

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 496**

21 Número de solicitud: 201830546

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/385 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.06.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.12.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**MANZANARES MIR, Paloma;
GARRIGUES CUBELLS, Sandra;
GANDÍA GÓMEZ, Mónica y
MARCOS LÓPEZ, José F.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PROTEÍNA ANTIFÚNGICA Y USOS DE LA MISMA**

57 Resumen:

Proteína antifúngica y usos de la misma.
La presente invención se refiere al uso de una proteína de origen fúngico denominada AfpA y/o a composiciones que comprenden dicha proteína, en el control de agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha. De la misma manera, la presente invención también se refiere al método de obtención de dicha proteína. Alternativamente, la proteína AfpA de la invención y composiciones que la comprenden, son también útiles en el ámbito biosanitario, específicamente para su uso como medicamento y más específicamente como medicamento para el tratamiento de patologías causadas por hongos.

ES 2 734 496 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína antifúngica y usos de la misma

5 La presente invención se engloba en el sector agroalimentario y biosanitario. Específicamente se refiere al uso de una proteína de origen fúngico denominada AfpA y/o de composiciones que comprenden dicha proteína, en el control de hongos patógenos, preferiblemente hongos patógenos de humanos, fitopatógenos y patógenos de frutos y verduras en post-cosecha. De la misma manera, la presente
10 invención también se refiere al método de obtención de dicha proteína.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los patógenos de origen fúngico representan una gran amenaza para la agricultura, la seguridad alimentaria y la salud pública. La importancia de las infecciones fúngicas sobre el ser humano ha ido en aumento debido fundamentalmente al incremento de pacientes inmunodeprimidos y a la aparición de nuevas cepas patógenas, llegando ya a causar una mortalidad significativa en nuestros días. Además, los hongos son los principales patógenos de especies vegetales cultivadas y, en los alimentos, las
20 micotoxinas producidas por determinados hongos pueden provocar serias consecuencias para la salud. Por estas razones, el mercado global de fungicidas y medicamentos antifúngicos se encuentra en continuo crecimiento, aunque en los últimos años se han introducido muy pocas moléculas antifúngicas tanto en clínica como en protección vegetal. Un problema grave de los compuestos antifúngicos es el
25 aumento de las resistencias a los mismos, lo que reduce alarmantemente su efectividad.

En la actualidad, el uso de fungicidas químicos es el principal método empleado para proteger los cultivos frente a las infecciones causadas por hongos. Sin embargo, la
30 aplicación de estos compuestos químicos en la agricultura presenta serias desventajas, como son su actividad inespecífica frente a otros microorganismos no perjudiciales, la aparición de cepas resistentes o sus efectos negativos para el medioambiente o la salud humana, que pueden abarcar desde simples irritaciones cutáneas hasta daños en el sistema reproductivo y posible carcinogenicidad. Estos
35 problemas han impulsado el estudio y la búsqueda de nuevas alternativas para el

control de las enfermedades causadas por hongos que presenten una mayor especificidad y escasos o nulos efectos para la salud de los consumidores, agricultores y para el medio ambiente sin que afecten a la calidad final de los productos.

5 Las proteínas antifúngicas (*Anti-Fungal Proteins*, AFPs) secretadas por hongos filamentosos son consideradas como candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevas moléculas y terapias antifúngicas. Las AFPs son proteínas pequeñas, catiónicas, muy estables, ricas en cisteínas (*Cysteine-Rich Proteins*, CRPs) y con una estructura compacta en láminas β estabilizada por la formación de hasta cuatro puentes disulfuro. Las AFPs son producidas y secretadas en grandes cantidades al medio de cultivo por hongos filamentosos ascomicetos, y exhiben una alta actividad antifúngica en el rango micromolar. La primera AFP identificada fue la producida por *Aspergillus giganteus* (AgAFP) (Nakaya, K., et al. Eur. J. Biochem., 1990; 193: 31-38). Otra proteína bien caracterizada es la proteína PAF de *Penicillium chrysogenum*, que se secreta y produce en grandes cantidades en el medio de cultivo (hasta 80 mg/L) (Marx, F., et al. Gene, 1995; 167: 167-171).

Ambas proteínas, AgAFP y PAF, inhiben el crecimiento de hongos filamentosos, incluyendo patógenos humanos y vegetales, sin afectar a levaduras, bacterias y células vegetales o de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Moreno, A.B., et al., Appl. Microbiol. Biotech. 2006, 72: 883-895; Hegedüs, N. y Marx, F. Fungal Biol. Rev. 2013, 26: 132-145). También destaca como proteína candidata para el control de hongos patógenos la proteína AfpB procedente del hongo *Penicillium digitatum*, cuya potencia antifúngica es incluso mayor, frente a diferentes hongos fitopatógenos, que la actividad antifúngica de la proteína PAF (Garrigues, S., et al. Sci Rep. 2017, 7: 14663).

En el genoma de hongos filamentosos se encuentran entre 1 y 3 genes que codifican proteínas con homología de secuencia con AFPs, y que han sido anotadas como “antifungal proteins” (Garrigues, S., et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016, 100: 2243). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos no se han podido ni detectar, ni identificar, ni producir las correspondientes proteínas antifúngicas. Sigue existiendo, en el estado de la técnica, la necesidad de producir de forma efectiva nuevas y más potentes AFPs para combatir enfermedades que padecen las frutas y verduras tras su cosecha, así como durante su almacenamiento y transporte, y a su vez que también sean efectivas en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos patógenos

humanos. El tratamiento de patologías humanas provocadas por hongos, así como el tratamiento de las frutas y verduras con dichas proteínas permitirá una mayor eficacia en el tratamiento de dichas patologías en humanos, además de permitir el almacenamiento de las mismas durante un periodo de tiempo más largo, permitiendo además el transforme de la fruta o verdura cosechada a largas distancias.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una solución a la demanda existente de nuevos compuestos antifúngicos útiles para el control biológico de agentes patógenos de frutas y/o verduras en post-cosecha, y agentes patógenos humanos. En este sentido, la presente invención se refiere a la purificación y caracterización de una nueva proteína de origen fúngico que presenta actividad antifúngica. Dicha proteína pertenece a la familia de proteínas denominadas AFPs, específicamente se denomina AfpA, de aquí en adelante proteína antifúngica de la invención, y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la proteína antifúngica AfpA comprende la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente aún, la proteína antifúngica AfpA consiste en la SEQ ID NO: 1. El hongo productor de la proteína de la invención pertenece al género *Penicillium*, preferiblemente a la especie *P. expansum*, y más preferiblemente aún, es la cepa *P. expansum* CECT 20906.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende dicha proteína AfpA de la invención (de aquí en adelante composición de la invención), donde opcionalmente, dicha composición puede comprender además excipientes, aditivos y/u otros principios activos adicionales.

Así otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la proteína fúngica AfpA (de aquí en adelante, proteína de la invención), específicamente la proteína AfpA que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 1 como antifúngico. Más preferiblemente, dicho uso de la proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1, o la composición de la invención que comprende dicha proteína AfpA de la invención, va dirigido al control biológico de

agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha y de agentes patógenos humanos, donde preferiblemente dichos agentes patógenos son hongos. En otra realización más preferida aún, la proteína antifúngica AfpA consiste en la SEQ ID NO: 1.

5

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención o a la composición que la comprende como agente de control biológico en alimentos y bebidas, capaz de evitar la contaminación fúngica de éstos.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el control biológico de agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de la invención o de la composición de la invención, a dichos frutos y/o verduras en post-cosecha.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de la proteína de la invención caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

(a) Cultivar un hongo de la especie *P. expansum* en medio mínimo de cultivo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicho hongo,

(b) Recoger el sobrenadante del cultivo de la etapa (a), y

20 (c) Purificar la proteína de la invención del sobrenadante de la etapa (b).

