

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 036**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/EP2014/051345**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14124786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14701200 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2956474**

54 Título: **Polipéptidos contra hongos fitopatógenos**

30 Prioridad:

12.02.2013 EP 13154940

12.02.2013 US 201361763585 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2018

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**VILCINSKAS, ANDREAS;
PÖPPEL, ANNE-KATHRIN y
WIESNER, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 036 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

Polipéptidos contra hongos fitopatógenos

La presente invención se refiere a polipéptidos que son eficaces contra hongos, especialmente contra hongos que provocan enfermedades en las plantas, y contra hongos que colonizan productos agrícolas. La invención se refiere, además, a procedimientos para preparar polipéptidos de este tipo, y a ácidos nucleicos que codifican este tipo de polipéptidos. Además, la invención se refiere a procedimientos y preparaciones para tratar plantas utilizando los polipéptidos de acuerdo con la invención, y al uso de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención para producir cultivos que están protegidos frente al daño de los hongos.

Las infecciones en seres humanos por hongos presentan importantes problemas, sobre todo para pacientes inmunodeficientes, porque hasta la fecha solo se conocen unos pocos fármacos antimicóticos activos fiables. Los empleados más frecuentemente incluyen derivados de azol, tales como clotrimazol o ketoconazol, que son menos tóxicos en comparación con otros compuestos (p. ej., anfotericina B) y, por lo tanto, a menudo representan la única posibilidad para el tratamiento de infecciones por hongos.

Además de las infecciones en seres humanos y animales, los hongos también pueden provocar un daño importante a las plantas. Las pérdidas en la cosecha debido a las infecciones de los cultivos por parte de hongos se encuentran entre los mayores problemas de la agricultura moderna. Se conocen más de 8000 especies de hongos que pueden provocar una enfermedad de la planta. Por ejemplo, especies de *Phytophthora* provocan la pudrición de las plantas de patata, de modo que el 20% de la cosecha de patata se pierde al año en todo el mundo. De particular importancia son especies de *Fusarium*, que infestan plantas de cereales, tales como el trigo, el maíz y la cebada. Por ejemplo, *Fusarium graminearum* provoca enfermedades en estas plantas que se manifiestan como manchas oculares en los tallos, necrosis de las hojas o raíces dañadas, así como podredumbre de la mazorca en el maíz. El daño provocado por *Fusarium graminearum* en el cultivo de trigo en los EE.UU. en el período de 1992 a 2001 ascendió a más de 2,6 billones de dólares US (Schisler et al. Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists; Adv Exp Med Biol. 2002; 504: 53-69). Además del alto rendimiento y las pérdidas de calidad en los cereales infestados, el hongo también provoca una contaminación importante del cereal con metabolitos tóxicos (micotoxinas), que cuando se ingieren provocan intoxicación grave (toxicosis) con importantes problemas de salud. A su vez, esto resulta en un daño económico masivo en el campo de la producción animal. Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 100 toxinas producidas por *Fusarium spp.*, de las cuales el desoxinivalenol y el nivalenol del grupo de tricotecenos son las micotoxinas más importantes en el cultivo de cereales. El efecto de estos potentes inhibidores de la síntesis de proteínas incluye toxicidad para la piel y afección adversa de los sistemas nervioso y digestivo de los animales superiores. Estas sustancias son, por lo tanto, un peligro importante tanto para los seres humanos como para los animales de granja.

Basado en la proporción cuantitativa, los ditiocarbamatos y los disulfuros de tiuram son los fungicidas más importantes empleados en agricultura, seguidos de los azoles. La aplicación de ditiocarbamatos y disulfuros de tiuram se considera con escepticismo, en particular debido a su potencial contaminante del agua y a sus pequeños mecanismos de acción específicos (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Folleto N° 4.5/14 del 25 de julio de 2005). Los problemas en el uso de azoles, tales como propiconazol o triticonazol, en la fitoprotección residen principalmente en el hecho de que sustancias químicamente relacionadas con el mismo mecanismo de acción (inhibición de la lanosterol-14 α -demetilasa específica para el hongo) también se emplean en medicina. Por lo tanto, existe el peligro de que la efectividad de los antimicóticos azólicos empleados en medicina se reduzca a través de la selección de resistencia en hongos potencialmente patógenos humanos en el medio ambiente (Informe del Instituto Federal Alemán para la Protección del Consumidor relacionado con la Salud y Medicina Veterinaria de 7 de junio de 2001). Aunque la formación de resistencia contra los azoles avanza de forma relativamente lenta y, por lo tanto, se considera un riesgo moderado desde el punto de vista de la fitoprotección, se considera que una situación exenta de resistencia no se puede restaurar incluso hoy en día. No obstante, los azoles son considerados hoy en día como un elemento indispensable del cultivo integrado de plantas.

Además de la infestación de cultivos en crecimiento, los hongos también representan un problema importante en el almacenamiento y depósito de semillas, cereales, frutas y otros productos agrícolas. La colonización con hongos no solo conduce a pérdidas inmediatas cuando los productos deben desecharse, sino que también conlleva el riesgo de intoxicación grave si se ingieren alimentos y piensos contaminados por micotoxinas. Sin embargo, el uso de fungicidas en la protección de existencias, que es posible en principio y deseable desde un punto de vista económico, está muy restringido. En la fitoprotección generalmente transcurre el tiempo suficiente entre la aplicación de plaguicidas y la cosecha, de modo que las sustancias activas puedan degradarse. En contraposición, para los cultivos almacenados, su venta o consumo debe esperarse en cualquier momento. Así, muchos plaguicidas altamente efectivos no se pueden aplicar en la protección de existencias por razones higiénicas o toxicológicas. Otras preparaciones se pueden emplear solo en concentraciones reducidas, observando los niveles máximos permitidos. Esto resulta en una reducción del éxito del control y en la necesidad de repetir la medición, lo que pone en tela de juicio el propósito del tratamiento desde un punto de vista económico. Por ejemplo, actualmente no se han aprobado fungicidas para su uso en la protección de depósitos en Alemania y Austria. Por lo tanto, no existe una solución satisfactoria para el control de hongos micotoxigenos en productos almacenados.

Con el fin de mejorar la situación, principalmente en el campo de la fitoprotección, se investigan, y en parte ya se han empleado diversas alternativas a los fungicidas sintéticos de bajo peso molecular. Una posibilidad es la inoculación controlada de cultivos de cosechas con hongos del suelo no virulentos, que compiten con las plagas de hongos, matándolas o inhibiendo su crecimiento por mecanismos que en parte se investigan de manera incompleta. A este respecto, se analiza el micoparasitismo, la antibiosis, la liberación de sideróforos, la competencia por el hábitat y los nutrientes, la inducción de mecanismos de resistencia sistémica y el fomento del crecimiento de las plantas. Hasta la fecha, se ha podido lograr un buen comportamiento principalmente en el tratamiento de cultivos de cacao para controlar la enfermedad de la escoba de bruja provocada por *Moniliophthora* (*sin. Crinipellis*) *perniciosa* en América del Sur. Una preparación formulada sobre la base de *Trichoderma stromaticum* fue aprobada en Brasil en febrero de 2012. Se encuentran en desarrollo otras preparaciones basadas en especies de *Trichoderma* simbióticas o endofíticas (*T. martiale*, *T. ovalisporum*) para uso contra la raíz negra del cacao, que es provocada por *Phytophthoras palmivora*, y contra *Moniliophthora roreri*, el patógeno que provoca la podredumbre por *Monilia* en el cacao.

Otra posible estrategia para controlar los hongos dañinos, que aún no ha sido introducida en la práctica médica o agrícola, es la aplicación de los denominados péptidos antimicrobianos. Estos incluyen oligopéptidos codificados por genes que típicamente consisten de 15 a 45 aminoácidos proteínogénicos enlazados entre sí en una cadena lineal (Zaslouff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002, 415: 389-95; Boman, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med.* 2003, 254: 197-215). Se han encontrado péptidos antimicrobianos en la gran mayoría de los organismos pluricelulares, y también son un componente importante del sistema inmunológico en mamíferos, incluidos los seres humanos. Los péptidos antimicrobianos son de suma importancia para la defensa inmune de organismos tales como los insectos y otros artrópodos, que no tienen un sistema inmunológico adaptativo. La mayoría de los péptidos antimicrobianos conocidos tienen una estructura anfipática, en donde el resto hidrofílico porta una carga positiva. Esto permite que los péptidos interactúen con la membrana típicamente cargada negativamente de bacterias y formen estructuras similares a poros después de incrustarse en la membrana. Dado que las membranas de los eucariotas habitualmente no portan carga negativa o solo una débil, la actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos es principalmente antibacteriana, ya que la efectividad es a menudo más pronunciada contra las bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Unos pocos péptidos antimicrobianos, tales como los péptidos cecropina, sarcotoxina y estomoxina, que se caracterizan por una estructura alfa-helicoidal, muestran una amplia gama de actividades y también son activos, en diversos grados, contra hongos, protozoos y células tumorales. Sin embargo, una tendencia a interacciones no específicas de péptidos antimicrobianos de este tipo con membranas biológicas también resulta a menudo en una actividad hemolítica y, por lo tanto, en una toxicidad para los mamíferos. Limitaciones adicionales a la aplicación práctica de muchos péptidos antimicrobianos se deben a la reducción de la actividad de los mismos por concentraciones más altas de sales, a menudo incluso por la concentración de NaCl fisiológico de 150 mM (Marr et al. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 2006, 6: 468-72). Esto se explica por la neutralización de la interacción electrostática con la membrana diana. Para algunos péptidos antimicrobianos, se ha descrito una actividad fungicida predominante o exclusivamente. Estos péptidos antimicrobianos incluyen galerimicina, heliomicina, termicina, Alo3, drosomicina, PsD1 y NaD1 (Lobo et al. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry.* 2007, 46: 987-96; van der Weerden et al. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *J Biol Chem.* 2008, 283: 14445-52). Una estructura tridimensional compacta estabilizada por tres o cuatro puentes disulfuro es característica de tales péptidos antimicrobianos. A péptidos antimicrobianos que tienen características estructurales de este tipo se les alude como defensinas independientemente de su gama de actividades y de los organismos por los que se producen. Alo3 es un caso especial, porque es la única defensina conocida que consiste exclusivamente en tres cadenas beta sin las porciones alfa-helicoidales encontradas en otras defensinas. El reconocimiento de las membranas fúngicas tiene lugar independientemente de las cargas, al menos en algunos casos mediante la unión específica a glucosilceramidas neutras (Aerts et al. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* 2008, 65: 2069-79). La actividad tanto contra hongos como, sobre todo, las bacterias Gram-positivas se ha descrito además para metchnikowina (Levashina et al. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem.* 1995, 233: 694-700). Este péptido rico en prolina, que consiste en 26 residuos aminoácidos, difiere de los péptidos antimicrobianos típicos por carecer de una actividad de lisis de la membrana. Péptidos antimicrobianos más ricos en prolina, con actividad predominantemente contra bacterias Gram-negativas, penetran en las membranas biológicas sin alterarlas e inhiben la proteína chaperona DnaK en el interior de la célula (Kragol et al. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry.* 2001, 40: 3016-26). El que este mecanismo de acción también sea válido para metchnikowina no está claro.

