

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de Noviembre de 2007 (08.11.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/125142 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/435 (2006.01) **A61K 38/08** (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)

(74) Mandatario: **COCA TORRENS, Manuela** (Consulpi,
S.L.); Rambla Badal, 137-139, esc. B. Entlo 1ª, E-08028
Barcelona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/000244

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Abril de 2007 (24.04.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200601098 28 de Abril de 2006 (28.04.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSITAT DE GIRONA** [ES/ES]; Plaça Sant
Domènec, 3, Edifici Les Aligues, E-17071 Girona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BARDAJÍ
RODRÍGUEZ, Eduard** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec,
3, Edifici Les Aligues, E-17071 Girona (ES). **MON-
TESINOS SEGUÍ, Emili** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec,
3, Edifici Les Aligues, E-17071 Girona (ES). **BADOSA
ROMACHO, Esther** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec, 3,
Edifici Les Aligues, E-17071 Girona (ES). **FELIU SO-
LEY, Lidia** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec, 3, Edifici Les
Aligues, E-17071 Girona (ES). **PLANAS GRABULEDA,
Marta** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec, 3, Edifici Les
Aligues, E-17071 Girona (ES). **FERRE MALAGÓN,
Rafael** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec, 3, Edifici Les
Aligues, E-17071 Girona (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: **ANTIMICROBIAL LINEAR PEPTIDES**

(54) Título: **PÉPTIDOS LINEALES ANTIMICROBIANOS**

(57) **Abstract:** The present invention relates to novel linear peptides with antimicrobial activity. Said peptides are made up of 11 amino acids, and they have the amino group of the amino acid constituting the N-terminal end in a non-derived form or functionalized with an acetyl group, p-toluene sulphonyl, benzyl or benzoyl. The amino acid constituting the C-terminal end of said peptides is in carboxamide form. The invention describes the synthesis and use of said peptides as antimicrobial agents to combat pathogenic bacteria for plants. The invention also relates to compositions containing said peptides and an auxiliary agent, and to a method for preventing and treating infections and diseases of plants caused by pathogenic bacteria.

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a nuevos péptidos lineales que presentan actividad antimicrobiana. Dichos péptidos están formados por 11 aminoácidos, y tienen el grupo amino del aminoácido que constituye el extremo N-terminal sin derivatizar o funcionalizado con el grupo acetilo, p- toluensulfonilo, bencilo o benzoílo. El aminoácido que constituye el extremo C- terminal de dichos péptidos está en forma de carboxamida. La invención describe la síntesis y la utilización de los mencionados péptidos como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas para plantas. También se refiere a composiciones que comprenden dichos péptidos y un agente auxiliar, y a un método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de plantas causadas por bacterias patógenas.

WO 2007/125142 A1

PÉPTIDOS LINEALES ANTIMICROBIANOS

Campo de la técnica

5

La presente invención se refiere a péptidos lineales que presentan propiedades antimicrobianas, que son particularmente eficaces frente a bacterias patógenas de las plantas, y se pueden emplear en composiciones fitosanitarias.

10

Estado de la técnica anterior

Las bacterias fitopatógenas son responsables de pérdidas de gran importancia económica en producción vegetal. Entre ellas se destacan, por ejemplo, las bacteriosis causadas por las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, y *Xanthomonas vesicatoria*.

15

Actualmente en Europa solamente están autorizados algunos productos para la protección de las plantas contra enfermedades bacterianas basados principalmente en derivados cúpricos con una eficacia de control insuficiente.

20

Antibióticos, como kasugamicina o estreptomina, que hasta hace pocos años estaban autorizados en algunos países, en la actualidad no están autorizados en Europa. Los antibióticos estreptomina y tetraciclina sí que están autorizados en países como los EE.UU., pero en numerosos casos se ha puesto de manifiesto la aparición de cepas resistentes del patógeno que hacen su uso inefectivo, o que pueden suponer un riesgo de transferencia de dicha resistencia a otras bacterias patógenas. En el caso de las micosis causadas por hongos fitopatógenos, si bien existen materias activas disponibles, se requieren continuamente nuevos fungicidas, en parte por la aparición de resistencias con una cierta frecuencia.

25

30

Además, muchos de los compuestos antibacterianos conocidos más efectivos presentan una persistencia en el medio ambiente que no es deseable.

En los últimos años se ha intensificado la preparación de nuevos tipos de antibióticos que puedan evitar la resistencia de las bacterias. Entre ellos destacan compuestos aislados de la propia naturaleza, por ejemplo los

35

péptidos, que están presentes en plantas y animales, y algunos de los cuales presentan propiedades antimicrobianas.

Las cecropinas son péptidos antimicrobianos presentes en la hemolinfa de la mariposa *Hyalophora cecropia* como respuesta a una infección bacteriana. En particular la cecropina A es un péptido lineal formado por 37 aminoácidos, que presenta una potente actividad lítica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, existen reticencias para su empleo en aplicaciones fitosanitarias dado su elevado coste de producción, al tener una longitud considerable, y su baja estabilidad frente a la degradación por proteasas.

En Ali *et al*, Mol.Plant-Microbe Interact., 2000, 13, 847-859 se describe un péptido activo frente a algunas bacterias patógenas de las plantas como son *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, y *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Se trata de un undecapéptido preparado por primera vez por Cavallarín *et al*, Mol.Plant-Microbe Interact., 1998, 11, 218-227, que está formado por la secuencia de aminoácidos Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu, y que el aminoácido del extremo C-terminal presenta un grupo carboxamida. Dicho péptido es un péptido híbrido formado por fragmentos de los péptidos de origen natural cecropina A y melitina. Concretamente está constituido por los aminoácidos 2-8 de cecropina A y 6-9 de melitina.

No se ha descrito la aplicación de dicho undecapéptido frente a otras bacterias fitopatógenas como *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*, que son particularmente relevantes porque afectan plantas que son de gran importancia económica, y contra las que hasta el momento los métodos utilizados para combatirlos son poco efectivos.

Por ello, subsiste la necesidad de disponer de nuevos compuestos antimicrobianos que presenten una buena eficacia frente a bacterias patógenas de las plantas, en particular, frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, o *Pseudomonas syringae*.

30

Objeto de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos péptidos que resultan de fácil preparación y que presentan una elevada eficacia para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de las plantas, además

35

presentan baja citotoxicidad en células eucariotas, y una buena estabilidad a la degradación por proteasas.

El objeto de la presente invención es proporcionar péptidos lineales que presentan propiedades antimicrobianas.

5 Forma también parte del objeto de la invención la utilización de dichos péptidos como agentes antimicrobianos.

También es objeto de la invención una composición fitosanitaria que comprende los péptidos de la invención y un agente auxiliar.

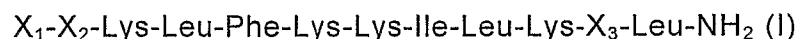
Otro objeto de la invención es un método para prevenir y tratar
10 infecciones y enfermedades de las plantas causadas por bacterias.

Descripción de la invención

Péptidos

15

El objeto de la presente invención es proporcionar péptidos lineales que responden a la fórmula general (I):



en donde

20

X_1 es hidrógeno, acetilo, *p*-toluensulfonilo, bencilo, o benzoílo,

X_2 es Lys, Tyr, Leu, Phe, o Trp, y

X_3 es Lys, Tyr, Val, Phe, o Trp,

con la condición de que el péptido en donde X_1 es hidrógeno, X_2 es Trp, y X_3 es Val se excluye expresamente.

25

En la fórmula general, cuando X_1 es hidrógeno se representa como H, el grupo acetilo se representa como Ac, el grupo *p*-toluensulfonilo como Ts, el grupo bencilo como Bn, y el grupo benzoílo como Bz.

Las abreviaturas empleadas para los aminoácidos en esta descripción siguen la normativa de la Comisión para la Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB, según se describe en el libro Biochemical Nomenclature and
30 Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992, Londres [ISBN 1-85578-005-4]. De esta forma Leu es L-leucina, Lys significa L-lisina, Ile es L-isoleucina, Phe es L-fenilalanina, Tyr es L-tirosina, Trp es L-triptófano, y Val es L-valina.

