

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 601**

51 Int. Cl.:

A01N 37/46 (2006.01)
A01N 63/10 (2010.01)
A01N 63/50 (2010.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07K 16/14 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2021** **PCT/EP2021/058548**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2021** **WO21198396**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2021** **E 21715638 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024** **EP 4125379**

54 Título: **Polipéptidos antifúngicos**

30 Prioridad:

31.03.2020 EP 20167432
31.12.2020 EP 20218017

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2024

73 Titular/es:

BIOTALYS NV (100.0%)
Buchtenstraat 11
9051 Gent, BE

72 Inventor/es:

BELOGLAZOVA, NATALIA;
REVETS, HILDE ADI PIERRETTE;
STANSSENS, PATRICK y
VAN DAELE, INGE ELODIE

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 992 601 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos antifúngicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con una composición que comprende al menos un polipéptido, que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO:2, polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo, y a dicho al menos un polipéptido mismo. La invención también está relacionada con el uso de la composición como un agente antifúngico. La invención además está relacionada con un método para proteger o tratar una planta o una parte de dicha planta contra una infección con un hongo fitopatógeno, un método de tratamiento poscosecha para proteger o tratar una planta cosechada o una parte cosechada de dicha planta de una infección con un hongo fitopatógeno y un método para inhibir el crecimiento o eliminar un hongo fitopatógeno, que comprende al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a una planta o a una parte de dicha planta la composición o el polipéptido. Además, la invención está relacionada con un método para preparar un polipéptido antifúngico y con un método para preparar una composición antifúngica.

Antecedentes

20 La presencia y persistencia de infecciones fúngicas patogénicas observadas en pacientes y animales, pero también en cultivos vegetales puede atribuirse principalmente a la presión selectiva de antifúngicos de amplio espectro y la falta general de eficacia de los agentes antifúngicos, que están disponibles en la actualidad.

25 En seres humanos y animales, las infecciones fúngicas sistémicas tales como la candidiasis invasiva y la aspergilosis invasiva se pueden producir por una variedad de patógenos fúngicos, por ejemplo, las virulentas especies *Candida C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* y las especies menos virulentas *C. parapsilosis* y *Torulopsis glabrata* (esta última a veces denominada *Candida glabrata*). Aunque *C. albicans* fue alguna vez el aislado fúngico más común obtenido en las unidades de cuidados intensivos, estudios posteriores han indicado que aproximadamente la mitad de dichos aislados ahora corresponden a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. El alza de especies no *albicans* implica la emergencia de especies de *Candida* resistentes a los tratamientos antifúngicos convencionales.

35 Tradicionalmente, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* han sido tratadas con el agente antifúngico anfotericina B, considerado la "regla de oro" de los tratamientos antifúngicos sistémicos. Desafortunadamente, la anfotericina B es en sí misma altamente tóxica y su uso está moderado por los efectos secundarios que incluyen escalofríos, fiebre, mialgia o tromboflebitis. Otros agentes antifúngicos incluyen los fármacos orales de azol (miconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol) y 5-fluorocitosina. No obstante, especies fúngicas tales como *C. krusei* y *T. glabrata* son resistentes al fluconazol, y estas especies aparecen a menudo en pacientes a los cuales se les han administrado estos fármacos de modo profiláctico. 40 Asimismo, también se ha informado acerca de cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol. Por lo tanto, a pesar de los avances realizados en los fármacos para tratamientos antifúngicos, persiste la aguda necesidad de agentes eficaces para el tratamiento de infecciones fúngicas.

45 En la agricultura, la protección de los cultivos se basa fundamentalmente en el uso de pesticidas, que se aplican a los cultivos mediante su rociado sobre los cultivos, aplicándolos durante el riego de los cultivos o incorporándolos al suelo. Los pesticidas a menudo son moléculas químicas orgánicas y su aplicación repetida en los cultivos representa amenazas de toxicidad tanto para los agricultores durante la manipulación como para el medioambiente, debido a la deriva del rociado, la persistencia en el suelo o el escurrimiento en la superficie o hacia el agua subterránea. Sería ventajoso poder usar compuestos alternativos que fuesen menos tóxicos para los seres humanos y el medioambiente, pero que al mismo tiempo proporcionasen un eficaz control de plagas vegetales. Los pesticidas proteicos con especificidad contra un determinado objetivo de una plaga vegetal pueden ser muy ventajosos a este respecto, ya que se espera que tengan corta vida en el medioambiente y que tengan menos efectos tóxicos no específicos. No obstante, solo existen unos pocos pesticidas proteicos o peptidérgicos conocidos. Algunos ejemplos son las toxinas Bt, lectinas, defensinas, 50 fabatinas, taquiplésina, magainina, harpina (véase el documento WO2010019442), subunidad b de albúmina de guisante 1 (PA1b). No obstante, estos pesticidas proteicos son péptidos pequeños con estructuras compactas, estabilizados por varios puentes disulfuro, o son proteínas más grandes (>300 aminoácidos) que se presentan en forma de cristales (toxinas cry). Es sabido, por cierto, en el campo de la agricultura que los productos biológicos, y en particular las proteínas, son estructuras complejas para el desarrollo de pesticidas, ya que, en general, tienen muy poca estabilidad para mantener su función pesticida en una formulación agroquímica, en particular en aplicaciones en el terreno. Los documentos WO2014/177595 y WO2014/191146 son 2 publicaciones que describen polipéptidos de unión a glucosilceramida con un efecto antifúngico, que se usan en el presente documento como ejemplo comparativo (véase el Ejemplo 6).

Características de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado exitosamente polipéptidos que sorprendentemente tienen alta especificidad, afinidad y potencia frente a objetivos de plagas, en particular, plagas patogénicas vegetales, animales o humanas, tales como, entre otras, hongos patogénicos vegetales, animales o humanos. El polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 puede unirse a una fracción lipídica específica de la membrana celular de una espora fúngica. La mera unión del polipéptido puede ser suficiente para la actividad fungicida a través del retardo del crecimiento y/o la lisis y la explosión de esporas, evitando así la formación de micelio. Por lo tanto, el polipéptido puede tener actividad fungicida o fungistática.

Asimismo, estos polipéptidos retienen su integridad, estabilidad y actividad en una composición y ese eficaz control de plagas o patógeno se puede lograr sorprendentemente con la aplicación de composiciones, que comprenden los polipéptidos divulgados en la presente solicitud, a cultivos, animales o seres humanos.

La eficacia y la potencia de los polipéptidos según se divulgan en la presente sugiere un potencial tanto para una dosificación de tratamiento más baja como para un tratamiento más eficaz con la misma dosis. Esto puede implicar una reducción de efectos secundarios no deseados y toxicidad reducida tanto en aplicaciones agroquímicas como médicas. Asimismo, esto permite la aplicación de cantidades o dosis menores de los polipéptidos o las composiciones divulgados en la presente.

Más particularmente, los inventores de la presente invención han descubierto que el direccionamiento hacia una estructura molecular de una plaga o un patógeno con los polipéptidos contemplados en la presente permite el control eficaz de ese patógeno.

En particular, los inventores de la presente invención han desarrollado polipéptidos que son capaces de prevenir, proteger, tratar o curar una planta, un animal o un ser humano de (desarrollar) una infección por un patógeno o de cualquier interacción biológica con un patógeno, en particular un patógeno fúngico. Por lo tanto, la presente invención demuestra que las moléculas biológicas, tales como polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, se pueden usar para proteger o tratar eficazmente una planta, un animal o un ser humano de sufrir alguna forma de daño o de sufrir la interacción biológica entre la planta, el animal o el ser humano y un patógeno, tal como por ejemplo a través de la infección por un patógeno.

Los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden usar como productos autónomos, por ejemplo, composiciones autónomas, tales como una composición antifúngica.

Los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden usar de manera preventiva o profiláctica, es decir, la primera aplicación se produce antes de la presencia de la enfermedad.

Los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden usar como fungicidas de contacto.

De acuerdo con la invención, por lo tanto, se proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo. Por lo tanto, el polipéptido provoca el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo. Es decir, la unión del polipéptido con un hongo da como resultado el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo.

También se proporciona un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo. Por lo tanto, el polipéptido provoca el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo. Es decir, la unión del polipéptido con un hongo da como resultado el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo.

Los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella pueden unirse (específicamente) a una membrana de un hongo o a un componente de una membrana de un hongo. En algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella no se unen (específicamente) a una pared celular o a un componente de una pared celular de un hongo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella no se unen (específicamente) a la glucosilceramida de un hongo.

La invención también proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, donde dicho al menos un polipéptido es capaz de unirse a una fracción lipídica de la membrana plasmática de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo). Dicha fracción lipídica puede obtenerse mediante cromatografía. Por ejemplo, dicha fracción lipídica puede obtenerse por un método que comprende:

fraccionar las hifas de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina y la selección de la fracción con un Factor de Retención (R_f, por sus

siglas en inglés) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

La invención también proporciona un polipéptido, donde dicho al menos un polipéptido es capaz de unirse a una fracción lipídica de la membrana plasmática de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo). Dicha fracción lipídica puede obtenerse mediante cromatografía. Por ejemplo, dicha fracción lipídica puede obtenerse por un método que comprende:

fraccionar hifas de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina y la selección de la fracción con un Factor de Retención (Rf) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

Asimismo, la invención proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido, polipéptido el cual comprende la secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 2 y polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo.

De acuerdo con la invención, además se proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, polipéptido el cual comprende: una región CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 52, una región CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 68, y una región CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 84 y dicho polipéptido es capaz de unirse a un hongo.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 2, donde dicho polipéptido es capaz de unirse a un hongo; y un polipéptido que comprende las SEQ ID Nos: 1 o 2 que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 52, una región CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 68, y una región CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 84, donde dicho polipéptido es capaz de unirse a un hongo.

Cualquiera de los polipéptidos de la invención se puede proporcionar en una composición, por ejemplo, una composición agroquímica.

Una composición como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un anticuerpo o un fragmento funcional de este, tal como, entre otros, un anticuerpo de cadena pesada o un fragmento funcional de este y donde dicho al menos un anticuerpo o fragmento funcional de este comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Una composición como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada (V_{HH}), el cual está naturalmente desprovisto de cadenas ligeras o un fragmento funcional de este, tal como, entre otros un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada de camélido (V_{HH} de camélido) o un fragmento funcional de este y donde dicho V_{HH} o fragmento funcional de este comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Una composición como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un dominio variable de cadena pesada camelizado de un anticuerpo convencional con cuatro cadenas (V_H camelizado), o un fragmento funcional de este y donde dicho V_H o fragmento funcional de este comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

Una composición como se divulga en la presente invención puede ser una composición agroquímica.

Una composición agroquímica como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, que se une específicamente con al menos un componente de la membrana plasmática de un hongo.

El al menos un componente de la membrana plasmática del hongo al cual el polipéptido comprendido en la composición como se divulga en la presente invención se une puede no ser una proteína.

El al menos un polipéptido en la composición agroquímica divulgada en la presente, puede estar presente en una cantidad eficaz para proteger o tratar a un ser humano o un animal o una planta o una parte de cualquiera de estos de una infección u otra interacción biológica con un patógeno fúngico, tal como, por ejemplo, entre otros a la concentración del polipéptido en la composición agroquímica comprendida entre el 0,0001 % y el 50 % en peso.

El al menos un polipéptido en las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención puede estar formulado en una solución acuosa, opcionalmente, entre otros, junto con portador adecuado y/o uno o más adyuvantes adecuados, tal como un portador agroquímicamente adecuado y/o uno o más adyuvantes adecuados.

Una composición agroquímica como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un polipéptido, el cual se une específicamente a un hongo patógeno, es decir, un hongo fitopatógeno.

Una composición agroquímica como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un polipéptido que se une específicamente a un hongo fitopatógeno, tal como, entre otros, un hongo fitopatógeno de un género seleccionado del grupo que comprende *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Gaeumannomyces*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nectria*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Phoma*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Podosphaera*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Scerotium*, *Sclerotinia*, *Septoria*, *Thielaviopsis*, *Ucinula*, *Venturia*, *Verticillium*, *Magnaporthe*, *Blumeria*, *Mycosphaerella*, *Ustilago*, *Melampsora*, *Phakospora*, *Monilinia*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus*.

Una composición agroquímica como se divulga en la presente invención puede comprender al menos un polipéptido, que se une específicamente a un hongo, el cual es un hongo para una planta seleccionada del grupo que comprende cereales, sorgo, arroz, remolacha azucarera, remolacha forrajera, frutos, nueces, la familia de plátanos o vides, cultivos leguminosos, cultivos oleosos, cucurbitáceas, plantas con fibra, cultivos para biocombustibles, vegetales, ornamentales, arbustos, árboles de hoja ancha, plantas perennes, pastos, café, té, tabaco, lúpulo, pimienta, goma y plantas que tienen látex.

El al menos un polipéptido en la composición agroquímica divulgada en la presente, puede al menos comprender:

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIFSINAMDWYRQAPGKQREWVAGITRGGTTKYADSVKGRFTISRD
NAKKKVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVLRGEQPWTRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 1);

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIFSINAMDWYRQAPGKQREWVAGITRGGTTKYADSVKGRFTISRD
NAKKKVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVLRGEQPWTRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 2);

polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo.

El al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención puede al menos comprender la secuencia de aminoácidos de una región CDR1 que tiene la secuencia RSIFSINAMD (SEQ ID NO: 52), una región CDR2 que tiene la secuencia GITRGGTTK (SEQ ID NO: 68), y una región CDR3 que tiene la secuencia LRGEQPWTRDY (SEQ ID NO: 84) y dicho polipéptido es capaz de unirse a un hongo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones que comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, el cual se une específicamente a un hongo, para usar como un agente antifúngico. La presente invención también proporciona los polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, que se unen específicamente a un hongo, para usar como un agente antifúngico.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido, polipéptido el cual comprende:

una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1 o 2 y polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo para usarlo como un agente antifúngico.

La invención también proporciona el uso de una composición que comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 como un agente antifúngico. Tal uso puede ser como un agente antifúngico en una planta. Por consiguiente, la presente invención proporciona usos de composiciones agroquímicas que comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, el cual se une específicamente a un hongo, como un agente antifúngico en plantas.