La aplicación de péptidos activos como fungicidas en medicina y cosméticos parece ser razonable, sobre todo, mediante la aplicación a la piel o las mucosas, por ejemplo, en forma de polvos, cremas, geles, lociones, champús, sprays, colutorios o pastas dentífricas. Además, existe la posibilidad de aplicación oral o inyección, por ejemplo, en el caso de una infección aguda potencialmente mortal. La aplicación externa también es posible en el campo de la fitoprotección y la protección de depósitos, por ejemplo, mediante pulverización o aplicando formulaciones en polvo. La preparación de péptidos activos puede efectuarse sintéticamente, principalmente por síntesis en fase sólida, o mediante la expresión heterológica de ácidos nucleicos correspondientes en diferentes organismos huésped. Dado que la preparación de oligopéptidos y polipéptidos en forma pura es complicada, se buscan formas de aplicación

alternativas, principalmente para la aplicación en la fitoprotección. Un método que está bien establecido, al menos en el campo de la investigación, consiste en la producción de plantas modificadas genéticamente, en las que se introdujeron ácidos nucleicos que codifican los péptidos activos a producir. Debido a que la producción constante de sustancias activas de este tipo por parte de la planta no es deseable en algunos casos, puede ser ventajoso introducir los ácidos nucleicos de tal manera que la expresión de los mismos esté bajo el control de promotores que se activan directamente por la infestación de hongos, o por las reacciones de estrés de la planta asociada con ellos.

Ácidos nucleicos que codifican las defensinas heliomicina y drosomicina se introdujeron en plantas de tabaco y podían mediar una resistencia pequeña, pero estadísticamente significativa, contra *Cercospora nicotianae* (Banzet et al. Expression of insect cysteine-rich antifungal peptides in transgenic tobacco enhances resistance to a fungal disease. Plant Sci. 2002, 162: 995-1006). De manera similar, la resistencia contra el mildiú pulverulento *Erysiphe cichoracearum* y *Sclerotinia minor* podía lograrse mediante la introducción de ácidos nucleicos que codifican gallerimicina en plantas de tabaco (Langen et al. Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. Biol Chem. 2006, 387: 549-57). Además de estas defensinas que son específicamente activas contra los hongos, también se prepararon plantas modificadas genéticamente que producen péptidos antimicrobianos con una gama más amplia de actividades. Por ejemplo, la expresión en el arroz de un gen extraño que codifica cecropina A dio como resultado un aumento de la resistencia contra el patógeno añublo del arroz *Magnaporthe grisea* (Coca et al. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. Planta 2006, 223: 392-406). El aumento de la resistencia contra *Fusarium solani* se logró mediante la expresión heteróloga en plantas de patata y tabaco de un gen que codifica un péptido híbrido artificial que consiste en elementos de secuencia de cecropina y de melitina, que se produce en el veneno de las abejas (Osusky et al. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. Nat Biotechnol. 2000, 18: 1162-6; Yevtushenko et al. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. J Exp Bot. 2005, 56: 1685-95). En la cebada, se observó un aumento de la resistencia contra *Fusarium graminearum* y *Blumeria graminis* tras la introducción de un gen extraño para metchnikowina (Rahnamaeian et al. Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. J Exp Bot. 2009, 60: 4105-14).

Debido a estos datos, se debe considerar como un hecho establecido que los hongos antimicrobianos son adecuados, en principio, para controlar las infecciones por hongos en las plantas y en la protección de los depósitos. Sin embargo, actualmente solo se conocen unos pocos de estos péptidos que tienen una actividad específica contra hongos en general y, en particular, contra hongos patógenos para plantas. El uso de péptidos que tienen una amplia gama de actividades conlleva el riesgo de que se impida el crecimiento de bacterias útiles, por ejemplo, las asociadas con las plantas como simbiotes. Además, la presencia de dichos péptidos en productos destinados a la ingestión humana o animal puede conducir a interferencias con la flora intestinal natural y, por lo tanto, afectar negativamente a la salud. Problemas adicionales surgen del hecho de que la mayoría de los péptidos antimicrobianos conocidos portan una carga neta positiva a valores de pH fisiológicos. Las interacciones no específicas resultantes con diferentes polímeros biológicos con carga negativa pueden conducir a efectos tóxicos que son difíciles de predecir. Por lo tanto, existe un riesgo de liberación de histamina por parte de los mastocitos al entrar en contacto con sustancias fuertemente catiónicas (Vaara, M. New approaches in peptide antibiotics. Curr Opin Pharmacol. 2009, 9: 571-6). Además, muchos de los péptidos antimicrobianos conocidos tienen una estructura anfipática, que implica una tendencia a incrustarse en las membranas biológicas de células de mamíferos, que se puede medir como una actividad hemolítica, de modo que existe un potencial tóxico adicional.

El documento EP 0 798 381 A2 describe un polipéptido de moscas del orden Diptera y su uso para preparar plantas transgénicas que tienen una resistencia incrementada contra *Fusarium*. La entrada en la Base de datos EMBL (en línea) de 1 de marzo de 2011, N° de acceso EBI JG 407441, describe un polinucleótido de *Lucilia cuprina*. No se describen funciones asociadas con este polinucleótido.

Sorprendentemente, se ha encontrado que un grupo de polipéptidos tienen actividad fungicida. Típicamente, la exposición a los polipéptidos de acuerdo con la invención a una concentración de 1 a 1000 μM , especialmente 2 μM , conduce a una inhibición semi-máxima de la germinación de las esporas de *Fusarium graminearum*.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención es idéntico a SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.

En otra realización de la invención, el polipéptido de acuerdo con la invención es eficaz contra el crecimiento de organismos de los géneros *Fusarium* y/o *Phytophthora*.

El polipéptido de acuerdo con la invención se puede derivar, especialmente en el extremo N, el extremo C y/o en la cadena peptídica. La derivación del extremo N puede incluir alquilación parcial o completa, acilación u otra modificación de N. La derivación del extremo C puede incluir amidación, esterificación u otra modificación del grupo carboxi terminal. La derivación de la cadena polipeptídica puede incluir, en particular, una modificación para mejorar las propiedades del polipéptido de acuerdo con la invención, por ejemplo, PEGilación, HESilación o similares. Si se desea, el polipéptido de acuerdo con la invención también puede acoplarse a unidades estructurales que tienen afinidad de unión por estructuras celulares del organismo contra el que se ha de emplear el polipéptido de acuerdo con la invención. Derivaciones adecuadas para lograr propiedades modificadas de polipéptidos son conocidas por la

persona experta. Derivados del polipéptido de acuerdo con la invención que tienen las actividades mencionadas también se reivindican de acuerdo con la invención.

En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido con la siguiente secuencia:

**Z₁-QHGYGAGGGHQQGYGSQHSSHAPQGGHVREQGFSGHVHEQQAGHHHEAGHHEQAGHHEQ
SGQQVHGGHGYK-Z₂,**

5 en que

Z₁ es el extremo N-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo amino terminal del polipéptido, o una cadena de hasta diez aminoácidos arbitrarios;

Z₂ es el extremo C-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo carboxi terminal del polipéptido, o una cadena de hasta diez aminoácidos amino arbitrarios.

10 En particular, Z₂ puede tener una secuencia de aminoácidos de SHGY-Z₃, en donde Z₃ es el extremo C-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo carboxi terminal del polipéptido, o una cadena de hasta seis aminoácidos arbitrarios.

En otra realización de la invención, el polipéptido de acuerdo con la invención puede tener D-aminoácidos o una estructura peptídica D-retro-inversa en parte o completamente en la cadena peptídica.

15 La invención también se refiere al uso de un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con la invención para producir el polipéptido de acuerdo con la invención, o para controlar hongos, en donde dicho polinucleótido tiene una secuencia que se hibrida en condiciones de rigurosidad utilizando 0.2xSSC a 42°C para el lavado con una sonda de oligonucleótidos o polinucleótidos seleccionada del grupo:

la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 1 a 231 de SEQ ID N° 3;

20 la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 1 a 102 de SEQ ID N° 3;

la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 103 a 331 de SEQ ID N° 3;

la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 18 a 251 de SEQ ID N° 4;

la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 18 a 119 de SEQ ID N° 4;

la cadena complementaria a los residuos de nucleótido 120 a 251 de SEQ ID N° 4.

25 La presente invención también se refiere al uso del polipéptido de acuerdo con la invención o de un ácido nucleico de acuerdo con la invención que codifica dicho polipéptido para controlar hongos, especialmente hongos que provocan enfermedades en las plantas; organismos de los géneros *Fusarium* y/o *Phytophthora*; organismos de la clase Peronosporomycetes.

30 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir el polipéptido de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere a una célula, a excepción de células de tipo salvaje de *Lucilia sericata*, que contienen un ácido nucleico para la expresión de un polipéptido de acuerdo con la invención, especialmente un polipéptido de SEQ ID N°s 1 o 2.

La invención también se refiere a un cultivo transgénico que contiene una célula de acuerdo con la invención.

35 La Figura 1 muestra el resultado del análisis de la proteína LserFCP1-77, que se preparó de forma completamente sintética, mediante cromatografía de fase inversa y espectrometría de masas.