35

De acuerdo con dicha normativa los péptidos se representan con las abreviaturas de los aminoácidos que los componen unidos por guiones,

que representan los enlaces peptídicos. Así por ejemplo el péptido denominado glicilglicilglicina se simboliza como Gly-Gly-Gly. Esto requiere la modificación del símbolo Gly para la glicina, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, de tres formas distintas:

- (i) "Gly-" significa $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-$
- 5 (ii) "-Gly-" significa $\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, y
- (iii) "-Gly" significa $\text{HN}-\text{CH}_2-\text{COOH}$

Así, cuando el guión se coloca a la derecha del símbolo, caso (i), indica que se ha eliminado el grupo OH del grupo carboxílico del aminoácido, y cuando se coloca a la izquierda del símbolo, caso (iii), indica que se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino del aminoácido; en el caso (ii) ambas modificaciones se aplican a un mismo símbolo.

El aminoácido Gly- constituye el extremo N-terminal del péptido, y el aminoácido -Gly constituye el extremo C-terminal del péptido.

Como se puede apreciar a partir de la fórmula general (I), todos los péptidos de la invención tienen el aminoácido Leu del extremo C-terminal en forma de carboxamida, representado como $-\text{Leu}-\text{NH}_2$.

El aminoácido que constituye el extremo N-terminal de los péptidos de la invención puede mantener su grupo amino sin derivatizar, o bien el mismo puede estar funcionalizado con un grupo acetilo, *p*-toluensulfonilo, bencilo o bencilo, tal como se expresa en la fórmula general (I).

En el caso de que dicho grupo amino no esté derivatizado, es decir, cuando X_1 es hidrógeno, en esta descripción se considera que el símbolo $\text{H}-\text{X}-$ es equivalente al símbolo $\text{X}-$, que es la forma adoptada por la IUPAC en el caso (i) ya mencionado.

Las estructuras de los péptidos de la invención se definen de acuerdo con la fórmula general (I).

Otra forma de definir la estructura de los péptidos de la invención consiste en emplear las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y especificando además la funcionalización que presentan en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal del péptido. Como ya se ha indicado, todos los péptidos de la invención tienen el aminoácido que forma el extremo C-terminal en forma de carboxamida.

Las mencionadas secuencias presentan los aminoácidos que se muestran en la Tabla I:

TABLA I

SEQ_ID_NO:	Estructura
1	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
2	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
3	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
4	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
5	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
6	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
7	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
8	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
9	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
10	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
11	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
12	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
13	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
14	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
15	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
16	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
17	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
18	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
19	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
20	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
21	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
22	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu

23	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
24	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
25	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu

La secuencia denominada SEQ_ID_NO:15 corresponde a la secuencia del péptido descrito por Cavallarin *et al*, Mol.Plant-Microbe Interact., 1998, 11, 218-227, cuyo derivado carboxamida en el extremo C-terminal de la secuencia se encuentra expresamente excluido de esta invención.

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos, se encuentran los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 14, y SEQ_ID_NO: 16 a SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Dentro de este grupo son especialmente preferidos los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 6 a SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 13, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 18 a SEQ_ID_NO: 22, y SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Particularmente preferidos son los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 6 y SEQ_ID_NO: 16, y que tienen el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida. El último de estos dos péptidos preferidos tiene la estructura: H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu-NH₂, correspondiente a la fórmula general (I) donde X₁ es H, X₂ es Lys, y X₃ es Phe.

También resultan ser preferidos los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo acetilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Dentro de este grupo, resulta especialmente preferido el péptido definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 16, que tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo acetilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida. Dicho péptido tiene la estructura Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu-NH₂, correspondiente a la fórmula general (I) donde X₁ es acetilo (Ac), X₂ es Lys, y X₃ es Phe.

También son preferidos los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo N-

terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Dentro de este grupo son particularmente preferidos los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1, 6, 11 y 16, y que tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Resulta más preferido el péptido definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 1, y que tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida. Dicho péptido tiene la estructura Ts-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂, correspondiente a la fórmula general (I) donde X₁ es *p*-toluensulfonilo (Ts), X₂ es Lys, y X₃ es Lys.

También son preferidos los péptidos definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo bencilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Dentro de este grupo es especialmente preferido el péptido definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 15, y que tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo bencilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida. Dicho péptido tiene la estructura Bn-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂, correspondiente a la fórmula general (I) donde X₁ es bencilo (Bn), X₂ es Trp, y X₃ es Val.

También son preferidos los péptidos definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y que tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo benzoílo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

Dentro de este grupo, son especialmente preferidos los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1, y SEQ_ID_NO: 11, y que tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo benzoílo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida. Resulta más preferido el primero de dichos péptidos que tiene la estructura Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂, correspondiente a la fórmula general (I) donde X₁ es benzoílo (Bz), X₂ es Lys, y X₃ es Lys.

Los péptidos descritos en la invención están formados por 11 aminoácidos que los hace apropiados para ser preparados empleando los pro-

cedimientos habituales de síntesis de péptidos en fase sólida, descritos por R.B. Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 1963, 85, 2149-2154.

Entre ellos se puede mencionar el que emplea como soporte sólido la resina 4-metilbencidrilamina (MBHA) funcionalizada con grupos amino.
5 Sobre dicho soporte sólido se llevan a cabo las reacciones sucesivas de acoplamiento entre los diferentes aminoácidos que integran el péptido.

Dicho procedimiento es bien conocido por el experto en la materia y se encuentra descrito, por ejemplo, en S.A.Kates, F.Albericio Eds., Solid-Phase Synthesis. A practical guide, Marcel Dekker, New York, 2000 [ISBN: 0-8247-0359-6], o en K. Burgess Eds., Solid-Phase Organic Synthesis, Wiley,
10 John & Sons, New York, 1999 [ISBN: 0471318256].

Cuando se emplea la resina MBHA como soporte sólido, habitualmente se incorpora a dicha resina un espaciador bifuncional sensible al medio ácido, que permite el desanclaje en condiciones suaves del péptido una
15 vez sintetizado.

Por ejemplo un espaciador bifuncional apropiado es el Fmoc-Rink-Linker (número CAS: 145469-56-3) comercializado por la empresa Senn Chemicals (Suiza).

Dicho espaciador, una vez se ha unido a través de su grupo carboxílico al grupo amino de la resina MBHA, y se ha eliminado el grupo protector Fmoc, presenta un grupo amino libre que permite el anclaje de un aminoácido que tenga un grupo carboxílico libre.
20

En el mercado se puede adquirir la resina Fmoc-Rink-MBHA en la empresa Senn Chemicals, que ya tiene incorporado el espaciador mencionado.

25 Un procedimiento para la preparación de los péptidos de la invención puede ser por ejemplo el que se describe a continuación.

En dicho procedimiento se utiliza la química del grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) como protector del grupo α -amino de los aminoácidos que se emplean para preparar los péptidos de la invención.

30 Para la protección de la cadena lateral de la lisina (Lys) y del triptófano (Trp) se ha empleado el grupo *terc*-butiloxycarbonilo (Boc). Para la protección de la cadena lateral de la tirosina (Tyr) se ha empleado el grupo *terc*-butilo (t-Bu).

En la primera etapa se procede a la eliminación del grupo protector Fmoc, presente en el grupo amino del espaciador bifuncional. A continua-
35

ción se procede al anclaje del aminoácido leucina, que también tiene el grupo α -amino protegido por el grupo Fmoc.

Antes de proceder al nuevo acoplamiento se elimina el grupo protector Fmoc de la leucina anclada en la resina.

5 El ciclo de acoplamiento-desprotección se repite hasta completar la estructura del péptido.

La incorporación de los dos últimos aminoácidos del péptido se realiza habitualmente mediante 2 o 3 acoplamientos sucesivos con el fin de completar la reacción de acoplamiento del aminoácido con el péptido anclado en la resina.