En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína AfpA de la invención o a una composición farmacéutica que la comprenda, para su uso como medicamento.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína AfpA de la invención o a una composición farmacéutica que la comprenda, para su uso como medicamento para el tratamiento de patologías inducidas por hongos.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad provocada por hongos en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o la composición farmacéutica de la invención, a dicho sujeto.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Producción y purificación de la proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1 a partir del sobrenadante del cultivo de *P. expansum* CECT 20906 crecido en Medio Mínimo (MM). Se muestran fotografías del análisis en contenido de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y tinción con azul Coomassie. **(A)** Contenido en proteínas del sobrenadante de cultivos de *P. expansum* CECT 20906 crecido en medio rico en nutrientes (PDB) o en medio mínimo (MM) durante 5, 7, y 10 días de cultivo (5d, 7d y 10d, respectivamente). **(B)** Contenido en proteínas de preparaciones puras de la proteína PAF de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 2) y de la proteína AfpA de *P. expansum* (SEQ ID NO: 1) junto con un marcador de proteínas de tamaño conocido como control. La proteína AfpA está identificada en los geles con un triángulo negro y la proteína PAF con un triángulo blanco.

FIG. 2. Curva dosis-respuesta para cuantificar el crecimiento *in vitro* del hongo patógeno de frutos *P. digitatum* como densidad óptica (OD) a 600 nm en presencia de concentraciones crecientes ($\mu\text{g/mL}$) de proteína AfpA (SEQ ID NO: 1).

FIG. 3. Curva dosis-respuesta para cuantificar el crecimiento *in vitro* de las levaduras patógenas de humanos *Candida albicans* (triángulos) y *Candida glabrata* (círculos) como densidad óptica (OD) a 600 nm en presencia de concentraciones crecientes ($\mu\text{g/mL}$) de proteína AfpA (SEQ ID NO: 1).

FIG. 4. (A) Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de las proteínas AfpA (SEQ ID NO: 1) y AfpB (SEQ ID NO: 3) frente a frutos infectados con *P. digitatum* a una dosis de inóculo de 10^4 conidios/mL analizada tras 4, 5, 6 y 7 días después de la inoculación (dpi: días post-inoculación). El grupo control no ha sido tratado con las proteínas antifúngicas. **(B)** Imágenes representativas de cada uno de los grupos y tratamientos tras 7 dpi.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Proteína antifúngica AfpA y composiciones que la comprenden

La proteína AfpA de la presente invención pertenece a la familia de proteínas AFPs, es secretada por el hongo *Penicillium expansum*, preferiblemente por la cepa *P. expansum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 20906.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína AfpA" se define por una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 1. El término "secuencia codificante de AfpA" se define como una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína AfpA de SEQ ID NO.:1, y que puede comprender diversas variantes procedentes de: a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1, b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a), c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético, d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 85%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1; en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína AfpA. Incluye, por tanto, diversas variantes de la proteína AfpA, esto es, proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína AfpA. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación. Dichas variantes son además funcionalmente equivalentes a la proteína AfpA de la invención.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga a la proteína AfpA " cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, y más preferiblemente de, al menos, un 99%. El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. El tanto

por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-
5 410 (1999).

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína AfpA o de una sus variantes.

10 La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades antifúngicas descritas en este documento. Dichas propiedades antifúngicas se pueden determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción.

15

Tal como se utiliza en esta descripción, el término control biológico se refiere al control de un agente, organismo o microorganismo patógeno de frutos y/o verduras en post-cosecha mediante el empleo de productos de origen biológico, preferiblemente AFPs, más preferiblemente la proteína AFP de la invención, o de una composición que
20 comprenda dicha proteína de la invención, siendo capaces de controlar dichos agentes, organismos o microorganismos patógenos de frutos y/o verduras, en post-cosecha y que pueden ser aplicados directa o indirectamente al fruto y/o verduras en post-cosecha. Alternativamente, a efectos de la presente invención, el término control biológico también se refiere al control de un agente, organismo o microorganismo
25 patógeno de alimentos en general, y bebidas, mediante el empleo de productos de origen biológico, preferiblemente AFPs, más preferiblemente la proteína AFP de la invención, o de una composición que comprenda dicha proteína de la invención, siendo capaz de controlar la contaminación preferiblemente fúngica, más preferiblemente de hongos filamentosos productores de micotoxinas, capaces de
30 contaminar frutos, vegetales, granos de cereales almacenados, zumos de frutas y derivados.

El término fruto o verdura en post-cosecha se refiere al fruto y/o verdura ya recogido.

35 La proteína AfpA de la invención puede combinarse o mezclarse con otros productos

que faciliten su vehiculación (en su caso) y/o que estabilicen y/o potencien su efecto, tales como otros principios activos.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición, en adelante composición de la invención, que comprende la proteína AfpA de la invención, opcionalmente junto con excipientes y/o vehículos aceptables.

10 A efectos de la presente invención, el término vehículo aceptable se refiere a una sustancia o combinación de sustancias que puede(n) ser utilizada(s) en el sector agrícola, farmacéutico, o alimentario, e incluye, por ejemplo, adyuvantes, sólidos o líquidos, diluyentes, disolventes, tensioactivos, etc. Dichos compuestos permiten una mejor aplicación de la proteína de la invención y/o alternativamente de los principios activos que la acompañan en las composiciones de la invención. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos
15 convencionales conocidos en el estado de la técnica.

Adicionalmente, las composiciones de la invención, pueden comprender, además, un excipiente, un diluyente, un adyuvante y/o un estabilizante, aceptables. Como entiende el experto en la materia, la proteína de la invención estará presente en la composición
20 de la invención en una cantidad agrícola o terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad tal que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de enfermedades causadas por hongos en frutos y verduras post-cosecha, alimentos y bebidas y en humanos. Dichos compuestos permiten una mejor aplicación de la proteína de la invención y/o alternativamente de
25 los principios activos que la acompañan en las composiciones de la invención, especialmente a frutas y verduras, alimentos y bebidas tratadas según la invención, y también a humanos.

La composición de la invención también puede contener, si se desea, uno o más
30 productos y/o principios activos que estabilicen y/o potencien su efecto. Alternativamente, dichos productos pueden ser una o más proteínas con diferentes actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes celulares fúngicas, tales como, una o más enzimas líticas capaces de modificar o degradar paredes celulares de hongos, por ejemplo, enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica, proteolítica, etc. En otra realización particular, la
35

composición de la invención comprende, además, uno o más fungicidas químicos. Como fungicida químico puede utilizarse cualquiera de los fungicidas químicos utilizados habitualmente, preferentemente un fungicida químico seleccionado del grupo formado por los fungicidas que afectan a la membrana, los fungicidas que afectan a la
5 síntesis de la pared celular y sus mezclas. Alternativamente, dichos principios activos se seleccionan de la lista que consiste en insecticidas, cebos, agentes esterilizantes, bactericidas, acaricidas, nematocidas, sustancias reguladoras del crecimiento, herbicidas, protectores, fertilizantes, etc.

10 Igualmente, la composición de la invención, cuando es una composición farmacéutica, puede comprender principios activos adicionales, que se seleccionaran por el experto en la materia en función de la patología que se desee tratar.

Asimismo, la composición de la invención puede contener conservantes y
15 estabilizantes que prolonguen la conservación y estabilidad de la misma. La composición de la invención puede contener una mezcla de dichos productos que estabilicen y/o potencien su efecto.

Tanto la proteína de la invención, como la composición de la invención pueden
20 presentarse en cualquier forma de presentación apropiada para su transporte, administración o aplicación, por ejemplo, en forma líquida o sólida, tal como en forma de un granulado. Las formas de presentación líquidas son adecuadas, por ejemplo, para su pulverización sobre el fruto y/o verdura en post-cosecha, o bien para crear un baño en el que se sumergen los frutos y/o verduras tras la cosecha. Estas
25 composiciones incluyen no solo composiciones que están listas para aplicarse mediante un dispositivo adecuado, tal como un dispositivo de pulverización o espolvoreado, sino también composiciones comerciales concentradas, que deben diluirse antes de aplicación a los frutos y/o verduras en post-cosecha.

30 Usos de la proteína AfpA de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere el uso de la proteína AfpA de la invención o de la composición que la comprende como antifúngico, preferiblemente en el control biológico de agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha.

35

En otro aspecto, la invención se refiere el uso de la proteína AfpA de la invención o de la composición que la comprende, en el control biológico de agentes patógenos de alimentos y bebidas, preferiblemente envasados y/o almacenados, para asegurar la seguridad alimentaria de los mismos.

5

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el control biológico de agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de la invención y/o de la composición de la invención.

10

A efectos de la presente invención, el término cantidad eficaz se refiere a la cantidad suficiente para obtener los resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento y protección, una cantidad eficaz es la cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de enfermedades causadas por patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha.