La Figura 2 muestra el resultado de un análisis de SDS-PAGE después de diferentes períodos de tiempo desde la inducción con IPTG de células de *E. coli* que se modificaron por ingeniería genética para la producción de un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento de factor Xa y LserFCP1-77.

40 La Figura 3 muestra el resultado de una cromatografía de afinidad de iones de metales inmovilizados para la purificación de un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento del factor Xa y LserFCP1-77, y el resultado del análisis de SDS PAGE relacionado.

La Figura 4 muestra el resultado de una cromatografía Mono-Q para la separación de los productos de escisión obtenidos después del tratamiento con factor Xa de un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento del factor Xa y LserFCP1-77, y el resultado del

45 La Figura 4 muestra el resultado de una cromatografía Mono-Q para la separación de los productos de escisión obtenidos después del tratamiento con factor Xa de un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento del factor Xa y LserFCP1-77, y el resultado del

análisis de SDS PAGE relacionado.

La Figura 5 muestra el resultado del análisis del polipéptido LserFCP1-77, que se preparó en forma recombinante, mediante cromatografía de fase inversa y espectrometría de masas.

5 La Figura 6 muestra el resultado de una cromatografía Mono-Q para la separación de los productos de escisión obtenidos después del tratamiento con enteroquinasa de un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento de enteroquinasa y LserFCP1-77, y el resultado del análisis espectrométrico de masas del polipéptido LserFCP1-73 obtenido.

La Figura 7 muestra el resultado de ensayos en el polipéptido LserFCP1-77 para la inhibición de la germinación de esporas de *Fusarium graminearum* en las concentraciones indicadas en comparación con un control de agua.

10 La Figura 8 muestra la relación dosis-efecto para la inhibición de la germinación de esporas de *Fusarium graminearum* por LserFCP1-77.

La Figura 9 muestra el resultado de ensayos en el polipéptido LserFCP1-73 para la inhibición de la germinación de esporas de *Fusarium graminearum* en las concentraciones indicadas en comparación con un control de agua.

15 La Figura 10 muestra el resultado de ensayos en el polipéptido LserFCP1-77 para la inhibición de la germinación de esporas de *Phytophthora parasitica* en las concentraciones indicadas en comparación con un control de agua.

De acuerdo con la invención, la expresión "actividad fungicida" se entiende que significa el exterminio de hongos, la inhibición del crecimiento de hongos y la prevención de la germinación de esporas de hongos. Estos efectos pueden ser total o parcialmente pronunciados.

20 De acuerdo con la invención, se entiende que la expresión "control de hongos" significa el exterminio de hongos o la inhibición del crecimiento de hongos existentes, así como la prevención de la colonización de hongos y la prevención de la germinación de esporas de hongos.

25 De acuerdo con la invención, se entiende también por "hongos" aquellos organismos a los que se alude coloquialmente como hongos (o mohos), incluso a pesar de que esto no refleja correctamente la evidencia científica relacionada con la filogénesis. En particular, se pretende que "hongos" de acuerdo con la invención incluyan representantes de la clase Peronosporomycetes (denominaciones anteriores Oomycota u Oomycetes), incluido el género *Phytophthora*.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención son adecuados para controlar hongos que provocan daños relacionados con la salud o económicos.

30 En una realización preferida de la invención, los polipéptidos de acuerdo con la invención se emplean para controlar hongos que provocan enfermedades en las plantas o daños en el almacenamiento de productos agrícolas.

En otra realización preferida de la invención, los polipéptidos de acuerdo con la invención se emplean para controlar hongos de los géneros *Phytophthora* y *Fusarium*.

35 Los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden utilizar en forma pura o en forma de diferentes formulaciones para controlar hongos. Para la aplicación externa, los polipéptidos pueden diluirse para formar una solución o suspensión líquida que contenga de 0,01 a 30 mg/ml del polipéptido respectivo, o mezclarse con un extensor sólido para aplicación como un polvo espolvoreable o polvo. Métodos para adaptar métodos comunes para la aplicación a cultivos y patógenos particulares se conocen en la bibliografía (Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens, K.D. Hickey, Ed., The American Phytopathological Society, 1986). Métodos de aplicación incluyen la pulverización acuosa o no acuosa realizada singular o periódicamente de plantas o partes de plantas, el recubrimiento de semillas y la incorporación en sistemas de pulverización. Aditivos auxiliares que pueden añadirse a la formulación incluyen estabilizadores, agentes para mejorar el comportamiento de disolución y agentes humectantes, y también agentes que permitan una microencapsulación.

45 Para un control particularmente eficaz de los hongos, los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden emplearse en combinación con otras sustancias activas como fungicidas. Además, es también posible la combinación con sustancias bactericidas, antivirales, nematocidas, insecticidas y otras sustancias activas comunes en la protección de las plantas. También es posible la combinación con fertilizantes, hormonas vegetales y reguladores del crecimiento. Una posibilidad de controlar los hongos por medio de los polipéptidos de acuerdo con la invención es diseñar plantas genéticamente mediante la introducción de secuencias de polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en su material genético mediante un proceso conocido como transformación. Métodos para preparar tales plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención son conocidos por la persona experta (Methods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach, H. Weissbach, Comps., Saunders College Publishing/Harcourt Brace, Junio 1988; Methods in plant molecular biology and biotechnology, B.R. Glick, J.E. Thompson, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993). En una variante ventajosa de la invención, las construcciones de genes artificiales de vectores adecuadamente modificados se incorporan en plantas, partes de plantas o células vegetales mediante

bombardeo con micropartículas recubiertas con ADN, mediante el denominado método de inmersión floral o mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Otros métodos posibles incluyen, por ejemplo, microinyección, permeabilización química, electroporación y fusión de protoplastos con unidades que contienen ADN, tales como células, minicélulas, protoplastos o liposomas. En otra variante ventajosa de la invención, un gen que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención se prepara sintéticamente, en que los tripletes de nucleótidos, que codifican un aminoácido cada uno, se adaptan al uso de codones preferido de la planta modificada genéticamente. Además, es posible colocar el gen extraño para que sea transferido bajo el control de un promotor que es activable por lesión y actividad de auxina de acuerdo con un método conocido, con lo cual se logra una expresión mejorada después de la colonización fúngica (Rahnamaeian. Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. J Exp Bot. 2009, 60: 4105-14). En una realización ventajosa de la invención, plantas de maíz y/o patata se modifican genéticamente con el fin de que sean capaces de producir los polipéptidos de acuerdo con la invención. Se puede utilizar un polipéptido correspondiente a SEQ ID N° 1 o N° 2 para controlar hongos. Además, también es posible emplear polipéptidos u oligopéptidos resultantes de la adición de residuos de aminoácidos adicionales.

Además, es posible emplear variantes del polipéptido que tienen elementos de secuencia adicionales que se han agregado, por ejemplo, para lograr un mayor rendimiento en la preparación en una forma recombinante, o una purificación facilitada.

En algunos casos, puede ser ventajoso emplear oligopéptidos que consistan en al menos doce residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID N° 1. Además, puede ser posible separar residuos de aminoácidos individuales, o reemplazarlos por los residuos de diferentes aminoácidos. La inserción de residuos de aminoácidos adicionales también es posible. Cambios de este tipo también son posibles cuando proceden de variantes truncadas o extendidas del polipéptido. En particular, puede ser ventajoso reemplazar los residuos de aminoácidos individuales por aquellos que tienen propiedades físico-químicas similares. Por lo tanto, principalmente los residuos de los aminoácidos son mutuamente intercambiables dentro de los siguientes grupos:

- 25 Arginina y lisina;
- ácido glutámico y ácido aspártico;
- glutamina, asparagina y treonina;
- glicina, alanina y prolina;
- leucina, isoleucina y valina;
- 30 tirosina, fenilalanina y triptófano;
- serina y treonina.

La identificación de polipéptidos que se derivan de SEQ ID N° 1 se puede efectuar, por ejemplo, mediante el rastreo de genotecas genómicas y/o de ADNc utilizando métodos conocidos, que se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell 2001 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NJ. Las genotecas pueden prepararse, por ejemplo, utilizando bacterias o bacteriófagos como organismos receptores. Además, las genotecas podrían estar en forma de datos de secuencia almacenados electrónicamente en medios adecuados, especialmente si dichos datos se produjeran mediante las técnicas conocidas como Secuenciación de Próxima Generación sin clonación molecular de moléculas de ácido nucleico. Como sondas para el rastreo pueden emplearse, en particular, secuencias de nucleótidos correspondientes a la cadena complementaria de SEQ ID N° 3 o SEQ ID N° 4, o de fragmentos de estas secuencias. Las secuencias de estas sondas pueden variar dentro del alcance de la degeneración del código genético, y también pueden contener nucleósidos tales como inosina, que no se producen de forma natural en los ácidos nucleicos que codifican proteínas, con el fin de potenciar la capacidad de los enlaces hidrógeno.

El rastreo también puede efectuarse utilizando anticuerpos generados contra polipéptidos correspondientes a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o fragmentos de estas secuencias.

Debido a su tamaño comparativamente pequeño, los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse por métodos de síntesis química de péptidos (Ejemplo 1). Esto puede implicar el uso de métodos conocidos en fase sólida, por ejemplo, de acuerdo con B. Merrifield. La síntesis puede efectuarse manualmente o con la ayuda de un sintetizador de péptidos automatizado utilizando una estrategia de grupo protector Fmoc o Boc. Es posible sintetizar los polipéptidos en fragmentos más pequeños, que posteriormente se enlazan entre sí.

La preparación de los polipéptidos de acuerdo con la invención también puede efectuarse mediante la expresión heteróloga de construcciones de ácidos nucleicos adecuadas en diferentes organismos receptores y células receptoras. Los métodos requeridos de ingeniería genética se describen en Sambrook y Russell 2001 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NJ. Se pueden emplear sistemas procarióticos (por ejemplo, *Escherichia coli* o *Pseudomonas fluorescens*) o sistemas eucarióticos (por ejemplo, células de

insectos, células vegetales o células de mamíferos).