La escisión del péptido del soporte sólido se realiza en condiciones ácidas, al mismo tiempo que se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el péptido.

Tras un proceso convencional de aislamiento, los péptidos de la invención se obtienen con una buena pureza, habitualmente superior al 90%, determinada por HPLC, en forma de sólidos pulverulentos, y se caracterizan por espectrometría de masas (ESI-MS).

Sorprendentemente se ha comprobado que los péptidos de la invención presentan una actividad antimicrobiana, que es particularmente efectiva frente a microorganismos patógenos de las plantas como son las bacterias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

Forma parte del objeto de la invención la utilización de los péptidos de la invención para la preparación de una composición antimicrobiana.

Preferiblemente los péptidos de la invención se utilizan como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas.

Preferiblemente las bacterias fitopatógenas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos para ser utilizados como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas, se encuentran los péptidos preferidos mencionados anteriormente en este mismo apartado.

Las bacterias mencionadas resultan ser indicadores apropiados para determinar la actividad antimicrobiana de compuestos que son susceptibles de ser empleados para combatir infecciones y enfermedades causadas por bacterias en plantas.

Erwinia amylovora es una bacteria Gram negativa que causa la enfermedad conocida como fuego bacteriano que afecta a las plantas de la familia de las rosáceas, entre las que se encuentran árboles frutales de gran importancia económica como son el manzano y el peral, y plantas ornamentales como el serbal, el espino, y el mostajo. En Europa está catalogada como una bacteria de cuarentena en agricultura. El fuego bacteriano puede afectar a prácticamente todos los órganos de la planta y con frecuencia implica la muerte de los árboles o arbustos enfermos. Actualmente no hay métodos efectivos para el control del fuego bacteriano y es necesario combinar distintas medidas encaminadas a eliminar o reducir el inóculo.

Xanthomonas vesicatoria es una bacteria Gram negativa que provoca la enfermedad denominada mancha bacteriana en plantas de la familia de las solanáceas que tienen una gran importancia económica como son el tomate y el pimiento. Esta enfermedad afecta a hojas, tallos y frutos provocando su marchitez o muerte.

Pseudomonas syringae es una bacteria Gram negativa que causa un gran número de enfermedades denominadas necrosis bacterianas en plantas de cultivos hortícolas y leñosos como frutales. La patogenicidad de *P. syringae* reside en muchos casos en su actividad nucleadora del hielo (INA+) que potencia los daños por helada, y la producción de diversas fitotoxinas como las siringomicinas.

Preferiblemente las plantas que se pueden tratar con los péptidos de la invención se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

Entre los árboles frutales se pueden mencionar los de pepita (manzano, peral), y hueso (melocotonero, albaricoquero, ciruelo, cerezo) y el platanero.

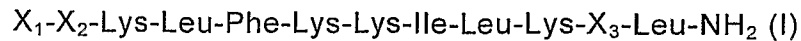
Entre las plantas hortícolas se encuentran las solánaceas (tomate, pimiento, patata) y cucurbitáceas (melón, sandía).

Ejemplos de plantas ornamentales son serbal, clavel, espino albar y mostajo.

Composiciones fitosanitarias

También forma parte del objeto de la invención una composición fitosanitaria que comprende

- un péptido lineal que responde a la fórmula general (I):



en donde

X_1 es hidrógeno, acetilo, *p*-toluensulfonilo, bencilo, o benzoílo,

X_2 es Lys, Tyr, Leu, Phe, o Trp, y

X_3 es Lys, Tyr, Val, Phe, o Trp,

con la condición de que el péptido en donde X_1 es hidrógeno, X_2 es Trp, y X_3 es Val se excluye expresamente, y

- un agente auxiliar.

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos para formar parte de dichas composiciones fitosanitarias, se encuentran los péptidos mencionados como preferidos en el apartado anterior denominado Péptidos.

Las composiciones fitosanitarias de la invención presentan buenas propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas de las plantas.

Habitualmente, en las composiciones antimicrobianas se combinan varios principios activos para obtener una mayor eficacia o un espectro más amplio de actuación. En este caso, las composiciones fitosanitarias de la invención también pueden comprender otros agentes antibacterianos para conseguir mayor eficacia antimicrobiana, como por ejemplo la combinación de varios péptidos de la invención, o su combinación con otras materias activas distintas.

Los péptidos de la invención también se pueden combinar con agentes antifúngicos, y así desplegar una acción antimicrobiana más amplia.

La cantidad de péptido que forma parte de la composición fitosanitaria puede ser variable en función de factores tales como el tipo de planta, la concentración de las bacterias patógenas en la planta, la extensión de la enfermedad, etc. La concentración efectiva del péptido se puede determinar y ajustar fácilmente mediante métodos de rutina bien conocidos por el experto en la materia. Habitualmente la concentración efectiva del péptido se encuentra comprendida entre 0,01 y 0,5 g/l.

El agente auxiliar que acompaña los péptidos de la invención en dichas composiciones fitosanitarias puede tener varias funciones, como por ejemplo, facilitar la dosificación del péptido, proporcionar un producto fácil-

mente manipulable, mejorar el mojado de las plantas con la composición fitosanitaria.

Dicho agente auxiliar puede ser seleccionado entre el grupo formado por: disolventes, diluyentes, cargas inertes, agentes tensioactivos humectantes, agentes tamponantes, agentes dispersantes, agentes antiapelmazantes, lubricantes, filtros de la radiación ultravioleta, y/o mezclas de los mismos.

Preferiblemente el agente auxiliar se selecciona entre el grupo formado por disolventes, tensioactivos, agentes tamponantes, filtros de la radiación ultravioleta y/o sus mezclas.

Más preferiblemente el disolvente es agua.

Las composiciones pueden presentarse en forma líquida o en forma sólida. Por ejemplo, en el caso de formulaciones líquidas, la composición de la invención puede presentarse en forma de una composición diluida lista para ser empleada, o bien en forma de una composición concentrada, que requiere su dilución antes de ser usada, habitualmente con agua.

En el caso de composiciones líquidas acuosas, la presencia de agentes tensioactivos humectantes facilita el mojado de las plantas cuando se pulverizan con dicha composición.

Una ventaja de los péptidos de la invención es que se pueden disolver en agua con facilidad, y se pueden formular generalmente como disoluciones acuosas sin necesidad de emplear disolventes orgánicos adicionales.

Las composiciones en forma sólida pueden ser en forma de gránulos, o polvos, en las que los péptidos de la invención se mezclan con cargas inertes finamente divididas como, por ejemplo, caolín, tierra de diatomeas, dolomita, carbonato cálcico, o talco. También pueden presentarse en forma de polvos o gránulos dispersables, que comprenden un agente humectante para facilitar la dispersión de los mismos en el líquido.

También forma parte del objeto de la invención un método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de plantas causadas por bacterias que comprende poner en contacto la planta con una composición fitosanitaria que incluye los péptidos de la invención.

En el método de la invención la composición fitosanitaria se puede aplicar de forma preventiva a las plantas para evitar la aparición de las infecciones y enfermedades causadas por bacterias. El tratamiento preventivo

tiene su base en que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de bacterias patógenas de las plantas.

En el método de la invención, la composición fitosanitaria también se puede emplear para tratar dichas infecciones y enfermedades una vez se ha detectado su presencia en las plantas, ya que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de las bacterias causantes de dichas infecciones y enfermedades.

En esta descripción el término infección se refiere a la invasión y destrucción de un órgano, por ejemplo, hojas, flores, o frutos, por parte de los microorganismos patógenos. Por tanto, se trata de un proceso localizado. En cambio, el término enfermedad se refiere a un proceso que afecta a la planta, dando lugar a síntomas.

Preferiblemente el método de la invención se emplea para prevenir y tratar infecciones y enfermedades provocadas por bacterias patógenas de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

Preferiblemente las plantas que se pueden tratar con los péptidos de la invención se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

En el método de la invención, la composición se puede poner en contacto con las partes de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por semillas, raíces, tallos, hojas, o frutos, o con el suelo o cualquier medio de crecimiento que rodee las raíces de las plantas.