15

Las cantidades o dosis indicadas en la presente invención se dan como ejemplos ilustrativos del procedimiento según la invención. Un experto en la técnica sabrá cómo adaptar las dosis de aplicación, especialmente según la naturaleza de la fruta y/o verdura a tratarse. La dosis de la proteína de la invención utilizada habitualmente en el procedimiento de tratamiento según la invención es general y ventajosamente de entre 0.5 a 100 µg/mL, preferiblemente de entre 1 a 50 µg/mL, más preferiblemente de entre 1 a 10 µg/mL, dependiendo del tipo de composición a seleccionar para fines de aplicación específicos.

20

25

El tratamiento de la fruta y/o las verduras con la proteína y/o composición de la invención se lleva a cabo mediante procedimientos de tratamiento convencionales. En una realización particular, se llevan a cabo mediante, por ejemplo, pulverización, vaporización, atomización, diseminación, espolvoreado, espumado, inmersión del fruto y/o verdura tras la cosecha en un baño que contiene la composición o la proteína de la invención etc.

30

A efectos de la presente invención, los agentes, organismos o microorganismos patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha incluyen a cualquier agente,

35

organismo o microorganismo capaz de producir daño o infección en frutos y/o verduras en post-cosecha, por ejemplo, hongos, bacterias, virus, nematodos e insectos. En una realización más preferida, los agentes patógenos son hongos, en otra realización más preferida, los hongos son hongos fitopatógenos.

5

A efectos de la presente invención, los agentes patógenos, preferiblemente son hongos fitopatógenos que se seleccionan de la lista que consiste en: *Colletotrichum* spp., por ejemplo *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*; *Fusarium* spp., por ejemplo *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliformis*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloides*; *Magnaporthe* spp.; por ejemplo *Magnaporthe oryzae*; *Verticillium* spp., por ejemplo *Verticillium theobromae*; *Nigrospora* spp.; *Botrytis* spp., por ejemplo *Botrytis cinerea*; *Geotrichum* spp., por ejemplo *Geotrichum candidum*; *Phomopsis* spp., *Phomopsis natalensis*; *Diplodia* spp., por ejemplo *Diplodia citri*, *Diplodia natalensis*; *Alternaria* spp., por ejemplo *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*; *Monilinia* spp., por ejemplo *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*; *Venturia* spp., por ejemplo *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*; *Rhizopus* spp., por ejemplo *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*; *Ceratocystis* spp., por ejemplo *Ceratocystis paradoxa*; *Penicillium* spp., por ejemplo *Penicillium funiculosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*; *Penicillium claviforme* *Gloeosporium* spp., por ejemplo *Gloeosporium album*, *Gloeosporium perennans*, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium singulata*; *Thielaviopsis* spp., por ejemplo *Thielaviopsis paradoxy*, *Thielaviopsis basicola*; *Aspergillus* spp., por ejemplo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus parasiticus*; *Lasiodiplodia* spp., por ejemplo *Lasiodiplodia theobromae*; *Cladosporium* spp.; *Acremonium* spp.

10
15
20
25

Entre los frutos y verduras en post-cosecha susceptibles de ser tratados con la proteína o con las composiciones de la invención se incluyen frutos y verduras de interés agronómico tales como cereales, por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y similares; remolachas, por ejemplo, remolacha azucarera y remolacha forrajera; fruta de pepita, hueso y bayas, por ejemplo, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y zarzamoras; frutos leguminosos, por ejemplo judías, lentejas, guisantes, habas de soja; cucurbitáceas, por ejemplo calabazas, pepinillos, melones, pepinos, calabacines; frutas cítricas, por ejemplo naranja, limón, pomelo, mandarina; frutas tropicales, por ejemplo papaya,

30
35

maracuyá, mango, carambola, piña tropical, plátano; verduras, por ejemplo espinaca, lechuga, espárrago, brasicáceas tales como repollos y nabos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas, pimientos picantes y dulces; aguacate, canela, alcanfor; o maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, te, uvas y lúpulo. Esta lista no es limitativa sino
5 ilustrativa de frutos y/o verduras en post-cosecha potencialmente susceptibles de ser tratados con la proteína y composición de la invención.

Es particularmente preferido el tratamiento de frutos cítricos, en particular naranja, limón, pomelo, mandarina.

10

A efectos de la presente invención, los agentes, organismos o microorganismos patógenos de alimentos y/o bebidas, preferiblemente envasados y/o almacenados, incluyen a cualquier agente, organismo o microorganismo capaz de producir daño o infección en dichos alimentos y/o verduras que impiden la seguridad alimentaria de
15 dichos alimentos y/o bebidas, por ejemplo, hongos, bacterias, virus, nematodos e insectos. En una realización más preferida, los agentes patógenos son hongos.

A efectos de la presente invención, los agentes patógenos, preferiblemente hongos, que afectan a alimentos y/o bebidas se seleccionan de la lista que consiste en:
20 *Aspergillus spp.*, por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus carbonarius*, entre otros; *Fusarium spp.*, por ejemplo, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium moniliforme*, entre otros, *Penicillium spp.*, por ejemplo, *Penicillium expansum*, *Penicillium claviforme*, entre otros, *Gibberella spp.*, por ejemplo, *Gibberella moniliformis*, entre otros, y/o cualquier combinación de los mismos.

25

Por tanto, la proteína AfpA de la invención constituye una alternativa real al uso de pesticidas de origen químico con alta capacidad contaminante y efectos importantes sobre la salud, ya que la utilización de biopesticidas basados en la capacidad natural de organismos vivos conlleva menores riesgos para el medio ambiente y la salud de
30 los consumidores. Además, tal y como se observa en los ejemplos incluidos en el presente documento, la proteína AfpA de la invención es una proteína extremadamente activa frente a hongos patógenos de frutas en post-cosecha, respecto de otras proteínas de tipo AFP conocidas, mejorando sustancialmente los resultados conocidos hasta la fecha respecto del uso de otras proteínas antifúngicas
35 conocidas. Igualmente, dicha proteína es útil en seguridad alimentaria, siendo capaz

de inhibir la infección por hongos productores de micotoxinas tóxica por ejemplo en frutos, vegetales, granos de cereales almacenados, zumos de frutas y derivados. Por dicho motivo, la proteína AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1) también puede ser empleada para garantizar la seguridad alimentaria en consumo humano y animal.

5

Es evidente para cualquier experto en la materia que la proteína AfpA de la invención también sería útil como medicamento, preferiblemente en el tratamiento de patologías inducidas o provocadas por hongos.

10 Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a la proteína de la invención, o a la composición farmacéutica que la comprende, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la proteína de la invención, o a la composición farmacéutica que la comprende, para su uso como medicamento en el
15 tratamiento de patologías provocadas por hongos.

En este sentido, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de aquí en adelante, "composición farmacéutica de la invención", que comprende la proteína de la invención y excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, tal y como
20 se ha definido previamente.

El término composición farmacéutica incluye composiciones para su uso en sanidad humana o animal (composiciones veterinarias).

25 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, una sustancia activa o principio activo adicional.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía apropiada (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, intranasal, parenteral, transdérmica, tópica, etc.), para lo cual se utilizarán los excipientes y vehículos farmacéuticamente
30 aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica de administración elegida. Las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación son conocimiento general para el experto en la materia. A modo ilustrativo, no limitativo, la composición farmacéutica de la invención puede
35 encontrarse formando parte de una formulación en macropartículas, nanopartículas o

liposomas, y puede administrarse en una forma farmacéutica de administración sólida, en una forma farmacéutica de administración líquida, o en una forma farmacéutica de administración que comprende un sistema disperso. Más concretamente, la composición farmacéutica de la invención puede encontrarse en forma de soluciones
 5 inyectables, formas farmacéuticas adecuadas para su administración sublingual, polvos, gránulos, perlas, comprimidos, cápsulas, jarabes, emulsiones, supositorios, colinos, nebulizaciones, aerosoles, cremas, geles, etc. La pauta de dosificación de la composición de la invención será determinada por el médico y los factores clínicos. Como es muy conocido en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores
 10 que incluyen las características físicas del paciente (edad, estatura, peso, sexo), el procedimiento de administración usado, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular usado y las propiedades farmacocinéticas del individuo.

