Cc gth	75 %	75 %	75 %	75 %	75 %	85 %	80 %	75 %	75 %	60 %	60 %	ID	Capsicum chinense	AAD21200

## EJEMPLO 1

*Actividad antifúngica de defensinas Clase I*

5 Tres defensinas Clase I o bien se purificaron de su fuente nativa (NaD2) o se expresaron usando sistema de expresión de *P. pastoris* ( $\gamma$ -zeationina2,  $\gamma$ -hordotionina) como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos se valoró frente a *Fusarium graminearum* básicamente como se describe en Broekaert y col. (1990) *FEMS Microbiol Lett* 69:55-60, 1990, y en comparación con la de dos defensinas clase II solanáceas (NaD1, NsD1). Las esporas se aislaron de cultivos esporulantes que crecen en caldo de dextrosa de patata (PDB) diluida a la mitad mediante filtración a través de muslina estéril. Las concentraciones de espora se determinaron usando un hemocitómetro y se ajustó a  $5 \times 10^4$  esporas/ml en  $\frac{1}{2}$  x PDB. Las suspensiones de espora (80  $\mu$ l) se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos junto con 20  $\mu$ l de proteína esterilizada por filtro (filtro con jeringuilla de 0,22  $\mu$ m; Millipore), o agua para proporcionar concentraciones finales de proteína de 0 a 10  $\mu$ M. Las placas se agitaron brevemente y se colocaron en oscuridad a 25 °C sin agitar durante 28 h. El crecimiento hifal se estimó midiendo la densidad óptica a 595 nm usando un lector de placa de microtitulación (SpectraMax Pro M5e; Molecular Devices). Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados (Figura 7) mostraron que las defensinas Clase I ensayadas presentaban baja actividad antifúngica.

## EJEMPLO 2

20 *Modificación a la región Bucle 1B de NaD1 sobre una defensina solanácea Clase II*

El primer aspecto de este ejemplo es la selección de una defensina solanácea Clase II. Las defensinas se sometieron a cribado para identificar defensinas que tienen una porción C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:52 o que tiene al menos 70 % de similitud a la misma después de alineación óptima (Tabla 4). La Figura 3 muestra el tipo de alineación. SEQ ID NO:50 representa los 20 aminoácidos contiguos terminales que incluyen el resto de cisteína invariante más C-terminal. NaD1, NsD1 PhD2, NeThio1 y NeThio2 son ejemplos de defensinas que tienen 100 % de similitud a SEQ ID NO:52.

30 NaD1 se selecciona como la cadena principal de defensina solanácea Clase II. Esta defensina comprende un Bucle 1B que tiene la secuencia de aminoácidos: NTFPGI (SEQ ID NO:12).

Uno o más de los restos de aminoácido NTFPGI se sustituye(n) por otro resto de aminoácido. Todos los seis restos se pueden alterar o 1 o 2 o 3 o 4 o 5 de los restos se pueden cambiar. Esto incluye una única sustitución de aminoácidos o un intercambio de Bucle 1B. Ejemplos de cambios hechos incluyen las siguientes secuencias (junto con la fuente entre paréntesis):

40 HRFKGP (NaD2) [SEQ ID NO:29];  
 QHHSFP (Zea2) [SEQ ID NO:30];  
 DTYRGV (PsD1) [SEQ ID NO:31];  
 PTWEGI (PsD2) [SEQ ID NO:32];  
 DKYRGP (MsDeF1) [SEQ ID NO:33];  
 KTFKGI (SoD2) [SEQ ID NO:34];  
 KTWSGN (DmAMP1) [SEQ ID NO:35];  
 45 EGWXGK (VrD1) [SEQ ID NO: 36];  
 GTWSGV (RsAFP2) [SEQ ID NO:37]; y  
 AGFKGP (gl-H) [SEQ ID NO:38].

Otros ejemplos incluyen seleccionar una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:67 a 79.

## EJEMPLO 3

*Inhibición del crecimiento de Fusarium graminearum en presencia de variantes de bucle de NaD1*

55 NaD1 recombinante y las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 se expresaron en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificaron como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a *Fusarium graminearum* se valoró básicamente como se describe en Broekaert y col. (1990) *FEMS Microbiol Lett* 69:55-60. Las esporas se aislaron de los cultivos formadores de esporas que crecen en caldo de dextrosa de patata (PDB) diluida a la mitad mediante filtración a través de muslina estéril. Las concentraciones de espora se determinaron usando un hemocitómetro y se ajustaron a  $5 \times 10^4$  esporas/ml en  $\frac{1}{2}$  x PDB. Las suspensiones de espora (80  $\mu$ l) se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos junto con 20  $\mu$ l de proteína esterilizada por filtro (filtro con jeringuilla de 0,22  $\mu$ m; Millipore), o agua para proporcionar concentraciones finales de proteína de 0 a 10  $\mu$ M. Las placas se agitaron brevemente y se colocaron en oscuridad a 25 °C sin agitación durante 28 h. El crecimiento hifal se estimó midiendo la densidad óptica a 595 nm usando un lector de placa de microtitulación (SpectraMax Pro M5e; Molecular Devices). Cada ensayo se realizó por triplicado.

## Resultados

La Figura 8 ilustra la actividad antifúngica relativa de las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *F. graminearum* (Fgr). A 0,825 ppm, HXP4, HXP34 y HXP35 inhibieron el crecimiento de *F. graminearum* en un 41,7, 14,6 o 34,5 % más que NaD1, respectivamente. A 1,65 ppm, todas las tres variantes de bucle inhibieron el crecimiento de *F. graminearum* en aproximadamente un 70 % más que NaD1.

## EJEMPLO 4

10 *Inhibición del crecimiento de Fusarium verticilloides en presencia de variantes de bucle de NaD1*

NaD1 recombinante y las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 se expresaron en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificaron como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a *Fusarium verticilloides* se valoró como se describe en el Ejemplo 1.

## Resultados

La Figura 9 ilustra la actividad antifúngica relativa de las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *F. verticilloides* (Fve). A 3,25 ppm, HXP4, HXP34 y HXP35 inhibieron el crecimiento de *F. verticilloides* en un 40,9, 29,4 o 5,1 % más que NaD1, respectivamente. A 6,5 ppm, todas las tres variantes de bucle inhibieron el crecimiento de *F. verticilloides* en al menos un 67 % más que NaD1.

## EJEMPLO 5

25 *Inhibición del crecimiento de Colletotrichum graminicola en presencia de variantes de bucle de NaD1*

NaD1 recombinante y las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 se expresaron en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificaron como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a *Colletotrichum graminicola* se valoró como se describe en el Ejemplo 1.

## Resultados

La Figura 10 ilustra la actividad antifúngica relativa de las variantes de bucle HXP4, HXP34 y HXP35 en comparación con NaD1 frente a *C. graminicola* (Cgr). A 13 ppm, HXP4, HXP34 y HXP35 inhibieron el crecimiento de *C. graminicola* en un 61,3, 21,8 o 83,2 % más que NaD1, respectivamente.

## EJEMPLO 6

*Producción de plantas transgénicas*

Se produjo canola transgénica (*Brassica napus*, cv RI64) que expresaba HXP4 por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El vector binario de ADN usado para la transformación (pHEX138) se describe en la Figura 11. El vector binario se transfirió en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación y la presencia del plásmido se confirmó por electroforesis en gel. Los cultivos de *Agrobacterium* se usaron para infectar secciones de hipocótilo de canola. Se seleccionaron raíces transgénicas sobre la kanamicina antibiótica a 25 mg/l. Se seleccionaron plantas transgénicas que expresaban HXP4 usando ELISA para detectar proteínas solubles extraídas de las hojas.

A partir de tres experimentos de transformación (CAT93, CAT94 y CAT96) 7 plantas (6 eventos) tenían niveles detectables de HXP4 (Tabla 5). El nivel de proteína HXP4 oscilaba de 0,3 a 2,1 ppm (ng de HXP4/mg de peso fresco de tejido de hoja).

TABLA 5

Línea de canola transgénica	Nivel de HXP4 (ppm)
93.1.2	2,1
93.1.3	2,0
93.15.3	1,9
96.7.2	1,8
96.17.1	0,3
96.72.1	1,9
94.11.1	1,6

*Bioensayos en invernadero con Leptosphaeria maculans*

El *Leptosphaeria maculans* patógeno se cultiva sobre placas de agar V8 al 10 % (v/v) durante 1 a 2 semanas a temperatura ambiente. Las picnidiosporas se aíslan cubriendo la placa con agua esterilizada (5 ml) y arañando la superficie del agar para sacar las esporas. Las esporas se separan del material hifal mediante filtración a través de tejidos estériles. La concentración de las esporas en el filtrado se mide usando un hemocitómetro y la concentración final se ajusta a entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  picnidiosporas/ml con agua.

Las plántulas se cultivaron en el invernadero en pequeñas bandejas de plantación a 22 °C. Aproximadamente diez días después de la siembra, los dos cotiledones de cada plántula se puntearon dos veces con una aguja de calibre 26 (una vez en cada uno de los 2 lóbulos) y el área herida se inocula con una gotita de esporas (5 µl). Los controles se inoculan con agua. Las plantas se mantienen bajo condiciones de alta humedad durante 3 días para facilitar la germinación de espóra.

Los síntomas de enfermedad se valoran hasta 20 días después de la inoculación. El tamaño de la lesión se cuantifica usando análisis por programa informático (ImageJ) de imágenes digitales en mm<sup>2</sup>. El tamaño de lesión promedio se analiza estadísticamente usando métodos no paramétricos.

## EJEMPLO 7

*Producción de plantas de maíz transgénicas que expresan HXP4*

Se producen plantas de maíz transgénicas por transformación mediada por *Agrobacterium* o bombardeo de partículas usando protocolos estándar tales como los descritos en el Número de Patente Americana 5.981.840; Número de Patente Americana 7.528.293; Número de Patente Americana 7.589.176; Número de Patente Americana 7.785.828; Frame y col. (2002) *Plant Physiology* 129:13-22. Un vector binario que contenía GAT como el marcador seleccionable, un promotor de ubiquitina para la expresión constitutiva y una secuencia optimizada de codón codificadora de o bien HXP4 o NaD1 bajo el control de un promotor de ubiquitina constitutivo así como una secuencia codificadora que codifica GAT como marcador seleccionable se transfirió dentro de una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Los embriones de maíz inmaduros se infectaron por inmersión en una suspensión de *Agrobacterium* seguido de un periodo de cocultivo sobre un medio sólido. A continuación, los embriones se "dejaron descansar" opcionalmente durante el tiempo en el que se incubaron en presencia de al menos un antibiótico que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*. Los próximos callos transformados se obtuvieron cultivando los embriones infectados sobre medio sólido que contenía glifosfato que inhibe el crecimiento de células no transformadas. Los callos transformados entonces eran capaces de regenerarse dentro de las plantas usando métodos estándar.

Se determinaron los niveles de expresión de HXP4 y NaD1 en plantas PCR positivas, por ejemplo, por cribado por ELISA. Las plantas que expresan HXP4 o NaD1 a >10 ppm se valoraron para resistencia incrementada a *Colletotrichum graminiicola* usando el bioensayo descrito en los Métodos.

## Resultados

Las plantas que expresan HXP4 a >10 ppm mostraron una reducción del 26 % en el área de lesión cuando se compara con plantas transformadas con un vector vacío. Las plantas que expresan NaD1 a >10 ppm no mostraron reducción en el área de lesión en comparación con el control vector vacío (Tabla 8).

## EJEMPLO 8

*Producción de plantas de soja transgénicas que expresan HXP4*

Se producen plantas de soja transgénicas que expresan HXP4 por transformación mediada por *Agrobacterium* o por bombardeo de partículas u otros protocolos estándar como los descritos en el Número de Patente Americana 7.589.176; Número de Patente Americana 7.528.293; Número de Patente Americana 7.785.828.

Las plantas de soja regeneradas que son PCR positivas para HXP4 se valoran para los niveles de expresión de HXP4, por ejemplo, por cribado por ELISA. Las plantas transgénicas fértiles se pueden valorar para el número de copia de gen y las líneas seleccionadas se ensayan para la resistencia a patógenos fúngicos de soja en bioensayos en invernadero.

Las líneas que presentan resistencia incrementada a patógenos fúngicos y roya de soja e insecto, a continuación, se valoran en ensayos de campo en suelo infectado y en ensayos donde las plantas de soja se infectan artificialmente con los patógenos fúngicos, insecto o roya objeto.

## EJEMPLO 9

*Producción de trigo transgénico que expresa HXP4*

5 Se producen plantas de trigo transgénicas que expresan HXP4 por transformación mediada por *Agrobacterium* o por bombardeo de partículas u otros protocolos estándar como los descritos en el Número de Patente Americana 7.785.828. Las plantas de trigo regeneradas que son PCR positivas para HXP4 se valoran para los niveles de expresión de HXP4, por ejemplo, por cribado por ELISA. Las plantas transgénicas fértiles se pueden valorar para el número de copia de gen y las líneas seleccionadas se ensayan para la resistencia a patógenos fúngicos de trigo en bioensayos en invernadero.

10 A continuación, las líneas que presentan resistencia incrementada a patógenos fúngicos de trigo se valoran en ensayos de campo en suelo infectado y en ensayos en los que las plantas de trigo se infectan artificialmente con los patógenos fúngicos objeto.

## EJEMPLO 10

*Actividad de NaD1 modificada frente al patógeno fúngico de humano Aspergillus niger*

20 NaD1 recombinante y la variante de bucle HXP4 se expresaron en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificaron como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a *Aspergillus niger* se valoró como se describió anteriormente.

## Resultados

25 La Figura 12 ilustra la actividad antifúngica relativa de la variante de bucle HXP4 en comparación con NaD1 frente a *A. niger*. A 13 ppm, HXP4 inhibió el crecimiento de *A. niger* en un 20,6 % más que NaD1. Esto se puede expresar como que HXP4 tiene más del 112 % de NaD1. A 26 ppm y 53 ppm, HXP4 inhibió el crecimiento en un al menos 10 % más que NaD1.

## EJEMPLO 11

*Actividad de NaD1 modificada frente a Cryptococcus spp.*

35 NaD1 recombinante y la variante de bucle HXP4 se expresaron en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificaron como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a dos cepas de *Cryptococcus neoformans* y una cepa de *C. gattii* se valoró como se describió anteriormente.