En la invención, un agente antifúngico puede ser un agente fungistático y/o un agente fungicida.

La invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

También, la presente invención proporciona métodos para proteger o tratar una planta o una parte de una planta de una infección con un hongo fitopatógeno, donde los métodos al menos comprenden el paso de aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta, una composición agroquímica o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. La composición agroquímica o el polipéptido se puede aplicar en condiciones eficaces para proteger o tratar la planta o parte de la planta frente a la infección con dicho hongo fitopatógeno.

Estos métodos pueden comprender aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta una composición agroquímica o un polipéptido como se divulga en la presente invención, por ejemplo, con una tasa de aplicación mayor que 50 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, tal como, entre otras, una tasa de aplicación mayor a 75 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, tal como una tasa de aplicación mayor que 100 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, o en particular una tasa de aplicación mayor que 200 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea.

Estos métodos pueden comprender aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta una composición agroquímica o un polipéptido como se divulga en la presente invención, por ejemplo, con una tasa de aplicación entre 50 g y 100 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, tal como, entre otras, una tasa de aplicación entre 50 g y 200 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, en particular una tasa de aplicación entre 75 g y 175 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea, tal como entre 75 g y 150 g de la composición agroquímica o el polipéptido por hectárea o entre 75 g y 125 g por hectárea.

Las composiciones agroquímicas o los polipéptidos como se divulgan en la presente pueden aplicarse directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta mediante rociado, atomizado, espumado, nebulizado, cultivo en hidrocultivo, cultivo en hidroponía, recubrimiento, sumersión, y/o incrustación, opcionalmente poscosecha.

La presente invención también proporciona métodos de tratamiento poscosecha para proteger o tratar una planta cosechada o una parte cosechada de la planta de una infección con un hongo fitopatógeno, que al menos comprende el paso de aplicar directa o indirectamente a la planta cosechada o a una parte cosechada de la planta, una composición agroquímica o un polipéptido como se describe en la presente, en condiciones eficaces para proteger o tratar la planta cosechada o una parte cosechada de la planta frente a la infección con el hongo fitopatógeno.

La presente invención también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un hongo fitopatógeno o métodos para eliminar un hongo fitopatógeno, los métodos comprenden al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a una planta o a una parte de la planta, una composición agroquímica o un polipéptido como se divulga en la presente invención.

En estos métodos, las composiciones agroquímicas o los polipéptidos como se divulgan en la presente pueden aplicarse directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta mediante rociado, atomizado, espumado, nebulizado, cultivo en hidrocultivo, cultivo en hidroponía, recubrimiento, sumersión, y/o incrustación, opcionalmente poscosecha.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el control basado en IncuCyte del crecimiento fúngico en presencia de dosis ascendentes de VHH 10G11Q.

Figura 2. Control basado en IncuCyte del crecimiento fúngico en presencia de dosis ascendentes de VHH 10G11Q y 41D01.

La figura 3 muestra la actividad antifúngica de sustituciones simples de aminoácidos en las regiones CDR de 10G11 (SEQ ID NO: 17 a 50). Se brindan los resultados relativos a la actividad 10G11.

La figura 4 muestra la actividad antifúngica de la variante marcada con his de 10G11Q-His (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 17-50). Se brindan los resultados relativos a la actividad 10G11Q.

La figura 5 muestra una estructura proteica modelo de la molécula 10G11 con indicación de las 3 regiones CDR. Las presentaciones de cintas con residuos aminoácidos seleccionados se muestran como un modelo de varillas.

La figura 6 muestra la actividad antifúngica de variantes con carga 10G11. Se brindan los resultados relativos a la actividad 10G11.

La figura 7 muestra una estructura proteica modelo mutante 9 de la variante con carga 10G11 (SEQ ID NO: 14) con indicación de las 3 regiones CDR. Las presentaciones de cintas con residuos aminoácidos sustituidos se muestran como un modelo de varillas.

La figura 8 muestra una estructura proteica modelo mutante 11 de la variante con carga 10G11 (SEQ ID NO: 16) con indicación de las 3 regiones CDR. Las presentaciones de cintas con residuos aminoácidos sustituidos se muestran como un modelo de varillas.

La figura 9 presenta los resultados de un prolongado ensayo antifúngico que muestra el efecto de los mutantes 3, 9 y 11 y la molécula 10G11.

La figura 10 muestra una separación por cromatografía de capa fina de las 4 fracciones diferentes presentadas en una extracción de lípidos totales.

La figura 11 muestra el resultado de la unión de 10G11 a vesículas de liposomas de diferentes composiciones que contienen la molécula fluorescente DPD.

La figura 12 muestra el perfil de unión de 10G11 a la Fracción 3 en comparación con un VHH de referencia

según se obtuvo mediante interferometría de biocapa (BLI).

La figura 13 muestra la unión de 10E11Q-His (SEQ ID NO: 86), 12C03Q-His (SEQ ID NO: 87) y 10G11Q-His (SEQ ID NO: 88) a la Fracción 3 según se obtuvo mediante ELISA.

La figura 14 muestra imágenes de microscopía de Botrytis cinerea sin tratamiento y tratada con 10G11. En el lateral derecho se proporciona una imagen aumentada de Botrytis cinerea tratada. La figura 15 muestra la evolución de % PESSEV de roya asiática de la soja en canopia baja después de la aplicación de diferentes compuestos.

La figura 16 muestra la evolución de PESSEV % de roya asiática de la soja en canopia media después de la aplicación de diferentes compuestos.

La figura 17 muestra la evolución de PESSEV % de roya asiática de la soja en canopia superior después de la aplicación de diferentes compuestos.

La figura 18 muestra la evolución de la gravedad de antracnosis en calabaza después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 19 muestra la evolución de la gravedad de Botrytis cinerea en racimos de uva después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 20 muestra la evolución de la gravedad de moho pulverulento en hojas de vid después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 21 muestra la evolución de la gravedad de moho pulverulento en racimos de uva después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 22 muestra la evolución de la gravedad de moho pulverulento en tomate después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 23 muestra la evolución de la incidencia de moho pulverulento en tomate después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 24 muestra la evolución de la gravedad de moho pulverulento en fresa después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 25 muestra la evolución de la incidencia de moho pulverulento en fresas después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 26 muestra el número de frutos de fresa infectados con Botrytis al momento de la cosecha después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 27 muestra la evolución de la gravedad de Botrytis en frutos de fresa en la poscosecha después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 28 muestra la evolución de la gravedad de moho pulverulento en fresa después de la aplicación de diversos compuestos.

La figura 29 muestra un gráfico ELISA de absorción usado para determinar la Kd.

La figura 30 muestra las secuencias de algunos de los polipéptidos de la invención, indicando los números de SEQ ID para las secuencias de longitud completa y las ubicaciones de las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En el caso de discrepancias entre las secuencias de esta figura y las secuencias del listado de secuencias, prevalecerán las secuencias de la figura.

La figura 31 muestra la actividad antifúngica de 10G11 con una sustitución de la totalidad de CDR2 a su secuencia de línea germinal y 10G11 con una sustitución de la totalidad de la región CDR3 con la CDR3 de un VHH de referencia. Se brindan los resultados relativos a la actividad 10G11.

Descripción del listado de secuencias

El listado de secuencias proporciona al menos las siguientes secuencias de la tabla 9 (las SEQ ID NOs: 3 a 51, 53 a 67, 69 a 83 y 85 a 111 no se incluyen en el redactado de las reivindicaciones):

VHH	Secuencia completa SEQ ID NO:	CDR1 SEQ ID NO:	CDR2 SEQ ID NO:	CDR3 SEQ ID NO:
10G11Q	1	52	68	84
10G11	2	52	68	84
10E11Q	3	53	69	85
10E11	4	53	69	85
12C03Q	5	54	70	86
12C03	6	54	70	86
Mutante 1	7	55	68	84
Mutante 2	8	52	71	84
Mutante 3	9	52	68	87
Mutante 4	10	55	71	87
Mutante 5	11	55	71	87
Mutante 6	12	56	68	84
Mutante 7	13	52	68	88
Mutante 8	14	56	68	88
Mutante 9	15	57	68	84

VHH	Secuencia completa SEQ ID NO:	CDR1 SEQ ID NO:	CDR2 SEQ ID NO:	CDR3 SEQ ID NO:
Mutante 10	16	52	68	89
Mutante 11	17	57	68	89
Mutante 1 solo ALA	18	58	68	84
Mutante 2 solo ALA	19	59	68	84
Mutante 3 solo ALA	20	60	68	84
Mutante 4 solo ALA	21	61	68	84
Mutante 5 solo ALA	22	62	68	84
Mutante 6 solo ALA	23	63	68	84
Mutante 7 solo ALA	24	64	68	84
Mutante 8 solo ALA	25	65	68	84
Mutante 9 solo ALA	26	66	68	84
Mutante 10 solo ALA	27	67	68	84
Mutante 11 solo ALA	28	52	72	84
Mutante 12 solo ALA	29	52	73	84
Mutante 13 solo ALA	30	52	74	84
Mutante 14 solo ALA	31	52	75	84
Mutante 15 solo ALA	32	52	76	84
Mutante 16 solo ALA	33	52	77	84
Mutante 17 solo ALA	34	52	78	84
Mutante 18 solo ALA	35	52	79	84
Mutante 19 solo ALA	36	52	80	84
Mutante 20 solo ALA	37	52	81	84
Mutante 21 solo ALA	38	52	82	84
Mutante 22 solo ALA	39	52	83	84
Mutante 23 solo ALA	40	52	68	84
Mutante 24 solo ALA	41	52	68	90
Mutante 25 solo ALA	42	52	68	91
Mutante 26 solo ALA	43	52	68	92
Mutante 27 solo ALA	44	52	68	93
Mutante 28 solo ALA	45	52	68	94
Mutante 29 solo ALA	46	52	68	95
Mutante 30 solo ALA	47	52	68	96
Mutante 31 solo ALA	48	52	68	97
Mutante 32 solo ALA	49	52	68	98
Mutante 33 solo ALA	50	52	68	99
Mutante 34 solo ALA	51	52	68	100
10G11-A	101	112	123	134
10G11-B	102	113	124	135
10G11-C	103	114	125	136
10G11-D	104	115	126	137
10G11-E	105	116	127	138
10G11-F	106	117	128	139
10G11-G	107	118	129	140
10G11-H	108	119	130	141
10G11-I	109	120	131	142
10G11-J	110	121	132	143
10G11-K	111	122	133	144

Tabla 9: Correlación entre Nos. de SEQ ID y el polipéptido y las secuencias CDR (las SEQ ID NOs: 3 a 51, 53 a 67, 69 a 83 y 85 a 144 no se incluyen en el redactado de las reivindicaciones).

5 Descripción detallada de la invención

La referencia a cualquier técnica conocida en esta memoria descriptiva no es, ni deberá considerarse como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica conocida forma parte del conocimiento común general en país alguno.

10

A menos que se definan de otra manera, todos los términos usados para divulgar la invención, incluso los términos técnicos y científicos, tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien con capacitación normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones en particular pero la invención no está limitada a ellas sino únicamente a las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no se deberá interpretar como una limitación del alcance.

Definiciones

Cuando se usa la expresión "que comprende" en la presente descripción y reivindicaciones, esta no excluye otros elementos o pasos.

Cuando se usa un artículo indefinido o definido para hacer referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "un", "una", "uno", "el", "la", este incluye un plural de ese sustantivo a menos que específicamente se indique lo contrario.

El término "aproximadamente" como se usa en la presente cuando se hace referencia a un valor mensurable tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, significa que abarca variaciones de $\pm 10\%$ o menos, preferentemente $\pm 5\%$ o menos, más preferentemente $\pm 1\%$ o menos, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ o menos de y desde el valor especificado, en tanto que sea apropiado realizar tales variaciones en la invención divulgada. Se ha de entender que el valor al cual se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga en sí mismo específica y preferentemente.

Los términos y las definiciones a continuación se proporcionan únicamente para ayudar a comprender la invención. A menos que se definan específicamente en la presente, todos los términos usados en esta solicitud tienen el mismo significado que tendrían para un experto en la técnica de la presente invención. Se indica a los profesionales que se remitan en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{da} ed., Cold Spring Harbor Press, Plainville, New York (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Suplemento 47), John Wiley & Sons, New York (1999), para obtener definiciones y términos de la técnica. No deberá interpretarse que las definiciones proporcionadas en la presente tienen un alcance menor que el comprendido por una persona con capacitación normal en la técnica.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y han sido realizados en una forma conocida por sí misma, como resultará evidente para un experto. Se hace referencia nuevamente a los manuales convencionales, a la técnica antecedente general mencionada anteriormente y a las referencias adicionales citadas en la presente.

Como se usan en la presente, las expresiones "polipéptido", "proteína", "péptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos derivados o modificados química o biológicamente, y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados.

Como se usan en la presente, los residuos aminoácidos se indicarán tanto por su nombre completo o de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra.

Como se usan en la presente, las expresiones "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido", "ácido polinucleico", "ácido nucleico" se usan de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus análogos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de un gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, regiones de control, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos, y cebadores. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular.

Como se usa en la presente, el término "homología" denota al menos similitud estructural secundaria entre dos macromoléculas, en particular entre dos polipéptidos o polinucleótidos, del mismo taxón o de diferentes taxones, donde dicha similitud se debe a ancestros en común. Por lo tanto, el término "homólogos" denota macromoléculas relacionadas de esa forma que tienen dicha similitud estructural secundaria y opcionalmente terciaria. Para comparar dos o más secuencias de nucleótidos, la "identidad de secuencia (porcentual)" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular usando métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, dividiendo el número de nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos por el número total de nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos y multiplicando por 100% o usando un algoritmo de cálculo conocido para el alineamiento de secuencias tal como NCBI Blast. Para determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tomar en cuenta las así llamadas sustituciones de aminoácidos

"conservativas", que se pueden describir en general como sustituciones de aminoácidos en las cuales un residuo aminoacídico se reemplaza con otro residuo aminoacídico con estructura química similar y el cual tiene escasa o esencialmente ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades del polipéptido. El experto en la técnica tendrá en claro cuáles son las sustituciones conservativas de aminoácidos posibles. Se dice que secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos son "exactamente iguales" si tienen 100 % de identidad de secuencia en toda su longitud.