En otra realización preferida, las patologías en humanos y/o animales provocadas por hongos se seleccionan de la lista que consiste en: *Candida* spp., por ejemplo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida tropicalis*; *Arthroderma* spp., por ejemplo *Arthroderma otae*, *Arthroderma vanbreuseghemii*; *Trichophyton* spp., por ejemplo *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*; *Aspergillus* spp., por ejemplo
 20 *Aspergillus fumigatus*; *Gibberella* spp., por ejemplo, *Gibberella moniliformis*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad provocada por hongos en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a dicho sujeto de la proteína o la composición
 25 farmacéutica de la invención.

En la presente invención los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "individuo" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye pero no se limita a animales
 30 de granja y domésticos, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

A efectos de la presente invención el término "tratamiento" se refiere a una
 35 intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología

de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. A efectos de la presente invención el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere la cantidad de proteína antifúngica de la invención (SEQ ID NO: 1) o
5 composición de la invención, que se requiere para lograr una mejora apreciable en el estado, por ejemplo, una patología, de la enfermedad o condición objetivo del tratamiento.

Procedimiento de obtención de la proteína de la invención.

10

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de la proteína de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende:

- (a) Cultivar un hongo de la especie *Penicillium expansum* en medio mínimo de cultivo bajo condiciones que permiten el crecimiento del hongo,
- 15 (b) Recoger el sobrenadante del cultivo de la etapa (a),
- (c) Purificar la proteína de la invención del sobrenadante de la etapa (b).

P. expansum, preferiblemente la cepa CECT 20906 se cultiva en medio de cultivo mínimo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicho hongo. Dicho medio de
20 cultivo mínimo comprende los nutrientes y requerimientos necesarios para el desarrollo y crecimiento del hongo.

En una realización preferida, el medio de cultivo mínimo comprende 2% sacarosa, 0,3 % NaNO₃, 0,05 % MgSO₄ x 7H₂O, 0,005 % FeSO₄ x 7H₂O, 0,1 % elementos traza
25 solución A, 25 mM tampón fosfato potásico, pH 5.8. Los elementos traza de la solución A son preferiblemente: 0,1% FeSO₄ x 7H₂O, 0,9% ZnSO₄ x 7H₂O, 0,4% CuSO₄ x 5H₂O, 0,01% MnSO₄ x H₂O, 0,01% H₃BO₃, 0,01% Na₂MoO₄ x 2H₂O.

En dicho medio de cultivo se inocula una suspensión de conidios de *P. expansum*
30 CECT 20906, preferiblemente igual o superior a 5x10⁴ conidios/mL de cultivo, preferentemente, igual o superior a 5x10⁵ conidios/mL de cultivo, por ejemplo, de 5x10⁶ conidios/ml de cultivo.

Las condiciones para el cultivo y crecimiento de *P. expansum* CECT20906 son las
35 condiciones convencionales, conocidas por los expertos en la materia, para el

desarrollo y crecimiento de dichos hongos, y comprenden, por ejemplo, la incubación del medio de cultivo, previamente inoculado, en un agitador orbital con agitación, a una temperatura comprendida entre 26 a 28 °C durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 96 horas. En el Ejemplo 1 se describen unas condiciones y unos medios de cultivo apropiados para el desarrollo y crecimiento de *P. expansum* CECT20906.

En otra realización preferida, el hongo *P. expansum* se cultiva en medio mínimo durante al menos 5 días, preferiblemente durante al menos 7 días, más preferiblemente durante al menos 10 días.

En otra realización preferida, en la etapa (b) se separa el micelio del medio de cultivo y se separa y recupera el sobrenadante.

El micelio puede retirarse por cualquier método apropiado de separación sólido-líquido, por ejemplo, mediante decantación, filtración, centrifugación, etc.; no obstante, en una realización particular, la retirada del micelio se realiza por centrifugación.

El sobrenadante se somete a un proceso de diálisis en tampón fosfato sódico 20 mM pH 6.6.

En otra realización preferida, la purificación de la etapa (c) se realiza mediante técnicas cromatográficas o de ultrafiltración.

En otra realización preferida, los rendimientos de producción y purificación de la proteína de la invención siguiendo el procedimiento descrito varían de entre 100 a 200 mg/L de medio de cultivo.

Alternativamente, la proteína antifúngica de la presente invención también puede ser sintetizada por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. La técnica de síntesis puede, pero sin limitarse, una técnica de síntesis macromolecular, como por ejemplo, pero sin limitarse, síntesis de péptidos en fase sólida. También se puede obtener cualquiera de los péptidos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, mediante técnicas adaptadas de biología molecular y biotecnológica, en microorganismos o plantas modificados genéticamente.

35

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y Métodos

15 **Microorganismos**

Los microorganismos empleados en los ensayos antimicrobianos incluyen: *Penicillium digitatum* CECT 20796, *Penicillium italicum* CECT 2294, *Penicillium expansum* CECT 20906, *Botrytis cinerea* CECT 2100, *Magnaporthe oryzae* PR9, *Fusarium oxysporum* 4287, *Penicillium chrysogenum* Q176 ATCC 10002 (productor de antibióticos), *Aspergillus niger* CBS 120.49 (productor de enzimas), *Candida albicans* CECT 1394, *Candida glabrata* CECT 1448, *Candida parapsilosis* CECT 1449, *Trichophyton rubrum* CECT 2794, *Arthroderma vanbreuseghemii* CECT 2958, *Gibberella moniliformis* CECT 2987 y *Aspergillus flavus* CECT 20802.

Para obtener los conidios, todos los hongos se cultivaron en medio sólido PDA (*potato dextrose agar*) durante 7-10 días a 25 °C para posteriormente obtener las suspensiones de conidios necesarias para los ensayos antimicrobianos y de producción de proteína.

30 **Producción y purificación de la proteína antifúngica AfpA de la invención.**

Para la producción de la proteína antifúngica AfpA de la presente invención, la cepa parental de *P. expansum* CECT 20906 se creció en 200 mL de Medio Mínimo para *P. chrysogenum* (2% sacarosa, 0,3 % NaNO₃, 0,05 % MgSO₄ x 7 H₂O, 0,005 % FeSO₄ x 7 H₂O, 0,1 % elementos traza solución A, 25 mM tampón fosfato potásico, pH 5.8; Elementos traza solución A: 0,1% FeSO₄ x 7 H₂O, 0,9% ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,4% CuSO₄

x 5 H₂O, 0,01% MnSO₄ x H₂O, 0,01% H₃BO₃, 0,01% Na₂MoO₄ x 2 H₂O) durante 10 días, utilizando un inóculo inicial de $5,5 \times 10^5$ conidios/mL.

Tras eliminar los restos de micelio por centrifugación (10000 rpm, 30 min), el sobrenadante se dializó (Snake Skin Dialysis Tubing 3.5 k MWCO) frente a tampón fosfato sódico 20 mM pH 6.6. Posteriormente se llevó a cabo una cromatografía líquida en un sistema AKTA Purifier (GE Healthcare) utilizando una columna de intercambio catiónico (ReSourceS 6 mL; GE Healthcare) equilibrada en el tampón de diálisis. Las proteínas no adsorbidas se eluyeron en el mismo tampón fosfato, y las proteínas adsorbidas a la resina cromatográfica se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M) en tampón fosfato 20 mM pH 6.6. Las fracciones cromatográficas (6 mL) se evaluaron mediante SDS-PAGE 16 % y las fracciones conteniendo la proteína antifúngica AfpA de la invención se mezclaron, para a continuación, ser dializadas frente a agua bidestilada y liofilizadas y posteriormente ser utilizadas en los ensayos antimicrobianos.

La concentración de la proteína antifúngica AfpA de la invención se determinó utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon_{280} = 0,639$ determinado experimentalmente.

La masa molecular y huella peptídica de la proteína antifúngica AfpA de la invención se determinó en el Servicio de Proteómica de la Universitat de València.

Ensayos de inhibición del crecimiento

Los ensayos de inhibición de crecimiento se realizaron en placas de microtítulo de 96 pocillos de fondo plano, en un volumen total de 100 μ L. Se mezclaron 50 μ L de una suspensión de 5×10^4 conidios/mL de cada una de las distintas cepas parentales fúngicas (en medio PDB diluido 10 veces conteniendo 0,02% de cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano) con 50 μ L de una preparación de cada proteína antifúngica ensayada (concentrada 2X). Se ensayaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de las proteínas desde 256 a 0,25 μ g/mL, realizándose las muestras por triplicado.