## Resultados

40 La Figura 13A ilustra la actividad antifúngica relativa de la variante de bucle HXP4 en comparación con NaD1 frente a *Cryptococcus neoformans* (C1065). A 13 ppm, HXP4 inhibió completamente el crecimiento de la levadura mientras que NaD1 solamente inhibió -16,7 %. Por consiguiente, HXP4 tenía más del 596 % de la actividad de NaD1. La proteína tampoco mostró actividad significativa a 6,5 ppm. La Figura 13B ilustra la actividad antifúngica relativa de NaD1 y HXP4 frente a una segunda cepa de *C. neoformans* (C2067). A 6,5 ppm, HXP4 inhibió el crecimiento por más del 80 % mientras que NaD1 solamente inhibió el crecimiento por menos del 4 %. Frente a *C. gattii* (Figura 13C), HXP4 inhibió 10 % más del crecimiento que NaD1 a 13 ppm y 38 % más crecimiento que NaD1 a 6,5 ppm.

## EJEMPLO 12

*Modificación de la región Bucle 1B de la defensina solanácea Clase II, TPP3 como cadena principal.*

50 Se selecciona TPP3 (SEQ ID NO: 5) como la cadena principal de defensina solanácea Clase II. Esta defensina comprende un Bucle 1B que tiene la secuencia de aminoácidos: QTFPGL (SEQ ID NO:15). La secuencia del Bucle 1B se cambia a la de NaD2 (HRFKGP) [SEQ ID NO:29]. La proteína quimérica (HXP107) se expresa en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purifica como se describe en los métodos. La actividad antifúngica del péptido frente a *Fusarium graminearum* se valora como se describe en el Ejemplo 1 así como su actividad anti insecto. La secuencia de aminoácidos de HXP107 se expone en SEQ ID NO:85.

## Resultados:

60 La proteína HXP107 conserva la actividad antifúngica frente a *Fusarium graminearum* (Fgr) con una IC50 de 0.5 µM. Esto se compara favorablemente con la actividad de la proteína madre, TPP3, la cual tiene una IC50 de 0,2 µM.

65

## EJEMPLO 13

*Modificación a la región Bucle 1B de las defensinas solanáceas Clase II, NsD1, C20 y SL549*

5 NsD1 (SEQ ID NO:49), C20 (aislado de *Capsicum*) (SEQ ID NO:58) y SL549 (aislada de *Nicotiana*) (SEQ ID NO:59) se seleccionan como la cadena principal de defensina solanácea Clase II. Estas defensinas comprenden un Bucle 1B que tiene la secuencia de aminoácidos: NTFPGI (SEQ ID NO:12), KYFKGL (SEQ ID NO:60) y NTFPGI (SEQ ID NO:12), respectivamente. Uno o más de los restos de aminoácido en el Bucle 1B se sustituye(n) por otro resto de aminoácido. Todos los seis restos se pueden alterar o 1 o 2 o 3 o 4 o 5 de los restos se pueden cambiar. Esto incluye una sustitución de aminoácidos única o un intercambio de Bucle 1B. Ejemplos de cambios incluyen las siguientes secuencias (junto con la fuente entre paréntesis).

15 HRFKGP (NaD2) [SEQ ID NO:29];  
 QHHSFP (Zea2) [SEQ ID NO:30];  
 DTYRGV (PsD1) [SEQ ID NO:31];  
 PTWEGI (PsD2) [SEQ ID NO:32];  
 DKYRGP (MsDeF1) [SEQ ID NO:33];  
 KTFKGI (SoD2) [SEQ ID NO:34];  
 20 KTWSGN (DmAMP1) [SEQ ID NO:35];  
 EGWXGK (VrD1) [SEQ ID NO: 36];  
 GTWSGV (RsAFP2) [SEQ ID NO:37]; y  
 AGFKGP (g1-H) [SEQ ID NO:38].

25 En otra realización, el Bucle 1B se sustituye por una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:67 a 79.

30 Las variantes de bucle recombinantes se expresan en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purifican como se describe en los métodos. La actividad antifúngica de los péptidos frente a patógenos fúngicos tales como *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum graminicola* y *Fusarium verticilloides* se valora como se describe en el Ejemplo 1.

## EJEMPLO 14

*Sinergia de HXP4 con inhibidores de proteasa frente a Fusarium graminearum y Colletotrichum graminicola*

35 El ADN que codifica el dominio maduro del inhibidor tipo I de cebada CI-1B (SEQ ID NO:63), el inhibidor tipo I de *Nicotiana glauca* NaPin1A, la cistatina de tomate SiCys9 (SEQ ID NO:64), la cistatina de arroz Osla (SEQ ID NO:65), y la cistatina de cebada HvCPI6 (SEQ ID NO:66) se obtuvo de Genscript. Los insertos se escindieron del vector pUC57 usando *Sac* II y *Sac* I, se extrajeron de los geles de agarosa usando el kit Perfectprep (Eppendorf) y se ligaron en pHUE que, a continuación, se usó para transformar células de *E. coli* TOP10. El ADN plásmido se aisló y, a continuación, se usó para transformar células Rosetta-Gami B de *E. coli*.

45 Se usaron colonias sencillas de *E. coli* Rosetta-Gami B para inocular medios 2YT (10 ml, 16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl) que contenían ampicilina (0,1 mg/ml), cloranfenicol (0,34 mg/ml), tetraciclina (0,1 mg/ml) y kanamicina (0,05 mg/ml) y se cultivaron toda la noche con agitación a 37 °C. Este cultivo se usó para inocular medios 2YT (500 ml) que contenían ampicilina (0,1 mg/ml), cloranfenicol (0,34 mg/ml), tetraciclina (0,1 mg/ml) y kanamicina (0,05 mg/ml) que, a continuación, se cultivaron durante 4 h hasta una densidad óptica (600 nm) de aproximadamente 1,0. A continuación, se añadió IPTG (concentración final 0,5 M) y el cultivo se dejó crecer durante unas 16 h adicionales a 16 °C. Las células se recogieron por centrifugación (4.000 g a 4 °C durante 20 min), se resuspendieron en tampón de lisis nativa (20 ml por litro de cultivo celular, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) y se congelaron a -80 °C. A continuación, las células se descongelaron y se trataron con lisozima (5 mg por 25 ml de células resuspendidas) durante 20 min a 4 °C. A continuación, se añadieron ADNasa 1 (125 uL, 2 mg/ml en glicerol al 20 % v/v, NaCl 75 mM) y MgCl<sub>2</sub> (125 uL, 1 M) y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 40 min sobre una plataforma de balanceo. A continuación, las muestras se sometieron a sonicación durante 2x30 s sobre hielo (polvo al 80 % p/v, Branson sonifier 450) y se centrifugaron (20.000 g a 4 °C durante 30 min). A continuación, se purificaron las proteínas de fusión a ubiquitina etiquetadas con hexahistidina (His6-Ub-NaCys1,2,3) a partir de los extractos de proteína mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizada (IMAC) bajo condiciones nativas usando resina Ni-NTA (1,5 ml a aproximadamente 25 ml de extracto de proteína nativa, Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las proteínas recombinantes se eluyeron usando tampón de elución (imidazol 250 mM, NaCl 200 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,0). El imidazol se separó aplicando la proteína eluida a una columna de filtración en gel Sephadex G50 preempaquetado (PD-10, Amersham) calibrada con Tris.Cl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0.

65 La ubiquitina etiquetada con hexahistidina se escindió de las proteínas recombinantes usando la enzima de desubiquitilación 6H.Usp2-cc (Catanzariti y col. (2004), *Protein Science* 13:1.331-1.339). La etiqueta escindida se separó por otra ronda de IMAC con los inhibidores de proteasa desubiquitilada como la proteína no unida. A continuación, esto se purificó más por HPLC de fase inversa.



Se prepararon CI-1B, SiCys9 y Osla recombinantes como soluciones madre (20  $\mu\text{M}$ ) en  $\text{H}_2\text{O}$ . El tipo de inhibidor de tripsina I-P de páncreas bovino (Anderson y Kingston (1983), *Proc. Natl. Acad. USA* 80:6.838-6.842) se compró a Sigma (T0256) y se diluyó a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ .

5 Los efectos inhibidores de HXP4 y NaD1 en combinación con inhibidores de serina o cisteína proteinasa sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum*, o *Colletotrichum graminicola* se midieron básicamente como se describe por Broekaert y col., *supra* 1990. Las esporas se aislaron de cultivos formadores de esporas crecientes sobre agar con escasos nutrientes sintéticos (SNPB, *Fusarium graminearum*) o agar V8 (*Colletotrichum graminicola*) y se recontaron usando un hemocitómetro.

10 Se condujeron ensayos antifúngicos en bandejas de microtitulación de 96 pocillos básicamente como se describe en el Ejemplo 1. Los pocillos se cargaron con 10  $\mu\text{l}$  de NaD1 (2,5  $\mu\text{M}$ ) esterilizada por filtro (filtro de jeringuilla con 0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore), HXP4 (2,5 mM), o agua junto con 10  $\mu\text{l}$  de inhibidor de proteinasa esterilizada por filtro (filtro con jeringuilla 0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore) o agua y 80  $\mu\text{l}$   $5 \times 10^4$  esporas/ml en PDB diluido a la mitad. Las placas se incubaron a 15 25 °C. El crecimiento fúngico se valoró midiendo la densidad óptica a 595 nm ( $A_{595}$ ) usando un lector de placa de microtitulación (SpectraMax Pro M2; Molecular Devices). Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

#### Resultados

20 Cuando se ensayaban a la misma concentración, HXP4 tenía un efecto sinérgico mayor con inhibidores de proteasa que NaD1 frente a *Fusarium graminearum*. HXP4 también era sinérgico con inhibidores de proteasa frente a *Colletotrichum graminicola*. Los cálculos de sinergia se presentan en las Tablas 6 y 7 en las que Ee es el efecto esperado de la respuesta aditiva según las fórmulas de Limpel (Richer y col. *Pestic. Sci.* 19:309-315) expresadas como inhibición en porcentaje y lo es el porcentaje de la inhibición observada. Sinergia, es decir, los valores de lo mayores que los valores de Ee se obtienen con todos los cuatro inhibidores de proteasa.

#### EJEMPLO 15

##### *Sinergia en planta de HXP4 con HvCP16 frente a Fusarium graminearum*

30 Las plantas de maíz transgénicas que expresan HXP4, HvCP16 o HXP4 + HvCP16 se crean usando el método descrito en el Ejemplo 7 y se valoran para la resistencia incrementada a *Fusarium graminearum* usando el bioensayo descrito en los Métodos.

35 La Figura 15 proporciona la construcción HvCP16 para la expresión en maíz y la Figura 16 proporciona la construcción HXP4+HvCP16 para la expresión en maíz.

#### Resultados

40 Las plantas que expresan HXP4 sola o HvCP16 sola no muestran reducción en el área de la lesión en comparación con las plantas transformadas con un vector vacío. Las plantas que expresan HXP4 + HvCP16 muestran una reducción del 45 % en el área de la lesión en comparación con el control vector vacío (Tabla 9).

#### EJEMPLO 16

##### *Efectos de HXP4 sobre roya de soja asiática*

50 NaD1 se aisló de flores de *Nicotiana glauca* y la variante de bucle HXP4 se expresó en el sistema de expresión de *P. pastoris* y se purificó como se describe en los métodos. Los efectos de HXP4 sobre la roya de soja asiática (*Phakopsora pachirhizi*) se ensayó y se comparó con NaD1. Uredosporas de *Phakopsora pachirhizi* se cultivaron sobre celofán que se colocó sobre una gotita de agar en presencia o ausencia de los péptidos a 100, 10, 1 y 0,1 ppm en agua. La germinación, formación de apresorio, y formación de estructuras postapresoriales se evaluaron usando microscopio a 24 h y 48 h. Se examinaron tres membranas por tratamiento y se evaluaron cincuenta germinados aislados por membrana.

#### Resultados

60 El efecto sobre la germinación (24 horas; Figura 14A), la formación de apresorio (24 horas; Figura 14B) y la formación de estructura postapresorio (48 horas; Figura 14C) todos se examinaron. A 10 ppm, HXP4 inhibió la germinación al 62 % más eficazmente que NaD1 mientras que la formación de apresorio y la formación de estructuras postapresorio se inhibieron en un 65 % y 59 % más que NaD1, respectivamente.



EJEMPLO 17

*Cribado de alto rendimiento para identificar nuevas secuencias de Bucle 1B*

5 Se llevó a cabo mutagénesis dirigida a sitio de NaD1 usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Phusion (Marca Comercial Registrada) (Finnzymes). Los cebadores de oligonucleótidos degenerados fosforilados en el extremo 5' se diseñaron para incorporar la mutación de seis aminoácidos aleatoria del Bucle 1B.

10 Se usó el sistema pHUE para la expresión de una biblioteca de variantes de Bucle 1B. La expresión y purificación se modificó ligeramente a partir del método descrito en el Ejemplo 14 para permitir la expresión en placas de 48 pocillos y la purificación en placas con filtro de 96 pocillos. El plásmido molde entero (pHUE-NaD1) se amplificó en una reacción de PCR de 35 ciclos con una temperatura de emparejamiento de 66 °C, 30 s. El producto de PCR lineal, a continuación, se circularizó usando T4 ADN ligasa durante la noche a 16 °C y se transformó en células Rosetta-Gami B (DE3) electrocompetentes según las instrucciones del fabricante. Las células recuperadas se cultivaron en placa sobre agar 2YT que contenía ampicilina (0,1 mg/ml), cloranfenicol (0,34 mg/ml), tetraciclina (0,1 mg/ml) y kanamicina (0,015 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante la noche.