En el método de la invención, la composición fitosanitaria se puede poner en contacto con la planta por cualquier técnica convencional, entre las que destacan, la pulverización, la inmersión o el riego.

Por ejemplo se puede preparar una disolución acuosa de los péptidos de la invención y proceder a la pulverización de las partes de la planta afectadas o susceptibles de ser afectadas. Si se trata de los frutos de un árbol frutal, por ejemplo, también se puede realizar el tratamiento de los mismos por pulverización o por inmersión antes de su cosecha o en post-cosecha.

El tratamiento de las raíces puede llevarse a cabo por ejemplo empleando una composición sólida en la que los péptidos se encuentran dispersos en una carga inerte, o por pulverización con la mencionada disolución acuosa, o mediante su aplicación por riego.

Ensayos biológicos

La actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención frente a bacterias patógenas para plantas se ha evaluado mediante la determinación de la concentración de péptido mínima necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos. Habitualmente dicha concentración se denomina concentración inhibitoria mínima (CIM).

Este tipo de ensayos es habitual en microbiología y es bien conocido por el experto en la materia. Una descripción de la metodología empleada se encuentra por ejemplo en M.J.Pelczar Jr, E.C.S.Chan, N.R.Krieg, Microbiology: Concepts and Applications. New York: McGraw-Hill, 1997.

Para evaluar dicho efecto antimicrobiano de los péptidos de la invención se emplearon las siguientes cepas de bacterias patógenas: *Erwinia amylovora* PMV6076 (INRA, Angers, Francia), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valencia, España), y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universitat de Girona, España).

Se ha comprobado que las composiciones que comprenden los péptidos de la invención disueltos en agua a concentraciones comprendidas entre 2,5 y 7,5 μM son efectivas para inhibir el crecimiento de bacterias como *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y/o *Pseudomonas syringae*.

Estos resultados demuestran la eficacia de la actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención, ya que en Avrahami *et al*, Biochemistry, 2001, 40, 12591-12603, se describe que una concentración inhibitoria mínima inferior a 50 μM es considerada como significativa.

Los péptidos de la invención son más efectivos frente a dichas bacterias que el péptido descrito por Cavallarin *et al*, definido por la secuencia SEQ_ID_NO:15 y que tiene el extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida, ya que este péptido presenta unas concentraciones inhibitorias mínimas superiores a 7,5 μM , cuando se ensaya frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

La actividad hemolítica de los péptidos es un indicador de la toxicidad en células eucariotas, y una característica que generalmente se determina para aquellos compuestos que pueden llegar a entrar en contacto con el cuerpo humano. Este sería el caso si frutas u hortalizas tratadas con los péptidos de la invención contuvieran restos de los mismos y fuesen consumidos por

las personas, o al ser manipulados por operarios durante su aplicación o preparación.

La mencionada actividad hemolítica se ha evaluado mediante la determinación de la liberación de hemoglobina que se produce al poner en
5 contacto una solución de dichos péptidos en tampón de TRIS con suspensiones de eritrocitos al 5% en volumen/volumen procedentes de sangre humana fresca. El resultado de dicha determinación se expresa como el porcentaje de hemólisis que se produce para una concentración conocida de péptido. Una descripción de la metodología empleada para la determinación de la actividad
10 hemolítica se encuentra en Oren *et al*, Biochemistry, 2000, 39, 6103-6114, y en Raguse *et al*, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 12774-12785.

Se ha comprobado que la gran mayoría de los péptidos de la invención presentan una actividad hemolítica significativa a una concentración que resulta ser entre diez y cien veces superior a la concentración a la que
15 son activos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de las plantas.

La estabilidad de los péptidos a la degradación por proteasas es una característica que permite evaluar que los péptidos se encuentren inalterados en el entorno de la planta durante un tiempo de vida medio razonable. Los péptidos pueden ser degradados tanto por proteasas presentes en el tejido
20 de las plantas como en microorganismos epífitos.

La estabilidad de los péptidos a la degradación por proteasas se ha evaluado mediante el tratamiento de soluciones de los péptidos en tampón TRIS con Proteinasa K (Sigma-Aldrich), y la monitorización de su degradación por HPLC a diferentes intervalos de tiempo. La degradación se expresa como
25 el porcentaje de péptido degradado después de un intervalo de tiempo determinado calculado a partir de la disminución del área del pico del péptido nativo por HPLC. Una descripción de la metodología empleada para la determinación de la estabilidad a proteasas se encuentra en Rozek *et al*, Biochemistry, 2003, 42, 14130-14138.

30 Se ha comprobado que algunos péptidos de la invención son más estables a la degradación por proteasas que el péptido descrito por Cavallarin *et al*.

A continuación, a los efectos de completar de forma suficiente la anterior descripción, se exponen los siguientes ejemplos.

Ejemplos

En los ejemplos que siguen se emplean las siguientes abreviaciones: Ac: acetilo; Ac₂O: anhídrido acético; Bn: benzilo; Boc: *tert*-butiloxycarbonilo; t-Bu: *tert*-butilo; Bz: benzoílo; CIM: concentración inhibitoria mínima; DIEA: N,N-diisopropiletilamina; DMF: N,N-dimetilformamida; EDTA, ácido etilendiaminotetracético; ESI-MS: espectrometría de masas con ionización por electrospray; Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonilo; HBTU: hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-N-metilmetanaminio; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LB: Luria Bertani; MBHA: 4-metilbencidrilamina; NMP: N-metilpirrolidona; TFA: ácido trifluoroacético; TIS: triisopropilsilano; TRIS: tris(hidroximetil)aminometano; Ts: *p*-toluensulfonilo; TSB: Trypticase Soy Broth; UV: ultravioleta.

Los productos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, la resina Fmoc-Rink-MBHA funcionalizada con grupos amino, y HBTU, se obtuvieron de Senn Chemicals. Los productos cloruro de bencilo, cloruro de benzoílo, ácido trifluoroacético, N-metilpirrolidona, y TIS se obtuvieron de Aldrich. Los productos cloruro de tosilo, piperidina y DIEA se obtuvieron de Fluka.

Las siguientes indicaciones sobre el procedimiento para la preparación de los péptidos son de carácter general:

- Se emplearon aminoácidos que tienen el grupo α -amino protegido con el grupo Fmoc.
- Para la protección de la cadena lateral de la lisina y del triptófano se empleó el grupo *tert*-butiloxycarbonilo (Boc). Para la protección de la cadena lateral de la tirosina se empleó el grupo *tert*-butilo (t-Bu).
- Las reacciones se llevaron a cabo en jeringas de 2 o 5 ml que tenían incorporado un filtro microporoso de polipropileno.
- Todas las transformaciones y lavados se llevaron a cabo a 25° C, a no ser que se indique lo contrario.
- El análisis por HPLC se llevó a cabo con un flujo de 1,0 ml/min empleando una columna de fase reversa Kromasil (4,6 x 40 mm; tamaño de partículas de 3,5 μ m). Se emplearon gradientes lineales con TFA acuoso al 0,1% y TFA en acetonitrilo al 0,1%, con una relación comprendida entre 0,98:0,02 y 0,98:0,1 durante un período de tiempo de 7 minutos con detección UV a una longitud de onda de 220 nm.

- Los espectros ESI-MS fueron adquiridos empleando un instrumento quadropolo Navigator; operando en el modo positivo de iones (ES+) con un voltaje en la muestra de 30 kV.
- Todas las relaciones entre los disolventes son volumen/volumen, a no ser que se especifique otro tipo de proporción.

Ejemplo 1.- Preparación de H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula general (I) donde X₁ es hidrógeno (H), X₂ es Lys, y X₃ es Val)

10

En una jeringa de 2 ml de capacidad, equipada con un filtro microporoso en la parte inferior, se colocaron 30 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA con una funcionalización de 0,66 mmol/g, equivalentes a 19,8 μ moles de grupos amino, y se llenó la jeringa con disolvente para hinchar-lavar la resina de acuerdo con la siguiente secuencia: CH₂Cl₂ (1 $\times$ 20 min) y DMF (1 $\times$ 20 min). La expresión CH₂Cl₂ (1 $\times$ 20 min) se refiere a que se realizó 1 lavado de 20 minutos con cloruro de metileno. Después de cada etapa de lavado se eliminó el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold de Promega Distribuidora).