Las placas fueron incubadas sin agitación durante 72 h a 25 °C. La actividad de las proteínas se determinó cuantificando el crecimiento de cada hongo por medida de la densidad óptica a 600 nm, usando un espectrofotómetro de placas Fluostar Omega (BMG labtech). Los resultados muestran la media de la absorbancia y su desviación

estándar. Los experimentos se repitieron al menos dos veces. MIC se define como la concentración mínima de proteína que inhibe completamente el crecimiento de los hongos, en todos los experimentos realizados.

5 **Ensayos de infección sobre frutos cítricos**

Los ensayos de infección sobre frutos cítricos fueron realizados utilizando frutos maduros de naranja de la variedad Navelina (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv Navelina). Éstos se infectaron con la cepa parental de *P. digitatum* CECT 20796 siguiendo el procedimiento descrito en López-García et al. (López-García, B., et al. Mol. Plant-Microbe Interact. 2000, 13: 837-846). Se inocularon tres réplicas de cinco frutos, generando 4 heridas a lo largo del ecuador de cada fruto, sobre las que se depositaron 5 µL de una suspensión de 10⁴ conidios/mL de la cepa parental incubada junto a concentraciones crecientes de las proteínas antifúngicas AfpB y AfpA (1, 10 y 100 µg de proteína por mL de inóculo).

15

Cada herida inoculada fue monitorizada para determinar la aparición de síntomas a diferentes días post inoculación (d.p.i.) mostrando el porcentaje de heridas infectadas a dichos tiempos. Los datos presentados hacen referencia al porcentaje del valor medio ± desviación estándar de las medidas.

20

Ejemplo 1. Producción y purificación de la proteína antifúngica AfpA (SEQ ID NO: 1) a partir del sobrenadante del cultivo de *P. expansum* CECT 20906 crecido en Medio Mínimo.

25

P. expansum CECT 20906 secreta la proteína AfpA (SEQ ID NO: 1) al sobrenadante de cultivo tras 5 días de crecimiento en Medio Mínimo (**FIG. 1**). Es de destacar que cuando *P. expansum* CECT 20906 se cultiva en medio rico PDB no se detecta la proteína antifúngica AfpA (SEQ ID NO: 1) en el sobrenadante del cultivo (**FIG. 1A**). Estos datos demuestran que la producción y obtención de la proteína AfpA en el sobrenadante de cultivos, solo es posible cuando el hongo *P. expansum* CECT 20906 se cultiva en Medio Mínimo.

30

La producción óptima de la proteína antifúngica AfpA se alcanza entre los 7-10 días de crecimiento. Como se ha descrito en materiales y métodos, la purificación de la proteína se lleva a cabo en un único paso cromatográfico de intercambio catiónico,

35

obteniéndose unos rendimientos de producción de entre 100 a 150 mg/L.

La identidad y la secuencia de aminoácidos de la proteína AfpA fue confirmada mediante análisis por huella peptídica, confirmándose que la secuencia aminoacídica de la proteína AfpA de la presente invención (SEQ ID NO: 1) es diferente a la secuencia aminoacídica de otras proteínas AFPs previamente conocidas, como por ejemplo, la proteína antifúngica AFP procedente de *Aspergillus giganteus*, la proteína PAF de *P. chrysogenum* y la proteína AfpB de *P. digitatum*.

Ejemplo 2. Actividad antifúngica *in vitro* de la proteína AfpA (SEQ ID NO: 1) de la invención frente a diferentes hongos filamentosos.

La actividad antifúngica de la proteína AfpA de la presente invención se determinó por cuantificación del incremento de la biomasa a lo largo del tiempo, utilizando ensayos en placas de microtítulo y midiendo la densidad óptica para determinar curvas dosis-respuesta (**FIG. 2**) y la mínima concentración inhibitoria (MIC, **Tabla 1**), tal y como se describe en materiales y métodos.

Tabla 1. Valores de MIC expresados en µg/mL para las proteínas antifúngicas PAF (SEQ ID NO: 2) procedente de *P. chrysogenum* y AfpB (SEQ ID NO: 3) procedente de *P. digitatum* en comparación con la proteína antifúngica AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1), respecto de una selección de hongos filamentosos. (n.d.: no determinado)

Hongo	PAF (SEQ ID NO: 2)	AfpB (SEQ ID NO: 3)	AfpA (SEQ ID NO: 1)
<i>P. digitatum</i>	64	4	1
<i>B. cinerea</i>	256	32	4
<i>P. expansum</i>	>256	4	2
<i>P. italicum</i>	>256	2	2
<i>P. chrysogenum</i>	>256	8	2
<i>M. oryzae</i>	>256	>256	16
<i>A. niger</i>	2	4	2
<i>F. oxysporum</i>	>256	128	4
<i>A. flavus</i>	n.d.	n.d.	4
<i>G. moniliformis</i>	n.d.	n.d.	4

A menores valores MIC mayor es la actividad antifúngica de la proteína. Por lo tanto, tal y como se observa en la **Tabla 1**, los valores de MIC demuestran que la proteína AfpA de la invención es más activa, presenta mayor actividad antifúngica, que otras proteínas de tipo AFPs previamente conocidas, tales como las proteínas PAF (SEQ ID NO: 2) de *P. chrysogenum* y AfpB (SEQ ID NO: 3) de *P. digitatum* frente a distintos hongos filamentosos.

La selección de hongos filamentosos frente a los que la proteína AfpA de la invención es activa incluye hongos fitopatógenos de frutos y/o verduras como *P. digitatum* y *P. italicum*, específicos de frutos cítricos, *Botrytis cinerea* causante de la podredumbre gris y capaz de atacar a una gran variedad de frutos y/o verduras, *Magnaporthe oryzae* patógeno de arroz que produce la enfermedad denominada pirculariosis y *Fusarium oxysporum* que afecta, entre otros, el cultivo del tomate.

Además, tal y como se observa en la **Tabla 1**, la proteína AfpA de la invención es también activa frente a hongos productores de aflatoxinas, tales como *Aspergillus flavus*, frecuente en semillas de cereales, y también asociado como patógeno oportunista con la aspergilosis pulmonar, y *Gibberella moniliformis*, también conocido como *Fusarium moniliformis* y *Fusarium verticilloides*, patógeno del maíz y otras especies, y productor de la micotoxina fumonisina, tóxica para animales y humanos. Por dicho motivo, la proteína AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1) también puede ser empleada para garantizar la seguridad alimentaria en consumo humano y animal.

Los valores de MIC varían entre 1 µg/mL para *P. digitatum* hasta 16 µg/mL en el caso de *M. oryzae*. Además, la proteína es activa frente al propio hongo productor *P. expansum* (MIC = 2 µg/mL), el principal patógeno de manzanas y productor de la micotoxina patulina.

La proteína AfpA de la invención también es efectiva frente a hongos no fitopatógenos, como la cepa de *P. chrysogenum* productora de PAF y una cepa de *A. niger* que es particularmente sensible a PAF. Por tanto, la proteína AfpA de la invención que comprende la SEQ ID NO; 1 y que es producida por el hongo *P. expansum* es una proteína antifúngica específica de hongos filamentosos y de amplio espectro.

35

Ejemplo 3. Actividad antifúngica *in vitro* de la proteína AfpA de la invención frente a diferentes hongos y levaduras de interés biosanitario.

5 La actividad antifúngica de la proteína AfpA de la presente invención frente a hongos y levaduras que provocan enfermedades en humanos, se determinó por cuantificación del incremento de la biomasa a lo largo del tiempo, utilizando ensayos en placas de microtítulo y midiendo la densidad óptica para determinar curvas dosis-respuesta (**FIG. 3**) y la mínima concentración inhibitoria (MIC, **Tabla 2**), tal y como se describe en materiales y métodos.

10

Tabla 2. Valores de MIC expresados en µg/mL para la proteína antifúngica AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1), respecto de una selección de hongos de interés biosanitario.

Hongo	AfpA (SEQ ID NO: 1)
<i>Candida albicans</i>	8
<i>Candida glabrata</i>	4
<i>Candida parapsilosis</i>	4
<i>Trichophyton rubrum</i>	4
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	4

15 La selección de hongos de interés biosanitario frente a los que la proteína AfpA de la invención es activa incluye levaduras patógenas de humanos como las tres principales especies causantes de las candidiasis: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, y los hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* y *Arthroderma vanbreuseghemii*, causantes de dermatofitosis o tiñas que afectan la capa córnea de la piel, pelos y uñas.