En una realización preferida de la invención, la preparación se efectúa en *E. coli* como un polipéptido de fusión con tiorredoxina y una secuencia de hexahistidina, en donde se proporciona una secuencia de reconocimiento de proteasa específica para la escisión del polipéptido de acuerdo con la invención (Ejemplos 2, 3 y 4).

- 5 Los polipéptidos de acuerdo con la invención, obtenidos mediante expresión heteróloga, pueden purificarse a partir de lisados celulares o sobrenadantes de los organismos o células modificados genéticamente mediante un cierto número de métodos conocidos. Métodos particularmente adecuados incluyen cromatografía de afinidad de iones de metales inmovilizados, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa (Ejemplo 3).

Ejemplo 1:

- 10 Preparación sintética del polipéptido LserFCP1-77.

El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID N° 1 se preparó completamente mediante síntesis en fase sólida sobre una resina de soporte polimérica. Un análisis del producto por cromatografía de fase inversa (columna: Alltech Alltima C18 4.6 x 250 mm, Fischer Scientific) con un gradiente de metanol ascendente en agua proporcionó un pico esencialmente homogéneo, de modo que se podría suponer una pureza de al menos 80% (Figura 1). Durante el análisis ulterior mediante espectrometría de masas de ionización por electroproyección (ESI-MS), se observó un ion de molécula dominante en m/z 746,50, que corresponde a la molécula diana protonada once veces (Figura 1).

Ejemplo 2:

Construcción de plásmidos para la preparación recombinante de LserFCP1-77 y LserFCP1-73 en *Escherichia coli*.

- 20 Para la expresión heteróloga en *E. coli* se preparó un gen sintético que codifica la secuencia del polipéptido LserFCP1-77 (SEQ ID N° 1). El uso del codón se adaptó al del organismo receptor *E. coli* K12. La síntesis de genes fue realizada por la compañía Eurofins MWG Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania) por contrato. Secuencias adicionales que permiten la inserción en el vector pASK-IBA33plus se añadieron a la secuencia codificante en los extremos 5' y 3'. Por lo tanto, el polinucleótido completo preparado sintéticamente tenía la secuencia que se muestra en la SEQ ID N° 4. El gen sintético se insertó en el vector pASK-IBA33plus de forma orientada utilizando dos sitios de escisión de endonucleasas de restricción BsaI. La construcción, así obtenida, se utilizó para la transformación de células de *E. coli* de las cepas TOP10 y BL21.

En experimentos adicionales que proceden de la construcción basada en pASK-IBA33plus, el gen sintético se volvió a clonar en el vector pET-32a(+). La re-clonación se realizó para obtener un plásmido que codifica un polipéptido de fusión que consiste en tiorredoxina, una secuencia de hexahistidina, una secuencia de reconocimiento de proteasa y el polipéptido LserFCP1-77. Se prepararon dos variantes de este plásmido; en una, la secuencia de reconocimiento codificada era específica para la enteroquinasa, y en la otra, para el factor de coagulación Xa. Por consiguiente, los plásmidos se designaron como pET-32-FCP-EK y pET-32-FCP-Xa.

Para la construcción de estos plásmidos, el gen sintético se amplificó por PCR, en donde las secuencias adicionales requeridas para la inserción en el nuevo vector se añadieron con los cebadores. pET-32-FCP-EK se construyó utilizando el cebador directo 1 que consiste en un sitio de restricción KpnI, una secuencia de enlace, una secuencia que codifica la secuencia de reconocimiento de enteroquinasa y una secuencia específica que codifica los primeros residuos de aminoácidos del polipéptido LserFCP1-77. pET-32-FCP-Xa se construyó utilizando el cebador directo 2 que consiste en un sitio de restricción KpnI, una secuencia de enlace, una secuencia que codifica la secuencia de reconocimiento del factor Xa y una secuencia específica que codifica los primeros residuos de aminoácidos del polipéptido LserFCP1-77. Para ambas construcciones, se utilizó el cebador inverso 3 que consiste en un sitio de restricción EcoRI, un codón de parada y una secuencia específica que codifica los últimos residuos de aminoácidos del polipéptido LserFCP1-77.

Cebador 1 (directo):

- 45 5'-tgagggtaccgacgacgacgacaagcagcatggctatggagcgg-3'

Cebador 2 (directo):

5'-tgagggtaccggtgggtggctccggtattgagggtegccageatggctatggagcgg-3'

Cebador 3 (reverso):

5'-tcagaattettaatacccgtgegattttag-3'

- 50 Los productos de la PCR se insertaron a través de los sitios de restricción KpnI y EcoRI en el vector pET-32a(+), y las construcciones obtenidas se utilizaron para la transformación de células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) (Novagen/Merck). La identificación de las células transformadas se efectuó por selección en medio nutriente que

contiene ampicilina. En su ADN genómico, la cepa de *E. coli* empleada contiene un fago lambda lisogénico en el que un gen que codifica la ARN polimerasa T7 está bajo el control de un promotor lacUV5. La expresión del gen de la ARN polimerasa T7 y, por lo tanto, la expresión del gen extraño que está bajo el control de un promotor T7 en el plásmido de expresión se induce mediante la adición de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG). La formación del polipéptido de fusión correspondiente en diferentes momentos después de la inducción se detectó mediante SDS-PAGE, seguido de tinción con azul Coomassie (Figura 2).

Ejemplo 3:

Producción del polipéptido recombinante LserFCP1-77 en *Escherichia coli*

Se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) (Novagen/Merck) con el plásmido pET-32-FCP-Xa construido tal como se describe en el Ejemplo 2, y se cultivaron en seis matraces Erlenmeyer de un litro con deflectores, cada uno de los cuales contenía 400 ml de medio LB complementado con 300 mg/l de ampicilina, a 37 °C con agitación a 250 rpm. Después de alcanzar un valor de absorción de 0,4 a 600 nm, según se observa por la medición de la turbidez, la inducción se efectuó mediante la adición de IPTG 1 mM. Después de continuar el cultivo durante 3 horas, las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación (10.000 x g, 10 min, 4 °C). El sedimento se resuspendió en 200 ml de tampón A (NaCl 100 mM, Tris 30 mM, pH 7,5) y las células se lisaron mediante fuerzas de cizallamiento en un homogeneizador de alta presión (Microfluidizer M110PS, Microfluidics, 30 Ossipee Road, Newton, MA 02464 EE.UU.). Después de la centrifugación (70.000 x g, 30 min, 4 °C), el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 mm. El lisado celular se cargó a un caudal de 4 ml/min en una columna cromatográfica de afinidad de iones de metales inmovilizados cargada con iones Co²⁺ (16 x 100 mm, TALON Superflow Resin, Clontech Laboratories, 1290 Terra Bella Avenue, Mountain View, CA 94043, EE.UU.). La columna se había equilibrado previamente con el tampón A. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con el tampón A hasta que la detección a 280 nm proporcionó un valor constante. La elución se efectuó con un gradiente escalonado de imidazol de 30 mM a 100 mM en tampón A. La cantidad principal del polipéptido de fusión se eluyó con la etapa de imidazol 100 mM. Un análisis por SDS PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie, proporcionó una pureza de más del 90% (Figura 3).

El polipéptido de fusión se reforzó mediante cromatografía de permeación en gel (HiPrep Desalting Column 26/10, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) en NaCl 10 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se incubaron diez microgramos del polipéptido de fusión con 500 unidades de factor Xa (Merck) en 10 ml de tampón de escisión (Tris-HCl 100 mM, NaCl 20 mM, pH 7,5) durante 16 h a temperatura ambiente. El producto de reacción se cargó a un caudal de 1 ml/min en una columna de intercambio iónico fuerte (MonoQ 5/50 GL, GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 8, y la columna se lavó con el mismo tampón. La elución se efectuó con un gradiente de 0 a 300 mM de NaCl a lo largo de 20 minutos. Un análisis por SDS PAGE demostró que el polipéptido LserFCP1-77, que se obtuvo como un producto de escisión y se eluyó a los 11 min, se separó completamente de los componentes polipeptídicos restantes (Figura 4). El pico correspondiente en el cromatograma era visible solo mediante detección por absorción UV, pero no por medición de fluorescencia. Esto puede explicarse por la ausencia de residuos de triptófano en la secuencia de aminoácidos del polipéptido LserFCP1-77. En un análisis SDS PAGE, LserFCP1-77 mostró una masa molecular aparente de 30 kDa en lugar de los 8,2 kDa esperados. Este comportamiento electroforético atípico posiblemente se explica por la unión ineficaz de las moléculas de SDS al polipéptido. La identidad del polipéptido se verificó mediante cromatografía de fase inversa (columna: BioBasic 8, 2 x 150 mm, Dionex; gradiente: 10-80% de acetonitrilo en agua con ácido fórmico al 0,1%) con inyección directa en un espectrómetro de masas ESI (amaZon ETD, Bruker Daltonik, Fahrenheitstr. 4, D-28359 Bremen). El ion molecular predominante observado en m/z 684 correspondió a la molécula diana protonada doce veces (Figura 5).

Ejemplo 4:

Producción del polipéptido recombinante LserFCP1-73 en *Escherichia coli*

Se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) (Novagen/Merck) con el plásmido pET-32-FCP-EK construido tal como se describe en el Ejemplo 2. El cultivo de las células y el procesamiento del lisado celular se realizaron mediante analogía con las operaciones descritas en el Ejemplo 3, excepto que se emplearon 0,1 unidades de enteroquinasa (Novagen) para escindir el polipéptido de fusión. También en este caso fue posible separar la molécula diana mediante cromatografía de intercambio aniónico (Figura 6). Sin embargo, el análisis espectrométrico de masas (micrOTOF II, Bruker Daltonik, Fahrenheitstr. 4, D-28359 Bremen) demostró que no se había formado el polipéptido esperado LserFCP1-77 (Figura 6). Los datos demostraron claramente que el polipéptido que se había formado era LserFCP1-73 con una masa molecular de 7755 Da. Esto se ha de explicar por el hecho de que los cuatro últimos residuos de aminoácidos de la secuencia de LserFCP1-77 se habían separado por escisión, aparentemente mediante una actividad no característica de la enteroquinasa.