20 Se usaron colonias sencillas para inocular 150 µl de 2YT que contenía ampicilina (0,1 mg/ml), cloranfenicol (0,34 mg/ml), tetraciclina (0,1 mg/ml) y kanamicina (0,015 mg/ml) en placas de 96 pocillos. Se incluyó Rosetta-Gami B (DE3) transformada con pHUE-NaD1 como control positivo. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación constante a 70 % de humedad. Se transfirió cincuenta microlitros de cada pocillo a 2,5 ml de anticuerpos 2YT y la expresión y la purificación se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

25 Las proteínas se ensayaron para la actividad frente a *Colletotrichum graminicola*. Se añadió cincuenta microlitros de solución proteica a 105 µl de solución de spora para proporcionar una concentración final de  $2 \times 10^4$  esporas/ml en ½ x caldo de dextrosa de patata que contenía CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, KCl 25 mM. Las placas se incubaron a 25 °C y se ensayó el crecimiento fúngico después de 40 h midiendo la densidad óptica a 595 nm usando un lector de placa de microtitulación (SpectraMax Pro M5e; Molecular Devices). Las proteínas que inhibieron el crecimiento fúngico igual o mayor que control de NaD1 se identificaron secuenciando el ADN plásmido de la colonia bacteriana usada para la expresión. Se encontró que una colonia sencilla identificada en el cribado tenía una secuencia de bucle 1B idéntica a la de NaD1. Se seleccionaron diversas colonias para purificación y ensayo a gran escala. Las proteínas se expresaron como se describe en el Ejemplo 14 y se ensayaron para la actividad frente a *Fusarium graminicola* y *Colletotrichum graminicola* como se describe en el Ejemplo 1. En la Tabla 10 se enumeran el identificador de las secuencias de Bucle 1.

35

TABLA 6

*Efecto sinérgico de HXP4 frente a NaD1 en combinación con inhibidores de proteínasa frente a Fgr*

Inhibidor proteasa	HXP4		NaD1	
	Ee	Io	Ee	Io
Cl-1B	12,1	81,1	17,1	27,3
SICys9	0,0	86,0	0,0	37,6
Oc1a	0,0	90,7	0,0	11,3
BTPi	2,0	81,0	2,0	5,0

TABLA 7

*Efecto sinérgico de HXP4 en combinación con inhibidores de proteínasa frente a Cgr*

Inhibidor de proteasa	HXP4	
	Ee	Io
BPTI	16,7	97,1
NaPin1A	11,8	69,3
HvCPI6	13,8	100,0
SICys9	15,4	94,9

40

TABLA 8

*Protección de plantas de maíz transgénicas que expresan HXP4 o NaD1 frente a Cgr*

Proteína	porcentaje de inhibición relativo a control vector vacío	Valor P
HXP4	26	0,029
NaD1	0	0,997

TABLA 9

*Protección de plantas de maíz transgénicas que expresan HXP4 en combinación con HvCPI6 frente a Fgr*

Proteína	Porcentaje de inhibición relativo a control vector vacío	Valor P
HXP4	0	0,183
HvCPI6	0	0,697
HXP4 + HvCPI6	45	<0,001

TABLA 10  
Secuencias de Bucle 1B de proteínas que inhiben el crecimiento de *Colletotrichum graminicola*

LSAKMV	FINRDW	LVSFPG
LSFKGT	SIIASA	ALFAGE
LVFGGM	IKAPGW	FLYREK
YNPVGL	LTLSNH	FIFRME
LFWEKS	LISFYP	HAFQKG
SPFVGP		

Bibliografía

- 5 Altschul y col. (1997) *Nucl. Acids. Res.* 25: 3.389
- Anderson y Kingston (1983), *Proc. Natl. Acad. USA* 80:6.838-6.842, 1983
- 10 Ausubel y col. (1994-1998) (En: "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc.
- Berrocal-Lobo y col. (2002) *Plant Physiol.* 128(3):951-961
- Bevan (1984) *Nucleic Acids Research* 12:8.711-8.721
- 15 Bloch y Richardson (1991) *FEBS Lett* 279(1):101-104
- Bonner y Laskey (1974) *Eur. J. Biochem* 46:83-88
- Broekaert y col. (1990) *FEMS Microbiol Lett* 69:55-60
- 20 Catanzariti y col. (2004) *Protein Science* 13:1.331-1.339
- Chang y col. (2005) *Mol. Biol. Cell* 16(10):4.941-4.953
- 25 Colilla y col. (1990) *FEBS Lett* 270(1-2):191-194
- De Samblanx y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(2):1.171-1.179
- 30 Frame y col. (2002) *Plant Physiol.* 129:13-22
- Gao y col. (2000) *Nat. Biotechnol* 18(12):1.307-1.310
- Janssen y col. (2003) *Biochemistry* 42(27):8.214-8.222
- 35 Jha y col., (2009) *Transgenic Res.* 18(1):59-69
- Jones y Dangl (2006) *Nature* 444(7117):323-329
- Lay y col. (2003) *Plant Physiol.* 131(3):1.283-1.293
- 40 Li y Asiegbu (2004) *J. Plant Res.* 117(2): 155-162
- Lin y col (2007) *Proteins* 68(2):530-540
- 45 Marmur y Doty (1962) *J. Mol. Biol.* 5:109-118
- Metlen y col. (2009) *Plant Cell Environ.* 32(6):641-653
- Nurnberger y col. (2004) *Immunol Rev.* 198:249-266
- 50 Richer (1987) *Pestic Sci.* 19:309-315
- Schaaper y col. (2001) *J. Pept. Res.* 57(5):409-418
- 55 Showalter (1993) *Plant Cell* 5(1):9-23
- Spelbrink y col. (2004) *Plant Physiol* 135(4):2.055-2.067
- van der Weerden y col. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(21):14.445-14.452

Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA

Yount y Yeaman (2005) *Protein Pept. Lett* 12(1):49-67

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HEXIMA LIMITED  
 VAN DER WEERDEN, Nicole Louise (US SOLAMENTE)  
 ANDERSON, Marilyn Anne (US SOLAMENTE)

10

<120> AGENTES ANTIPATÓGENOS

<130> 35104419/EJH

15

<150> US 61/440.309  
 <151> 07-02-2011

<160> 85

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos genérica de la región Bucle 1 B

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X1 = G, D, H, K, A, E, Q, T, P, L, M, S o R

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X2 = K, R, G, H, L, N, F, I, S, T o Y

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> X3 = W, Y, H, L, G, F o P

45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> X4 = K, S, R, H, T, E, V, N, Q, D, G o X

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X5 = S, K, Y, F, G o H

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> X6 = P, V, L, T, A, F, N, K, R, M, G, H, I o Y

60

<400> 1

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6  
 1 5

ES 2 660 965 T3

<210> 2  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de NaD1 (*Nicotiana alata*) que contiene el Bucle 1B

<400> 2

10

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

<210> 3  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de PhD1 (*Petunia hybrida*) que contiene el Bucle 1B

20

<400> 3

Ala Thr Cys Lys Ala Glu Cys Pro Thr Trp Asp Ser Val Cys Ile Asn  
 1 5 10 15

Lys Lys Pro Cys Val Ala Cys Cys Lys Lys Ala Lys Phe Ser Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Glu Cys  
 35 40 45

25

<210> 4  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de PhD2 (*Petunia hybrida*) que contiene el Bucle 1B

<400> 4

ES 2 660 965 T3

Gly Thr Cys Lys Ala Glu Cys Pro Thr Trp Glu Gly Ile Cys Ile Asn  
 1 5 10 15

Lys Ala Pro Cys Val Lys Cys Cys Lys Ala Gln Pro Glu Lys Phe Thr  
 20 25 30

Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro  
 35 40 45

Cys

- <210> 5
- <211> 48
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de TPP3 (*Solanum lycopersicum*) que contiene el Bucle 1B
- <400> 5

Gln Gln Ile Cys Lys Ala Pro Ser Gln Thr Phe Pro Gly Leu Cys Phe  
 1 5 10 15

Met Asp Ser Ser Cys Arg Lys Tyr Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr Gly  
 20 25 30

Gly His Cys Ser Lys Leu Gln Arg Lys Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

- <210> 6
- <211> 47
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de FST (*Nicotiana tabacum*) que contiene el Bucle 1B
- <400> 6

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Leu Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

25

ES 2 660 965 T3

<210> 7  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina (*Nicotiana excelsior*) que el Bucle 1B [NeThiol]

<400> 7

10

```

Arg Glu Cys Ala Arg Glu Ile Phe Thr Gly Leu Cys Ile Thr Asn Pro
1           5           10           15

Gln Cys Arg Lys Ala Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr Asp Gly His Cys
          20           25           30

Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
      35           40           45
    
```

<210> 8  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina (*Nicotiana excelsior*) que contiene el Bucle 1B [NeThio2]

20

<400> 8

```

Lys Asp Cys Lys Thr Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Ile Thr
1           5           10           15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr Asp Gly
          20           25           30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
      35           40           45
    
```

25

<210> 9  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina (*Nicotiana attenuata*) que contiene el Bucle 1B [Nagth]

35

<400> 9



ES 2 660 965 T3

Lys Ser Thr Cys Lys Ala Glu Ser Asn Thr Phe Glu Gly Phe Cys Val  
 1 5 10 15

Thr Lys Pro Pro Cys Arg Arg Ala Cys Leu Lys Glu Lys Phe Thr Asp  
 20 25 30

Gly Lys Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Ile Cys Tyr Lys Pro Cys  
 35 40 45

<210> 10  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina (*Nicotiana paniculata*) que contiene el Bucle 1B [NpThiol]

10

<400> 10

Lys Ser Thr Cys Lys Ala Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Leu Cys Ile  
 1 5 10 15

Thr Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Leu Ser Glu Lys Phe Thr Asp  
 20 25 30

Gly Lys Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Ile Cys Tyr Lys Pro Cys  
 35 40 45

<210> 11  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción de g-tionina (*Capicum chinense*) que contiene el Bucle 1B [Cc-gth]

20

<400> 11

25

Gln Asn Asn Ile Cys Lys Thr Thr Ser Lys His Phe Lys Gly Leu Cys  
 1 5 10 15

Phe Ala Asp Ser Lys Cys Arg Lys Val Cys Ile Gln Glu Asp Lys Phe  
 20 25 30

Glu Asp Gly His Cys Ser Lys Leu Gln Arg Lys Cys Leu Cys Thr Lys  
 35 40 45

Asn Cys  
 50

# ES 2 660 965 T3

5  
<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de NaD1  
<400> 12

10  
Asn Thr Phe Pro Gly Ile  
1 5

15  
<210> 13  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PhD1  
<400> 13

20  
Pro Thr Trp Asp Ser Val  
1 5

25  
<210> 14  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PhD2  
<400> 14

30  
Pro Thr Trp Glu Gly Ile  
1 5

35  
<210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de TPP3  
<400> 15

40  
Gln Thr Phe Pro Gly Leu  
1 5

45  
<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de FST  
<400> 16

50  
<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de FST  
<400> 16

55

ES 2 660 965 T3

Asn Thr Phe Pro Gly Ile  
1 5

5 <210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina (*N. excelsior*) [NeThiol]  
<400> 17

Ile Ser Thr Gly Leu  
1 5

15 <210> 18  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina (*N. excelsior*) [NeThio2]  
<400> 18

Asn Thr Phe Pro Gly Ile  
1 5

25 <210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina (*N. attenuata*) [Na-gth]  
35 <400> 19

Asn Thr Phe Glu Gly Phe  
1 5

40 <210> 20  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina (*N. paniculata*) [NpThiol]  
<400> 20

Asn Thr Phe Pro Gly Leu  
1 5

50 <210> 21  
<211> 6  
<212> PRT  
55 <213> Artificial

ES 2 660 965 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g-tionina (*C. chinense*) [Cc-gth]

<400> 21

5

Lys His Phe Lys Gly Leu  
1 5

<210> 22

<211> 47

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de defensina NaD2 que contiene Bucle 1B

15

<400> 22

Arg Thr Cys Glu Ser Gln Ser His Arg Phe Lys Gly Pro Cys Ala Arg  
1 5 10 15

Asp Ser Asn Cys Ala Thr Val Cys Leu Thr Glu Gly Phe Ser Gly Gly  
20 25 30

Asp Cys Arg Gly Phe Arg Arg Arg Cys Phe Cys Thr Arg Pro Cys  
35 40 45

20

<210> 23

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de defensina gl-H que contiene Bucle 1B

<400> 23

Arg Ile Cys Arg Arg Arg Ser Ala Gly Phe Lys Gly Pro Cys Val Ser  
1 5 10 15

Asn Lys Asn Cys Ala Gln Val Cys Met Gln Glu Gly Trp Gly Gly Gly  
20 25 30

Asn Cys Asp Gly Pro Leu Arg Arg Cys Lys Cys Met Arg Arg Cys  
35 40 45

30

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de defensina Psd1 que contiene Bucle 1B

ES 2 660 965 T3

<400> 24

Lys Thr Cys Glu His Leu Ala Asp Thr Tyr Arg Gly Val Cys Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Ala Ser Cys Asp Asp His Cys Lys Asn Lys Ala His Leu Ile Ser  
 20 25 30

Gly Thr Cys His Asn Trp Lys Cys Phe Cys Thr Gln Asn Cys  
 35 40 45

5 <210> 25  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de defensina MsDef1 que contiene Bucle 1B

<400> 25

Arg Thr Cys Glu Asn Leu Ala Asp Lys Tyr Arg Gly Pro Cys Phe Ser  
 1 5 10 15

Gly Cys Asp Thr His Cys Thr Thr Lys Glu Asn Ala Val Ser Gly Arg  
 20 25 30

Cys Arg Asp Asp Phe Arg Cys Trp Cys Thr Lys Arg Cys  
 35 40 45

15 <210> 26  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de defensina DmAMP1 que contiene Bucle 1B

25 <400> 26

Glu Leu Cys Glu Lys Ala Ser Lys Thr Trp Ser Gly Asn Cys Gly Asn  
 1 5 10 15

Thr Gly His Cys Asp Asn Gln Cys Lys Ser Trp Glu Gly Ala Ala His  
 20 25 30

Gly Ala Cys His Val Arg Asn Gly Lys His Met Cys Phe Cys Tyr Phe  
 35 40 45

Asn Cys  
 50

30 <210> 27  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 660 965 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de defensina RsAFP2 que contiene Bucle 1B

<400> 27

5

Gln Lys Leu Cys Gln Arg Pro Ser Gly Thr Trp Ser Gly Val Cys Gly  
 1 5 10 15

Asn Asn Asn Ala Cys Lys Asn Gln Cys Ile Arg Leu Glu Lys Ala Arg  
 20 25 30

His Gly Ser Cys Asn Tyr Val Phe Pro Ala His Lys Cys Ile Cys Tyr  
 35 40 45

Phe Pro Cys  
 50

<210> 28

<211> 47

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de defensina g-zeationina2 (Zea2) que contiene Bucle 1B