20

Después de hinchar-lavar la resina, ésta se trató con una mezcla de piperidina y DMF (3:7, 1 $\times$ 2 min y 1 $\times$ 10 min) para eliminar el grupo Fmoc presente en el grupo amino del espaciador bifuncional, y, a continuación, se lavó con DMF (6 $\times$ 1 min).

Seguidamente la resina se trató con 21 mg de Fmoc-Leu-OH (59 μ moles), 22 mg de HBTU (59 μ moles) y 11 μ l de DIEA (63 μ moles) en 0,1 ml de DMF. Después de 4 h se lavó la resina con DMF (6 $\times$ 1 min) y se comprobó que el test de ninhidrina era negativo (Kaiser *et al*, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

La eliminación del grupo Fmoc y los lavados subsiguientes se realizaron como ya se ha descrito anteriormente.

El ciclo de acoplamiento-desprotección se repitió para los siguientes cuatro aminoácidos protegidos con el grupo N^α-Fmoc: Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH y Fmoc-Ile-OH. En cada etapa se procedió al lavado con DMF (6 $\times$ 1 min).

35

A partir del quinto aminoácido incorporado, tanto la eliminación del grupo Fmoc, los ciclos acoplamiento-desprotección como los correspon-

dientes lavados se realizaron de la misma manera substituyendo en estos casos la DMF por NMP. Los seis últimos aminoácidos se incorporaron protegidos con el grupo N^α-Fmoc: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH y Fmoc-Leu-OH. Para la incorporación de los dos últimos aminoácidos se realizaron 2-3 acoplamientos sucesivos para obtener un test de ninhidrina negativo.

Después de eliminar el grupo Fmoc del último aminoácido acoplado, como ya se ha descrito anteriormente, se lavó la resina con NMP (6 × 1 min) y CH₂Cl₂ (6 × 1 min), y se obtuvo el péptido lineal unido a la resina, H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA. A continuación se escindió el péptido de la resina mediante un tratamiento con 1 ml de una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5) durante 2 horas. Se recogieron los filtrados en un vial mediante una presión positiva de nitrógeno. La resina se lavó con una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5, 2 × 0,5 ml). Los filtrados se combinaron y se evaporaron casi a sequedad bajo una corriente de nitrógeno hasta obtener un aceite. Dicho aceite se precipitó con éter dietílico, se centrifugó, y el éter se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces. Finalmente, el producto sólido obtenido se disolvió en agua, y se liofilizó.

Se obtuvo un sólido pulverulento que tenía una pureza superior al 90% analizada por HPLC (tiempo de retención 4,39 minutos), y su estructura se confirmó por ESI-MS.

La síntesis de este péptido también se llevó a cabo a mayor escala utilizando 200 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA con una funcionalización de 0,66 mmol/g, equivalentes a 132 μmoles de grupos amino, utilizando el procedimiento descrito en este mismo Ejemplo 1.

25

Ejemplo 2.- Preparación de Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula general (I) donde X₁ es acetilo (Ac), X₂ es Lys, y X₃ es Val)

30

La peptidilresina H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtenida en el Ejemplo 1, se trató con 0,2 ml de una mezcla de anhídrido acético (Ac₂O), piridina y CH₂Cl₂ (1:1:1) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó con CH₂Cl₂ (6 × 1 min).

A continuación, se escindió el péptido de la resina y se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La pureza del péptido obte-

35

nido fue superior al 90% determinada por HPLC (tiempo de retención 4,59 minutos), y su estructura se confirmó por ESI-MS.

5 Ejemplo 3.- Preparación de Ts-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula general (I) donde X₁ es p-toluensulfonilo (Ts), X₂ es Lys, y X₃ es Val)

La peptidilresina H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtenida en el Ejemplo 1, se trató con cloruro de p-toluensulfonilo (TsCl) (792 μ moles) y DIEA (1,58 mmoles) en 0,2 ml de una
10 mezcla de CH₂Cl₂ y NMP (9:1) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó con NMP (6 $\times$ 1 min).

A continuación, se escindió el péptido de la resina y se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La pureza del péptido obtenido fue superior al 90% determinada por HPLC (tiempo de retención 4,89 minutos), y su estructura se confirmó por ESI-MS.
15

Ejemplo 4.- Preparación de Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula general (I) donde X₁ es benzoílo (Bz), X₂ es Lys, y X₃ es Val)
20

La peptidilresina H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtenida en el Ejemplo 1, se trató con cloruro de benzoílo (BzCl) (792 μ moles) y DIEA (1,58 mmoles) en 0,2 ml de una mezcla de CH₂Cl₂ y NMP (9:1) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó con NMP (6 $\times$ 1 min).
25

A continuación, se escindió el péptido de la resina y se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La pureza del péptido obtenido fue superior al 90% determinada por HPLC (tiempo de retención 5,00 minutos), y su estructura se confirmó por ESI-MS.
30

Ejemplo 5.- Preparación de Bn-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula general (I) donde X₁ es bencilo (Bn), X₂ es Lys, y X₃ es Val)

La peptidilresina H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtenida en el Ejemplo 1, se trató con bromuro de bencilo (BnBr) (792 μ moles) y DIEA (1,58 mmoles) en 0,2 ml de una mezcla de CH_2Cl_2 y NMP (9:1) durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó con NMP (6 $\times$ 1 min).

A continuación, se escindió el péptido de la resina y se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La pureza del péptido obtenido fue superior al 90% determinada por HPLC (tiempo de retención 4,73 minutos), y su estructura se confirmó por ESI-MS.

10

Ejemplo 6.- Preparación de una quimioteca de péptidos lineales en fase sólida

Se diseñó una quimioteca para la obtención de 125 péptidos, que responden a la fórmula general (I):



en donde

X_1 es hidrógeno, acetilo, *p*-toluensulfonilo, bencilo, o benzoílo,

X_2 es Lys, Tyr, Leu, Phe, o Trp, y

X_3 es Lys, Tyr, Val, Phe, o Trp,

con la condición de que el péptido en donde X_1 es hidrógeno, X_2 es Trp, y X_3 es Val, se excluye expresamente de los péptidos de la invención.

En cinco jeringas de 5 ml de capacidad, etiquetadas adecuadamente y equipadas con un filtro microporoso en la parte inferior, se colocaron 350 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA con una funcionalización de 0,66 mmol/g, equivalentes a 231 μ moles de grupos amino. Las jeringas se llenaron con disolvente para hinchar-lavar la resina de acuerdo con la siguiente secuencia: CH_2Cl_2 (1 $\times$ 20 min) y DMF (1 $\times$ 20 min). Después de cada etapa de lavado se eliminó el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold de Promega Distribuidora).

Después de hinchar-lavar las resinas, éstas se trataron con una mezcla de piperidina y DMF (3:7, 1 $\times$ 2 min y 1 $\times$ 10 min) para eliminar el grupo Fmoc presente en el grupo amino del espaciador bifuncional, y, a continuación, se lavaron con DMF (6 $\times$ 1 min).

Seguidamente las cinco resinas se trataron con 245 mg de Fmoc-Leu-OH (693 μ moles), 263 mg de HBTU (693 μ moles) y 121 μ l de DIEA (693

μmoles) en 0,8 ml de DMF. Después de 4 h se lavaron las resinas con DMF (6 × 1 min) y se comprobó que el test de ninhidrina era negativo (Kaiser *et al*, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

5 A continuación se eliminó el grupo Fmoc y se realizaron los lavados correspondientes tal y como se ha descrito anteriormente. Seguidamente se acopló a cada resina el aminoácido X₃ correspondiente: Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH o Fmoc-Lys(Boc)-OH, siguiendo el procedimiento empleado para acoplar el aminoácido protegido Fmoc-Leu-OH.