Como se usan en la presente, las expresiones "región determinante de complementariedad" o "CDR" dentro del contexto de los anticuerpos se refieren a regiones variables tanto de cadenas H (pesadas) como de cadenas L (ligeras) (también abreviadas VH y VL, respectivamente) y contienen las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente con objetivos antigénicos. Estas regiones CDR determinan la especificidad básica del anticuerpo para una estructura particular determinante antigénica. Dichas regiones también se denominan "regiones hipervariables". Las CDR representan segmentos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha descubierto que las ubicaciones posicionales de estas secuencias críticas de aminoácidos dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas variables pesada y ligera de todos los anticuerpos canónicos tienen 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) por las respectivas cadenas ligera (L) y pesada (H).

El término "afinidad", como se usa en la presente, se refiere al grado en el cual un polipéptido, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un VHH, se une a un antígeno para cambiar el equilibrio del antígeno y el polipéptido hacia la presencia de un complejo formado por su unión. Así, por ejemplo, cuando un antígeno y un anticuerpo (fragmento) se combinan en una concentración relativamente equivalente, un anticuerpo (fragmento) con alta afinidad se unirá con el antígeno disponible para cambiar el equilibrio hacia una alta concentración del complejo resultante. Comúnmente se emplea la constante de disociación para describir la afinidad entre el dominio de unión de una proteína y el objetivo antigénico. Generalmente, la constante de disociación es menor que 10^{-5} M. Preferentemente, la constante de disociación es menor que 10^{-6} M, más preferentemente, menor que 10^{-7} M. Con la mayor preferencia, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M.

Las expresiones "unir específicamente" y "unión específica", como se usan en la presente, se refieren generalmente a la capacidad de un polipéptido, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un VHH, para unirse preferencialmente a un antígeno en particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes antígenos. En ciertas realizaciones, una interacción de unión específica discriminará entre antígenos deseables e indeseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1.000 o 10.000 veces).

Por consiguiente, se dice que una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención se "une específicamente a" un objetivo particular cuando esa secuencia de aminoácidos tiene afinidad por, especificidad por y/o está específicamente dirigida contra ese objetivo (o al menos por una parte o fragmento de este).

La "especificidad" de una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención se puede determinar sobre la base de la afinidad y/o la aidez.

Se dice que una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención es "específica para un primer antígeno objetivo de interés en oposición a un segundo antígeno objetivo de interés" cuando esta se une al primer antígeno objetivo de interés con una afinidad que es al menos 5 veces, tal como al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y preferentemente al menos 1.000 veces más elevada que la afinidad con la cual esa secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención se une al segundo antígeno objetivo de interés. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, cuando se dice que una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención es "específica para" un primer antígeno objetivo de interés en oposición a un segundo antígeno objetivo de interés, esta se puede unir específicamente (como se define en la presente) al primer antígeno objetivo de interés, pero no al segundo antígeno objetivo de interés.

Como se usan en la presente, las expresiones "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" se pueden referir a (al uso de) una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención que se une específicamente a un antígeno objetivo de interés e inhibe, reduce y/o previene la interacción entre ese antígeno objetivo de interés, y su pareja de unión natural. Las expresiones "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" también se pueden referir a (al uso de) una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención que se une específicamente a un antígeno objetivo de interés e inhibe, reduce y/o previene una actividad biológica del antígeno objetivo de interés, según se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado. Por consiguiente, "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" también se pueden referir a (al uso de) una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención que se

une específicamente a un antígeno objetivo de interés e inhibe, reduce y/o previene uno o más mecanismos, efectos, respuestas, vías funcionales o actividades, biológicos o fisiológicos en los cuales interviene el antígeno objetivo de interés. Tal acción de la secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención como un antagonista se puede determinar de cualquier forma adecuada y/o usando cualquier ensayo adecuado (*in vitro* y usualmente celular o *in vivo*) conocido en la técnica, según el antígeno objetivo de interés.

Por lo tanto, más particularmente, "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" usando una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención pueden significar tanto inhibir, reducir y/o prevenir la interacción entre un antígeno objetivo de interés y su pareja natural de unión, o, inhibir, reducir y/o prevenir la actividad de un antígeno objetivo de interés, o, inhibir, reducir y/o prevenir uno o más mecanismos, efectos, respuestas, funciones, vías o actividades, biológicos o fisiológicos en los cuales interviene el antígeno objetivo de interés, tal como en al menos 10 %, pero preferentemente al menos 20 %, por ejemplo en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más, según se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo*, en comparación con la actividad del antígeno objetivo de interés en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin usar la secuencia de aminoácidos divulgada en la presente. Además, "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" también pueden significar inducir una disminución en la afinidad, la aversez, la especificidad y/o la selectividad de un antígeno objetivo de interés por uno o más de sus parejas naturales de unión y/o inducir una disminución en la sensibilidad del antígeno objetivo de interés por una o más condiciones en el medio o las proximidades en las cuales está presente el antígeno objetivo de interés (tal como pH, fuerza iónica, la presencia de cofactores, etc.), en comparación con las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención. En el contexto de la presente invención, "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" también pueden involucrar inhibición, reducción y/o prevención alostérica de la actividad de un antígeno objetivo de interés.

La actividad inhibitoria o antagónica o la actividad potenciadora o agonizante de una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención puede ser reversible o irreversible, pero en el caso de aplicaciones agroquímicas, farmacéuticas y farmacológicas generalmente se producirá de forma reversible.

Se considera que una secuencia de aminoácidos como se divulga en la presente invención está "(en forma) esencialmente aislada" como se usa en la presente, cuando ha sido extractada o purificada de la célula huésped y/o del medio en el cual se produce.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención, las expresiones "región de unión", "sitio de unión" o "sitio de interacción" presentes en las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención tendrán el significado de un sitio, una región, un locus, una parte o un dominio particular presentes en la molécula objetivo, siendo tal sitio, región, locus, parte o dominio responsables de la unión a esa molécula objetivo. Por lo tanto, dicha región de unión consiste esencialmente en tal sitio, región, locus, parte o dominio particular de la molécula objetivo, que está en contacto con la secuencia de aminoácidos cuando se une a esa molécula objetivo.

"Planta" como se usa en la presente, significa una planta entera o una parte de esta, que incluye frutos frescos, vegetales y semillas. La planta o la parte de una planta pueden ser una planta viva o una parte de esta. Además, el término "planta" como se usa en la presente abarca plantas completas, ancestros y progenie de las plantas y partes de plantas, que incluyen semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (que incluyen tubérculos), flores, y tejidos y órganos, donde cada uno de los mencionados comprende el gen/ácido nucleico de interés. El término "planta" también abarca células vegetales, cultivos en suspensión, tejido calloso, embriones, regiones merismáticas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas, nuevamente, donde cada uno de los mencionados comprende el gen/ácido nucleico de interés.

La elección de plantas de control adecuadas es una parte de rutina del montaje experimental y puede incluir plantas correspondientes de tipo silvestre o plantas correspondientes sin el gen de interés. La planta de control es generalmente de la misma especie de planta o incluso de la misma variedad que la planta que se ha de evaluar. La planta de control también puede ser un nulicigoto de la planta que se ha de evaluar. Los nulicigotos son individuos que pierden el transgén por segregación. Una "planta de control" como se usa en la presente no se refiere solamente a plantas enteras, sino también a partes de plantas, que incluyen semillas y partes de semillas.

"Cultivo" como se usa en la presente significa una especie o variedad vegetal que se cultiva para ser cosechada como alimento, forraje para ganado, materia prima para combustibles, o para cualquier otro propósito económico. A modo de ejemplo no limitante, dichos cultivos pueden ser maíz, cereales, tales como trigo, centeno, cebada y avena, sorgo, arroz, remolacha azucarera y remolacha forrajera, frutas, tales como pomáceas (por ejemplo, manzanas y peras), cítricos (por ejemplo, naranjas, limones, limas, pomelos o mandarinas), frutas de hueso (por ejemplo, melocotones, nectarinas o ciruelas), nueces (por ejemplo, almendras o nueces de nogal), frutos rojos (por ejemplo, cerezas, fresas, moras o frambuesas), la familia de

plátanos o vides, cultivos leguminosos, tales como judías, lentejas, guisantes y soja, cultivos para producir aceites, tales como girasol, cártamo, colza, canola, ricino u olivos, cucurbitáceas, tales como pepinos, melones o calabazas, plantas para producir fibras, tales como algodón, lino y cáñamo, cultivos para producir combustibles, tales como caña de azúcar, miscanthus o pasto varilla, vegetales, tales como patatas, tomates, pimientos, lechuga, espinaca, cebollas, zanahorias, berenjenas, espárragos o col, ornamentales, tales como flores (por ejemplo, petunias, pelargonios, rosas, tulipanes, lirios o crisantemos), arbustos, árboles con hojas anchas (por ejemplo, álamos o sauces) y perennes (por ejemplo, coníferas), pastos, como césped, césped deportivo o pasturas para forraje u otras plantas útiles tales como café, té, tabaco, lúpulo, pimienta, plantas que producen goma o látex.

Una "plaga", como se usa en la presente, es un organismo que es dañino para las plantas, los animales, los seres humanos o sus intereses, e incluye, entre otras, plagas de los cultivos (como se define más adelante), plagas domésticas, tales como cucarachas, hormigas, etc., y vectores de enfermedades, tales como el mosquito que transmite malaria.

Una "plaga vegetal", "fitopatógeno" o "plaga de un cultivo", como se usan en la presente de manera intercambiable, se refieren a organismos que específicamente causan daño a las plantas, a las partes de una planta o a productos vegetales, en particular, plantas, partes de una planta o productos vegetales empleados en la agricultura. Obsérvese que la expresión "plaga vegetal" o "plaga de un cultivo" se usa para significar que la plaga se dirige a las plantas y las daña. Las plagas en particular pertenecen a animales invertebrados, por ejemplo insectos (que incluyen insectos plaga agrícolas, insectos plaga de plantas ornamentales, insectos plaga forestales). Las plagas de cultivos más relevantes incluyen, entre otros, áfidos, gusanos, moscas, avispas y similares, nemátodos (que viven libremente en el suelo o en particular especies que parasitan raíces vegetales, tales como nemátodo del nudo radical y nemátodos quísticos, tales como nemátodo quístico de la soja y nemátodo quístico de la patata), ácaros (tales como ácaros araña, ácaros de pies hilados y ácaros de las agallas) y gasterópodos (que incluyen babosas tales como *Deroceras* spp., *Milax* spp., *Tandonia* sp., *Limax* spp., *Arion* spp. y *Veronicella* spp. y caracoles tales como *Helix* spp., *Cernuella* spp., *Theba* spp., *Cochlicella* spp., *Achatina* spp., *Succinea* spp., *Ovachlamys* spp., *Amphibulima* spp., *Zachrysia* spp., *Bradybaena* spp., y *Pomacea* spp.), hongos patógenos (que incluyen Ascomycetes (tales como *Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., *Verticillium* spp., *Magnaporthe* spp.), Basidiomycetes (tales como *Rhizoctonia* spp., *Phakospora* spp., *Puccinia* spp.), y Oomycetes similares a hongos (tales como *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.), bacterias (tales como *Burkholderia* spp. y *Proteobacteria* tales como *Xanthomonas* spp. y *Pseudomonas* spp.), Phytoplasma, Spiroplasma, virus (tales como el virus mosaico del tabaco y el virus mosaico de la coliflor) y protozoos.

"Microbio", como se usa en la presente, significa bacteria, virus, hongo, levadura y similares, y "microbiano" significa derivado de un microbio.

"Hongo", como se usa en la presente, significa un organismo eucariota, perteneciente al grupo de Eumycota. El término hongo en la presente invención también incluye organismos similares a hongos tales como los oomicetos. Los oomicetos (u oomycota) forman un linaje filogenético distintivo de microorganismos eucariotas similares a hongos. Este grupo fue clasificado originalmente entre los hongos, pero enfoques modernos dan respaldo a una relación relativamente cercana con los organismos fotosintéticos tales como algas pardas y diatomeas, dentro del grupo de los heterocontos.

"Infección por plaga" o "enfermedad por plaga" como se usa en la presente, se refiere a una afección, enfermedad o trastorno inflamatorio en un organismo vivo, tal como una planta, un animal o un ser humano, el cual es provocado por una plaga.

"Infección fúngica" o "enfermedad fúngica" como se usa en la presente, se refiere a una afección, enfermedad o trastorno inflamatorio en un organismo vivo, tal como una planta, un animal o un ser humano, el cual es provocado por un hongo.

"Sustancia activa", "ingrediente activo" o "principio activo", como se usan de manera intercambiable en la presente, significan cualquier elemento biológico, bioquímico o químico y sus derivados, fragmentos o compuestos basados en estos, que incluyen microorganismos, que tienen acción general o específica frente a organismos perjudiciales en un sujeto, y en particular en plantas, partes de plantas o en productos vegetales, tanto de origen natural como de fabricación, que incluyen cualquier impureza que resulta inevitablemente de los procesos de fabricación.