15

<400> 28

Arg Val Cys Met Gly Lys Ser Gln His His Ser Phe Pro Cys Ile Ser  
 1 5 10 15

Asp Arg Leu Cys Ser Asn Glu Cys Val Lys Glu Asp Gly Gly Trp Thr  
 20 25 30

Ala Gly Tyr Cys His Leu Arg Tyr Cys Arg Cys Gln Lys Ala Cys  
 35 40 45

20

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de NaD2

<400> 29

His Arg Phe Lys Gly Pro  
 1 5

30

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de Zea2



ES 2 660 965 T3

<400> 30

Gln His His Ser Phe Pro  
1 5

5  
<210> 31  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PsD1

<400> 31

Asp Thr Tyr Arg Gly Val  
1 5

15  
<210> 32  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de PsD2

25  
<400> 32

Pro Thr Trp Glu Gly Ile  
1 5

30  
<210> 33  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

35  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de MsDef1

<400> 33

Asp Lys Tyr Arg Gly Pro  
1 5

40  
<210> 34  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de SoD2

<400> 34

Lys Thr Phe Lys Gly Ile  
1 5

50  
<210> 35  
<211> 6  
<212> PRT  
55  
<213> Artificial

# ES 2 660 965 T3

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de DmAMP1

5 <400> 35

**Lys Thr Trp Ser Gly Asn**  
**1 5**

<210> 36  
<211> 5  
10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de VrD1

15 <400> 36

**Glu Gly Trp Gly Lys**  
**1 5**

<210> 37  
<211> 6  
20 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de RsAFP2

25 <400> 37

**Gly Thr Trp Ser Gly Val**  
**1 5**

<210> 38  
<211> 6  
35 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de g1-H

40 <400> 38

**Ala Gly Phe Lys Gly Pro**  
**1 5**

<210> 39  
<211> 47  
45 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de HXP4 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en NaD1)

50 <400> 39

ES 2 660 965 T3

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser His Arg Phe Lys Gly Pro Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

5 <210> 40  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP34 (Bucle 1B de Zea2 [Zea2L1B] en NaD1)  
 <400> 40

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Gln His His Ser Phe Pro Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

15 <210> 41  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP35 (Bucle 1B de PsD1 [PsDL1B] en NaD1)  
 <400> 41

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Asp Thr Tyr Arg Gly Val Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

25 <210> 42  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP91 (Bucle 1B de MsDeF1 [MsDef1L1B] en NaD1)

35

ES 2 660 965 T3

<400> 42

```

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Asp Lys Tyr Arg Gly Pro Cys Ile Thr
1           5           10           15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly
          20           25           30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35           40           45
    
```

5 <210> 43  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP92 (Bucle 1B de SoD1 [SoD1L1B] en NaD1)

<400> 43

```

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Lys Thr Phe Lys Gly Ile Cys Ile Thr
1           5           10           15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly
          20           25           30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35           40           45
    
```

15 <210> 44  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP58 (Bucle 1B de DmAMP1 [DMAMPL1B] en NaD1)

25 <400> 44

```

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Lys Thr Trp Ser Gly Asn Cys Ile Thr
1           5           10           15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly
          20           25           30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35           40           45
    
```

30 <210> 45  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP37 (Bucle 1B de VrDI [VrD1L1B] en NaD1)

ES 2 660 965 T3

<400> 45

```

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Glu Gly Trp Gly Lys Cys Ile Thr Lys
1           5           10           15

Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly His
          20           25           30

Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35           40           45
    
```

5

<210> 46  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP72 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en PhD2)

15

<400> 46

```

Gly Thr Cys Lys Ala Glu Cys His Arg Phe Lys Gly Pro Cys Ile Asn
1           5           10           15

Lys Ala Pro Cys Val Lys Cys Cys Lys Ala Gln Pro Glu Lys Phe Thr
          20           25           30

Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro
          35           40           45

Cys
    
```

20

<210> 47  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HXP95 (Bucle 1B de NaD2 [NaD2L1B] en NsD1)

<400> 47

```

Lys Asp Cys Lys Arg Glu Ser His Arg Phe Lys Gly Pro Cys Ile Thr
1           5           10           15

Lys Leu Pro Cys Arg Arg Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Ala Asp Gly
          20           25           30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35           40           45
    
```

30

<210> 48  
 <211> 141  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 660 965 T3

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica defensina de *Nicotiana suaveolens*

<400> 48

5

```

aaagattgca aaagagaaag caatacattc cctggaatat gcattaccaa accaccatgc      60
agaaaagctt gtatccgtga gaaatttact gatggtcatt gtagcaaaat cctcagaaga      120
tgtctatgca ctaagccatg t                                             141
    
```

<210> 49

<211> 47

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de NsD1

15

<400> 49

```

Lys Asp Cys Lys Arg Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Ile Thr
 1              5              10              15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Arg Glu Lys Phe Thr Asp Gly
              20              25              30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
          35              40              45
    
```

20

<210> 50

<211> 141

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica NsD2 de *Nicotiana suaveolens*

<400> 50

```

aaagattgca aaagagaaag caatacattc cctggaatat gcattaccaa actaccatgc      60
agaagagctt gtatcagtga gaaatttgcct gatggtcatt gtagcaaaat cctcagaagg      120
tgtctatgca ctaagccatg t                                             141
    
```

30

<210> 51

<211> 47

35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica NsD2

40

<400> 51



ES 2 660 965 T3

Lys Asp Cys Lys Arg Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Ile Thr  
 1 5 10 15

Lys Leu Pro Cys Arg Arg Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Ala Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

5 <210> 52  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de NaD1 que termina e incluye el resto de cisteína invariante más C-terminal

<400> 52

Lys Phe Thr Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys  
 1 5 10 15

Thr Lys Pro Cys  
 20

15 <210> 53  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de cola C-terminal de NaD1

25 <400> 53

Val Phe Asp Glu Lys Met Thr Lys Thr Gly Ala Glu Ile Leu Ala Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Lys Thr Leu Ala Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Ile Met Asp  
 20 25 30

Asn

30 <210> 54  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la región Bucle 1B

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa1 = NGDHKAEQTPLMSR

5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa2 = KRGLNFISTY

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa3 = WYHLGFP

15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(3)  
 <223> Xaa4 = PKSRHTEVNQDG

20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(5)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(3)  
 <223> Xaa5 = SKYFGH

30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa6 = PVLTA FNKRMGHY

<400> 54

Xaa1	Xaa2	Xaa3	Xaa4	Xaa5	Xaa6
1			5		

35  
 <210> 55  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la región Bucle 1B

45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa1 = NHQDKE

50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa2 = RHTKG

55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa3 = FHYW

60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa4 = PKSR

ES 2 660 965 T3

5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa5 = GF

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa6 = PVIN  
 <400> 55

Xaa1	Xaa2	Xaa3	Xaa4	Xaa5	Xaa6
1			5		

15  
 <210> 56  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la región Bucle 1B

25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa1 = LFSIAHYQDKG

30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa2 = SVFIKLAPNTRHG

35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa3 = AFWNISYPLH

40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa4 = KGERAPFQVS

45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa5 = MGKDSYPENF

50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa6 = VTMSWAPGEKLHIN  
 <400> 56

Xaa1	Xaa2	Xaa3	Xaa4	Xaa5	Xaa6
1			5		

55  
 <210> 57  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60

ES 2 660 965 T3

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena principal de NaD1 que tiene un Bucle 1B definida por X1 a X6

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa1 = LFSIAHYQDKG

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa2 = SVFIKLAPNTRHG

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa3 = AFWNISYPLH

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa4 = KGERAPFQVS

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa5 = MGKDSYPENF

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa6 = VTMSWAPGEKLHIN

35 <400> 57

```

Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Cys Ile Thr
1          5          10          15
.
Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly
20          25          30
.
His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys
35          40          45

```

40 <210> 58  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de C20

<400> 58

ES 2 660 965 T3

Gln Asn Ile Cys Lys Thr Thr Ser Lys Tyr Phe Lys Gly Leu Cys Ile  
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Ser Cys Arg Lys Val Cys Ile Glu Lys Asp Lys Phe Glu  
 20 25 30

Asp Gly His Cys Ser Lys Leu Gln Arg Lys Cys Leu Cys Thr Lys Leu  
 35 40 45

Cys

5 <210> 59  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de SL549  
 <400> 59

Lys Asp Cys Lys Arg Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys Leu Thr  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr Asp Gly  
 20 25 30

His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
 35 40 45

15 <210> 60  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos del Bucle 1B de C20  
 <400> 60

Lys Tyr Phe Lys Gly Leu  
 1 5

25 <210> 61  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de NaPin1A

35 <400> 61

ES 2 660 965 T3

Gln Ser Gly Cys Pro Gly Val Thr Lys Glu Arg Trp Pro Glu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Pro Ala Lys Phe Ala Met Gln Ile Ile Gln Lys Glu Asn Pro  
 20 25 30  
 Lys Leu Thr Asn Val Gln Thr Ile Leu Asn Gly Arg Pro Val Thr Glu  
 35 40 45  
 Asp Leu Arg Cys Asn Arg Val Arg Leu Phe Val Asn Val Leu Asp Phe  
 50 55 60  
 Val Val Gln Thr Pro Gln Val Gly  
 65 70

5 <210> 62  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de BPTI

<400> 62

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr  
 20 25 30  
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala  
 35 40 45  
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala Ile Gly Pro Trp Glu Asn  
 50 55 60  
 Leu  
 65

15 <210> 63  
 <211> 83  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CI-1B

<400> 63

ES 2 660 965 T3

```

Met Arg Ser Met Glu Gly Ser Val Pro Lys Tyr Pro Glu Pro Thr Glu
1           5           10           15

Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Ala Lys Arg Ser Trp Pro Glu Val Val
           20           25           30

Gly Met Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ile Ile Leu Arg Asp Lys Pro
           35           40           45

Asp Ala Gln Ile Glu Val Ile Pro Val Asp Ala Met Val Pro Leu Asp
           50           55           60

Phe Asn Pro Asn Arg Ile Phe Ile Leu Val Ala Val Ala Arg Thr Pro
65           70           75           80

Thr Val Gly

```

5 <210> 64  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HVCPI6

<400> 64

ES 2 660 965 T3

Met Arg Val Ile Arg Ser Arg Ala Ile Leu Ile Val Leu Phe Leu Val  
 1 5 10 15

Ser Ala Phe Gly Leu Ser Glu Gln Gly Lys Ser Gly Gly Phe Cys Ser  
 20 25 30

Glu Glu Met Ala Thr Leu Gly Gly Val His Asp Ser His Gly Ser Ser  
 35 40 45

Gln Asn Ser Asp Glu Ile His Ser Leu Ala Lys Phe Ala Val Asp Glu  
 50 55 60

His Asn Lys Lys Glu Asn Ala Met Ile Glu Leu Ala Arg Val Val Lys  
 65 70 75 80

Ala Gln Glu Gln Thr Val Ala Gly Lys Leu His His Leu Thr Leu Glu  
 85 90 95

Val Met Asp Ala Gly Lys Lys Lys Leu Tyr Glu Ala Lys Val Trp Val  
 100 105 110

Lys Pro Trp Leu Asn Phe Lys Glu Leu Gln Glu Phe Lys His Val Glu  
 115 120 125

Asp Val Pro Thr Phe Thr Ser Ser Asp Leu Gly Val Lys Gln Val Glu  
 130 135 140

Gln Asn Ser Gly Leu Lys Ser Val Pro Val His Asp Pro Val Val Glu  
 145 150 155 160

Glu Ala Ala Glu His Ala Ile Lys Thr Ile Gln Gln Arg Ser Asn Ser  
 165 170 175

Ile His Pro Tyr Lys Leu Gln Glu Ile Val His Ala Asn Ala Glu Met  
 180 185 190

Ala Asp Asp Ser Thr Lys Leu His Leu Val Ile Lys Thr Ser Arg Gly  
 195 200 205

Gly Lys Glu Glu Lys Phe Lys Val Gln Val Gln His Asn Asn Glu Gly  
 210 215 220

Ala Phe His Leu Asn Arg Met Glu Pro Asp Asn  
 225 230 235

<210> 65  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5



ES 2 660 965 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de SICys9

<400> 65

5

Met Ser Ser Asp Gly Gly Pro Val Leu Gly Gly Val Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

Asn Glu Asn Asp Leu His Leu Val Asp Leu Ala Arg Phe Ala Val Thr  
20 25 30

Glu His Asn Lys Lys Ala Asn Ser Leu Leu Glu Phe Glu Lys Leu Val  
35 40 45

Ser Val Lys Gln Gln Val Val Ala Gly Thr Leu Tyr Tyr Phe Thr Ile  
50 55 60

Glu Val Lys Glu Gly Asp Ala Lys Lys Leu Tyr Glu Ala Lys Val Trp  
65 70 75 80

Glu Lys Pro Trp Met Asp Phe Lys Glu Leu Gln Glu Phe Lys Pro Val  
85 90 95

Asp Ala Ser Ala Asn Ala  
100

<210> 66

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Osla

15

<400> 66

ES 2 660 965 T3

Ala Thr Ser Ala Leu Gly Arg Arg Gly Val Leu Leu Gly Gly Trp Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Val Lys Asp Val Asn Asp Pro His Val Gln Glu Leu Gly Gly Trp  
 20 25 30  
 Ala Val Ala Gln His Ala Ser Leu Ala Lys Asp Gly Leu Leu Phe Arg  
 35 40 45  
 Arg Val Thr Arg Gly Glu Gln Gln Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Arg  
 50 55 60  
 Leu Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Ser Gly Lys Arg Val Thr Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Ile Tyr Glu His Trp Ser Arg Thr Arg Lys Leu Thr Ser Phe  
 85 90 95  
 Lys Pro Ala Ala Gly Gly  
 100

5 <210> 67  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
 10 <400> 67

Leu Ser Phe Lys Gly Thr  
 1 5

15 <210> 68  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
 <400> 68

Leu Val Phe Gly Gly Met  
 1 5

25 <210> 69  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
 35 <400> 69

ES 2 660 965 T3

**Tyr Asn Pro Val Gly Leu**  
**1 5**

5  
<210> 70  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
<400> 70

**Leu Phe Trp Glu Lys Ser**  
**1 5**

15  
<210> 71  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
<400> 71

**Ser Pro Phe Val Gly Pro**  
**1 5**

25  
<210> 72  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

30  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
35  
<400> 72

**Ser Ile Ile Ala Ser Ala**  
**1 5**

40  
<210> 73  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento  
<400> 73