Ejemplo 5:

Determinación de la actividad de LserFCP1-77 contra *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum (cepa IFA 65)

Fuente de suministro: Departamento Interuniversitario de Biotecnología Agrícola de Tulln, Austria.

- 5 Referencia: Steiner B, Kurz H, Lemmens M, Buerstmayr H. Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor Appl Genet.* febrero de 2009; 118(4): 753-64.

10 *Fusarium graminearum* se cultivó en placas de agar SNA a temperatura ambiente hasta la esporulación. Las esporas se separaron por barrido de la placa con agua, se ajustaron a una densidad de 20,000 esporas/ml y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. Para realizar los ensayos, se combinaron 0,05 ml de cada una de las suspensiones de esporas con 0,05 ml de cada una de las soluciones de LserFCP1-77 de diferente concentración en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de la incubación durante 24 h a temperatura ambiente, las esporas se examinaron microscópicamente para determinar la germinación utilizando lentes de objetivo con 4 aumentos y 10 aumentos. El resultado fue documentado fotográficamente (Figura 7). Se contó la
15 proporción de esporas germinadas y no germinadas, y los datos obtenidos se utilizaron para la representación gráfica de la relación dosis-efecto (Figura 8). La concentración así establecida en la que se produjo una inhibición media máxima fue de 1.6 µM. Además, la longitud de las hifas formadas por las espumas germinadas se observó como una medida semicuantitativa de la inhibición (Figura 7).

Ejemplo 6:

- 20 Determinación de la actividad de LserFCP1-73 contra *Fusarium graminearum*

La efectividad de LserFCP1-73 a una concentración de 100 µM se determinó en comparación con un control de agua mediante el sistema de ensayo descrito en el Ejemplo 5. Se observó una inhibición completa de la germinación de esporas por LserFCP1-73 (Figura 9).

Ejemplo 7:

- 25 Determinación de la actividad de LserFCP1-77 contra *Phytophthora parasitica*

Phytophthora parasitica (aislado 329)

30 Fuente de suministro: INRA (institut national de la recherche agronomique), Francia Referencia: Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricci P. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell.* febrero de 1999; 11(2): 223-35.

35 Se cultivó *Phytophthora parasitica* en placas de agar Rye B durante 8 días a 25 °C. Los esporangios se lavaron con agua y la suspensión de esporangios obtenida se incubó durante 4 h a 4 °C para inducir la formación de zoosporas. Después de una dilución 1:50 en medio RPMI 1640, se determinó la densidad de las esporas y se ajustó a 20.000 esporas/ml. El comportamiento adicional del ensayo se realizó utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 5. El resultado también se documentó fotográficamente (Figura 10).

Listados de Secuencias

Los aminoácidos se abreviaron según la nomenclatura IU PAC de la siguiente manera: alanina A, arginina R, asparagina N, ácido aspártico E, cisteína C, ácido glutámico D, glutamina Q, glicina G, histidina H, isoleucina I, leucina L, lisina K, metionina M, fenilalanina F, prolina P, serina S, treonina T, triptófano W, tirosina Y, valina V

- 40 SEQ ID NO: 1 - LserFCP1-77

**QHGYGAGGGHQQGYGSQHSSHAPQGGHVREQGFSGHVHEQQAGHHHEAGHHEQAGHHEQSG
QQVHGQGHGYKSHGY**

- SEQ ID NO: 2 - LserFCP1-73

**QHGYGAGGGHQQGYGSQHSSHAPQGGHVREQGFSGHVHEQQAGHHHEAGHHEQAGHHEQSG
QQVHGQGHGYK**

- SEQ ID NO: 3 – *ADNc* de *L. sericata* que codifica LserFCP1-77

45 **5' -CAACACGGCTATGGTGCCGGTGGCCATGGCCAACAAGGCTATGGTAGCCAACATAGCAG
TCATGCTCCCCAAGGTGGACATGTTGTCCGTGAACAAGGTTTTAGTGGTCATGTTTCATGAAC**

ES 2 693 036 T3

**AACAGGCTGGGCATCATCATGAAGCTGGCCATCATGAGCAAGCTGGTCATCATGAACAATCT
GGTCAACAAGTTCATGGTCAAGGTCATGGCTATAAAAAGTCATGGTTAT-3'**

SEQ ID NO: 4 - gen sintético con uso del codón adaptado a *E. coli* que codifica LserFCP1-77

Los segmentos de secuencia no codificantes añadidos para la clonación se imprimen en caracteres oblicuos.

**5' -ATGGTAGGTCTCAAATG CAG CAT GGC TAT GGA GCG GGT GGA CAT GGC
CAG CAG GGT TAC GGC TCT CAG CAC AGC AGT CAT GCT CCG CAA GGT
GGC CAT GTC GTT CGC GAA CAG GGC TTT TCC GGT CAC GTA CAC GAG
CAG CAA GCA GGC CAT CAC CAT GAA GCC GGC CAT CAC GAA CAA GCG
GGT CAC CAT GAG GAG TCA GGG CAG CAA GTG CAT GGG CAA GGT CAT
GGC TAC AAA TCG CAC GGG TAT TAAAGCGCTGAGACCTACCAT -3'**

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a al menos 12 residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2, en donde le polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que conduce a una inhibición semi-máxima de la geminación de las esporas de *Fusarium graminearum* a una concentración de 1 a 1000 µM, especialmente 2 µM.
3. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2, que es eficaz contra el crecimiento de organismos de los géneros *Fusarium graminearum* y/o *Phytophthora*.
- 10 4. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el N terminal se derivatiza mediante alquilación parcial o completa, o mediante acilación.
5. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el O terminal se derivatiza mediante amidación o esterificación.
6. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cadena polipeptídica se derivatiza mediante PEGilación o HESilación.
- 15 7. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene la siguiente secuencia:

Z₁-QHGYGAGGGHGQQGYGSQHSSHAPQGGHVVREQGFSGHVHEQQAGHHHEAGHHEQAGHHEQ
SGQQVHGQGHGYK-Z₂,

en que
Z₁ es el extremo N-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo amino terminal del polipéptido, o una cadena de hasta diez aminoácidos arbitrarios;
- 20 Z₂ es el extremo C-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo carboxi terminal del polipéptido, o una cadena de hasta diez aminoácidos amino arbitrarios.
8. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde Z₂ tiene una secuencia de aminoácidos de SHGY-Z₃, en donde Z₃ es el extremo C-terminal del polipéptido, o un derivado del grupo carboxi terminal del polipéptido, o una cadena de hasta seis aminoácidos arbitrarios.
- 25 9. El polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el polipéptido tiene D-aminoácidos en parte o completamente, o tiene una estructura peptídica D-retro-inversa.
10. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9.
11. Uso del polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido y que tiene una secuencia que se hibrida en condiciones de rigurosidad utilizando 0.2xSSC a 42 °C para el lavado con una sonda de oligonucleótidos o polinucleótidos seleccionada del grupo:
la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 1 a 231 de SEQ ID N° 3;
la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 1 a 102 de SEQ ID N° 3;
la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 103 a 331 de SEQ ID N° 3;
la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 18 a 251 de SEQ ID N° 4;
- 35 la cadena complementaria a los residuos de nucleótidos 18 a 119 de SEQ ID N° 4;
la cadena complementaria a los residuos de nucleótido 120 a 251 de SEQ ID N° 4,
para controlar hongos, especialmente hongos que provocan enfermedades en las plantas, organismos de los géneros *Fusarium graminearum* y/o *Phytophthora*, organismos de la clase Peronosporomycetes.
12. Un procedimiento para preparar un polipéptido de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 13. Una célula, a excepción de células de tipo salvaje de *Lucilia sericata*, que contienen un ácido nucleico para la expresión de un polipéptido con las SEQ ID N°s 1 o 2.
14. Un cultivo transgénico que contiene una célula de acuerdo con la reivindicación 13.