"Agroquímico", como se usa en la presente, significa adecuado para usar en la industria agroquímica (que incluye agricultura, horticultura, floricultura y uso doméstico y en jardinería, pero también productos destinados a usos no relacionados con los cultivos tales como usos operativos en salud pública, control de plagas, para controlar insectos y roedores indeseables, usos domésticos, tales como fungicidas, insecticidas y agentes domésticos, para proteger plantas o partes de plantas, cultivos, bulbos, tubérculos, frutos (por ejemplo, de organismos perjudiciales, enfermedades o plagas); para controlar, preferentemente, promover o

aumentar, el crecimiento de plantas; y/o para promover el rendimiento de plantas, cultivos o las partes de plantas que se cosechan (por ejemplo, sus frutos, flores, semillas, etc.). Los ejemplos de tales sustancias resultarán evidentes para el experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, compuestos que son activos como insecticidas (por ejemplo, insecticidas de contacto o insecticidas sistémicos, que incluyen insecticidas para uso doméstico), herbicidas (por ejemplo, herbicidas de contacto o herbicidas sistémicos, que incluyen herbicidas para uso doméstico), fungicidas (por ejemplo, fungicidas de contacto o fungicidas sistémicos, que incluyen fungicidas para uso doméstico), nematocidas (por ejemplo, nematocidas de contacto o nematocidas sistémicos, que incluyen nematocidas para uso doméstico) y otros pesticidas y biocidas (por ejemplo, agentes para eliminar insectos o caracoles); como así también fertilizantes; reguladores del crecimiento tales como hormonas vegetales; micronutrientes, fitoprotectores, feromonas; repelentes; cebos para insectos; y/o principios activos que se usan para modular (es decir, aumentar, disminuir, inhibir, potenciar y/o activar) la expresión génica (y/u otros procesos biológicos o bioquímicos) en o mediante la planta objetivo (por ejemplo, la planta que se ha de proteger o la planta que se ha de controlar), tal como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN bicatenario o monocatenario, por ejemplo, como el usado en el contexto de la tecnología de ARN interferente) y otros factores, proteínas, productos químicos, etc. conocidos *per se* para este fin, etc. Los ejemplos de tales agroquímicos serán evidentes para el experto en la técnica; e incluyen, por ejemplo, entre otros: glifosato, paraquat, metolaclor, acetoclor, mesotriona, 2,4-D, atrazina, glufosinato, sulfosato, fenoxaprop, pendimetalina, picloram, trifluralina, bromoxinil, clodinafop, fluroxipir, nicosulfurón, bensulfurón, imazetapir, dicamba, imidacloprid, tiameoxam, fipronil, clorpirifós, deltametrina, lambda-cialotrina, endosulfán, metamidofos, carbofurano, clotianidina, cipermetrina, abamectina, diflufenican, spinosad, indoxacarb, bifentrina, teflutrina, azoxistrobina, tiameoxam, tebuconazol, mancozeb, ciazofamida, fluazinam, piraclostrobina, epoxiconazol, clorotalonil, fungicidas de cobre, trifloxistrobina, prothioconazol, difenoconazol, carbendazim, propiconazol, tiofanato, sulfuro, boscalid y otros agroquímicos conocidos o cualquier combinación adecuada de estos.

Una "composición agroquímica" como se usa en la presente significa una composición para uso agroquímico, como se define adicionalmente, que comprende al menos una sustancia activa, opcionalmente con uno o más aditivos para favorecer la óptima dispersión, atomización, deposición, humectación foliar, distribución, retención y/o absorción de agroquímicos. Resultará evidente a partir de la descripción adicional en la presente que una composición agroquímica como se usa en la presente incluye agentes de control biológico o pesticidas biológicos (que incluyen, entre otros, agentes biológicos biocidas, biostáticos, fungistáticos y fungicidas) y estos términos se emplearán de manera intercambiable en la presente solicitud. Por consiguiente, una composición agroquímica, como se usa en la presente, incluye composiciones que comprenden al menos una molécula biológica como ingrediente, sustancia o principio activo para el control de plagas en plantas o en otros escenarios relacionados con el agro (tal como, por ejemplo, en el suelo). Ejemplos no limitantes de moléculas biológicas usadas como principios activos en las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención son proteínas (que incluyen anticuerpos y sus fragmentos, tales como, entre otros, fragmentos de dominio variable de cadena pesada de anticuerpos, que incluyen VHH), secuencias de ácidos nucleicos, (poli)sacáridos, lípidos, vitaminas, glucolípidos hormonales, esteroides y glicerolípidos.

Como ejemplo no limitante, los aditivos en las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención pueden incluir, entre otros, diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes de dispersión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas y/o agentes de control de deriva.

Una "composición biostática" o un "agente biostático" como se usa en la presente significa cualquier ingrediente, sustancia o principio activo o una composición que comprende cualquier ingrediente, sustancia o principio activo para uso biostático (como se define adicionalmente en la presente) que comprende al menos una sustancia o ingrediente activo biostático, opcionalmente combinado con uno o más aditivos que favorecen la óptima dispersión, atomización, deposición, humectación foliar, distribución, retención y/o absorción de la sustancia o el ingrediente activo. Como ejemplo no limitante, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos (iónicos), agentes humectantes, agentes de dispersión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas, inhibidores de proteasa y/o agentes de control de deriva.

Una "composición biocida" o un "agente biocida" como se usa en la presente significa cualquier ingrediente, sustancia o principio activo o una composición que comprende cualquier ingrediente, sustancia o principio activo para uso biocida (como se define adicionalmente en la presente) que comprende al menos una sustancia o ingrediente activo biocida, opcionalmente combinado con uno o más aditivos que favorecen la óptima dispersión, atomización, deposición, humectación foliar, distribución, retención y/o absorción de la sustancia o el ingrediente activo. Como ejemplos no limitantes, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos (iónicos), agentes humectantes, agentes de dispersión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes

anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas, inhibidores de proteasa y/o agentes de control de deriva.

Una "composición fungistática" o un "agente fungistático" como se usa en la presente significa cualquier ingrediente, sustancia o principio activo o una composición que comprende cualquier ingrediente, sustancia o principio activo para uso fungistático (como se define adicionalmente en la presente) que comprende al menos una sustancia o ingrediente activo fungistático, opcionalmente combinado con uno o más aditivos que favorecen la óptima dispersión, atomización, deposición, humectación foliar, distribución, retención y/o absorción de la sustancia o el ingrediente activo. Como ejemplos no limitantes, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos (iónicos), agentes humectantes, agentes de dispersión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas, inhibidores de proteasa y/o agentes de control de deriva.

Una "composición fungicida" o un "agente fungicida" como se usa en la presente significa cualquier ingrediente, sustancia o principio activo o una composición que comprende cualquier ingrediente, sustancia o principio activo para uso fungicida (como se define adicionalmente en la presente) que comprende al menos una sustancia o ingrediente activo fungicida, opcionalmente combinado con uno o más aditivos que favorecen la óptima dispersión, atomización, deposición, humectación foliar, distribución, retención y/o absorción de la sustancia o el ingrediente activo. Como ejemplos no limitantes, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos (iónicos), agentes humectantes, agentes de dispersión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas, inhibidores de proteasa y/o agentes de control de deriva.

"Uso agroquímico", como se usa en la presente, no incluye solamente el uso de agroquímicos como se definió anteriormente (por ejemplo, pesticidas, reguladores de crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, defoliantes, etc.) que son adecuados y/o están destinados al uso en cultivos que crecen en campos (por ejemplo, agricultura), sino que también incluye el uso de agroquímicos como se definió anteriormente (por ejemplo, pesticidas, reguladores de crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, defoliantes etc.) destinados al uso en cultivos que crecen en invernaderos (por ejemplo, horticultura/floricultura) o sistemas de cultivo hidropónico e incluso el uso de agroquímicos según se definió anteriormente que son adecuados y/o que no están destinados al uso en cultivos, sino al uso en jardines privados, usos domésticos (por ejemplo, herbicidas o insecticidas para uso doméstico), o usos por parte de operadores de control de plagas (por ejemplo, control de malezas, etc.).

"(Efecto) biostático" o "uso biostático", como se usa en la presente, incluye cualquier efecto o uso de una sustancia activa (opcionalmente comprendida en una composición biostática, biocida, fungicida o fungistática según se define en la presente) para controlar, modular o interferir en la actividad perjudicial de una plaga, tal como una plaga de plantas o un fitopatógeno, que incluye, entre otros usos, inhibir el crecimiento o la actividad de la plaga, alterar el comportamiento de la plaga, y repeler o atraer la plaga en plantas, partes de plantas o en otros escenarios relacionados con el agro, tales como, por ejemplo, para usos domésticos o en el suelo.

"(Efecto) biocida" o "uso biocida", como se usa en la presente, incluye cualquier efecto o uso de una sustancia activa (opcionalmente comprendida en una composición biocida o fungicida según se define en la presente) para controlar, modular o interferir en la actividad perjudicial de una plaga, tal como una plaga de plantas o un fitopatógeno, que incluye, entre otros usos, eliminar la plaga, inhibir el crecimiento o la actividad de la plaga, alterar el comportamiento de la plaga, y repeler o atraer la plaga en plantas, partes de plantas o en otros escenarios relacionados con el agro, tales como, por ejemplo, para usos domésticos o en el suelo.

"(Efecto) fungistático" o "uso fungistático", como se usa en la presente, incluye cualquier efecto o uso de una sustancia activa (opcionalmente comprendida en una composición fungicida o fungistática según se define en la presente) para controlar, modular o interferir en la actividad perjudicial de un hongo, que incluye, entre otros, inhibir el crecimiento o la actividad del hongo, alterar el comportamiento del hongo, y repeler o atraer el hongo en plantas, partes de plantas o en otros escenarios relacionados con el agro, tal como, por ejemplo, para usos domésticos o en el suelo.

"(Efecto) fungicida" o "uso fungicida", como se usa en la presente, incluye cualquier efecto o uso de una sustancia activa (opcionalmente comprendida en una composición fungicida o fungistática según se define en la presente) para controlar, modular o interferir en la actividad perjudicial de un hongo, que incluye, entre otros, eliminar el hongo, inhibir el crecimiento o la actividad del hongo, alterar el comportamiento del hongo, y repeler o atraer el hongo en plantas, partes de plantas o en otros escenarios relacionados con el agro, tal como, por ejemplo, para usos domésticos o en el suelo.

"Actividad pesticida" o "actividad biocida", como se usa de modo intercambiable en la presente, significa

interferir en la actividad perjudicial de una plaga, que incluye, entre otros, eliminar la plaga, inhibir el crecimiento o la actividad de la plaga, alterar el comportamiento de la plaga, repeler o atraer la plaga.

"Actividad biostática", como se usa en la presente, significa interferir en la actividad perjudicial de una plaga, que incluye, entre otros, inhibir el crecimiento o la actividad de la plaga, alterar el comportamiento de la plaga, repeler o atraer la plaga.

La actividad pesticida, biocida o biostática de un ingrediente, sustancia o principio activo o de una composición o un agente que comprende un ingrediente, una sustancia o un principio activo pesticida, biocida o biostático, se puede expresar como la actividad inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) de un agente (expresada en unidades de concentración, tales como, por ejemplo, mg/ml), sin estar, sin embargo, limitada a esta.

"Actividad fungicida", como se usa en la presente, significa interferir en la actividad perjudicial de un hongo, que incluye, entre otros, eliminar el hongo, inhibir el crecimiento o la actividad del hongo, alterar el comportamiento del hongo y repeler o atraer al hongo.

"Actividad fungistática", como se usa en la presente, significa interferir en la actividad perjudicial de un hongo, que incluye, entre otras, inhibir el crecimiento o la actividad del hongo, alterar el comportamiento del hongo y repeler o atraer al hongo.

La actividad fungicida o fungistática de un ingrediente, sustancia o principio activo o de una composición o un agente que comprende un ingrediente, una sustancia o un principio activo pesticida, biocida o biostático, se puede expresar como la actividad inhibitoria mínima (MIC) de un agente (expresada en unidades de concentración, tales como, por ejemplo, mg/ml), sin estar, sin embargo, limitada a esta.

Un "portador", como se usa en la presente, significa cualquier portador sólido, semisólido o líquido en o sobre el cual se puede incorporar, incluir, inmovilizar, adsorber, absorber, enlazar, encapsular, incrustar, unir o el cual puede comprender adecuadamente una sustancia activa. Los ejemplos no limitantes de tales portadores incluyen nanocápsulas, microcápsulas, nanoesferas, microesferas, nanopartículas, micropartículas, liposomas, vesículas, perlas, un gel, partículas de resina iónicas débiles, liposomas, vehículos de entrega coclear, gránulos pequeños, granulados, nanotubos, moléculas de carbono en forma de balón (bucky-balls), gotitas de agua que son parte de una emulsión agua-en-aceite, gotitas de aceite que son parte de una emulsión aceite-en-agua, materiales orgánicos tales como corcho, madera y otros materiales derivados de vegetales (por ejemplo, en forma de cáscaras de semillas, virutas de madera, pulpa, esferas, perlas, láminas o cualquier otra forma adecuada), papel o cartón, materiales inorgánicos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina, silicatos y zeolitas, o incluso células microbianas (tales como células de levadura) o fracciones adecuadas o fragmentos de estos.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de estos, tales como Fab F(ab)2, Fv, y otros fragmentos que retienen la función de unión a antígeno del anticuerpo principal. Como tal, un anticuerpo se puede referir a una inmunoglobulina o glucoproteína, o un fragmento o porción de esta, o a una construcción que comprende una porción de unión a antígeno comprendida dentro de un marco modificado similar a inmunoglobulina, o a una porción de unión a antígeno comprendida dentro de una construcción que comprende un marco o matriz de soporte que no es similar a inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea. La expresión no está limitada respecto de las especies o la fuente del anticuerpo, tampoco está destinada a estar limitada por la forma en la cual este es realizado. La expresión abarca inmunoglobulinas enteras como así también fragmentos tales como Fab, F(ab)2, Fv, y otros que retienen la función de unión a antígeno del anticuerpo. En esta invención se pueden emplear anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero. En la práctica, no obstante, los anticuerpos serán generalmente de rata o murinos debido a la disponibilidad de líneas celulares de rata o murinas para usar en la elaboración de las líneas celulares híbridas o hibridomas que se requieren para producir anticuerpos monoclonales.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo policlonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos heterogénea. Los anticuerpos policlonales a menudo derivan de sueros agrupados de animales inmunizados o de seres humanos seleccionados.

"Dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento funcional de este", como se usa en la presente, significa (i) el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada, el cual está naturalmente desprovisto de cadenas ligeras (también indicado en adelante como V_{HH}), que incluye, entre otros, el dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos de cadena pesada de camélidos o tiburones o (ii) el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas

(también indicado en adelante como V_H), que incluye, entre otros, un dominio variable camelizado (como se define adicionalmente en la presente) de la cadena pesada de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas (también indicado en adelante como V_H camelizado).