**Ile Lys Ala Pro Gly Trp**  
**1 5**

50  
<210> 74  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

55

# ES 2 660 965 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

<400> 74

5

**Leu Thr Leu Ser Asn His**  
**1 5**

<210> 75

<211> 6

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

15

<400> 75

**Leu Ile Ser Phe Tyr Pro**  
**1 5**

20

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

<400> 76

**Ala Leu Phe Ala Gly Glu**  
**1 5**

30

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

40

<400> 77

**Phe Leu Tyr Arg Glu Lys**  
**1 5**

45

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

<400> 78

**Phe Ile Phe Arg Met Glu**  
**1 5**

55

ES 2 660 965 T3

<210> 79  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de Bucle 1B de sustitución identificada siguiendo cribado de alto rendimiento

<400> 79

10

His Ala Phe Gln Lys Gly  
1 5

<210> 80  
<211> 381  
<212> ADN  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> HvCPI6 para la expresión en maíz

20

<400> 80

```
atggccaaca agcacctgtc cctctccctc ttctctgtgc tctctggcct ctccgectcc 60
ctcgcctccg gagccaacctc ggcctctggc cgccgcggcg tgettctggg cgggtggagc 120
cccgtcaagg acgtgaacga cccgcacgtc caggagctag gcgggtgggc ggtggcccag 180
cacgccagcc tagccaagga cgggctgtctc ttccgccggg tgacgcgcgg cgagcagcag 240
gtgggtgtccg ggatgaacta ccgcctcttc gtggctgcgg cggacggctc cggcaagagg 300
gtgacctatc tcgcgcagat ctacgagcac tggagcagga cccgcaagct cacgtccttc 360
aagccggctg ccggcggctg a 381
```

25

<210> 81  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de HvCPI6 para la expresión en maíz

<400> 81

ES 2 660 965 T3

Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Gly Ala Thr Ser Ala Leu Gly Arg Arg  
 20 25 30  
 Gly Val Leu Leu Gly Gly Trp Ser Pro Val Lys Asp Val Asn Asp Pro  
 35 40 45  
 His Val Gln Glu Leu Gly Gly Trp Ala Val Ala Gln His Ala Ser Leu  
 50 55 60  
 Ala Lys Asp Gly Leu Leu Phe Arg Arg Val Thr Arg Gly Glu Gln Gln  
 65 70 75 80  
 Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Arg Leu Phe Val Val Ala Ala Asp Gly  
 85 90 95  
 Ser Gly Lys Arg Val Thr Tyr Leu Ala Gln Ile Tyr Glu His Trp Ser  
 100 105 110  
 Arg Thr Arg Lys Leu Thr Ser Phe Lys Pro Ala Ala Gly Gly  
 115 120 125

<210> 82  
 <211> 636  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> HvCPI6-L-HXP4-PPCT

10

<400> 82

atggccaaca agcacctgtc cctctccctc ttctctgtgc tecteggect ctcgectec 60  
 ctcgectceg gagccacctc ggcctctggc cgcccgggcg tgcttctggg cgggtggagc 120  
 cccgtcaagg acgtgaacga cccgcacgtc caggagctag gccgggtgggc ggtggcccag 180  
 cacgccagcc tagccaagga cgggctgtct ttccgcccgg tgacgcgcgg cgagcagcag 240  
 gtgggtgtceg ggatgaacta ccgcctcttc gtggteggcg cggacggctc cggcaagagg 300  
 gtgacctatc tcgcgagat ctacgagcac tggagcagga cccgcaagct cagtccttc 360  
 aagccggctg ccggcggcga ggagaagaag aacagggagt gcaaacaga gagcaacagc 420  
 ttccctggca tetgcattac taagccaccg tgccgcaagg cctgcatctc cgaagagttt 480  
 acagacgggc actgttccaa aatcctccgc aggtgcctct gcacgaagcc gtgcgttttc 540  
 gacgagaaga tgacgaagac tggggcggag attctcgtg agggaggcaa gactctggcg 600  
 gctgcctctc tggaagagga aattatggac aattga 636

ES 2 660 965 T3

<210> 83  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de HvCPI6-L-HXP4-PPCT

10

```

Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
1          5          10          15

Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Gly Ala Thr Ser Ala Leu Gly Arg Arg
          20          25          30

Gly Val Leu Leu Gly Gly Trp Ser Pro Val Lys Asp Val Asn Asp Pro
          35          40          45

His Val Gln Glu Leu Gly Gly Trp Ala Val Ala Gln His Ala Ser Leu
          50          55          60

Ala Lys Asp Gly Leu Leu Phe Arg Arg Val Thr Arg Gly Glu Gln Gln
65          70          75          80

Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Arg Leu Phe Val Val Ala Ala Asp Gly
          85          90          95

Ser Gly Lys Arg Val Thr Tyr Leu Ala Gln Ile Tyr Glu His Trp Ser
          100          105          110

Arg Thr Arg Lys Leu Thr Ser Phe Lys Pro Ala Ala Gly Gly Glu Glu
          115          120          125

Lys Lys Asn Arg Glu Cys Lys Thr Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile
          130          135          140

Cys Ile Thr Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Ser Glu Lys Phe
145          150          155          160

Thr Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys
          165          170          175

Pro Cys Val Phe Asp Glu Lys Met Thr Lys Thr Gly Ala Glu Ile Leu
          180          185          190

Ala Glu Glu Ala Lys Thr Leu Ala Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Ile
          195          200          205

Met Asp Asn
          210
    
```





ES 2 660 965 T3

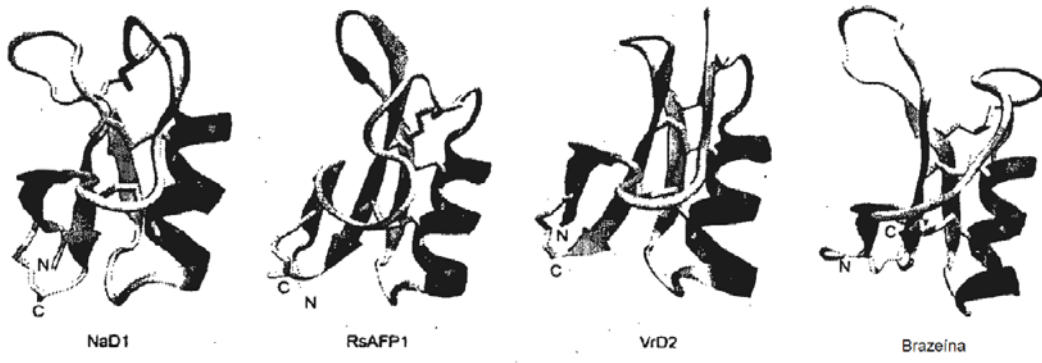
Gln Gln Ile Cys Lys Ala Pro Ser His Arg Phe Lys Gly Pro Cys Phe  
1 5 10 15

Met Asp Ser Ser Cys Arg Lys Tyr Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr Gly  
20 25 30

Gly His Cys Ser Lys Leu Gln Arg Lys Cys Leu Cys Thr Lys Pro Cys  
35 40 45

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de defensina Clase II solanácea artificialmente modificada aislado con una región bucle (Bucle 1B) entre una primera cadena  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  en su porción del extremo N-terminal y que tiene actividad antifúngica, y en el que dicho Bucle 1B está reemplazado por un Bucle 1B de otra defensina, teniendo dicho polipéptido una porción del extremo C-terminal con al menos una 70 % de similitud a SEQ ID NO:52 después de alineación óptima.
- 10 2. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1 en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:57 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de similitud a SEQ ID NO:57 después de alineación óptima.
- 15 3. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1 o 2 en el que el polipéptido comprende un Bucle 1B seleccionado de la lista que consiste en SEQ ID NO:29 a 38.
- 15 4. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1 o 2 en el que el polipéptido comprende un Bucle 1B seleccionado de la lista que consiste en SEQ ID NO:67 a 79.
- 20 5. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1 o 2 que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia de aminoácidos a un polipéptido seleccionado de la lista que consiste en HXP4 (SEQ ID NO:39), HXP34 (SEQ ID NO:40) y HXP35 (SEQ ID NO:41).
- 25 6. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1 o 2 en el que el patógeno fúngico se selecciona de la lista que consiste en un patógeno fúngico de planta, un patógeno fúngico de mamífero y una roya.
- 30 7. El polipéptido aislado de la Reivindicación 6 en el que el hongo se selecciona de la lista que consiste en *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, *Fusarium* spp tal como *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium virgululiforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tucumaniae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Trychophyton* spp, *Cryptococcus* spp, *Microsporum* spp, *Penicillium* spp, *Trichosporon* spp, *Scedosporium* spp, *Paecilomyces* spp, *Acremonium* spp y mohos dematiáceous.
- 35 8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido aislado de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Una planta genéticamente modificada que produce el polipéptido de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7 o progenie de dicha planta que produce dicho polipéptido.
- 40 10. La planta genéticamente modificada de la Reivindicación 9 seleccionada de la lista que consiste en maíz, soja, algodón, sorgo, trigo, cebada, maíz, canola, abacá, alfalfa, almendra, manzana, espárrago, plátano, judía-*phaseolus*, zarzamora, haba, anacardo, yuca, garbanzo, cítrico, coco, café, higo, lino, uvas, cacahuete, cáñamo, lavanda, aceitunas, cebolla, guisante, maní, pera, mijo en grano, patata, colza, césped inglés, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, taro, té, tabaco, tomate, triticale y ñame.
- 45 11. Un método para generar una planta genéticamente modificada que presenta actividad antifúngica como resultado de la modificación genética, comprendiendo el método crear una planta mediante la transformación que comprenda células que expresen el ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, el nivel de expresión en la planta suficiente para la defensina modificada para presentar un efecto protector frente a un patógeno fúngico de planta.
- 50 12. Un método par generar una defensina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena principal de una defensina solanácea Clase II que tiene una región Bucle 1B entre la cadena  $\beta$  1 y la hélice  $\alpha$  en la porción del extremo N-terminal de la defensina solanácea Clase II, comprendiendo el método modificar la región Bucle 1B mediante una sustitución de aminoácidos de la región Bucle 1B entera y en el que dicho Bucle 1B está reemplazado por un Bucle 1B de otra defensina para generar un polipéptido de defensina con actividad antifúngica.
- 55 13. El método de la Reivindicación 12 en el que el Bucle 1B en la defensina solanácea Clase II se modifica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en SEQ ID NOs:29 a 38 y SEQ ID NO:67 a 79.