20

Los valores de MIC para las especies de hongos que provocan infecciones en humanos, varían entre 4 µg/mL (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *T. rubrum* y *A. vanbreuseghemii*) a 8 µg/mL (*C. albicans*). Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad de la proteína AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1) frente a hongos patógenos humanos.

25

Ejemplo 4. La proteína AfpA de la invención (SEQ ID NO: 1) controla la podredumbre post-cosecha producida por *P. digitatum* en frutos cítricos.

5 La evaluación de la capacidad de control de podredumbres postcosecha se determinó realizando ensayos de inoculación de *P. digitatum* sobre frutos cítricos utilizando variedades comerciales de naranjas. Las inoculaciones y el seguimiento de la infección se realizaron siguiendo los protocolos descritos previamente por los inventores (López-García, B., et al. Mol. Plant-Microbe Interact., 2000; 13: 837-846).

10 En la **FIG. 4** se presentan los resultados de los bioensayos de control de la podredumbre causada por *P. digitatum* en frutos cítricos de naranja (variedad Navelina). Los frutos fueron inoculados con conidios del hongo (10^4 conidios/mL) conjuntamente con la proteína. La evaluación de la infección se determinó como el porcentaje de heridas infectadas a diferentes tiempos (dpi; días tras la inoculación). El
15 análisis de las medias revela una reducción significativa en el porcentaje de heridas infectadas en frutos co-inoculados con el hongo y AfpA, lo que indica que la proteína es capaz de controlar la podredumbre causada por *P. digitatum*.

Los ejemplos mostrados en el presente documento demuestran que la proteína
20 antifúngica AfpA de la invención, es una proteína AFP extremadamente activa en el control de la infección por hongos fitopatógenos en frutos y /o verduras post-cosecha en comparación con otras AFPs conocidas y utilizadas para el mismo fin. Además, tal y como se muestra en el Ejemplo 3 la proteína antifúngica AfpA de la invención, es útil en el tratamiento de hongos patógenos en humanos, por tanto dicha proteína es útil
25 como medicamento, particularmente, para el tratamiento de patologías provocadas por hongos capaces de infectar humanos. Adicionalmente, la proteína ApfA de la invención también es muy activa frente a hongos productores de aflatoxinas, tóxicas tanto animales y humanos, demostrándose su utilidad en métodos de seguridad alimentaria.

30

REIVINDICACIONES

1. Uso de una proteína que comprende la SEQ ID NO: 1 o de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1 como antifúngico.
5
2. Uso según la reivindicación 1 donde la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1 es una proteína de origen fúngico.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la proteína que
10 comprende la SEQ ID NO: 1 es producida por un hongo del género *Penicillium*.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1 es producida por la especie *Penicillium expansum*.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1 es producida por el hongo *Penicillium expansum* cepa CECT 20906.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el control biológico de
20 agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el control biológico de agentes patógenos de alimentos y bebidas.
- 25 8. Uso según la reivindicación 6 donde el agente patógeno es un hongo fitopatógeno que se selecciona de la lista que consiste en: *Penicillium spp.*, *Botrytis spp.*, *Magnaporthe spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Verticillium spp.*, *Geotrichum spp.*, *Phomopsis spp.*, *Diplodia spp.*, *Alternaria spp.*, *Monilinia spp.*, *Venturia spp.*, *Rhizopus spp.*, *Ceratocystis spp.*, *Gloeosporium spp.*,
30 *Thielaviopsis spp.*, *Lasiodiplodia spp.*, *Nigrospora spp.*, *Cladosporium spp.*, *Acremonium spp.*, y/o cualquier combinación de los mismos.
9. Uso según la reivindicación 8 donde el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que consiste en: *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*,
35 *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae*, *Verticillium theobromae*, *Botrytis*

- cinerea, Geotrichum candidum, Phomopsis natalensis, Diplodia citri Diplodia natalensis, Alternaria citri, Alternaria alternata, Monilinia fructigena, Monilinia laxa, Venturia inaequalis, Venturia pyrina, Rhizopus stolonifer, Rhizopus oryzae, Ceratocystis paradoxa, Penicillium funiculosum, Penicillium expansum, Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Gloeosporium album, Gloeosporium perennans, Gloeosporium fructigenum, Gloeosporium singulata, Thielaviopsis paradoxy, Thielaviopsis basicola, Aspergillus flavus, Aspergillus carbonarius, Lasiodiplodia theobromae*, y/o cualquier combinación de los mismos.
- 5
- 10 10. Uso según la reivindicación 7 donde el agente patógeno es un hongo y se seleccionan de la lista que consiste en: *Aspergillus spp., Fusarium spp., Penicillium spp., Gibberella spp.*, y/o cualquier combinación de los mismos
11. Uso según la reivindicación 10 donde el agente patógeno se selecciona de la lista que consiste en: *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus carbonarius, Fusarium verticilloides, Fusarium moniliforme, Penicillium expansum, Penicillium claviforme, Gibberella moniliformis* y/o cualquier combinación de los mismos.
- 15
12. Uso según la reivindicación 6 donde los frutos en post-cosecha se seleccionan de la lista que consiste en: fresa, fresón, aceitunas, uvas, naranjas, limones, mandarinas, melocotones, albaricoques, cerezas, peras, manzanas, nectarinas, tomates, zanahorias, coliflores.
- 20
13. Proteína o composición que comprenden la SEQ ID NO: 1 según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como medicamento.
- 25
14. Proteína o composición que comprenden la SEQ ID NO: 1 según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como medicamento en el tratamiento de patologías inducidas por hongos.
- 30
15. Proteína o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde los hongos inductores de patologías se seleccionan de la lista que consiste en: *Candida spp., Arthroderma spp., Trichophyton spp. Aspergillus spp, Gibberella spp.* y/o cualquier combinación de los mismos.
- 35
16. Proteína o composición para su uso según la reivindicación 15 donde el hongo se selecciona de la lista que consiste en: *Candida albicans, Candida glabrata, Candida*

parapsilosis, Candida guilliermondii, Candida krusei, Candida lusitaniae, Candida tropicalis, Arthroderma otae, Arthroderma vanbreuseghemii, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Aspergillus fumigatus, Gibberella moniliformis y/o cualquier combinación de los mismos.

5

17. Método para el control biológico de agentes patógenos de frutos y/o verduras en post-cosecha que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1 o de una composición que comprenda la SEQ ID NO: 1, a dichos frutos y/o verduras en post-cosecha.

10

18. Método según la reivindicación 17 donde la SEQ ID NO: 1 o la composición que la comprende, se administra mediante inyección, inmersión, vaporización, pulverización, diseminación, espolvoreado y/o espumado.

15

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18 donde la cantidad eficaz de la SEQ ID NO: 1 o de la composición que la comprende varía de entre 1 a 50 µg/mL.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 donde los agentes patógenos son hongos fitopatógenos que se seleccionan de la lista que consiste en:
20 *Penicillium spp., Botrytis spp., Magnaporthe spp., Fusarium spp., Aspergillus spp., Colletotrichum spp., Verticillium spp., Geotrichum spp., Phomopsis spp., Diplodia spp., Alternaria spp., Monilinia spp., Venturia spp., Rhizopus spp., Ceratocystis spp., Gloeosporium spp., Thielaviopsis spp., Lasiodiplodia spp., Nigrospora spp., Cladosporium spp., Acremonium spp.* y/o cualquier combinación de los mismos.

25

21. Método según la reivindicación 20 donde el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que consiste en: *Colletotrichum musae, Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum coccodes, Fusarium semitectum, Fusarium moniliforme, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Magnaporthe oryzae, Verticillium theobromae, Botrytis cinerea, Geotrichum candidum, Phomopsis natalensis, Diplodia citri, Diplodia natalensis, Alternaria citri, Alternaria alternata, Monilinia fructigena, Monilinia laxa, Venturia inaequalis, Venturia pyrina, Rhizopus stolonifer, Rhizopus oryzae, Ceratocystis paradoxa, Penicillium funiculosum, Penicillium expansum, Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Gloeosporium album, Gloeosporium perennans,*

30

Gloeosporium fructigenum, *Gloeosporium singulata*, *Thielaviopsis paradoxy*, *Thielaviopsis basicola*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Lasioidiploidia theobromae* y/o cualquier combinación de los mismos.