Como se describe a continuación, se puede considerar que la secuencia de aminoácidos y la estructura de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo, sin embargo sin limitación, comprende cuatro regiones marco o "FR", que se denominan en la técnica y en la presente "región marco 1" o "FR1"; "región marco 2" o "FR2"; "región marco 3" o "FR3"; y "región marco 4" o "FR4", respectivamente, regiones marco, las cuales están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

También como se describe a continuación, el número total de residuos aminoácidos en un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (que incluye un V_{HH} o un V_H) puede estar en la región de 110-130, es preferentemente 112-115, y es con la mayor preferencia 113. No obstante se deberá observar que las partes, los fragmentos o los análogos de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo no están particularmente limitados por su longitud y/o tamaño, en tanto que tales partes, fragmentos o análogos retengan (al menos en parte) la actividad funcional, tal como la actividad pesticida, biocida, biostática, fungicida o fungistática (como se define en la presente) y/o retengan (al menos en parte) la especificidad de unión del dominio variable de cadena pesada original de un anticuerpo del cual estas partes, fragmentos o análogos derivan. Las partes, los fragmentos o los análogos que retienen (al menos en parte) la actividad funcional, tal como la actividad pesticida, biocida, biostática, fungicida o fungistática (como se define en la presente) y/o retienen (al menos en parte) la especificidad de unión del dominio variable de cadena pesada original de un anticuerpo del cual estas partes, fragmentos o análogos derivan también se denominan en la presente "fragmentos funcionales" de un dominio variable de cadena pesada.

Un método para la numeración de residuos aminoácidos de dominios variables de cadena pesada es el método descrito por Chothia et al. (*Nature* 342, 877-883 (1989)), la así llamada "definición AcM" y la así llamada "definición de contacto". Este es el sistema de numeración adoptado en la presente.

Alternativamente, los residuos aminoácidos de un dominio variable de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (que incluye un V_{HH} o un V_H) pueden numerarse de acuerdo con la numeración general para dominios variables de cadena pesada dada por Kabat et al. ("*Sequence of proteins of immunological interest*", Servicios de Salud Pública de los EE.UU., Institutos Nacionales de Salud Bethesda, Md., Publicación No. 91), según se aplica a dominios V_{HH} de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, mencionado anteriormente (véase por ejemplo la FIG. 2 de dicha referencia).

En el caso de la descripción general de anticuerpos de cadena pesada y sus dominios variables, se hace referencia, entre otras, a las siguientes referencias, las cuales se mencionan como antecedente general de la técnica: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 del Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx NV; WO 01/90190 por el Consejo Nacional de Investigación de Canadá; WO 03/025020 (=EP 1 433 793) por el Instituto de Anticuerpos; como así también WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 por Ablynx; Hamers-Casterman et al., *Nature* 1993 Jun. 3; 363 (6428): 446-8.

Generalmente, cabe destacar que la expresión "dominio variable de cadena pesada" como se usa en la presente en su sentido más amplio no está limitada a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. Por ejemplo, como se expondrá con mayor detalle a continuación, los dominios variables de cadena pesada de la invención se pueden obtener (1) aislando el dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural; (2) aislando el dominio V_H de un anticuerpo con cuatro cadenas de origen natural (3) por la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_{HH} de origen natural; (4) por la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H de origen natural (5) por la "camelización" (como se describe a continuación) de un dominio V_H de origen natural de cualquier especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o por la expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio V_H ; (6) por la "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "acD" según lo descrito por Ward et al (supra), o por expresión de un ácido nucleico que codifica tal dominio V_H camelizado (7) usando técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (8) preparando un ácido nucleico que codifica un V_{HH} o un V_H usando técnicas para la síntesis de los ácidos nucleicos, seguido por la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (9) por cualquier combinación de los precedentes. Los métodos y las técnicas adecuados para realizar lo anterior serán evidentes para los expertos en la técnica sobre la base de la divulgación de la presente e incluyen, por ejemplo, los métodos y las técnicas descritas con mayor detalle a continuación.

No obstante, de acuerdo con una realización específica, los dominios variables de cadena pesada como se divulgan en la presente invención no tienen una secuencia de aminoácidos que sea exactamente igual (es decir, como en un grado de identidad de secuencia de 100 % con esta) a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural, tal como la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural de un mamífero, y en particular de un ser humano.

Las expresiones "cantidad eficaz" y "dosis eficaz", como se usa en la presente, significan la cantidad necesaria para lograr el o los resultados deseados.

Como se usan en la presente, las expresiones "determinar", "medir", "evaluar", "monitorear" y "ensayar" se usan de modo intercambiable e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos usados para divulgar la presente invención, que incluyen los términos técnicos y científicos, tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien con capacitación normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Mediante una guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención.

POLIPÉPTIDOS

Los polipéptidos divulgados en la presente que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2 son capaces de unirse a un hongo. Por lo tanto, el polipéptido provoca el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo. Es decir, la unión del polipéptido con un hongo da como resultado el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora de dicho hongo.

Los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella pueden unirse (específicamente) a una membrana de un hongo o a un componente de una membrana de un hongo. En algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella no se unen (específicamente) a una pared celular o a un componente de una pared celular de un hongo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención y los empleados en ella no se unen (específicamente) a la glucosilceramida de un hongo.

Los polipéptidos pueden ser capaces de unirse (específicamente) con una fracción lipídica de la membrana plasmática de un hongo, tal como, por ejemplo una fracción lipídica de *Botrytis cinerea* u otro hongo. Dicha fracción lipídica (de *Botrytis cinerea* u otro hongo) puede obtenerse mediante cromatografía. La cromatografía se puede realizar en un extracto lipídico crudo (también denominado en la presente extracto lipídico total, o TLE, por sus siglas en inglés) obtenida de hifas y/o conidia fúngicas. La cromatografía puede ser, por ejemplo, cromatografía de capa fina o cromatografía rápida de fase normal. La cromatografía (por ejemplo, cromatografía de capa fina) se puede realizar sobre un sustrato, por ejemplo, una placa de vidrio recubierta con gel de sílice. La cromatografía se puede realizar usando una mezcla de cloroformo/metanol (por ejemplo, 85/15 % v/v) como eluyente.

Por ejemplo, dicha fracción lipídica puede obtenerse por un método que comprende: fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina y seleccionar la fracción con un Factor de Retención (Rf) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

En una realización más específica, la fracción lipídica se puede obtener por un método que comprende: fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina sobre un portaobjetos de vidrio recubierto con sílice usando una mezcla de cloroformo/metanol (por ejemplo 85/15 % v/v) como eluyente y la selección de la fracción con un Factor de Retención (Rf) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

Alternativamente, la fracción se puede obtener usando cromatografía rápida de fase normal. En dicho método, el método comprende:

fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal, y seleccionar la fracción con un Factor de Retención (Rf) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

En una realización más específica, la fracción lipídica se puede obtener por un método que comprende: fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal que comprende disolver el TLE en diclorometano (CH_2Cl_2) y MeOH y usar CH_2Cl_2 /MeOH (por ejemplo, 85/15 %, v/v) como eluyente, seguido de filtración de las fracciones a través de un filtro.

En una realización más específica, la fracción lipídica se puede obtener por un método que comprende: fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción

de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal que comprende disolver el TLE en diclorometano (CH_2Cl_2) y MeOH cargar el TLE en un cartucho de fase rápida (por ejemplo, un cartucho rápido con partículas de 15 μm), hacer correr la columna con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85/15 %, v/v) como el eluyente, y filtrar las fracciones a través de un filtro (por ejemplo, un filtro de jeringa de 0,45 μm con una membrana de nailon) y secar las fracciones.

Las fracciones de la cromatografía se pueden procesar antes del ensayo de unión del polipéptido a la fracción o de la interacción con la fracción. Por ejemplo, se pueden preparar liposomas que comprenden las fracciones. Dicho método puede comprender el uso de hidratación de película delgada. Por ejemplo, en tal método, se pueden preparar liposomas usando hidratación de película delgada con la adición de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). La unión y/o la disrupción de las membranas por la unión del polipéptido se pueden medir mediante un cambio en la fluorescencia antes y después de la unión del polipéptido (o mediante referencia a un control adecuado).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención y empleados en ella pueden unirse (específicamente) a una fracción cromatográfica que contiene lípidos de la membrana plasmática de un hongo, opcionalmente donde la fracción cromatográfica que contiene lípidos se prepara en liposomas antes de ensayar la unión del polipéptido a esta.

La unión del polipéptido a una fracción lipídica de un hongo se puede confirmar por cualquier método adecuado, por ejemplo, interferometría de biocapa. Las interacciones específicas con la fracción lipídica se pueden ensayar. Por ejemplo, se puede determinar si el polipéptido es capaz de romper la fracción lipídica cuando la fracción está preparada en liposomas, por ejemplo, usando hidratación de capa fina.

En los métodos en los que interviene la cromatografía, se puede realizar un paso de extracción antes del paso de cromatografía. Por ejemplo, las hifas y/o conidia fúngicas se pueden someter a un paso de extracción para proporcionar extracto lipídico crudo o extracto lipídico total sobre el cual se realiza la cromatografía. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden extraer hifas y/o conidia fúngicas (por ejemplo, hifas fúngicas y/o conidia de *Fusarium oxysporum* o *Botrytis cinerea*) a temperatura ambiente, por ejemplo, usando cloroformo:metanol en las siguientes proporciones 2:1 y 1:2 (v/v). Los extractos así preparados se pueden combinar y secar para proporcionar un extracto lipídico crudo o TLE.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el polipéptido puede ser capaz de unirse (específicamente) a una fracción lipídica de la membrana plasmática de un hongo (tal como *Fusarium oxysporum* o *Botrytis cinerea*), donde la fracción lipídica de la membrana plasmática del hongo se obtiene o se puede obtener mediante cromatografía. La cromatografía puede ser cromatografía rápida de fase normal o cromatografía de capa fina. La unión del polipéptido con el lípido con la fracción lipídica se puede determinar de acuerdo con interferometría de biocapa. En algunas realizaciones, el paso de cromatografía se puede realizar en una fracción lipídica cruda o puede obtenerse por un método que comprende la extracción de lípidos de hifas y/o conidia fúngicas de una muestra fúngica. El paso de extracción puede usar cloroformo:metanol en proporciones de 2:1 y 1:2 (v/v) para proporcionar dos extractos, y luego combinar los extractos.

En los métodos relacionados con cromatografía de capa fina, la cromatografía puede comprender los siguientes pasos:

fraccionar hifas de un hongo mediante extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina y seleccionar la fracción con un Factor de Retención (R_f) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

En algunos métodos relacionados con cromatografía de capa fina, la cromatografía puede comprender los siguientes pasos:

fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina sobre un portaobjetos de vidrio recubierto con sílice usando una mezcla de cloroformo/metanol (por ejemplo 85/15 % v/v) como el eluyente y la selección de la fracción con un Factor de Retención (R_f) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

En los métodos relacionados con cromatografía rápida de fase normal, la cromatografía puede comprender los siguientes pasos:

fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal, y la selección de la fracción con un Factor de Retención (R_f) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

En algunos métodos relacionados con cromatografía rápida de fase normal, la cromatografía puede comprender los siguientes pasos:

fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal que comprende disolver el TLE en diclorometano

(CH₂Cl₂) y MeOH y usar CH₂Cl₂/MeOH (por ejemplo, 85/15 %, v/v) como el eluyente, seguido de la filtración de las fracciones a través de un filtro.

En algunos métodos relacionados con la cromatografía rápida de fase normal, la cromatografía puede comprender los siguientes pasos:

fraccionar hifas y/o conidia de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante la extracción de lípidos totales por cromatografía rápida de fase normal que comprende disolver el TLE en diclorometano (CH₂Cl₂) y MeOH cargar el TLE en un cartucho de fase rápida (por ejemplo, un cartucho rápido con partículas de 15 µm), hacer correr la columna con CH₂Cl₂/MeOH (85/15 %, v/v) como el eluyente, y filtrar las fracciones a través de un filtro (por ejemplo, un filtro de jeringa de 0,45 µm con una membrana de nailon) y secar las fracciones.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1 o 2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2 que comprende:

una región CDR1 que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 52, una región CDR2 que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 68; y una región CDR3 que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 84.

Los polipéptidos definidos en la presente pueden tener de forma adecuada ciertas secuencias de región marco. Por ejemplo, el polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 puede comprender una secuencia de la región marco 1 (FR1) de acuerdo con la SEQ ID NO: 149, una secuencia de región marco 2 (FR2) de acuerdo con la SEQ ID NO:151, una secuencia de región marco 3 (FR3) de acuerdo con la SEQ ID NO:152 y una secuencia de región marco 4 (FR4) de acuerdo con la SEQ ID NO:153. El polipéptido que comprende la SEQ ID NO:2 puede comprender una secuencia de región marco 1 (FR1) de acuerdo con la SEQ ID NO: 150, una secuencia de región marco 2 (FR2) de acuerdo con la SEQ ID NO:151, una secuencia de región marco 3 (FR3) de acuerdo con la SEQ ID NO:152 y una secuencia de región marco 4 (FR4) de acuerdo con la SEQ ID NO:153.

Las regiones CDR y marco se pueden definir de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Los polipéptidos de la invención se pueden proporcionar en la forma de composiciones, por ejemplo, composiciones agroquímicas.

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN AL MENOS UN POLIPÉPTIDO

En un aspecto, los inventores de la presente han proporcionado composiciones agroquímicas que comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, el cual se puede unir específicamente a una plaga. Cabe destacar que, a través de esta interacción con una estructura molecular específica de la plaga, las composiciones divulgadas en la presente invención son capaces de inhibir, prevenir o reducir una o más actividades biológicas del fitopatógeno, de forma tal que se inhibe, previene o reduce el crecimiento del fitopatógeno. En ciertas realizaciones, las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención son capaces de eliminar una plaga de una planta a través de la interacción específica de al menos un polipéptido, el cual se puede unir específicamente a una plaga y el cual está comprendido en las composiciones.

Por consiguiente, las composiciones agroquímicas según se divulgan en la presente, se pueden usar para modular, tal como disminuir o inhibir, la función biológica de una plaga de una planta al unirse a un sitio de unión presente en un objetivo de esa plaga de una planta por lo cual se afectan las actividades naturales (tal como, entre otras, el crecimiento) de la plaga y/o una o más vías biológicas en las cuales interviene el objetivo estructural de esa plaga.

Asimismo, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido según se divulga en la presente invención, tienen varias ventajas adicionales sobre los agentes de unión tradicionales inmunoglobulina y no inmunoglobulina conocidos en la técnica. De hecho, los polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 son dominios variables de cadena pesada aislados de inmunoglobulina, los cuales son más potentes y más estables que los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, lo que lleva a (1) formas de dosificación más bajas, menor frecuencia de dosificación y, por lo tanto, menos efectos secundarios; y (2) estabilidad mejorada que resulta en una elección más amplia de vías de administración. Debido a su tamaño pequeño, los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina tienen la capacidad de atravesar membranas y penetrar en los compartimentos fisiológicos, tejidos y órganos a los que otros polipéptidos y proteínas más grandes no pueden acceder.