**Figura 1**

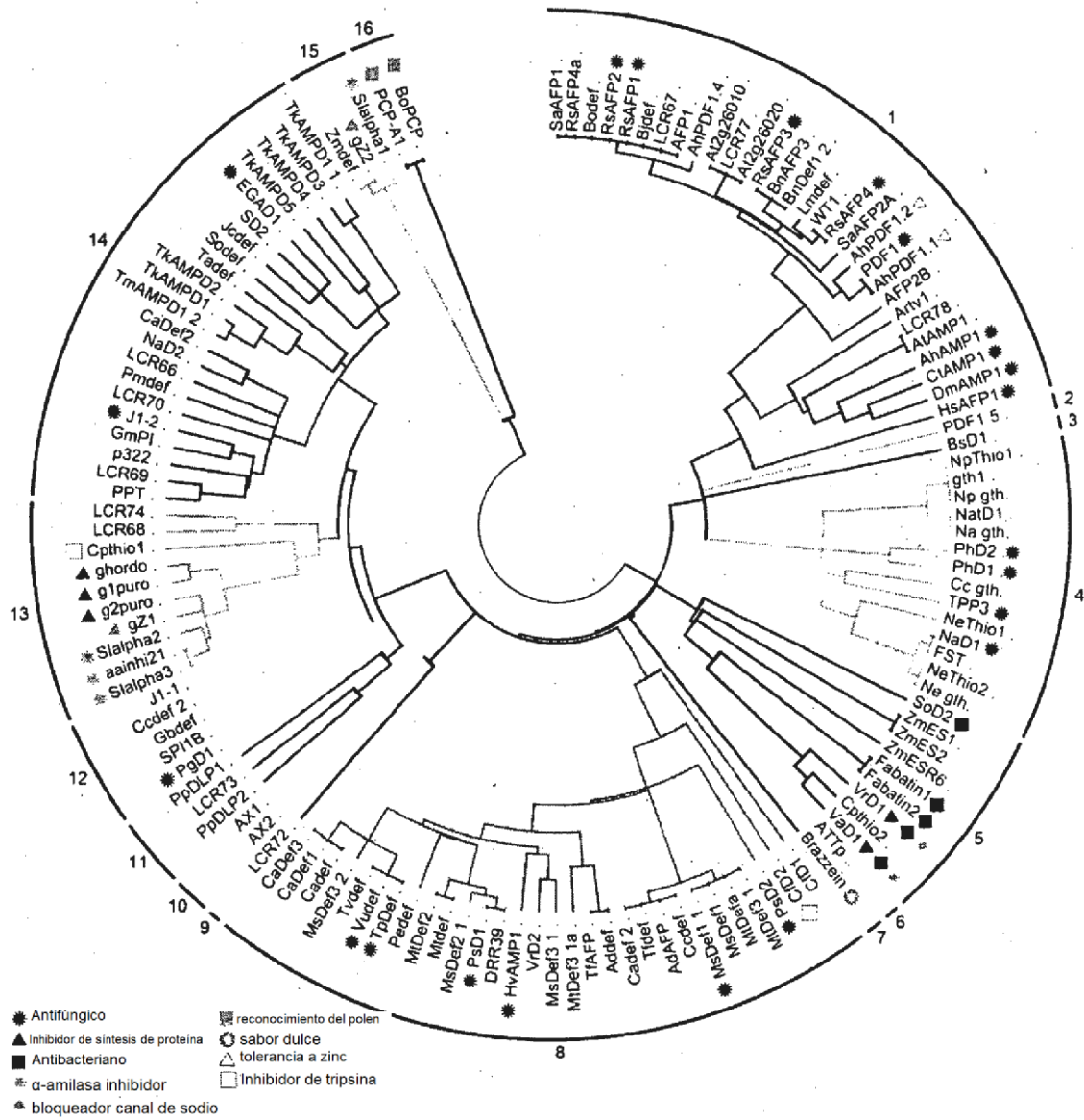


Figura 2

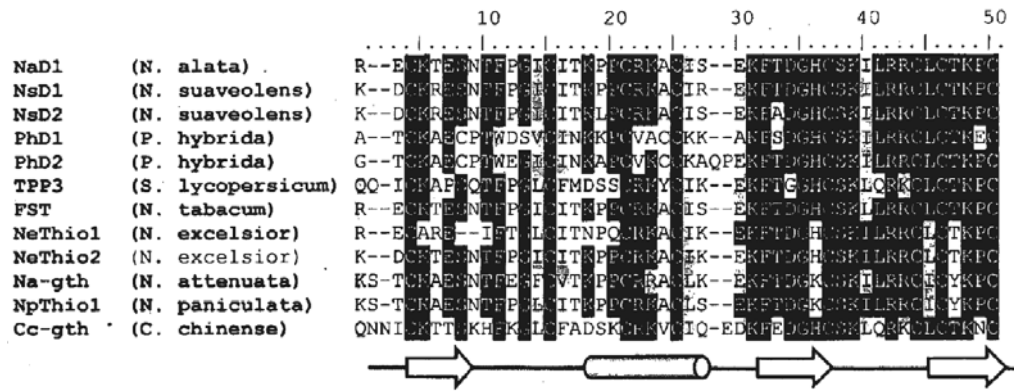


Figura 3A



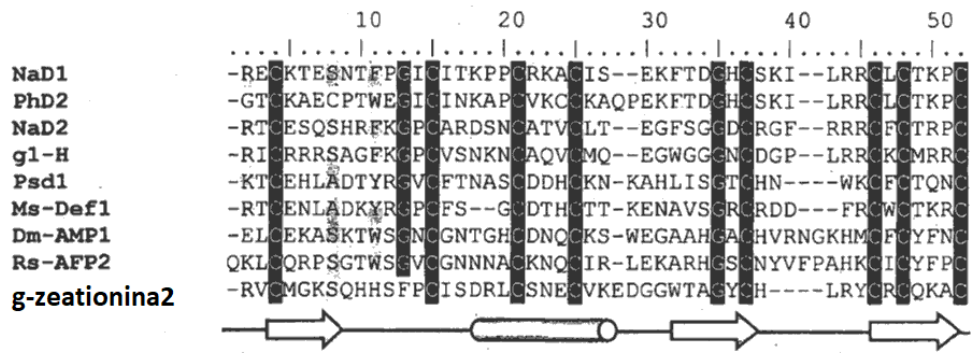
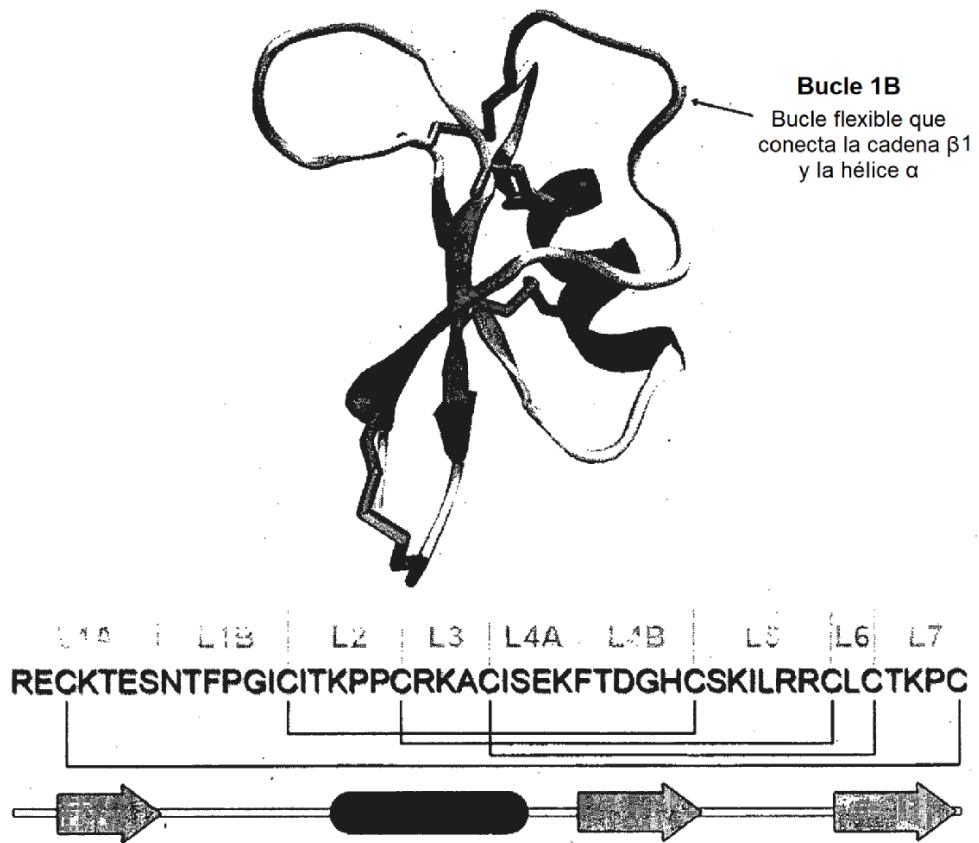
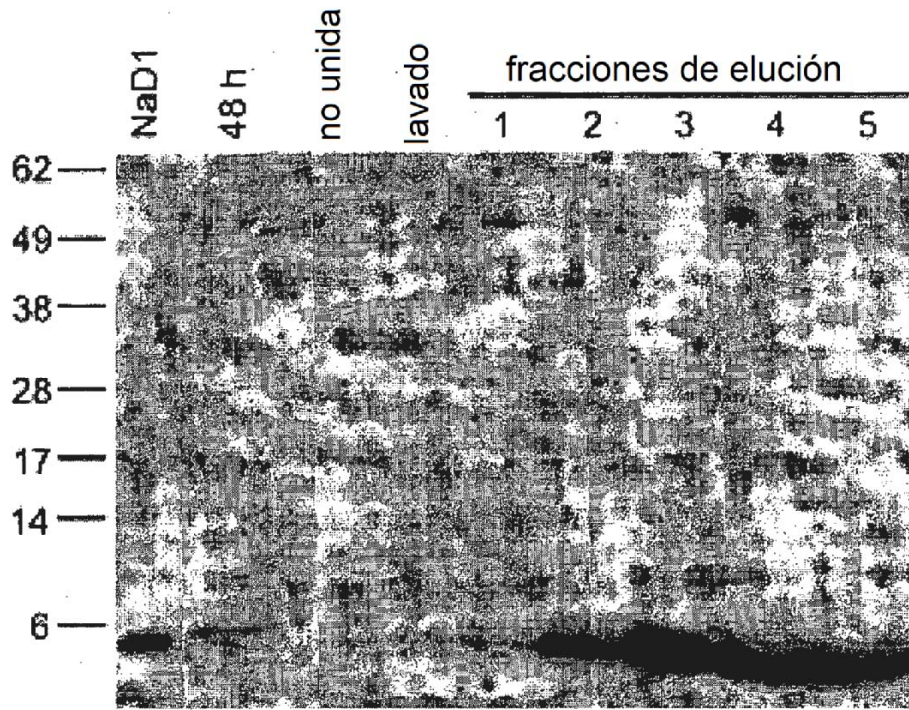