- 5 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 donde los frutos en post-cosecha se seleccionan de la lista que consiste en: fresa, fresón, aceitunas, uvas, naranjas, limones, mandarinas, melocotones, albaricoques, cerezas, peras, manzanas, nectarinas, tomates, zanahorias y coliflores.
- 10 23. Procedimiento de obtención de la proteína que comprende la SEQ ID NO:1 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- (a) Cultivar un hongo de la especie *Penicillium expansum* en medio mínimo de cultivo bajo condiciones que permiten el crecimiento del hongo,
 - (b) Recoger el sobrenadante del cultivo de la etapa (a),
 - 15 (c) Purificar la SEQ ID NO: 1 del sobrenadante de la etapa (b).
24. Procedimiento según la reivindicación 23 donde el hongo *P. expansum* es la cepa CECT 20906.
- 20 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24 caracterizado por que el hongo *P. expansum* se cultiva durante al menos 5 días.
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 donde la etapa de purificación se realiza mediante técnicas cromatográficas.
- 25 27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 donde los rendimientos de obtención de la SEQ ID NO: 1 varían de entre 100 a 200 mg/L.

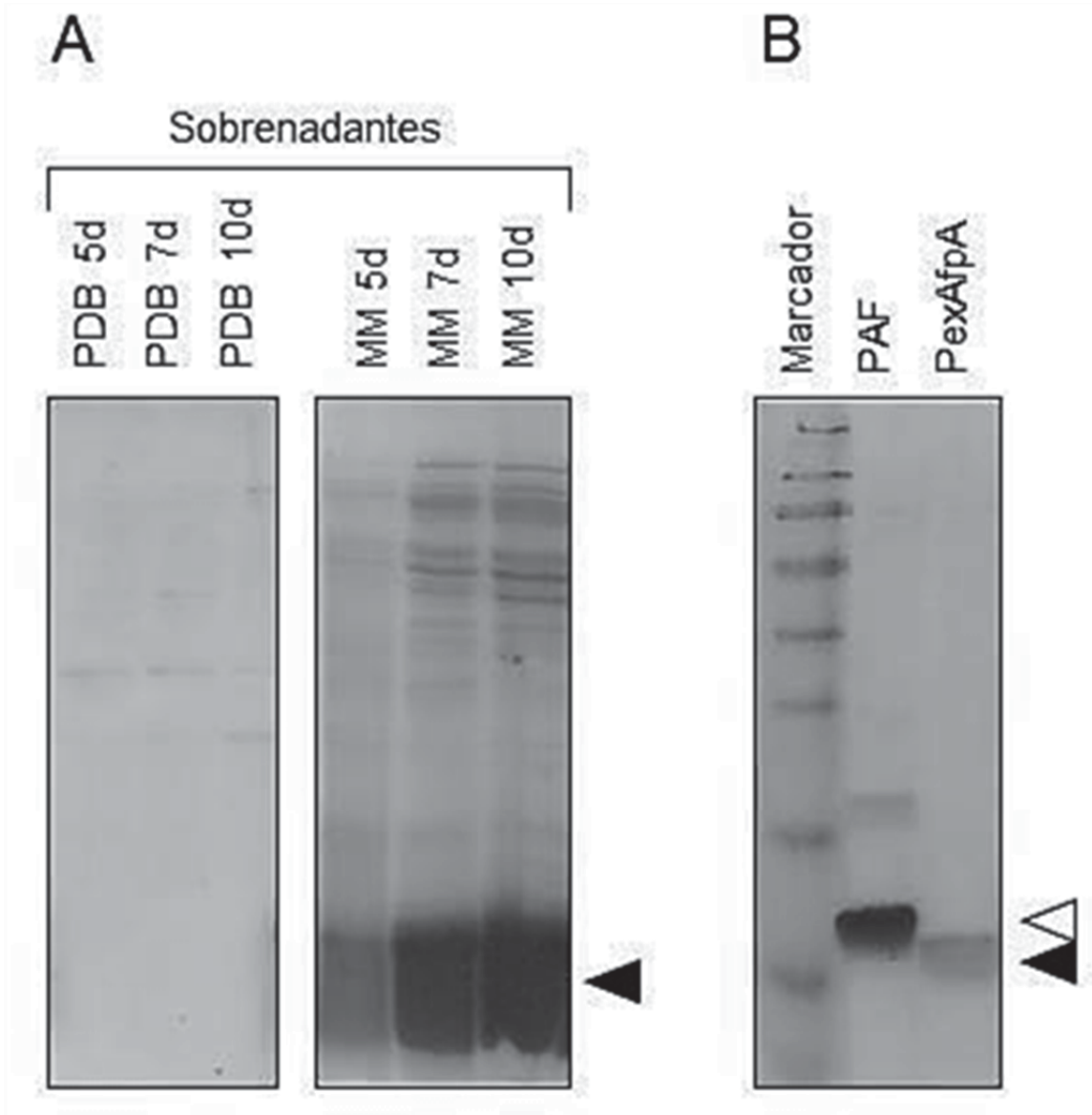


FIG. 1

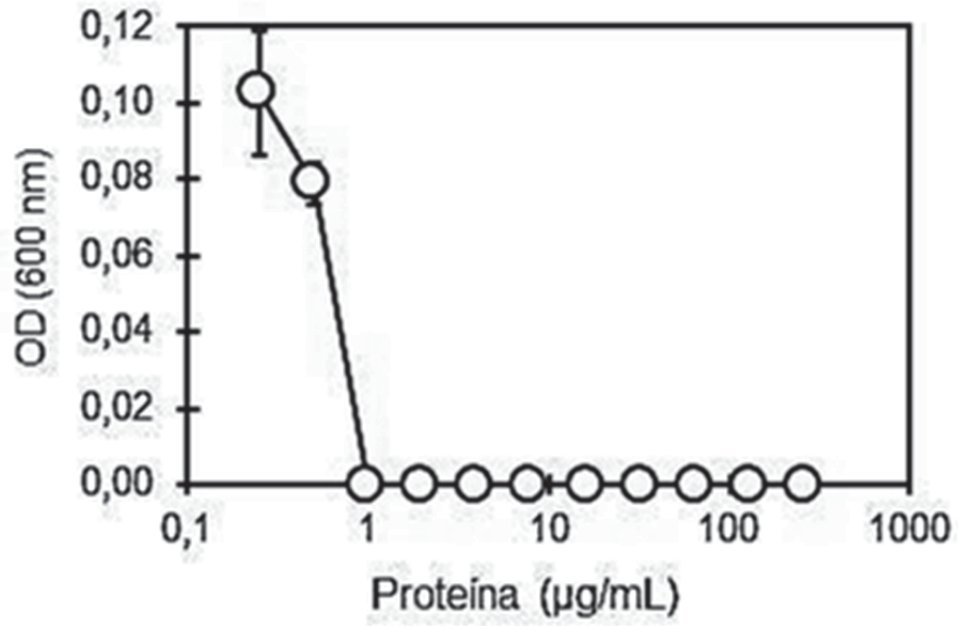


FIG. 2

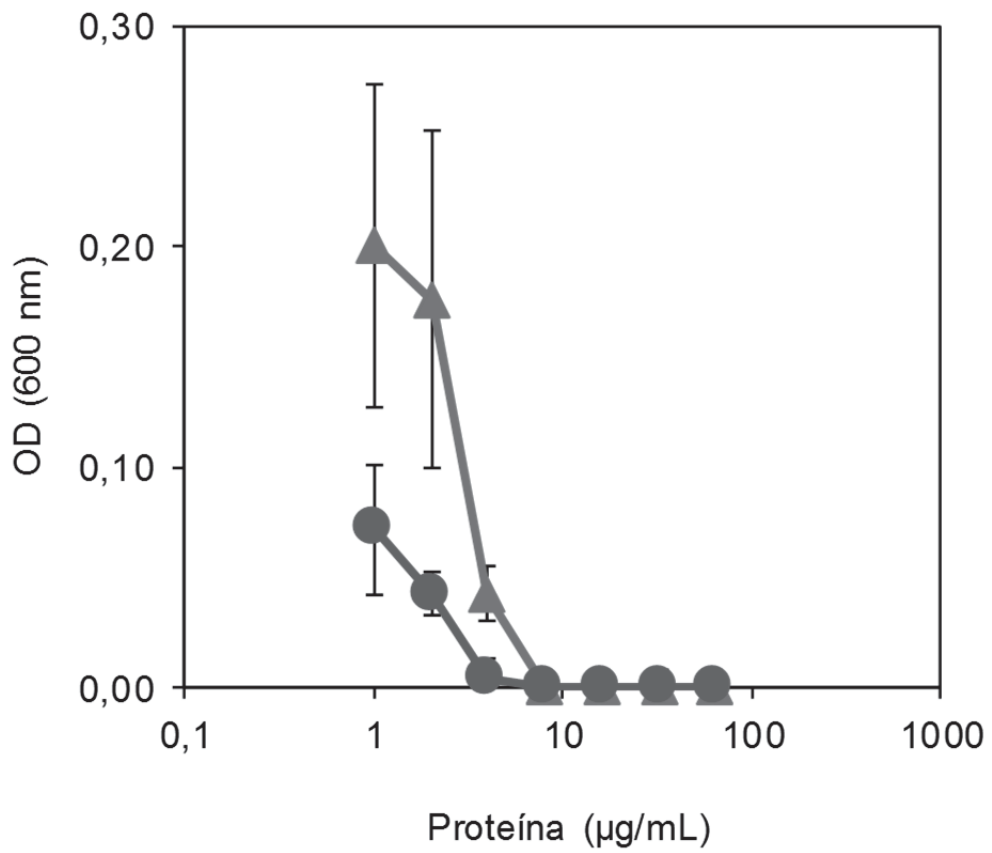


FIG. 3

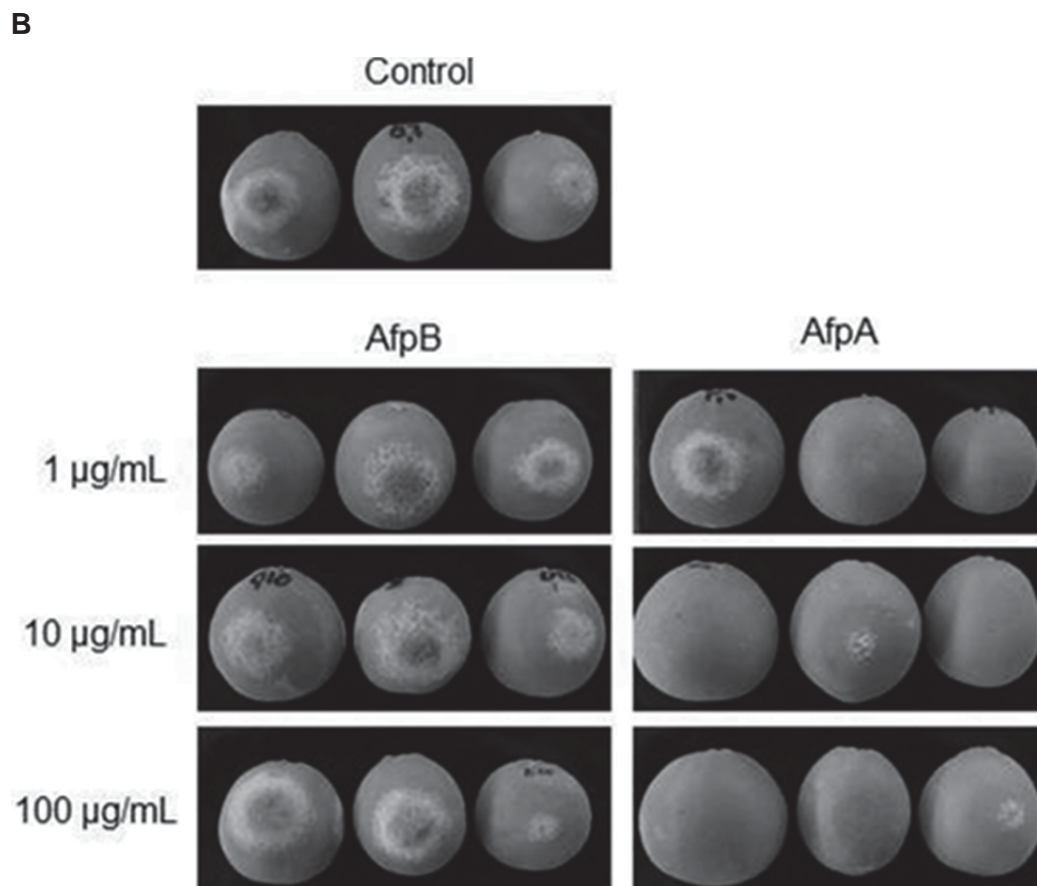