10 La eliminación del grupo Fmoc y los lavados subsiguientes se realizaron como ya se ha descrito anteriormente.

El ciclo de acoplamiento-desprotección se repitió para los siguientes tres aminoácidos. De esta manera se acoplaron secuencialmente: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH y Fmoc-Ile-OH. Estos acoplamientos se
15 realizaron para cada una de las cinco resinas. En cada etapa se procedió al lavado con DMF (6 × 1 min).

A partir del quinto aminoácido incorporado la eliminación del grupo Fmoc, los ciclos acoplamiento-desprotección y los lavados correspondientes se realizaron de la misma manera substituyendo en estos casos el uso de
20 DMF por el de NMP. Siguiendo este procedimiento se acoplaron a cada una de las cinco resinas de manera secuencial dos residuos de Fmoc-Lys(Boc)-OH, uno de Fmoc-Phe-OH y uno de Fmoc-Leu-OH. En cada etapa se procedió al lavado con NMP (6 × 1 min). Para la incorporación del décimo residuo fue necesario un doble acoplamiento para obtener un test de ninhidrina negativo.

25 Una vez acoplado el décimo residuo, cada una de las peptidilresinas confinadas en las cinco jeringas, se dividió en cinco fracciones. Las 25 fracciones obtenidas, correspondientes a aproximadamente 46 μmoles de peptidilresina cada una, se colocaron en 25 jeringas de 2 ml de capacidad, etiquetadas adecuadamente y equipadas con un filtro microporoso en la parte inferior. A continuación se eliminó el grupo Fmoc y se realizaron los lavados
30 correspondientes tal y como se ha descrito anteriormente. A cada una de las cinco fracciones de resina que llevan incorporado el mismo aminoácido X₃ se acopló el residuo X₂ correspondiente: Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc) o Fmoc-Leu-OH. Los acoplamientos se realizaron utilizando 138 μmoles del aminoácido N^α-Fmoc protegido correspon-
35 diente, 138 μmoles de HBTU y 138 μmoles de DIEA en 0,3 ml de NMP. Para la

incorporación de estos aminoácidos fue necesario realizar un doble acoplamiento para obtener un test de ninhidrina negativo.

5 A continuación cada una de las 25 fracciones anteriores se dividió en cinco fracciones iguales. Las 125 fracciones de resina obtenidas, correspondientes a aproximadamente 9,2 μ moles de peptidilresina, se colocaron en 125 jeringas de 2 ml de capacidad, etiquetadas adecuadamente y equipadas con un filtro microporoso en la parte inferior. A continuación se eliminó el grupo Fmoc y se realizaron los lavados correspondientes tal y como ya se ha descrito anteriormente.

10 Cuatro de las cinco fracciones de resina obtenidas a partir de cada una de las 25 fracciones anteriores se derivatizaron en el extremo N-terminal por acetilación, tosilación, benzoilación o bencilación, respectivamente.

15 La acetilación se realizó por tratamiento con 0,2 ml de una mezcla de Ac_2O , piridina y CH_2Cl_2 (1:1:1) durante 1 h a temperatura ambiente.

La tosilación se llevó a cabo por tratamiento con TsCl (368 μ moles) y DIEA (736 μ moles) en 0,2 ml de una mezcla de CH_2Cl_2 y NMP (9:1) durante 1 h a temperatura ambiente.

20 La benzoilación se realizó por tratamiento con BzCl (368 μ moles) y DIEA (736 μ moles) en 0,2 ml de una mezcla de CH_2Cl_2 y NMP (9:1) durante 1 h a temperatura ambiente.

La bencilación se llevó a cabo por tratamiento con BnBr (368 μ moles) y DIEA (736 μ moles) en 0,2 ml de una mezcla de CH_2Cl_2 y NMP (9:1) durante 48 h a temperatura ambiente.

25 Posteriormente a estos tratamientos las resinas se lavaron con NMP (6×1 min).

Finalmente, se procedió a la escisión de los 125 péptidos de la resina en la correspondiente jeringa y al aislamiento de cada uno de ellos siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

30 Los péptidos obtenidos se analizaron por HPLC y se confirmó su estructura por ESI-MS. En todos los casos se obtuvo una pureza superior al 90%.

Ejemplo 7.- Ensayos de actividad antimicrobiana

35 El efecto antimicrobiano de los péptidos de la invención se determinó frente a las siguientes cepas de bacterias patógenas: *Erwinia amylo-*

vora PMV6076 (INRA, Angers, Francia), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valencia, España), y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universitat de Girona, España).

5 Todas las bacterias se conservaron a una temperatura de -80°C en medio Luria-Bertani (LB) complementado con glicerina al 20% en volumen/volumen.

Las suspensiones de *E.amylovora* PMV6076 y *P.syringae* pv. *syringae* EPS94 se obtuvieron después de un crecimiento de 24 horas a 25°C , y la muestra de *X.vesicatoria* 2133-2 se obtuvo después de la incubación durante 48 horas a 25°C en agar LB. En todos los casos se resuspendieron en agua
10 estéril para obtener una suspensión ajustada a una absorbancia de 0,2 a 600 nm, que correspondía aproximadamente a 10^8 unidades formadoras de colonias/ml.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), los
15 péptidos se solubilizaron en agua estéril milli-Q hasta una concentración final de $1000\text{ }\mu\text{M}$ y se filtraron a través de un filtro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de poro.

Se realizaron diluciones de los péptidos de la invención para obtener soluciones a las concentraciones 750, 500, 250, 200, 150, 125, 100, 75, 50 y $25\text{ }\mu\text{M}$.

20 Se mezclaron $20\text{ }\mu\text{l}$ de cada dilución con $20\text{ }\mu\text{l}$ de la suspensión del indicador bacteriano correspondiente, y $160\text{ }\mu\text{l}$ de medio líquido TSB (Trypticase Soy Broth), hasta un volumen total de $200\text{ }\mu\text{l}$ en cada pocillo de una microplaca. Así las concentraciones efectivas a las que se sometían las suspensiones de bacterias fueron 75, 50, 25, 20, 15, 12,5, 10, 7,5, 5 y $2,5\text{ }\mu\text{M}$.

25 Se llevaron a cabo dos réplicas para cada cepa, concentración y péptido en ensayo.

Los controles positivos contenían agua en lugar de péptido, y los controles negativos contenían los péptidos sin la suspensión bacteriana.

El crecimiento microbiano se determinó automáticamente mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm empleando el Microbiology Analyser Bioscreen C (Labsystems).
30

Las microplacas se incubaron a 25°C durante 48 horas con una agitación de 20 segundos antes de la medida de la absorbancia cada hora. Cada experimento se realizó dos veces.

35 Como CIM se tomó la concentración de péptido más baja a la que no se producía crecimiento bacteriano al final del experimento.

En la Tabla II se presenta el rango de concentraciones entre las que se encuentra la CIM, expresada en μM , después de 48 h de incubación a 25° C, para diferentes péptidos de la invención frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*. Los péptidos de la Tabla II se identifican con los parámetros X_1 , X_2 y X_3 que figuran en la fórmula general (I). Además, la Tabla II incluye el número de referencia con relación a la quimioteca preparada en el Ejemplo 6. En la Tabla II se incluyen como Ejemplo comparativo los resultados correspondientes al péptido descrito por Cavallarin *et al*, que no forma parte de la invención:

10

TABLA II

Ref.	X_1	X_2	X_3	<i>P.syringae</i>	<i>X.vesicatoria</i>	<i>E.amylovora</i>
Ejemplo comparativo	H	Trp	Val	>7,5	>7,5	>7,5
BP017	H	Lys	Trp	5-7.5	5-7.5	>7.5
BP100	H	Lys	Tyr	2.5-5	5-7.5	2.5-5
BP095	H	Tyr	Tyr	5-7.5	2.5-5	5-7.5
BP105	H	Leu	Tyr	5-7.5	2.5-5	5
BP090	H	Phe	Tyr	5-7.5	2.5-5	5-7.5
BP020	H	Trp	Tyr	2,5-5	2,5-5	2,5-5
BP015	H	Lys	Val	2,5-5	>7,5	5-7,5
BP033	H	Leu	Val	5-7,5	>7,5	5-7,5
BP076	H	Lys	Phe	2,5-5	2,5-5	2,5-5
BP081	H	Leu	Phe	2,5-5	<2,5	2,5-5
BP066	H	Phe	Phe	5-7,5	2,5-5	2,5-5
BP019	H	Trp	Phe	5-7,5	2,5-5	5-7,5
BP052	H	Lys	Trp	5	2,5-5	2,5-5
BP047	H	Tyr	Trp	5-7,5	2,5-5	5-7,5

BP018	H	Trp	Trp	5-7,5	2,5	5-7,5
BP120	Ac	Tyr	Lys	5-7,5	5-7,5	>7,5
BP101	Ac	Lys	Tyr	5-7,5	2,5	>7,5
BP029	Ac	Lys	Val	5-7,5	7,5	5-7,5
BP077	Ac	Lys	Phe	5-7,5	<2,5	5-7,5
BP053	Ac	Lys	Trp	5-7,5	2,5-5	>7,5
BP038	Ac	Trp	Trp	>7,5	<2,5	>7,5
BP125	Ts	Lys	Lys	2,5-5	2,5-5	>7,5
BP121	Ts	Tyr	Lys	2,5-5	2,5-5	>7,5
BP102	Ts	Lys	Tyr	2,5-5	<2,5	5-7,5
BP097	Ts	Tyr	Tyr	>7,5	<2,5	>7,5
BP030	Ts	Lys	Val	5-7,5	5-7,5	5-7,5
BP078	Ts	Lys	Phe	5-7,5	<2,5	5-7,5
BP054	Ts	Lys	Trp	5-7,5	<2,5	>7,5
BP059	Ts	Leu	Trp	>7,5	2,5	>7,5
BP011	Bn	Trp	Val	5-7,5	2,5-5	5-7,5
BP126	Bz	Lys	Lys	2,5-5	2,5-5	5-7,5
BP122	Bz	Tyr	Lys	5-7,5	2,5-5	>7,5
BP103	Bz	Lys	Tyr	5-7,5	<2,5	7,5
BP031	Bz	Lys	Val	5-7,5	<2,5	2,5-5
BP010	Bz	Trp	Val	>7,5	<2,5	>7,5
BP055	Bz	Lys	Trp	>7,5	<2,5	>7,5

Se puede comprobar que los péptidos de la invención presentan una buena eficacia para inhibir el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria*, y/o *Erwinia amylovora*.

Además la eficacia de los péptidos de la invención es superior a la del péptido ya conocido, cuyos resultados se presentan en la primera fila de la tabla anterior bajo la denominación de Ejemplo comparativo.

5 Ejemplo 8.- Ensayos de actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los péptidos de la invención se evaluó mediante la determinación de la liberación de hemoglobina que se produce al poner en contacto una solución de los péptidos con una suspensión de eritrocitos al 5% en volumen procedentes de sangre humana fresca.

La sangre se recogió asépticamente empleando un sistema Vacutainer® K2E (Belliver, Gran Bretaña) con EDTA, y se almacenó a 4° C durante un período inferior a 2 horas.

La sangre se centrifugó a 6.000g durante 5 minutos para separar los eritrocitos. Éstos se lavaron tres veces con tampón TRIS (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,2), y se suspendieron en tampón TRIS hasta obtener una suspensión que contenía un 10% en volumen de eritrocitos.

Los péptidos se solubilizaron en tampón TRIS hasta una concentración final 100, 300, y 500 µM.

Se emplearon tres réplicas para cada péptido y concentración.

Se mezclaron 65 µl de la suspensión de eritrocitos al 10% en volumen con 65 µl de la solución de péptido en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Micro-Amp® (Applied Biosystems, EE.UU.) (5% en volumen de eritrocitos), y se incubó la mezcla durante 1 h a 37° C bajo agitación. De este modo las suspensiones de eritrocitos se sometieron a concentraciones de péptidos de 50, 150, y 250 µM.

A continuación se centrifugaron las placas a 3.500g durante 10 minutos, y se transfirieron alícuotas de 80 µl del sobrenadante a microplacas de 100 pocillos (Bioscreen), que se diluyeron con 80 µl de agua milli-Q.

El grado de hemólisis se determinó a partir de la absorbancia a 540 nm con un lector de placas Bioscreen.

El control positivo de hemólisis completa se determinó en una solución de tampón TRIS que contenía melitina 200 µM (Sigma-Aldrich, España).

El porcentaje de hemólisis (H) se determinó empleando la ecuación:

$$H = 100 \times [(Op - Ob) / (Om - Ob)]$$

donde O_p era la densidad óptica medida para una concentración de péptido determinada, O_b era la densidad óptica de la solución tampón, y O_m era la densidad óptica para el control positivo con melitina.

- 5 La Tabla III presenta los resultados de actividad hemolítica, expresada como el porcentaje de hemólisis calculado según la ecuación anterior, para concentraciones de péptidos de la invención correspondientes a 50, 150 y 250 μM . Los péptidos de la Tabla III se identifican con los parámetros X_1 , X_2 , y X_3 que figuran en la fórmula general (I). Además la Tabla III incluye el número de referencia con relación a la quimioteca preparada en el Ejemplo 6:

10

TABLA III

Ref.	X_1	X_2	X_3	% Hemólisis 50 μM	% Hemólisis 150 μM	% Hemólisis 250 μM
BP119	H	Tyr	Lys	4	19	45
BP100	H	Lys	Tyr	3	22	43
BP095	H	Tyr	Tyr	7	50	76
BP105	H	Leu	Tyr	14	91	90
BP090	H	Phe	Tyr	11	57	84
BP020	H	Trp	Tyr	78	77	72
BP015	H	Lys	Val	0	16	45
BP033	H	Leu	Val	4	38	68
BP076	H	Lys	Phe	3	34	65
BP081	H	Leu	Phe	10	65	88
BP066	H	Phe	Phe	9	63	89
BP019	H	Trp	Phe	57	94	100
BP128	H	Leu	Lys	2	31	66
BP052	H	Lys	Trp	51	84	79
BP047	H	Tyr	Trp	81	76	82

BP018	H	Trp	Trp	78	68	74
BP124	Ac	Lys	Lys	1	5	23
BP101	Ac	Lys	Tyr	4	31	62
BP096	Ac	Tyr	Tyr	47	86	85
BP077	Ac	Lys	Phe	6	40	81
BP053	Ac	Lys	Trp	60	82	85
BP038	Ac	Trp	Trp	80	86	80
BP125	Ts	Lys	Lys	2	8	23
BP121	Ts	Tyr	Lys	22	81	86
BP102	Ts	Lys	Tyr	39	79	80
BP097	Ts	Tyr	Tyr	83	81	88
BP030	Ts	Lys	Val	25	70	80
BP078	Ts	Lys	Phe	40	85	95
BP126	Bz	Lys	Lys	2	14	24
BP122	Bz	Tyr	Lys	32	78	96
BP103	Bz	Lys	Tyr	42	83	80
BP031	Bz	Lys	Val	34	71	76
BP010	Bz	Trp	Val	77	77	76
BP011	Bn	Trp	Val	81	96	100

En todos los casos se observa que la concentración en la que se llegaría a producir una hemólisis significativa es entre 10 y 100 veces superior a la concentración en la que los péptidos de la invención presentan actividad antimicrobiana.

Ejemplo 9.- Ensayos de estabilidad a la degradación por proteasas

La estabilidad de los péptidos de la invención a la degradación por proteasas se determinó mediante un ensayo de digestión del péptido por Proteinasa K (Sigma-Aldrich Corporation, Madrid, España).

Se empleó una disolución de 50 µg/ml de péptido y de 1 µg/ml de Proteinasa K en tampón TRIS 100 mM a pH 7,6, a temperatura ambiente.