Figura 4

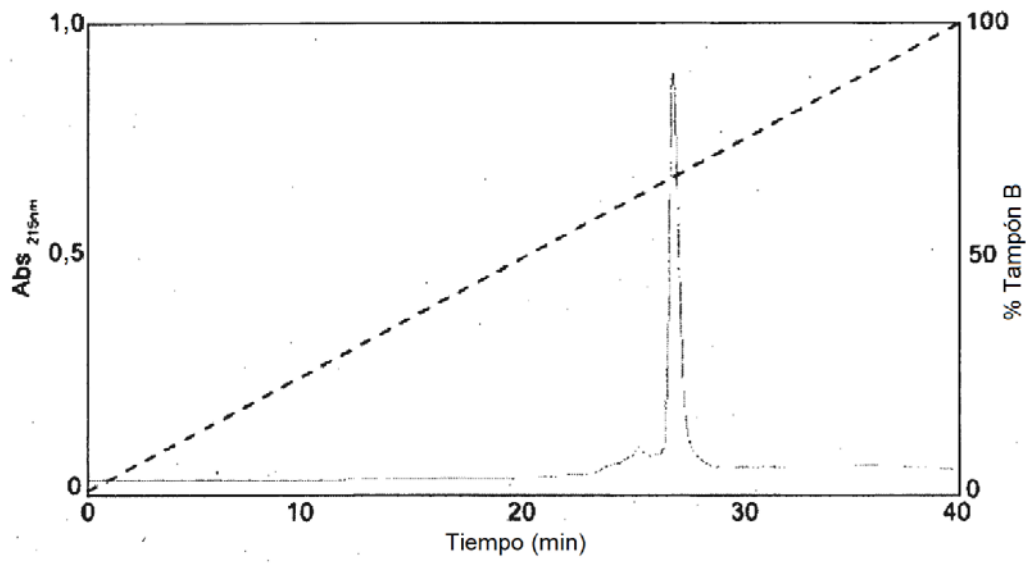


**Figura 5**





**Figura 6A**



**Figura 6B**

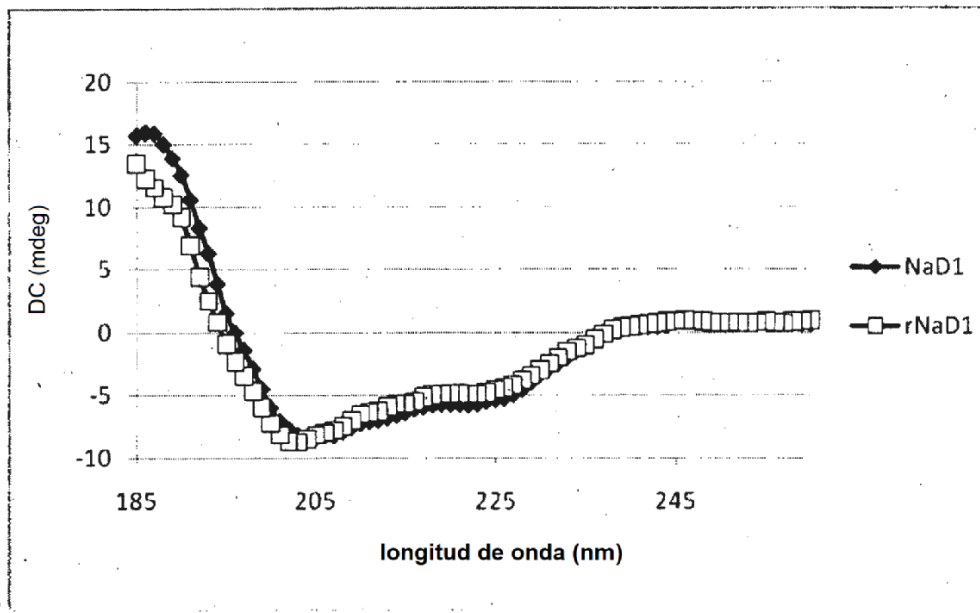


Figura 6C

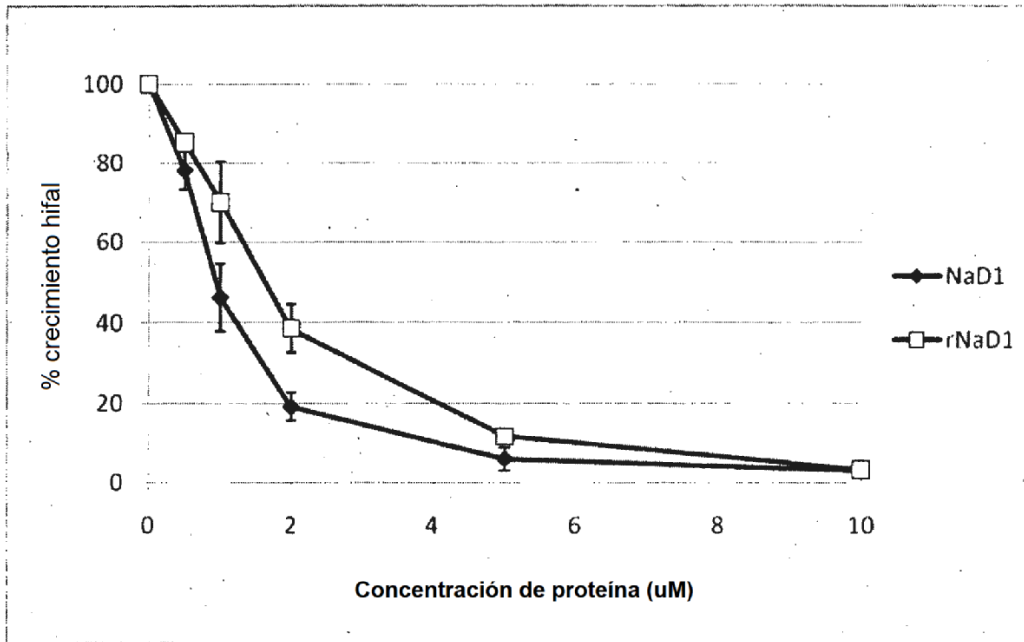


Figura 6D

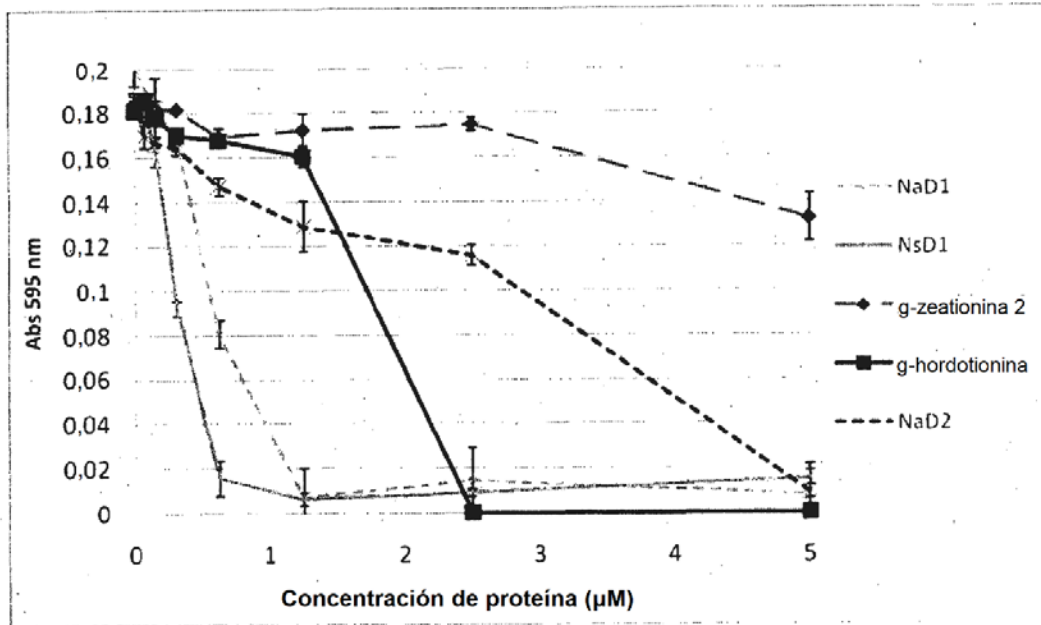


Figura 7

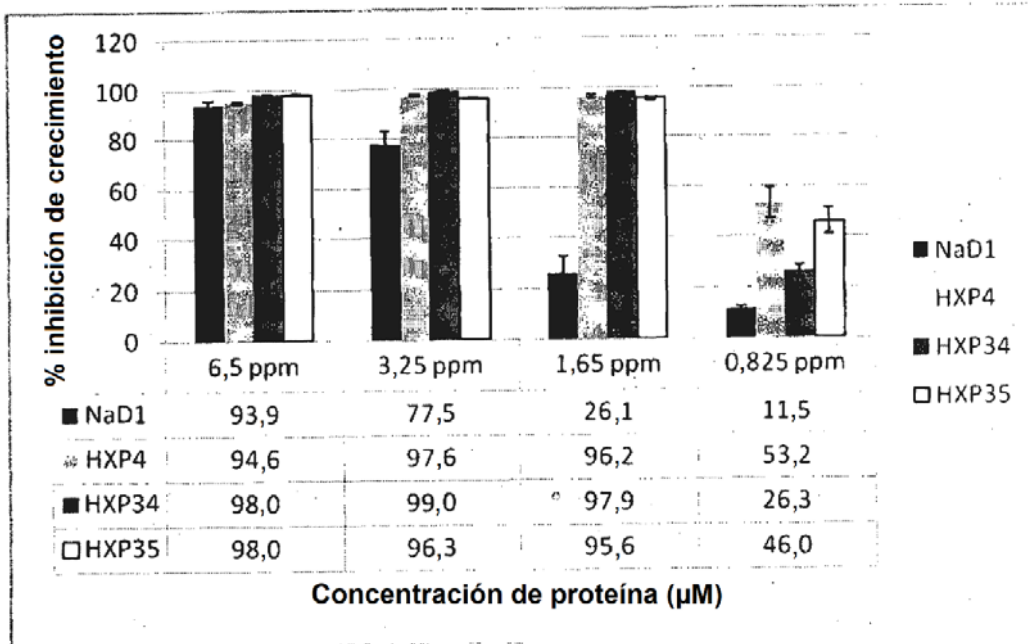
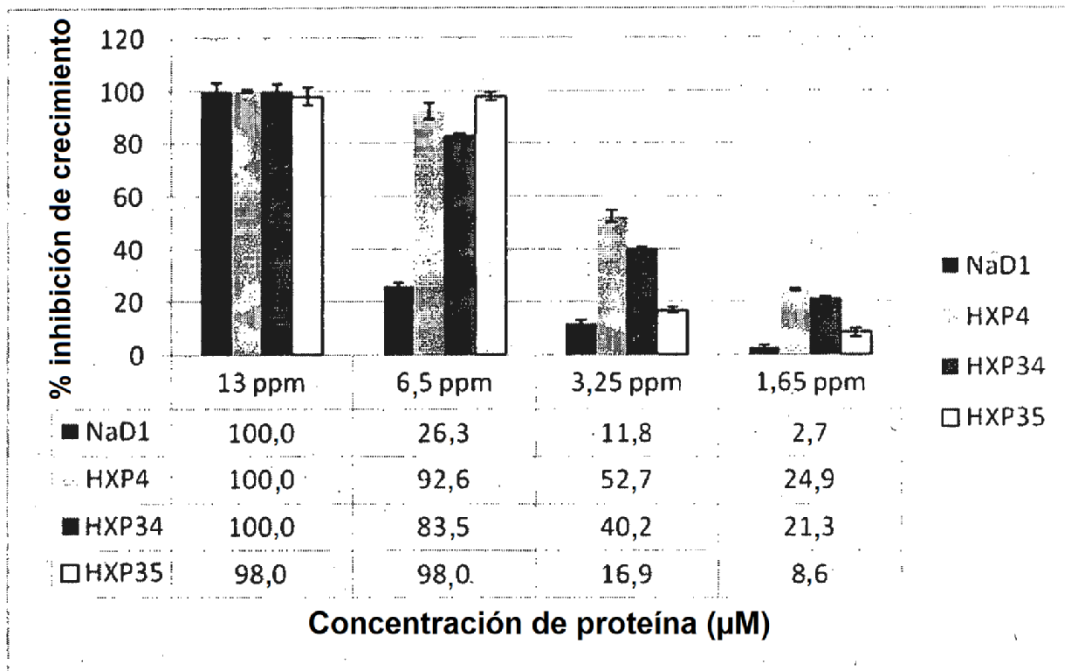
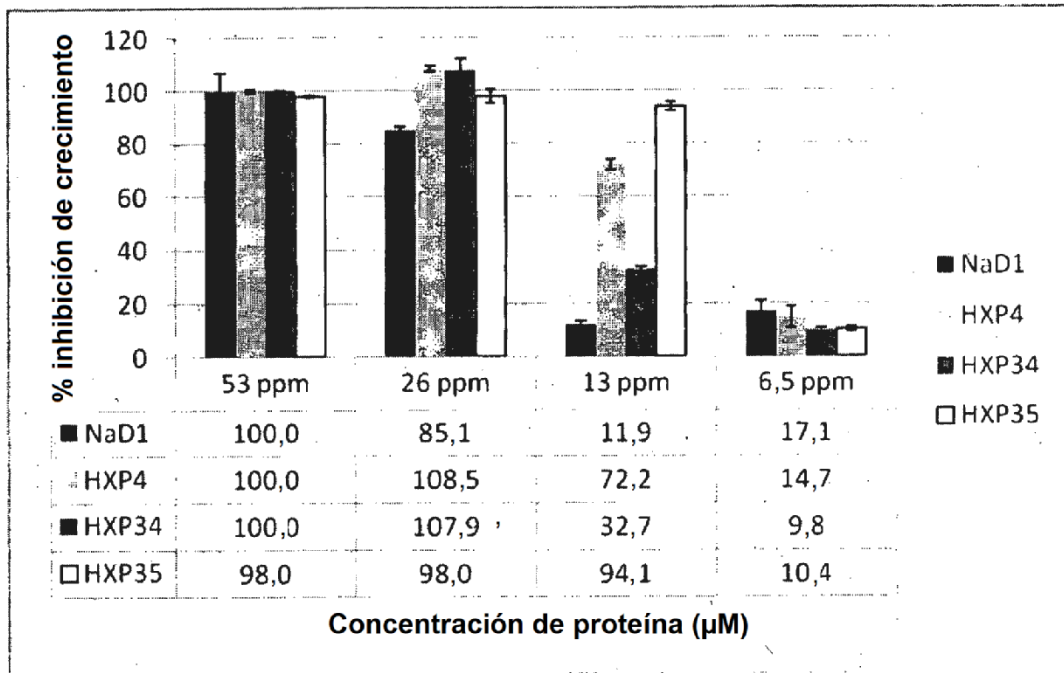


Figure 8

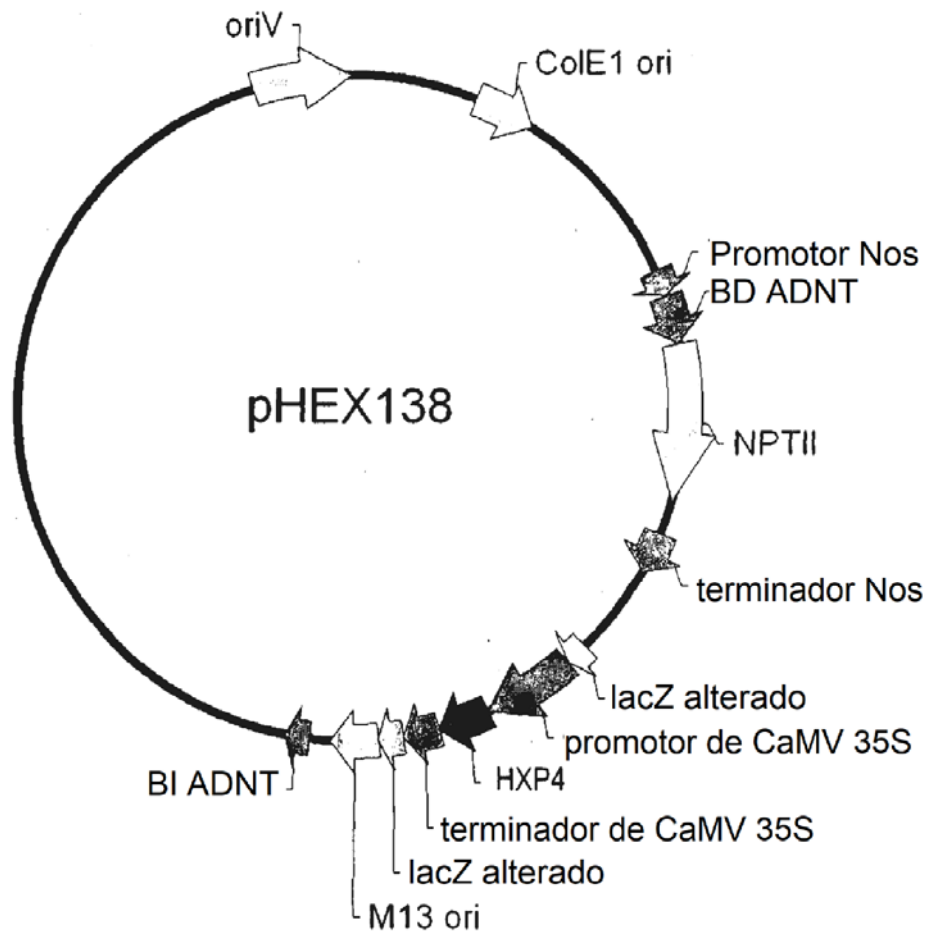


**Figura 9**



**Figura 10**





**Figura 11**

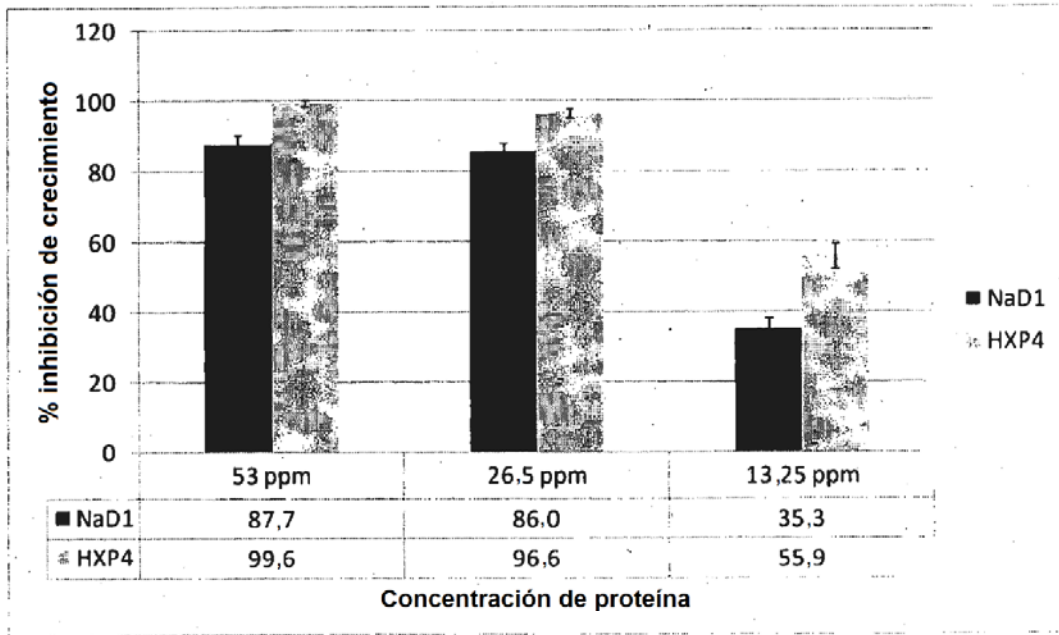
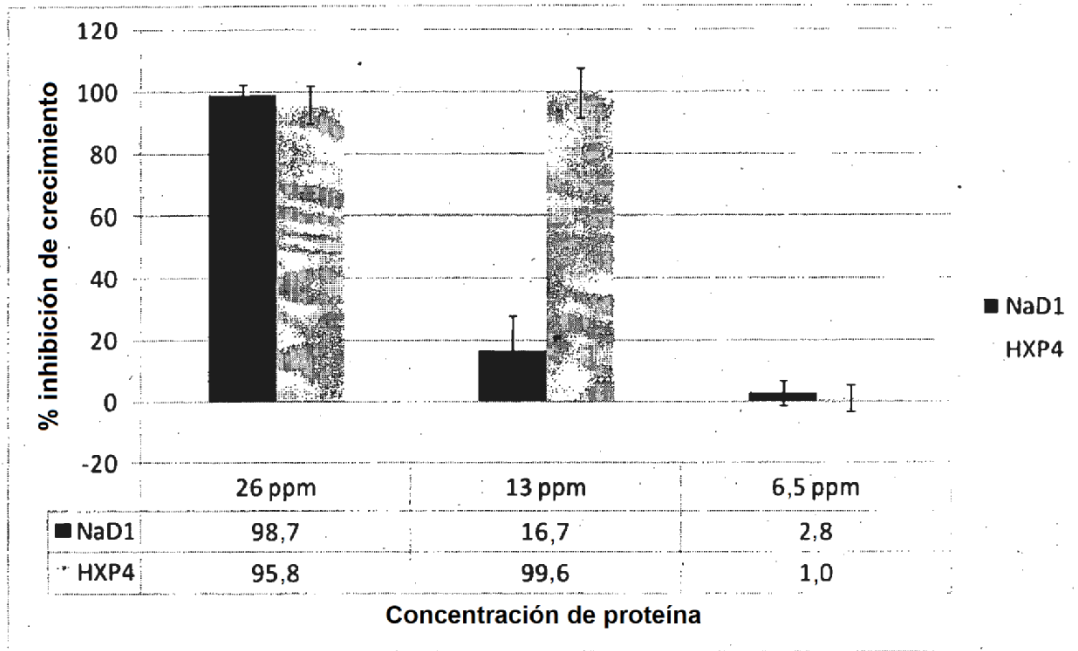
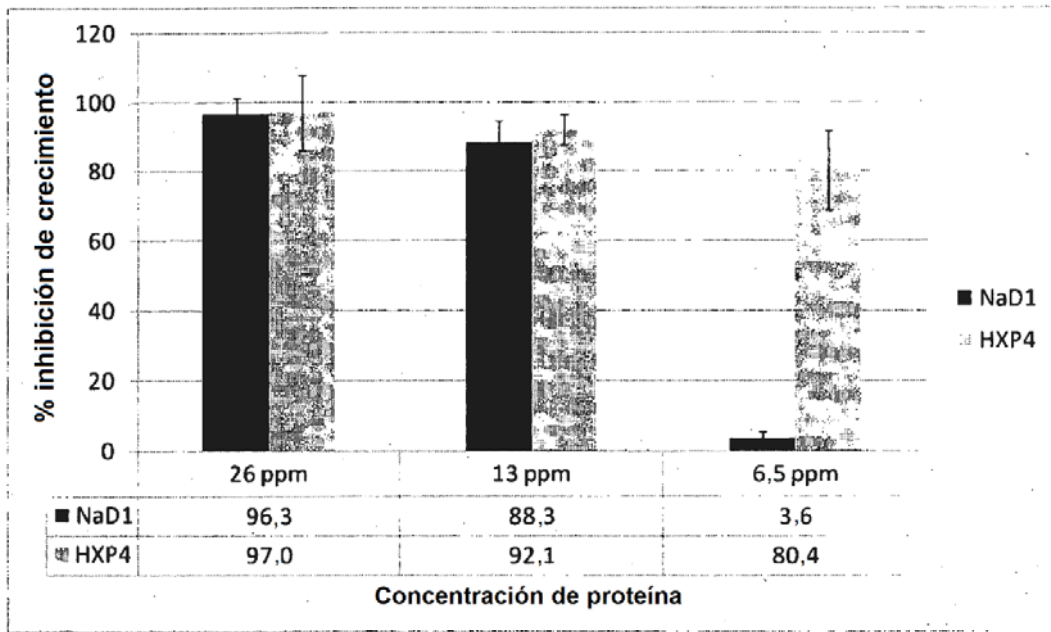