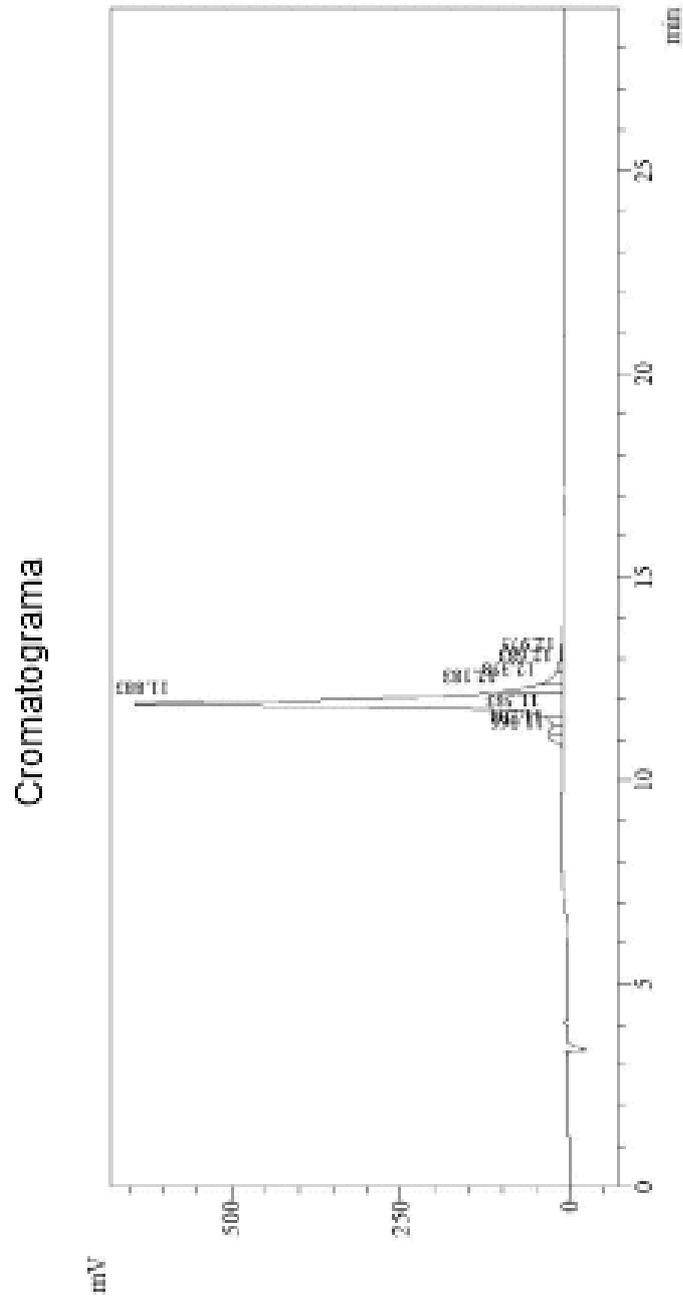


Fig.1

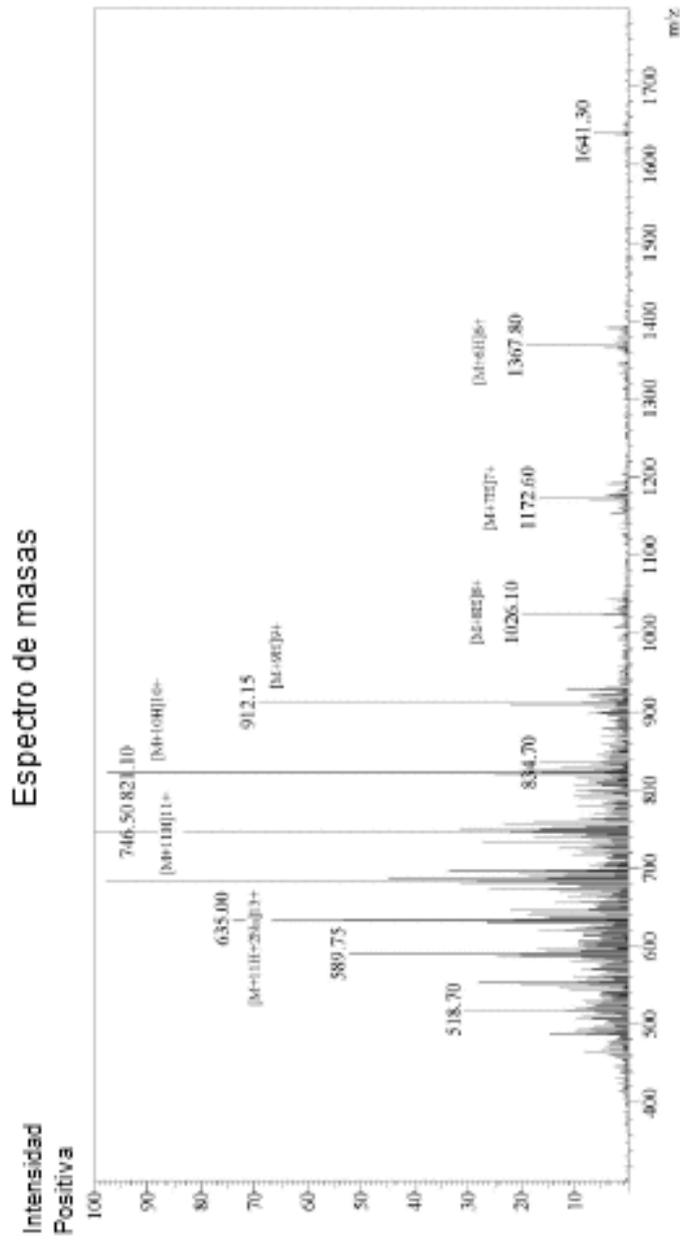


Fig.1
(continúa)

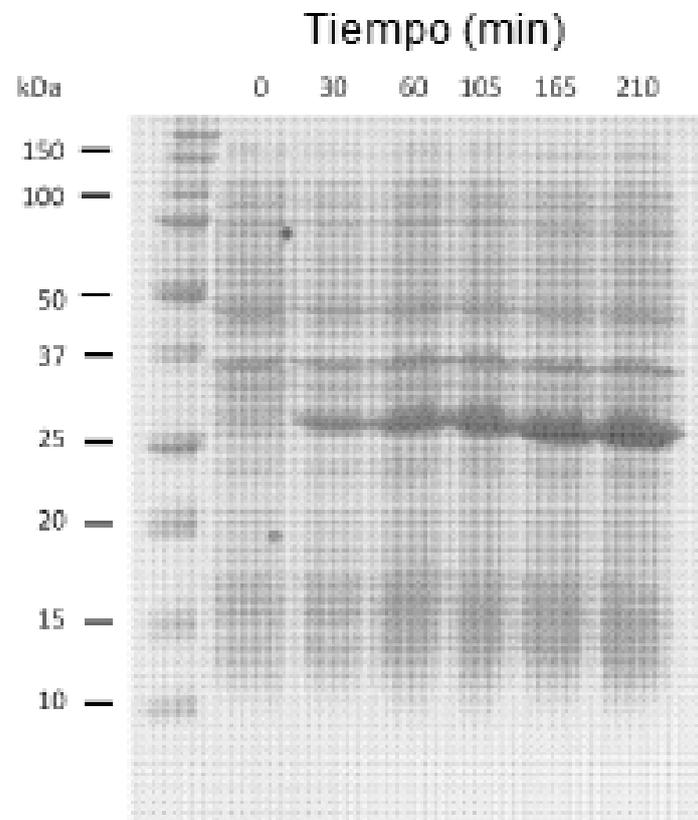


Fig.2

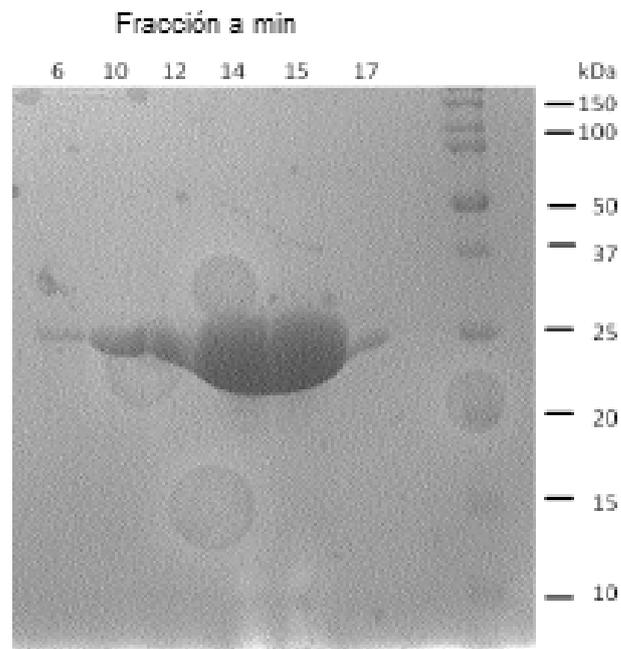
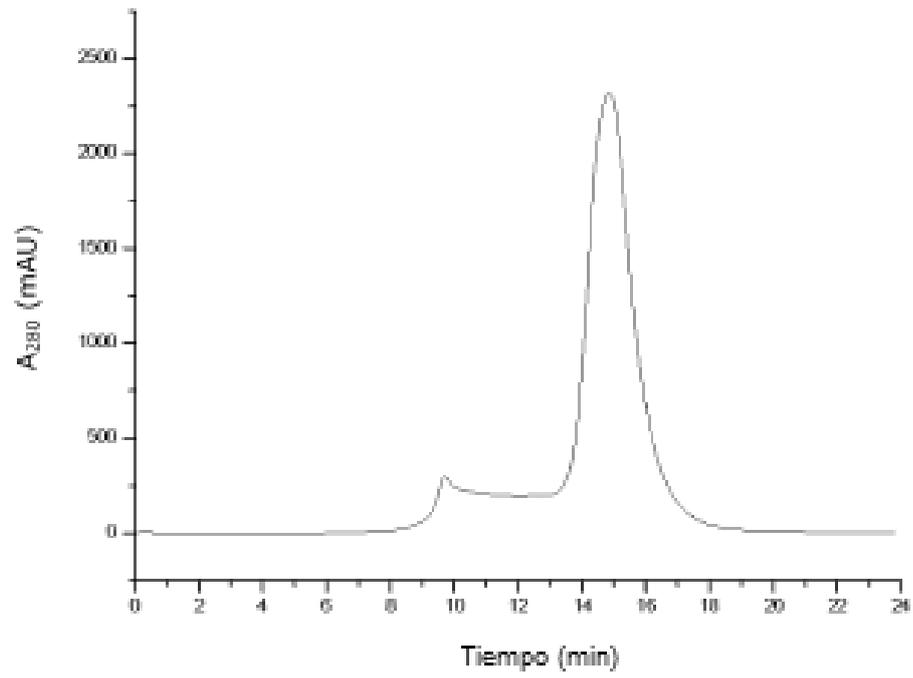