El progreso de la escisión del péptido se determinó cromatográficamente a tiempos comprendidos entre 5 y 45 minutos. Para ello se empleó una columna C₁₈ de fase reversa (Kromasil, 4,6 x 40 mm; 3,5 µm de tamaño de partícula), y gradientes lineales de TFA acuoso al 0,1% y TFA en acetonitrilo al 0,1% desde 0,98:0,02 a 0:1 durante 7 min realizando la detección mediante absorbancia en el ultravioleta a 220 nm.

La Tabla IV presenta los resultados de estabilidad a la degradación por proteasas, expresada como el porcentaje de degradación de cada péptido a los 45 minutos. Los péptidos de la Tabla IV se identifican con los parámetros X₁, X₂, y X₃ que figuran en la fórmula general (I). Además la Tabla IV incluye el número de referencia con relación a la quimioteca preparada en el Ejemplo 6. En la Tabla IV se incluyen como Ejemplo comparativo los resultados correspondientes al péptido descrito por Cavallarin *et al*, que no forma parte de la invención:

TABLA IV

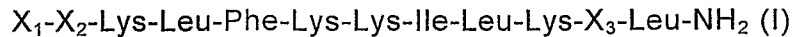
Ref.	X ₁	X ₂	X ₃	% Degradación en 45 minutos
Ejemplo comparativo	H	Trp	Val	100
BP008	Ac	Trp	Val	100
BP077	Ac	Lys	Phe	84
BP009	Ts	Trp	Val	100
BP125	Ts	Lys	Lys	67
BP010	Bz	Trp	Val	100
BP126	Bz	Lys	Lys	53

BP015	H	Lys	Val	100
BP019	H	Trp	Phe	87
BP020	H	Trp	Tyr	85
BP033	H	Leu	Val	100
BP076	H	Lys	Phe	49
BP100	H	Lys	Tyr	60

Se puede observar que algunos péptidos de la invención son más estables frente a la degradación por proteasas que el péptido descrito por Cavallarin *et al* (Ejemplo comparativo). En particular, los péptidos correspondientes a la fórmula general (I) donde X_1 es hidrógeno, X_2 es Lys, y X_3 es Phe, o X_1 es benzoílo, X_2 es Lys y X_3 es Lys, resultan ser dos veces más estables que el péptido del Ejemplo comparativo.

REIVINDICACIONES

1.- Péptidos lineales caracterizados porque responden a la fórmula general (I):



5 en donde

X_1 es hidrógeno, acetilo, *p*-toluensulfonilo, bencilo, o benzoílo,

X_2 es Lys, Tyr, Leu, Phe, o Trp, y

X_3 es Lys, Tyr, Val, Phe, o Trp,

con la condición de que el péptido en donde X_1 es hidrógeno, X_2 es Trp, y X_3
10 es Val, se excluye expresamente.

2.- Péptidos según la reivindicación 1 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 14, y SEQ_ID_NO: 16 a SEQ_ID_NO: 25, y porque tienen el aminoácido del extremo C-terminal en
15 forma de grupo carboxamida.

3.- Péptidos según la reivindicación 2 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 6 a SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 13, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 18 a SEQ_ID_NO: 22, y SEQ_ID_NO: 25, y
20 porque tienen el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

4.- Péptidos según la reivindicación 3 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 6 y SEQ_ID_NO: 16, y porque tienen el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.
25

5.-Péptidos según la reivindicación 1 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo acetilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.
30

6.- Péptido según la reivindicación 5 caracterizado porque está definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 16, y porque tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo acetilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.
35

7.- Péptidos según la reivindicación 1 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

5

8.- Péptidos según la reivindicación 7 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1, 6, 11 y 16, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

10

9.- Péptido según la reivindicación 8 caracterizado porque está definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 1, y porque tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo *p*-toluensulfonilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

15

10.- Péptidos según la reivindicación 1 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo bencilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

20

11.- Péptido según la reivindicación 10 caracterizado porque está definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 15, y porque tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo bencilo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

25

12.- Péptidos según la reivindicación 1 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo benzoílo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

30

13.- Péptidos según la reivindicación 12 caracterizados porque están definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1, y SEQ_ID_NO: 11, y porque tienen el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo benzoílo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.

35

- 14.- Péptido según la reivindicación 13 caracterizado porque está definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 1, y porque tiene el aminoácido del extremo N-terminal funcionalizado con el grupo benzoílo, y el aminoácido del extremo C-terminal en forma de grupo carboxamida.
- 5
- 15.- Utilización de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la preparación de una composición antimicrobiana.
- 16.- Utilización según la reivindicación 15 como agentes antimicrobianos frente
- 10 a bacterias patógenas de las plantas.
- 17.- Utilización según la reivindicación 16 caracterizada porque las bacterias patógenas de las plantas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.
- 15
- 18.- Utilización según las reivindicaciones 16 o 17 caracterizada porque las plantas se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.
- 20
- 19.- Composición fitosanitaria que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un agente auxiliar.
- 20.- Composición según la reivindicación 19 caracterizada porque el péptido se encuentra a una concentración comprendida entre 0,01 y 0,5 g/l.
- 25
- 21.- Composición según las reivindicaciones 19 o 20 caracterizada porque el agente auxiliar se selecciona entre el grupo formado por disolventes, tensioactivos, agentes tamponantes, filtros de la radiación ultravioleta y/o sus mezclas.
- 30
- 22.- Composición según la reivindicación 21 caracterizada porque el disolvente es agua.
- 23.- Método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de plantas causadas por bacterias que comprende poner en contacto la planta con una com-
- 35 posición fitosanitaria según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22.

24.- Método según la reivindicación 23 caracterizado porque las bacterias se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

- 5 25.- Método según las reivindicaciones 23 o 24 caracterizado porque las plantas se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

- 10 26.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 caracterizado porque la composición se pone en contacto con las partes de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por semillas, raíces, tallos, hojas, o frutos, o con el suelo o cualquier medio de crecimiento que rodee las raíces de las plantas.

- 15 27.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 caracterizado porque la composición fitosanitaria se pone en contacto con la planta por pulverización, inmersión o riego.

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/000244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A01N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALI, G.S. et al. "Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: in vitro growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. August 2000, Vol. 13, n° 8, pages 847-859, the whole document, especialmente péptido pep11.	1,5,7,10-12,15-27
Y	ES 2195734 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.12.2003, the whole document.	1,5,7,10-12,15-27
Y	CAVALLARIN. L. et al. "Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. March 1998. Vol. 11, N°. 3, pages 218-227; Fig. 1.	1,5,7,10-12,15-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 October 2007 (01.10.2007)

Date of mailing of the international search report

05-10-2007

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. +34 91 349 84 66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/000244

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIN, S.Y. et al. "Antibacterial, antitumor and hemolytic 1-27 activities of alpha-helical antibiotic peptide, P18 and its analogs". JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH. December 2001, Vol. 58, n° 6, pages 504-514, the whole document.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/000244

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2195734 AB	01.12.2003	WO 03008442 A	30.01.2003

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2007/000244

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, A01N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	ALI, G.S. et al. "Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: in vitro growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. Agosto 2000, Vol. 13, nº 8, páginas 847-859, todo el documento, especialmente péptido pep11.	1,5,7,10-12,15-27
Y	ES 2195734 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.12.2003, todo el documento.	1,5,7,10-12,15-27
Y	CAVALLARIN. L. et al. "Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. Marzo 1998. Vol. 11, Nº. 3, páginas 218-227; Fig. 1.	1,5,7,10-12,15-27

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

01 Octubre 2007 (01.10.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05 Octubre 2007 (05-10-2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono +34 91 349 84 66

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2007/000244

C (continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SHIN, S.Y. et al. .Antibacterial, antitumor and hemolytic 1-27 activities of alpha-helical antibiotic peptide, P18 and its analogs". JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH. Diciembre 2001, Vol. 58, nº 6, páginas 504-514, todo el documento.	1-27

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2007/000244

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES 2195734 AB	01.12.2003	WO 03008442 A	30.01.2003

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/435 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)