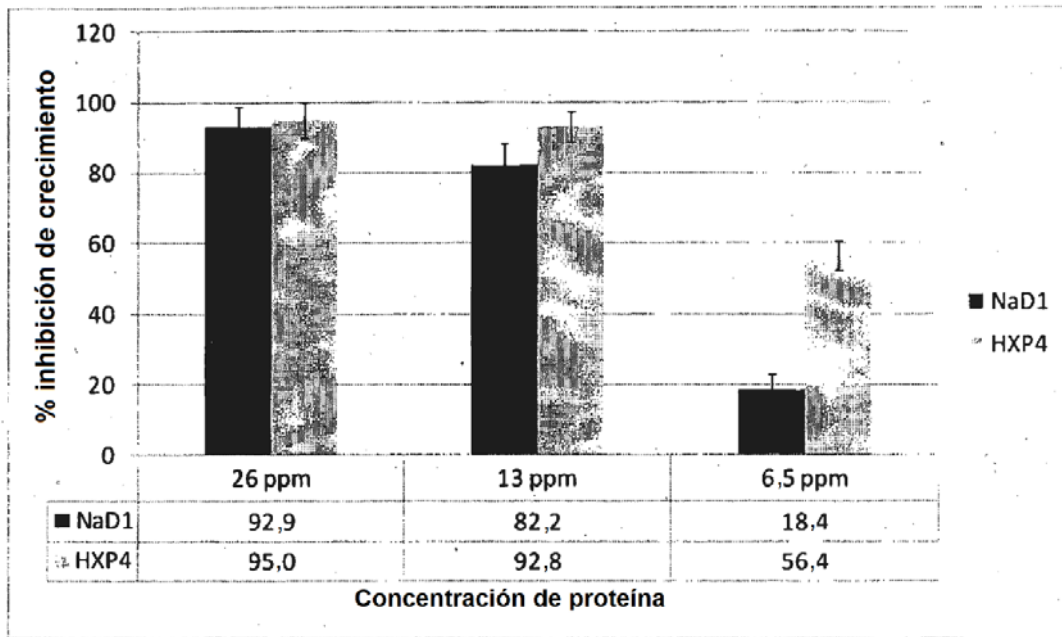
Figura 12



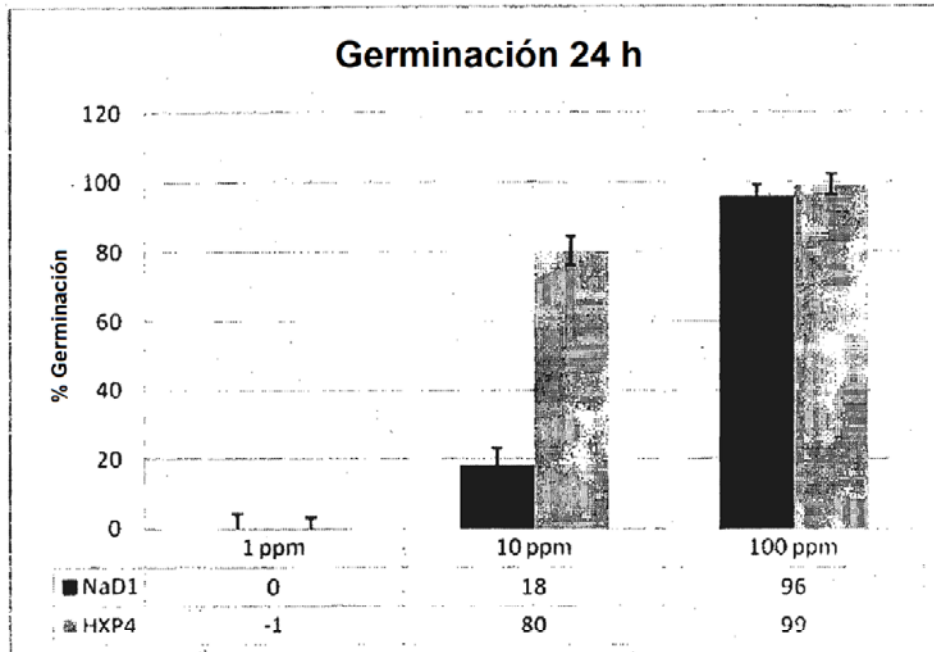
**Figura 13A**



**Figura 13B**



**Figura 13C**



**Figura 14A**

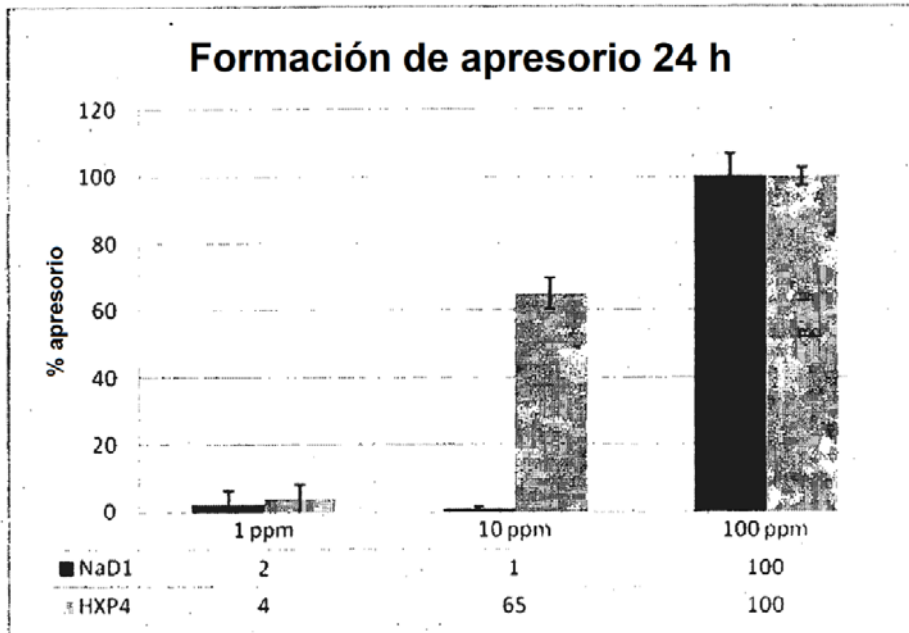


Figura 14B

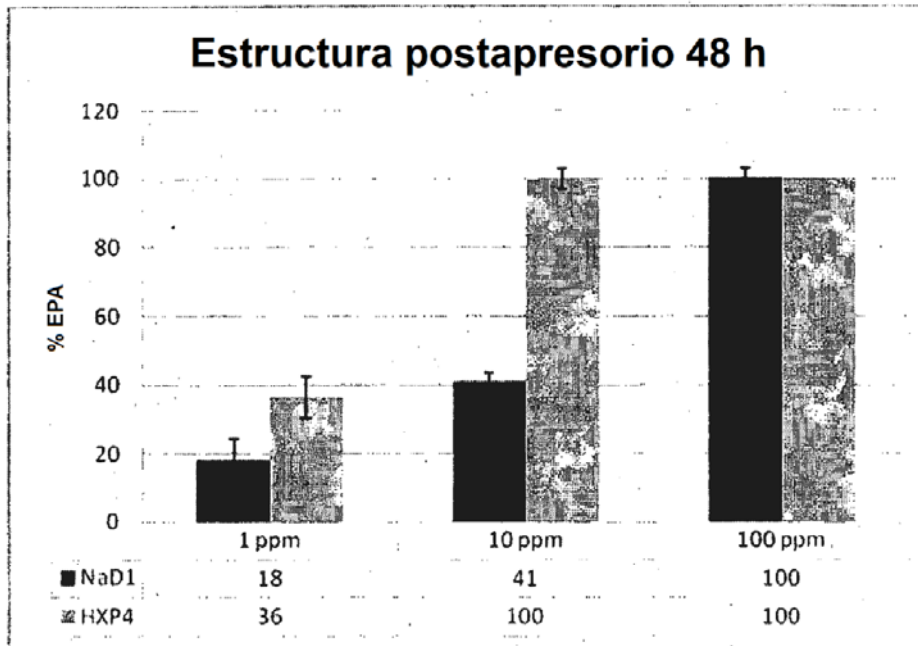


Figura 14C



```

>SSBAA-HvCPI6 para expression en maíz
      10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atggccaacaagcacctgtccctctccctcttctctcgtgctctctcggcctctccgctccctcgcctccg
M A N K H L S L S L F L V L L G L S A S L A S

      80      90      100     110     120     130     140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gagccacctcggccctcggcgcggcggtgcttctgggcgggtggagccccgtcaaggacgtgaacga
G A T S A L G R R G V L L G G W S P V K D V N D

      150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cccgcacgtccaggagctaggcgggtgggcgggtggcccagcacgccagcctagccaaggacgggctgctc
P H V Q E L G G W A V A Q H A S L A K D G L L

      220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ttccgccgggtgacgcgcggcgagcagcaggtggtgtccgggatgaactaccgcctcttcgtggtcgcgg
F R R V T R G E Q Q V V S G M N Y R L F V V A

      290     300     310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cggacggctccggcaagagggtgacctatctcgcgcagatctacgagcactggagcaggaccccgcaagct
A D G S G K R V T Y L A Q I Y E H W S R T R K L

      360     370
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cacgtccttcaagccggctgccggcggtga
T S F K P A A G G *
    
```

Figura 15

>SS<sub>BAA</sub>-HvCPI6-L-HXP4-CTPP<sub>NaD1</sub>

```

      10      20      30      40      50      60      70
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atggccaacaagcacctgtccctctccctcttctctcgtgctcctcggcctctccgcctccctcgctccg
M A N K H L S L S L F L V L L G L S A S L A S

      80      90      100     110     120     130     140
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gagccacctcggccctcggccgcggcggtgcttctgggagggtggagccccgtcaaggacgtgaacga
G A T S A L G R R G V L L G G W S P V K D V N D

     150     160     170     180     190     200     210
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ccgcacgtccaggagctaggcgggtggcggtggcccagcacgccagcctagccaaggacgggctgctc
P H V Q E L G G W A V A Q H A S L A K D G L L

     220     230     240     250     260     270     280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ttccgcgggtgacgcggcgagcagcaggtggtgctccgggatgaactaccgcctcttctggtgctcgg
F R R V T R G E Q Q V V S G M N Y R L F V V A

     290     300     310     320     330     340     350
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cggacggctccggcaagaggggtgacctatctcgcgcagatctacgagcactggagcaggaccgcgaagct
A D G S G K R V T Y L A Q I Y E H W S R T R K L

     360     370     380     390     400     410     420
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cacgtccttaagccggctgccggcgaggagaagaagaacagggagtgcaaacagagagcaacacg
T S F K P A A G G E E K K N R E C K T E S N T

     430     440     450     460     470     480     490
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ttcctggcatctgcattactaagccaccgtgccgcaaggcctgcacatctccgaaaagtttacagacgggc
F P G I C I T K P P C R K A C I S E K F T D G

     500     510     520     530     540     550     560
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
actgttcaaaatcctccgcaggtgcctctgcacgaagccgtgcttttcgacgagaagatgacgaagac
H C S K I L R R C L C T K P C V F D E K M T K T

     570     580     590     600     610     620     630
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tggggcggagattctcgctgaggaggccaagactctggcggtgcctgctggaagaggaaattatggac
G A E I L A E E A K T L A A A L L E E E I M D

....|.
aattga
N *

```

Figura 16