Fig.3

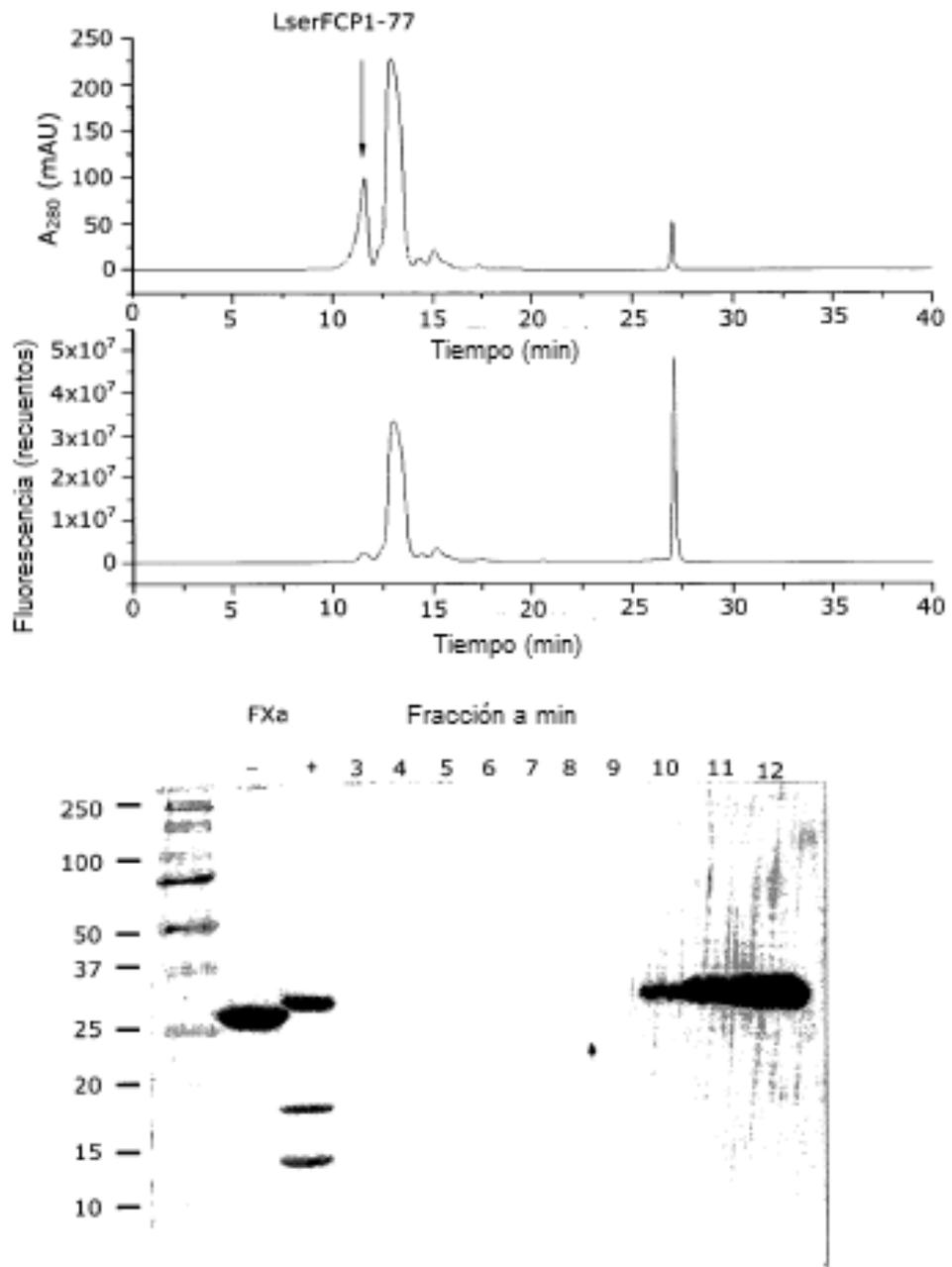


Fig.4

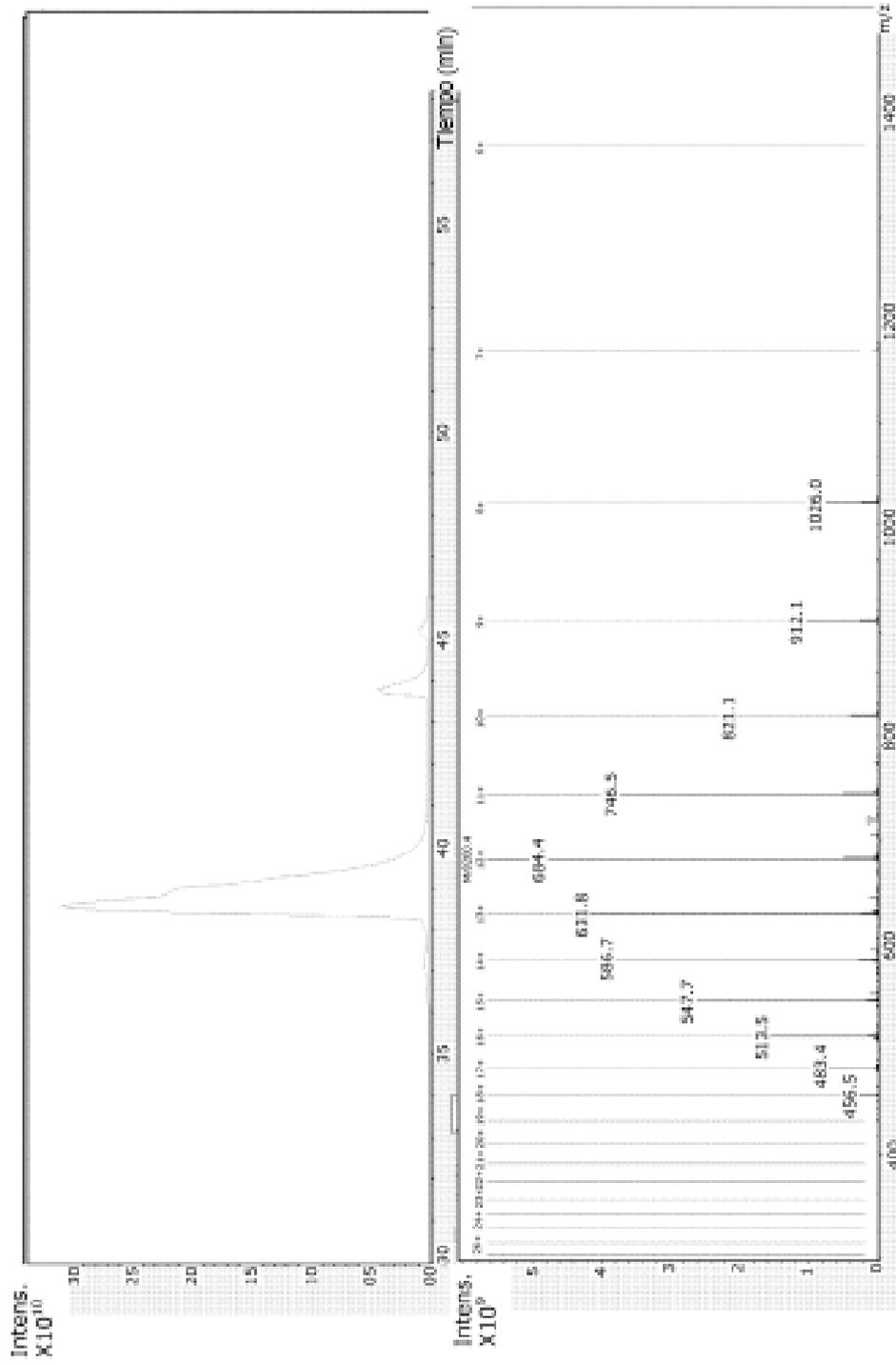


Fig.5

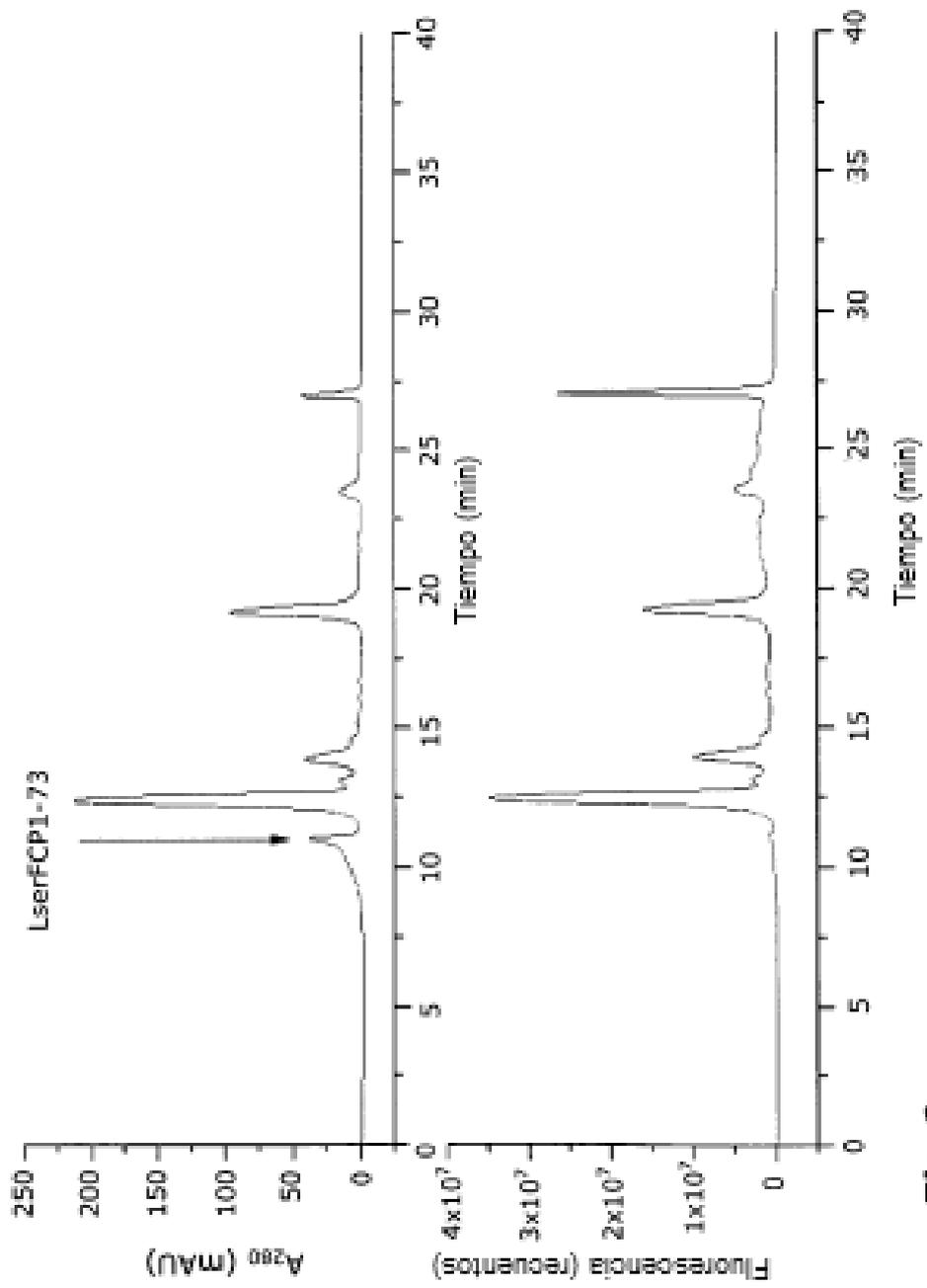


Fig.6

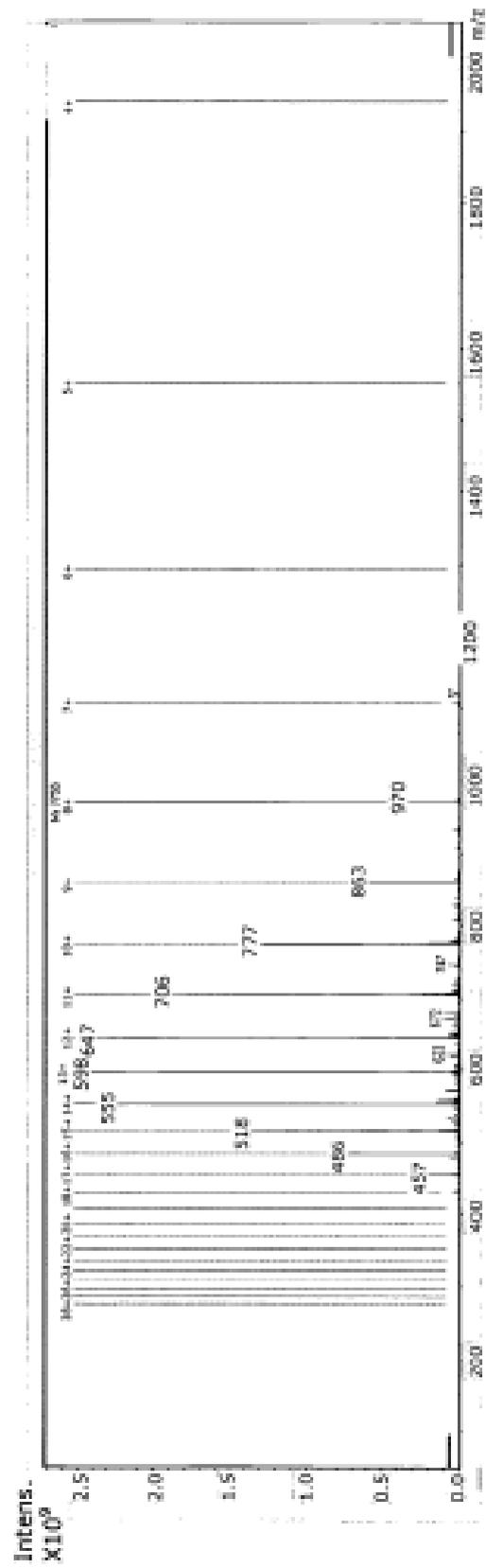


Fig.6