El al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, comprendido en las composiciones como se divulga en la presente invención puede ser un polipéptido que comprende, o que en

condiciones adecuadas (tales como condiciones fisiológicas) es capaz de formar un pliegue inmunoglobulina (es decir, por plegamiento). Se hace referencia, entre otros trabajos, a la reseña de Halaby et al., J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71. Preferentemente, cuando está adecuadamente plegada como para formar un pliegue inmunoglobulina, dicha secuencia polipeptídica es capaz de unirse específicamente (según se define en la presente) a un objetivo o un antígeno; y más preferentemente, es capaz de unirse a un objetivo de una plaga o a un antígeno de una plaga con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), una constante de velocidad para la asociación k_{on} y/o una constante de velocidad para la disociación k_{off} , o alternativamente como un valor CI_{50} , como se describe en la presente) que es como se define en la presente. Además, las partes, los fragmentos, análogos, mutantes, las variantes, los alelos y/o los derivados de tales secuencias polipeptídicas son preferentemente tales que comprenden un pliegue inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un pliegue inmunoglobulina.

En realizaciones particulares, la invención proporciona una composición agroquímica que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 para combatir plagas de plantas, más particularmente un hongo de una planta, composición la cual comprende al menos un polipéptido o una secuencia de aminoácidos de entre 80 a 200 aminoácidos como la sustancia activa. Nótese que "entre 80 y 200 aminoácidos", como se usa en la presente, se refiere a entre 80 y 200, es decir, incluye la cantidad de 80 aminoácidos y también la cantidad de 200 aminoácidos. Por lo tanto, "entre 80 y 200 aminoácidos" se puede usar de manera intercambiable con "de 80 a 200 aminoácidos".

En ciertas realizaciones adicionales, la invención proporciona una composición agroquímica para combatir plagas de plantas, composición la cual comprende al menos dos polipéptidos (diferentes) o al menos dos secuencias de aminoácidos (diferentes) de entre 80 y 200 aminoácidos como la sustancia activa y donde al menos un polipéptido comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Más aún en otras realizaciones adicionales, la invención proporciona una composición agroquímica para combatir plagas de plantas, composición la cual comprende al menos tres polipéptidos (diferentes) o al menos tres secuencias de aminoácidos (diferentes) de entre 80 y 200 aminoácidos como la sustancia activa y donde al menos un polipéptido comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. También están previstas combinaciones adicionales de diferentes polipéptidos siempre que un polipéptido comprenda la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

La composición agroquímica que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 es una composición agroquímica, según se define en la presente, para combatir plagas de plantas, como se definió anteriormente, lo cual significa que la composición agroquímica, más en particular, la sustancia activa, como se definió antes, comprendida en la composición agroquímica, es capaz de interferir, preferentemente reducir o detener, los efectos perjudiciales de una o más plagas de plantas en una o más plantas, preferentemente en cultivos.

Los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos comprendidos en las composiciones divulgadas en la presente invención pueden ser polipéptidos o secuencias de aminoácidos de origen natural, pueden ser derivados de un polipéptido de origen natural, o alternativamente pueden ser enteramente diseñados o sintetizados artificialmente. Los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos pueden estar basados en inmunoglobulina o pueden estar basados en dominios presentes en las proteínas, que incluyen, entre otros, proteínas microbianas, inhibidores de proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas helicoidales antiparalelas monocatenarias o proteínas con motivos repetidos. Los ejemplos no limitantes de dichos polipéptidos, con los rangos de longitud de aminoácidos descritos en la presente, incluyen dominios de unión a carbohidratos (CBD) (Blake et al (2006) J. Biol. Chem. 281, 29321-29329), anticuerpos de cadena pesada (Ac de cadena pesada), anticuerpos de dominio simple (Ac de dominio simple), minicuerpos (Tramontano et al (1994) J. Mol. Recognition 7, 9-24), el dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH), el dominio variable de los nuevos receptores de antígenos (VNAR), anticuerpos (Nygren P.A. (2008) FEBS J. 275, 2668-2676), alfacuerpos (véase WO2010066740), dominios diseñados con repetición de anquirina (DARPs) (Stumpp et al (2008) Drug Discovery Today 13, 695-701), anticalinas (Skerra et al (2008) FEBS J. 275, 2677-2683), knottinas (Kolmar et al (2008) FEBS J. 275, 2684-2690) y dominios CH2 modificados genéticamente (nanoanticuerpos, véase Dimitrov DS (2009) mAbs 1, 26-28). En particular, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención consisten en una cadena polipeptídica simple y no están modificados postraduccionalmente. Más particularmente, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención derivan de un sistema inmunitario innato o adaptado, preferentemente de una proteína de un sistema inmunitario innato o adaptado. Aún más particularmente, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención derivan de una inmunoglobulina. Con la mayor particularidad, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención comprenden 4 regiones marco y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de estas (los cuales entonces usualmente contendrán al menos algunos de los residuos aminoacídicos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad). En particular, los polipéptidos o las secuencias de

aminoácidos como se divulgan en la presente invención son fácilmente reproducibles con alto rendimiento, preferentemente en un sistema de expresión microbiana recombinante, y convenientes para su posterior aislamiento y/o purificación. En particular, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en DARPin, knottinas, alfacerpos y V_{HH} .
 5 Más particularmente, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente se seleccionan del grupo que consiste en alfacerpos y V_{HH} . Con la mayor particularidad, los polipéptidos o las secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención son V_{HH} .

En particular, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas en la presente invención puede consistir en una cadena polipeptídica simple y no está modificado postraduccionalmente. Más particularmente, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas en la presente invención puede derivar de un sistema inmunitario innato o adaptado, preferentemente de una proteína de un sistema inmunitario innato o adaptado. Aún más particularmente, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas en la presente invención puede derivar de una inmunoglobulina. Con la mayor particularidad, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas en la presente invención puede comprender 4 regiones marco y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de estas (los cuales entonces usualmente contendrán al menos algunos de los residuos aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad). En particular, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas son fácilmente reproducibles con alto rendimiento, preferentemente en un sistema de expresión microbiana recombinante, y convenientes para su posterior aislamiento y/o purificación.

De acuerdo con realizaciones particulares, la invención proporciona un número de segmentos de residuos aminoácidos (es decir, péptidos pequeños) que son particularmente adecuados para unirse a un antígeno de una plaga o al objetivo de una plaga, tal como, entre otros, un antígeno fúngico o un objetivo fúngico.

Las constantes de disociación (K_d) se pueden estimar sobre la base de los resultados de un ensayo ELISA. En análisis en equilibrio como en ELISA, la K_d se puede calcular a partir de la respuesta de unión en equilibrio. Donde los pocillos de una placa ELISA se recubren con un antígeno objetivo, y donde el antígeno objetivo puede ser una fracción lipídica de la membrana de *Botrytis cinerea*, dicho método puede usar además un rango de concentraciones de un polipéptido que se une al antígeno objetivo. Donde el ensayo ELISA generalmente proporciona una medida de adsorción cuantitativa para cada concentración de polipéptido que representa la unión del polipéptido con el antígeno objetivo, el rango de concentración de un polipéptido puede ser, por ejemplo, 0,5, 1, 2,5 y 10 μM . El rango más adecuado de concentraciones usadas puede variar según la afinidad del polipéptido por el antígeno objetivo. Los valores de absorción correspondientes según se determinan por ELISA pueden resultar en una curva sigmoidea cuando los valores de absorción se representan gráficamente frente a la conversión logarítmica de las concentraciones del polipéptido. La curva sigmoidea puede servir para definir un valor de CI_{50} . Donde la CI_{50} es la concentración del polipéptido donde el valor de absorción correspondiente es el 50 % del valor saturado según se estima con el máximo de la función sigmoidea, la K_d se puede estimar en $1/K_a$ donde la constante de asociación (K_a) se puede estimar como $1/CI_{50}$. Por lo tanto, K_d corresponde a la concentración del analito que alcanza el equilibrio al 50 % de saturación de unión. Para estos cálculos se pueden usar métodos de computación convencionales. Por ejemplo, se pueden realizar estos cálculos usando GraphPad. En algunas realizaciones, la K_d se puede determinar por resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés).

La CI_{50} puede ser la CI_{50} para la inhibición de la germinación de esporas y/o el crecimiento micelial (es decir, la concentración (μM) que inhibe el 50 % de la germinación de esporas y/o el crecimiento micelial) por ejemplo, de *Fusarium oxysporum* y/o *Botrytis cinerea*. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen una CI_{50} menor que aproximadamente 10 μM , por ejemplo, menor que aproximadamente 1 μM , para la inhibición de la germinación de esporas y/o el crecimiento micelial.

La K_d puede ser la K_d para unión a la fracción lipídica, la cual se puede obtener como se describe en la presente (es decir, por métodos cromatográficos, y puede ser la fracción lipídica de un hongo tal como *Fusarium oxysporum* o *Botrytis cinerea*). La K_d de los polipéptidos puede ser menor que aproximadamente 10 μM , por ejemplo, menor que aproximadamente 1 μM . La K_d se puede determinar de acuerdo con cualquier método adecuado. Por ejemplo, la K_d se puede determinar por interferometría de biocapa (BLI), por ejemplo, empleando Octet. El ensayo usado para determinar la K_d puede ser un ensayo ELISA.

La unión específica de un polipéptido a un objetivo de una plaga se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, selección biológica ("biopanning"), análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayos de enzimas (EIA, por sus siglas en inglés) y ensayos de competición intercalados, y las diferentes variantes de estos conocidas en la técnica.

En una realización preferida, el polipéptido de entre 80 y 200 aminoácidos, se obtiene por selección de

afinidad frente a una molécula objetivo de una plaga en particular y dicho polipéptido tiene una alta afinidad por dicha molécula objetivo de una plaga: generalmente, la constante de disociación de la unión entre el polipéptido y su molécula objetivo de una plaga es menor que 10^{-5} M, más preferentemente, la constante de disociación es menor que 10^{-6} M, incluso más preferentemente, la constante de disociación es menor que 10^{-7} M, con la mayor preferencia, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M.

En realizaciones particulares, el al menos un polipéptido comprendido en las composiciones divulgadas en la presente invención tiene un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) para dicho hongo fitopatógeno de 1,0 µg/ml o menos de dicho dominio variable en solución.

También se divulgan en la presente polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos o un subrango, como se divulgó en la presente anteriormente, obtenidos por selección de afinidad a un objetivo específico de una plaga vegetal, los cuales son capaces de inhibir el crecimiento y/o la actividad de una plaga de un cultivo a una concentración inhibitoria aproximadamente entre 0,00001 y 1 µM. En realizaciones específicas, las concentraciones inhibitorias mínimas están comprendidas entre 0,0001 y 1 µM, entre 0,001 y 1 µM, entre 0,01 y 1 µM, entre 0,1 y 1 µM, entre 0,0001 y 0,1 µM, entre 0,001 y 0,1 µM, entre 0,01 y 0,1 µM, entre 0,00001 y 0,01 µM, entre 0,0001 y 0,01 µM o entre 0,001 y 0,01 µM. En otras realizaciones específicas, las concentraciones inhibitorias mínimas están comprendidas entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 0,1 µM, entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,01 µM, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1 µM, entre aproximadamente 0,00001 y aproximadamente 0,01 µM, entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 0,01 µM, o entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,01 µM.

La Concentración Inhibitoria Mínima o el valor CIM es la concentración más baja de un agente tal como un polipéptido que inhibe el crecimiento visible del cultivo o la plaga de planta después de su incubación. Por ejemplo, se considera a la concentración fungicida mínima (CFM) como la concentración más baja de un polipéptido que previene el crecimiento y reduce el inóculo fúngico en al menos el 99,90 % dentro de las 24 horas. Las CFM (concentraciones fungicidas mínimas) se pueden determinar en placas de agar pero también se pueden determinar convenientemente en fluidos (por ejemplo, en placas con micropocillos) según el tipo de hongo y las condiciones de ensayo.

En realizaciones particulares adicionales, las composiciones como se describen en la presente comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, el cual: comprende la combinación de una región CDR1 que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 52, una región CDR2 que tiene una secuencia descrita en la SEQ ID NO: 68, y una región CDR3 que tiene una secuencia descrita en la SEQ ID NO: 84 (y el cual es capaz de unirse a un hongo) (y el polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo).

Los polipéptidos como se divulgan en la presente invención pueden ser en particular un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada. En realizaciones particulares adicionales, los polipéptidos divulgados en la presente pueden ser una secuencia de dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que deriva de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas (tal como, entre otros, una secuencia V_H que deriva de un anticuerpo humano) o ser una denominada secuencia V_{HH} (como se define en la presente) que deriva de un denominado "anticuerpo de cadena pesada" (como se define en la presente).

En realizaciones particulares, las composiciones como se divulgan en la presente invención, comprenden al menos una secuencia de dominio variable de cadena pesada derivada de un anticuerpo o un fragmento funcional de este, tal como, entre otros, un anticuerpo de cadena pesada de camélido o un fragmento funcional de este, secuencia de dominio variable la cual puede ser, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada de camélido (V_{HH}).

Las secuencias polipeptídicas de las composiciones divulgadas en la presente invención puede ser, en particular, un anticuerpo de dominio (o un dominio variable de cadena pesada que sea adecuado para usar como un anticuerpo de dominio), un anticuerpo de dominio simple (o un dominio variable de cadena pesada que sea adecuado para usar como un anticuerpo de dominio simple), o un "Ac de dominio (o un dominio variable de cadena pesada que sea adecuado para usar como un Ac de dominio); otros dominios variables simples, o cualquier fragmento de cualquiera de ellos. Para obtener una descripción general de anticuerpos de dominio (simple) se hace referencia además a la técnica conocida citada anteriormente, como así también al documento EP 0 368 684. En cuanto a la expresión "Ac de dominio", se hace referencia, por ejemplo, a Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), a Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; como así también, por ejemplo, a los documentos WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente invención proporciona polipéptidos con la estructura

(general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refiere a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la cual CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y son como se define en la presente.