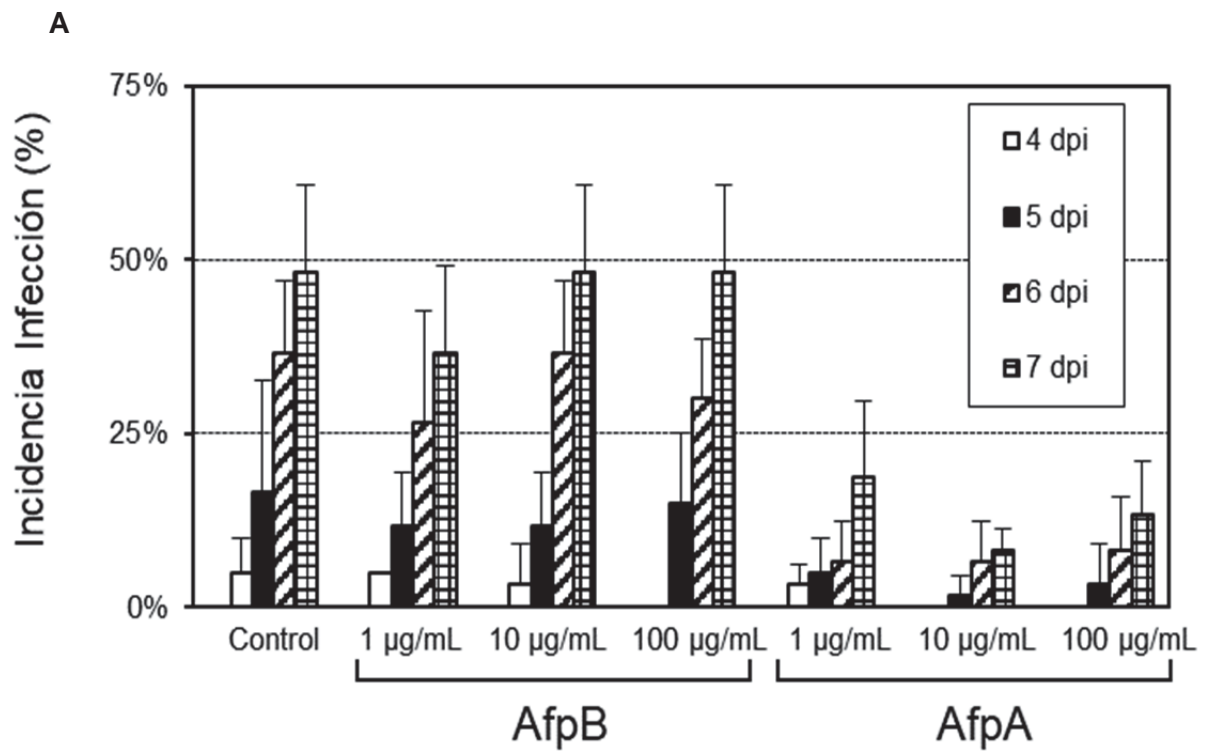


FIG. 4



- ②① N.º solicitud: 201830546
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	"Antifungal protein. <i>Penicillium expansum</i> ". UniProtKB, nº de acceso A0A0A2K8K6, 04/02/2015, [base de datos en línea], [recuperado el 27/09/2018]. Recuperado de Internet, <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0A2K8K6 >. Recuperado de la base de datos EMBL-EBI, Hinxton, Reino Unido, todo el documento.	1-27
X	GARRIGUES, S. et al. "Ocurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i> ". APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 01/03/2016, Vol. 100, Nº 5, páginas 2243-2256, <DOI: 10.1007/s00253-015-7110-3>; todo el documento, especialmente página 2247, Fig. 1.	1-27
X	BALLESTER, A.R. et al. "Genome, transcriptome, and functional analyses of <i>Penicillium expansum</i> provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 01/03/2015, Vol. 28, Nº 3, páginas 232-248, <DOI: 10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>; todo el documento, especialmente Materiales y Métodos.	1-27

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 02.10.2018</p>	<p>Examinador M. Novoa Sanjurjo</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/04 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

C07K14/385 (2006.01)

A61P31/10 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBL-EBI, HCAPLUS, INTERNET