(continúa)

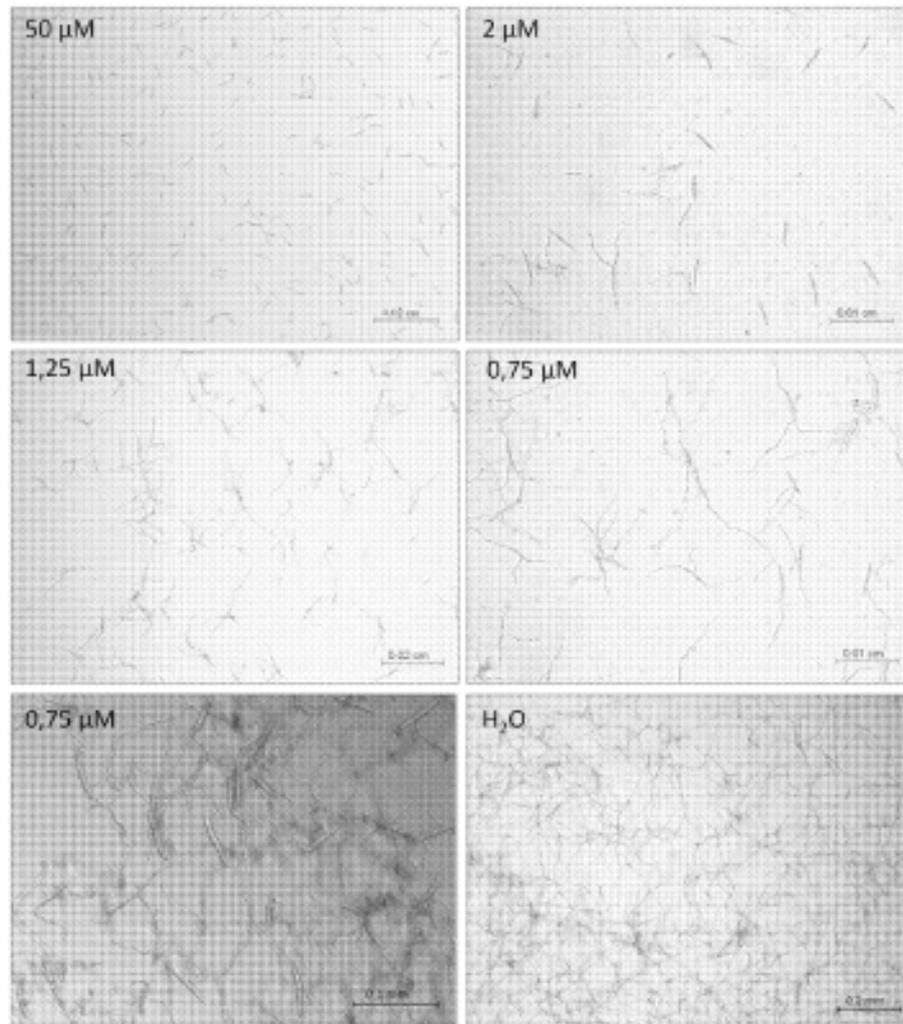


Fig.7

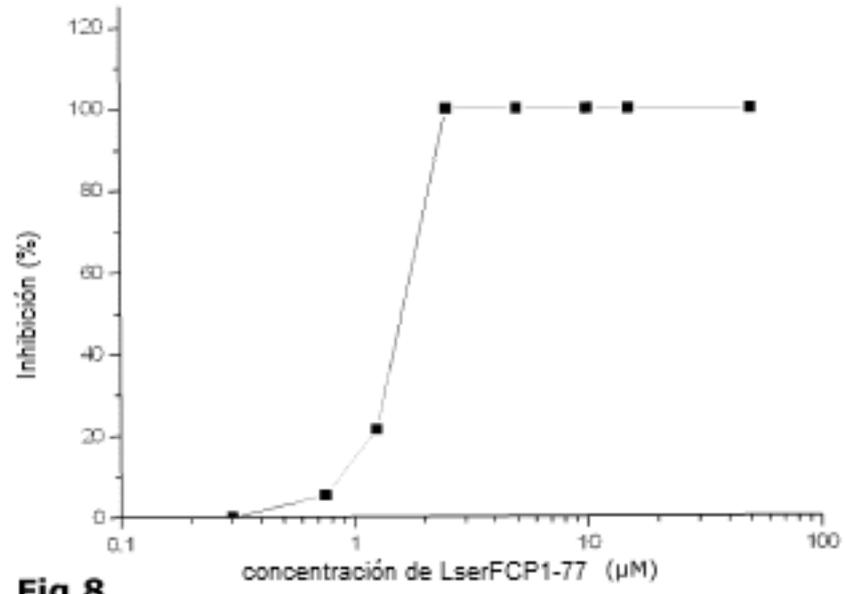


Fig.8

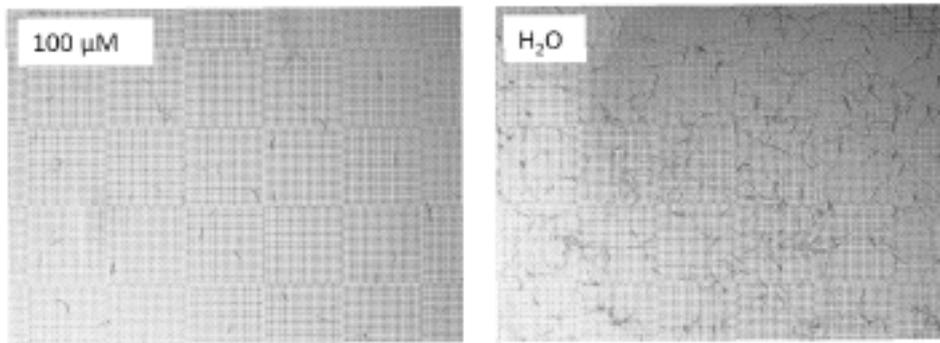


Fig.9

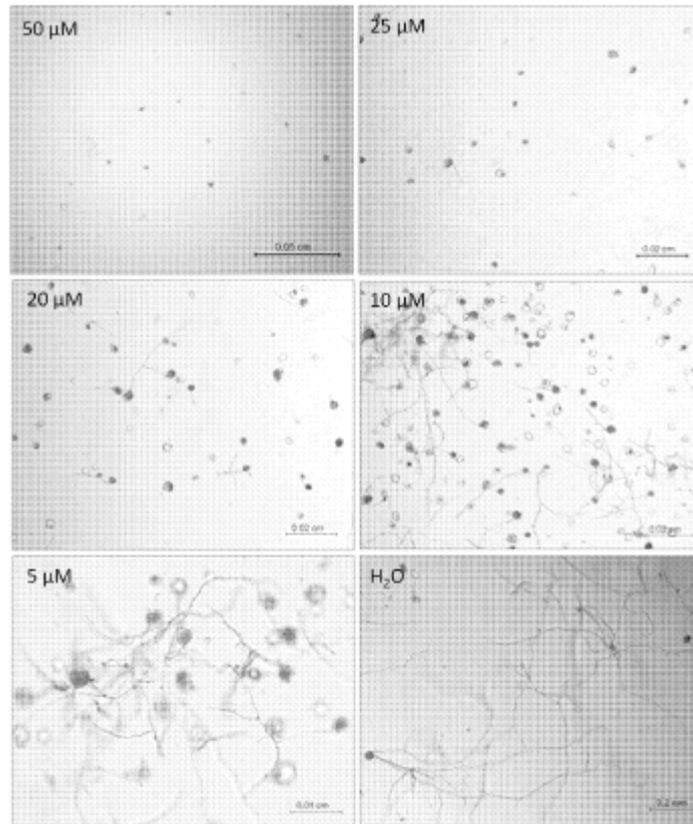


Fig.10