En particular, la invención en algunas realizaciones específicas proporciona composiciones agroquímicas que comprenden al menos un polipéptido que está dirigido contra un objetivo de una plaga, tal como un objetivo fúngico, y comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales secuencias de aminoácidos.

Nuevamente, tales polipéptidos se pueden derivar de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y pueden ser, por ejemplo, secuencias V_{HH} de origen natural (es decir, de una especie adecuada de camélido) o dominios variables de cadena pesada sintéticos o semisintéticos, que incluyen, entre otros, secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (y en particular secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas), como así también aquellas que han sido obtenidas mediante técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o de origen natural), injerto de CDR, recubrimiento "veneering", combinando fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores superpuestos, y técnicas similares para modificar genéticamente secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto en la técnica; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores como se describe en la presente.

Se entiende que las composiciones agroquímicas o las composiciones para control biológico como se divulga en la presente invención son estables, tanto durante el almacenamiento como durante la utilización, lo cual significa que se mantiene la integridad de la composición agroquímica en almacenamiento y/o en condiciones de utilización de la composición agroquímica, lo cual puede incluir elevadas temperaturas, ciclos congelamiento-descongelamiento, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación UV, presencia de productos químicos perjudiciales y similares. Más preferentemente, el polipéptido de entre 80 a 200 aminoácidos, y los diversos subrangos descritos en la presente, permanecen estables en la composición agroquímica, lo cual significa que la integridad y la actividad pesticida del polipéptido se mantienen durante el almacenamiento y/o las condiciones de utilización de la composición agroquímica, lo cual puede incluir temperaturas elevadas, ciclos congelamiento-descongelamiento, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación UV, presencia de productos químicos perjudiciales y similares. Con la mayor preferencia, dicho polipéptido de entre 80 y 200 aminoácidos, y los diversos subrangos descritos en la presente, permanecen estables en la composición agroquímica cuando la composición agroquímica se almacena a temperatura ambiente durante un período de dos años o cuando la composición agroquímica se almacena a 54 °C durante un período de dos semanas. Preferentemente, la composición agroquímica de la presente invención retiene al menos aproximadamente el 70 % de actividad, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 % de actividad, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % de actividad o más. Opcionalmente, el polipéptido puede estar comprendido en un portador, como se definió, para proteger al polipéptido de los efectos perjudiciales provocados por otros componentes en la composición agroquímica o de los efectos perjudiciales durante el almacenamiento o durante la aplicación. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen, entre otros, alginatos, gomas, almidón, β -ciclodextrinas, celulosas, poliurea, poliuretano, poliéster, células microbianas o arcilla.

La composición agroquímica puede producirse en cualquier tipo de formulación, las formulaciones preferidas son polvos, polvos humectables, gránulos humectables, gránulos dispersables en agua, emulsiones, concentrados emulsionables, polvos, suspensiones, concentrados en suspensión, suspoemulsiones (mezclas de suspensiones y emulsiones), suspensiones en cápsulas, dispersiones acuosas, dispersiones oleosas, aerosoles, pastas, espumas, suspensiones o concentrados en suspensión ("flowable concentrates").

El polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, puede ser la única sustancia activa en la composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención; no obstante, también es posible que la composición agroquímica comprenda uno o más agroquímicos adicionales, según se definió, además del polipéptido o la secuencia de aminoácidos (o los al menos uno, al menos dos o al menos tres polipéptidos o secuencias de aminoácidos como se divulga en la presente invención). Tales composiciones agroquímicas o para control biológico adicionales pueden tener un efecto diferente en plagas de plantas como el polipéptido o la secuencia de aminoácidos, estos pueden tener un efecto sinérgico con el polipéptido o la secuencia de aminoácidos, o estos pueden incluso modificar la actividad del polipéptido o la secuencia de aminoácidos en ciertas plantas. Los productos agroquímicos adicionales adecuados pueden ser herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, acaricidas, bactericidas, viricidas, reguladores del crecimiento vegetal, protectores y similares. Tales productos agroquímicos pueden ser productos químicos o pueden ser sustancias biológicas, por ejemplo, un microbiano. Estos incluyen, entre otros, glifosato, paraquat, metolaclor, acetoclor, mesotriona, 2,4-D, atrazina, glufosinato, sulfosato, fenoxaprop, pendimetalina, picloram, trifluralina, bromoxinil, clodinafop, fluroxipir, nicosulfurón, bensulfurón, imazetapir, dicamba, imidacloprid, tiامتoxam, fipronil, clorpirifós, deltametrina, lambda-cialotrina, endosulfán, metamidofos, carbofurano,

clotianidina, cipermetrina, abamectina, diflufenican, spinosad, indoxacarb, bifentrina, teflutrina, azoxistrobina, tiametoxam, tebuconazol, mancozeb, ciazofamida, fluazinam, piraclostrobina, epoxiconazol, clorotalonil, fungicidas de cobre (por ejemplo, oxiclورو de cobre, hidróxido de cobre), trifloxistrobina, prothioconazol, difenoconazol, carbendazim, propiconazol, tiofanato, sulfuro, boscalid, tricloclazol, hexaconazol, metalaxil, benomilo, kitazina, tebuconazol, tridemorf, propineb, sulfato de estreptomycin y oxitetraciclina, y otros productos agroquímicos conocidos o cualquier combinación adecuada de estos.

Los productos agroquímicos adicionales adecuados pueden ser una sustancia biológica, tal como un microbio, por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas*, una cepa de *Bacillus* o una cepa de *Streptomyces*.

En ciertos aspectos, los polipéptidos comprendidos en las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención se pueden enlazar opcionalmente con uno o más grupos, restos o residuos adicionales mediante uno o más enlaces. Este único o varios grupos, restos o residuos adicionales pueden servir para la unión a otros objetivos de interés. Deberá quedar claro que tales grupos, residuos, restos y/o sitios de unión adicionales pueden proporcionar o no funcionalidad adicional a los polipéptidos como se divulgan en la presente invención (y/o a la composición en la cual está presente) y pueden modificar o no las propiedades de los polipéptidos como se divulga en la presente invención. Tales grupos, residuos, restos o unidades de unión también pueden ser, por ejemplo, grupos químicos que pueden ser biológicamente activos.

Estos grupos, restos o residuos pueden estar, en realizaciones en particular, enlazados de forma N o C terminal con los polipéptidos en las composiciones como se divulgan en la presente invención.

En realizaciones particulares, los polipéptidos en las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención también pueden haber sido modificadas químicamente. Por ejemplo, tal modificación puede suponer la introducción o el enlace de uno o más grupos funcionales, residuos o restos en el dominio variable de cadena pesada. Estos grupos, residuos o restos pueden conferir a los polipéptidos una o más propiedades o funcionalidades deseadas. Los ejemplos de tales grupos funcionales se tornarán evidentes al experto en la técnica.

Por ejemplo, la introducción o el enlace de tales grupos funcionales en un polipéptido puede resultar en un aumento en la solubilidad y/o la estabilidad del polipéptido, en una reducción de la toxicidad del polipéptido, o en la eliminación o atenuación de cualquier efecto secundario no deseado del polipéptido, y/o en otras propiedades ventajosas.

En realizaciones particulares, el único o los varios grupos, residuos, restos, están enlazados al polipéptido por medio de uno o más enlaces o espaciadores adecuados.

En realizaciones particulares adicionales, dos o más polipéptidos específicos para un objetivo en las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención se pueden enlazar entre sí o pueden estar interconectados. En realizaciones particulares, el único o los varios polipéptidos están enlazados entre sí por medio de uno o más enlazadores o espaciadores adecuados. Los espaciadores o enlazadores adecuados para usar en el acoplamiento de los diferentes polipéptidos pesados como se divulga en la presente invención resultarán obvios para el experto en la técnica y puede ser generalmente cualquier enlazador o espaciador usado en la técnica para enlazar péptidos y/o proteínas.

Algunos enlazadores o espaciadores particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, entre otros, enlazadores polipeptídicos tales como enlazadores glicina, enlazadores serina, enlazadores mixtos glicina/serina, enlazadores ricos en glicina y serina o enlazadores compuestos de fragmentos polipeptídicos mayormente polares, o compuestos químicos entrecruzadores homobifuncionales o heterobifuncionales tales como glutaraldehído u, opcionalmente, espaciados con PEG, maleimidas o ésteres NHS.

Por ejemplo, un enlazador o espaciador polipeptídico puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada que tiene una longitud entre 1 y 50 aminoácidos, tal como entre 1 a 30, y en particular entre 1 y 10 residuos aminoácidos. Deberá quedar claro que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del enlazador o de los enlazadores pueden tener alguna influencia sobre las propiedades de los polipéptidos, que incluyen, entre otras, la afinidad, especificidad o avidez por el objetivo de una plaga. Deberá quedar claro que cuando se emplean dos o más enlazadores, estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes. En el contexto y la divulgación de la presente invención, el experto en la técnica será capaz de determinar los enlazadores óptimos a los fines de acoplar dominios variables de cadena pesada como se divulgan en la presente invención sin ninguna carga experimental indebida.

OBJETIVOS

En realizaciones particulares, los polipéptidos comprendidos en las composiciones divulgadas en la presente invención se obtienen por afinidad de selección frente a un objetivo de una plaga en particular tal como un antígeno fúngico o un objetivo fúngico. La obtención de polipéptidos adecuados por afinidad de selección

frente a un objetivo de una plaga particular se puede realizar, por ejemplo, mediante el cribado de un conjunto, una colección o una biblioteca de células que expresan polipéptidos en su superficie (por ejemplo, bacteriófagos) para detectar su unión frente a una molécula objetivo de una plaga, molécula de la cual se conoce en la técnica que es un objetivo para un pesticida; todo lo cual se puede realizar en una forma conocida *per se*, que esencialmente comprende los siguientes pasos no limitantes: a) la obtención de una solución o suspensión aislada de una molécula objetivo de una plaga, molécula de la cual se conoce en la técnica que es un objetivo para un pesticida; b) la selección biológica de fagos u otras células de una biblioteca de polipéptidos frente a dicha molécula objetivo; c) aislamiento de fagos u otras células que se unen a la molécula objetivo; d) determinación de la secuencia nucleotídica que codifica el inserto polipeptídico de fagos de unión individuales u otras células; e) la producción de una cantidad de polipéptidos de acuerdo con esta secuencia usando expresión de proteínas recombinantes y f) la determinación de la afinidad de dicho polipéptido por dicho objetivo de una plaga y opcionalmente g) el ensayo de la actividad pesticida en un ensayo biológico para dicha plaga. Se pueden usar diversos métodos para determinar la afinidad entre el polipéptido y la molécula objetivo de una plaga, que incluyen, por ejemplo, ensayos por inmovilización ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) o ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés), los cuales son una práctica común en la técnica, por ejemplo, según se describe en Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera Edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. La constante de disociación se usa comúnmente para describir la afinidad entre un polipéptido y su molécula objetivo de una plaga. Generalmente, la constante de disociación de la unión entre el polipéptido y su molécula objetivo de una plaga es menor que 10^{-5} M, más preferentemente, la constante de disociación es menor que 10^{-6} M, aún más preferentemente, la constante de disociación es menor que 10^{-7} M, con la mayor preferencia, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M.

Las moléculas objetivo de una plaga como se divulgan en la presente invención son moléculas que se originan en o sobre organismos plaga y las cuales, cuando son limitadas y/o inhibidas, eliminan o detienen, inhiben o reducen el crecimiento o la actividad pesticida de dicho organismo plaga. Dichas moléculas objetivo adecuadas están fácilmente disponibles para el experto en la técnica en la bibliografía existente o en las bases de datos de patentes, e incluyen, entre otras, proteínas parasitarias secretadas tales como 16D10 como moléculas objetivo de una plaga adecuadas para nemátodos del nudo radical (Huang et al (2006) PNAS 103: 14302-14306), la bomba de protones V-ATPasa como molécula objetivo de una plaga adecuada para especies de insectos coleópteros, hemípteros, dípteros y nemátodos (Knight AJ y Behm CA (2011) Ex. Parasitol. Sept 19), la tetraspanina PLS1 como molécula objetivo de una plaga fúngica adecuada para *B. cinerea* y *M. grisea* (Gourgues et al (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 1197) o la bomba de protones ATPasa como objetivo antifúngico (Manavathu EK et al (1999) Antimicrob Agents and Chemotherapy, Dec p. 2950). Se entiende que las moléculas objetivo de una plaga preferidas se encuentran accesibles en el espacio extracelular (contrariamente a los objetivos plaga intracelulares).

Más particularmente, un objetivo de una plaga al cual se une el al menos un polipéptido de las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención, puede ser un componente de la membrana plasmática de una plaga. Un componente de la membrana plasmática de una plaga como se usa en la presente puede ser cualquier componente comprendido o que forma parte de (es decir, al menos una parte del cual está asociada con, presente en o conectada o unida con) la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática o cualquiera de las proteínas incrustadas allí de una célula de la plaga. En realizaciones particulares, un componente de la membrana plasmática de una plaga puede ser un fosfolípido, una glucoproteína, un carbohidrato o colesterol.

En realizaciones particulares, el componente de la membrana plasmática de una plaga a la cual el al menos un polipéptido en las composiciones divulgadas en la presente invención se une específicamente no es una proteína.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, el componente de la membrana plasmática de una plaga a la cual el al menos un polipéptido en las composiciones divulgadas en la presente invención se une específicamente es un lípido, tal como por ejemplo un fosfolípido, un carbohidrato o colesterol.

En ciertas realizaciones particulares, el objetivo al cual los polipéptidos en las composiciones agroquímicas de la presente invención se unen no es un componente de la pared celular.

En ciertas realizaciones específicas, el objetivo al cual los polipéptidos en las composiciones agroquímicas de la presente invención se unen no es quitina.

En una realización preferida, la(s) plaga(s) vegetal(es) que se combate(n) mediante la composición agroquímica o la composición para control biológico como se divulga en la presente invención es un hongo, tal como un hongo fitopatógeno, como se definió anteriormente. Los hongos pueden ser altamente perjudiciales para las plantas y pueden provocar pérdidas sustanciales en las cosechas de los cultivos. Los hongos fitopatógenos incluyen hongos necrotróficos y hongos biotróficos, e incluyen ascomicetos, basidiomicetos y oomicetos.

Los ejemplos de hongos fitopatógenos son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, aquellos seleccionados del grupo que consiste en los Géneros: *Alternaria*; *Ascochyta*; *Botrytis*; *Cercospora*; *Colletotrichum*; *Diplodia*; *Erysiphe*; *Fusarium*; *Leptosphaeria*; *Gaeumanomyces*; *Helminthosporium*; *Macrophomina*; *Nectria*; *Oidium*; *Peronospora*; *Phakopsora*; *Phoma*; *Phymatotrichum*; *Phytophthora*; *Plasmopara*; *Podosphaera*; *Puccinia*; *Puthium*; *Pyrenophora*; *Pyricularia*; *Pythium*; *Rhizoctonia*; *Sclerotium*; *Sclerotinia*; *Septoria*; *Thielaviopsis*; *Uncinula*; *Venturia*; y *Verticillium*. Los ejemplos específicos de infecciones vegetales por hongos que se pueden combatir con las composiciones agroquímicas de la invención incluyen, moho pulverulento y botrytis cinerea en cultivos de frutos y vegetales tales como uvas y fresas. Los ejemplos específicos adicionales de infecciones vegetales por hongos que se pueden combatir con las composiciones agroquímicas de la invención incluyen *Erysiphe graminis* en cereales, *Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea* en cucurbitáceas, *Podosphaera leucotrica* en manzanas, *Podosphaera aphanis*, por ejemplo, para tratar el moho pulverulento, por ejemplo, en fresas, *Podosphaera xanthii*, por ejemplo para tratar el moho pulverulento, por ejemplo, en pepinos, *Oidium neolycopersici*, por ejemplo para tratar el moho pulverulento, por ejemplo, en tomates, *Uncinula necator* en vides, *Puccinia* sp. en cereales, *Rhizoctonia* sp. en algodón, papas, arroz y céspedes, *Ustilago* sp. en cereales y caña de azúcar, *Venturia inaequalis* (scab) en manzanas, *Helminthosporium* sp. en cereales, *Septoria nodorum* en trigo, *Septoria tritici* en trigo, *Rhynchosporium secalis* en cebada, *Botrytis cinerea* (podredumbre gris) en fresas, tomates y uvas, *Cercospora arachidicola* en maníes, *Peronospora tabacina* en tabaco, u otras *Peronospora* en diversos cultivos, *Pseudocercospora herpotrichoides* en trigo y cebada, *Pyrenophora teres* en cebada, *Pyricularia oryzae* en arroz, *Phytophthora infestans* en patatas y tomates, *Fusarium* sp. (tal como *Fusarium oxysporum*) y *Verticillium* sp. en diversas plantas, *Plasmopara viticola* en uvas, *Alternaria* sp. en frutas y vegetales, *Pseudoperonospora cubensis* en pepinos, *Mycosphaerella fijiensis* en plátano, *Ascochyta* sp. en garbanzos, *Leptosphaeria* sp. en canola, *Phakopsora* spp., tal como *Phakopsora pachyrhizi*, y *Colletotrichum* sp. en diversos cultivos, por ejemplo *Colletotrichum orbiculare* el cual puede provocar antracnosis en calabazas. Las composiciones de acuerdo con la invención son activas frente a especies normalmente sensibles y resistentes y frente a todas o algunas etapas en el ciclo vital del hongo fitopatógeno.

En realizaciones particulares, las composiciones agroquímicas como se divulga en la presente invención están dirigidas contra un hongo fitopatógeno del género seleccionado del grupo que comprende *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Gaeumanomyces*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nectria*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Phoma*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Podosphaera*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Septoria*, *Thielaviopsis*, *Uncinula*, *Venturia*, *Verticillium*, *Magnaporthe*, *Blumeria*, *Mycosphaerella*, *Ustilago*, *Melampsora*, *Phakospora*, *Monilinia*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus*.

En ciertas realizaciones particulares, las composiciones como se divulgan en la presente invención comprenden al menos un polipéptido, el cual se une específicamente a un objetivo de un hongo de las especies fúngicas *Botrytis*, *Fusarium* o *Penicillium*, tales como un componente de la membrana plasmática de un hongo.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones agroquímicas que comprenden polipéptidos que están específicamente dirigidos contra un componente de la estructura molecular de la membrana plasmática celular de una plaga.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones agroquímicas que comprenden polipéptidos que están específicamente dirigidos contra un componente de la estructura molecular de la membrana plasmática celular de una plaga, el cual no es una proteína.

Incluso en otra realización particular las plagas vegetales son bacterias fitopatógenas que incluyen, entre otras, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (que provoca el rayado marrón bacteriano del arroz), *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (que provoca la mancha marrón bacteriana de cattleya), *Acidovorax konjacii* Konnyaku (que provoca el añublo foliar bacteriano), *Agrobacterium rhizogenes* (que provoca la raíz en cabellera del melón), *Agrobacterium tumefaciens* (que provoca agallas de la corona), *Burkholderia andropogonis* (que provoca la mancha bacteriana en el clavel), *Burkholderia caryophylli* (que provoca el marchitamiento bacteriano en el clavel), *Burkholderia cepacia* (que provoca la mancha marrón en cymbidium), *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (que provoca la podredumbre del cuello en el gladiolo), *Burkholderia glumae* (que provoca podredumbre de espiga en el arroz), *Burkholderia plantarii* (que provoca tizón bacteriano de las plántulas de arroz), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (que provoca cancrrosis bacteriana en el tomate), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (que provoca podredumbre anular en la patata), *Clostridium* spp. (que provoca la podredumbre mucilagínosa de la patata), *Curtobacterium flaccumfaciens* (que provoca la cancrrosis bacteriana de la cebolla), *Erwinia amylovora* (que provoca el fuego bacteriano de la pera), *Erwinia ananas* (que provoca marmolado marrón bacteriano del arroz), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (que provoca la pata negra de la patata), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (que provoca podredumbre blanda de la raíz de vegetales), *Erwinia chrysanthemi* (que provoca el añublo bacteriano de las plántulas del taro), *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (que provoca la podredumbre bacteriana del pie del arroz),

Erwinia herbicola pv. milletiae (que provoca la agalla bacteriana de la glicina), Pseudomonas cichorii (que provoca la mancha bacteriana del crisantemo), Pseudomonas corrugate Pith (que provoca la necrosis del tomate), Pseudomonas fuscovaginae (que provoca la podredumbre marrón de la vaina del arroz), Pseudomonas marginalis pv. marginalis (que provoca podredumbre blanda de la raíz de la col) Pseudomonas rubrisubalbicans (que provoca la raya moteada de la caña de azúcar), Pseudomonas syringae pv. aptata (que provoca el añublo bacteriano de la remolacha azucarera), Pseudomonas syringae pv. atropurpurea (que provoca el tizón de halo del raigrás), Pseudomonas syringae pv. castaneae (que provoca cancrisis bacteriana de la castaña), Pseudomonas syringae pv. glycinea (que provoca el añublo bacteriano de la soja), Pseudomonas syringae pv. lachrymans (que provoca la mancha bacteriana del pepino), Pseudomonas syringae pv. maculicola (que provoca la mancha negra bacteriana del repollo), Pseudomonas syringae pv. mori (que provoca el añublo bacteriano de la mora), Pseudomonas syringae pv. morsprunorum (que provoca cancrisis bacteriana de ciruelas), Pseudomonas syringae pv. oryzae (que provoca el tizón de halo del arroz), Pseudomonas syringae pv. phaseolicola (que provoca el tizón de halo de la judía), Pseudomonas syringae pv. pisi (que provoca el añublo bacteriano del guisante), Pseudomonas syringae pv. sesame (que provoca la mancha bacteriana del sésamo), Pseudomonas syringae pv. striafaciens (que provoca el añublo rayado de la avena), Pseudomonas syringae pv. syringae (que provoca la mancha parda bacteriana de los pequeños frutos rojos), Pseudomonas syringae pv. tabaci (que provoca el fuego salvaje del tabaco), Pseudomonas syringae pv. theae (que provoca el añublo del brote del té), Pseudomonas syringae pv. tomato (que provoca la mancha foliar bacteriana del tomate), Pseudomonas viridiflava (que provoca la mancha parda de la judía), Ralstonia solanacearum (que provoca marchitamiento bacteriano), Rathayibacter rathayi (que provoca añublo bacteriano de la cabeza del pasto ovillo), Streptomyces scabies (que provoca la sarna común de la patata), Streptomyces ipomoea (que provoca la podredumbre del suelo de la batata), Xanthomonas albilineans (que provoca la raya blanca de la caña de azúcar), Xanthomonas campestris pv. cerealis (que provoca la raya bacteriana del centeno), Xanthomonas campestris pv. campestris (que provoca podredumbre negra), Xanthomonas campestris pv. citri (que provoca cancrisis de los cítricos), Xanthomonas campestris pv. cucurbitae (que provoca la mancha parda bacteriana del pepino), Xanthomonas campestris pv. glycines (que provoca pústula bacteriana de la soja), Xanthomonas campestris pv. incanae (que provoca podredumbre negra del rizoma), Xanthomonas campestris pv. (que provoca la mancha foliar angular del malvacearum del algodón), Xanthomonas campestris pv. (que provoca cancrisis bacteriana del mango), Mangiferaeindicae Xanthomonas campestris pv. mellea (que provoca la mancha foliar bacteriana del tabaco de Wisconsin), Xanthomonas campestris pv. (que provoca la mancha bacteriana de la gran nigromaculans bardana), Xanthomonas campestris pv. phaseoli (que provoca la pústula bacteriana del poroto), Xanthomonas campestris pv. pisi (que provoca la podredumbre bacteriana del tallo de la judía), Xanthomonas campestris pv. pruni (que provoca el tiro de munición bacteriano del melocotón), Xanthomonas campestris pv. raphani (que provoca la mancha bacteriana del rábano japonés), Xanthomonas campestris pv. ricini (que provoca la mancha bacteriana del ricino), Xanthomonas campestris pv. theicola (que provoca cancrisis del té), Xanthomonas campestris pv. translucens (que provoca el añublo bacteriano del pasto ovillo), Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (que provoca la mancha bacteriana del tomate), Xanthomonas oryzae pv. oryzae (que provoca el añublo foliar bacteriano del arroz).

En aún otra realización las formulaciones agroquímicas de la invención también se pueden usar para combatir plagas vegetales tales como insectos, ácaros, helmintos, virus, nemátodos y moluscos que se encuentran en la agricultura, en la horticultura, en bosques, en jardines y en instalaciones de ocio. Las composiciones de acuerdo con la invención son activas frente a especies normalmente sensibles y resistentes y frente a todas o algunas etapas del desarrollo. Estas plagas vegetales incluyen: plagas del filo: Artrópodos, en particular de la clase de los ácaros, por ejemplo, Acarus spp., Aceria sheldoni, Aculops spp., Aculus spp., Amblyomma spp., Amphitetranychus viennensis, Argas spp., Boophilus spp., Brevipalpus spp., Bryobia praetiosa, Centruroides spp., Chorioptes spp., Dermanyssus gallinae, Dermatophagoides pteronyssius, Dermatophagoides farinae, Dermacentor spp., Eotetranychus spp., Epitrimerus pyri, Eutetranychus spp., Eriophyes spp., Halotydeus destructor, Hemitarsonemus spp., Hyalomma spp., Ixodes spp., Latrodectus spp., Loxosceles spp., Metatetranychus spp., Nupharsa spp., Oligonychus spp., Ornithodoros spp., Ornithonyssus spp., Panonychus spp., Phyllocoptruta oleivora, Polyphagotarsonemus latus, Psoroptes spp., Rhipicephalus spp., Rhizoglyphus spp., Sarcoptes spp., Scorpio maurus, Stenotarsonemus spp., Tarsonemus spp., Tetranychus spp., Vaejovis spp., Vasates lycopersici.

Aún otros ejemplos son del orden de Anoplura (Phthiraptera), por ejemplo, Damalinia spp., Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Ptilus pubis, Trichodectes spp.

Aún otros ejemplos son del orden de Chilopoda, por ejemplo, Geophilus spp., Scutigera spp.

Aún otros ejemplos son del orden de los Coleópteros, por ejemplo, Acalymma vittatum, Acanthoscelides obtectus, Adoretus spp., Agelastica alni, Agriotes spp., Alphitobius diaperinus, Amphimallon solstitialis, Anobium punctatum, Anoplophora spp., Anthonomus spp., Anthrenus spp., Apion spp., Apogonia spp., Atomaria spp., Attagenus spp., Bruchidius obtectus, Bruchus spp., Cassida spp., Cerotoma trifurcata, Ceutorhynchus spp., Chaetocnema spp., Cleonus mendicus, Conoderus spp., Cosmopolites spp., Costelytra zealandica, Ctenicera spp., Curculio spp., Cryptorhynchus lapathi, Cyllindrocopturus spp., Dermestes spp.,

Diabrotica spp., Dichocrocis spp., Diloboderus spp., Epilachna spp., Epitrix spp., Faustinus spp., Gibbium psyllodes, Hellula undalis, Heteronychus arator, Heteronyx spp., Hylamorphia elegans, Hylotrupes bajulus, Hypera postica, Hypothenemus spp., Lachnosterna consanguinea, Lema spp., Leptinotarsa decemlineata, Leucoptera spp., Lissorhoptrus oryzophilus, Lixus spp., Luperodes spp., Lyctus spp., Megascelis spp.,
 5 Melanotus spp., Meligethes aeneus, Melolontha spp., Migdolus spp., Monochamus spp., Naupactus xanthographus, Niptus hololeucus, Oryctes rhinoceros, Oryzaephilus surinamensis, Oryzaphagus oryzae, Otiorrhynchus spp., Oxycetonia jucunda, Phaedon cochleariae, Phyllophaga spp., Phyllotreta spp., Popillia japonica, Premnotypes spp., Prostephanus truncatus, Psylliodes spp., Ptinus spp., Rhizobius ventralis, Rhizopertha dominica, Sitophilus spp., Sphenophorus spp., Stegobium paniceum, Sternechus spp.,
 10 Symphyletes spp., Tanymecus spp., Tenebrio molitor, Tribolium spp., Trogoderma spp., Tychius spp., Xylotrechus spp., Zabrus spp.

Aún otros ejemplos son del orden de los Colémbolos, por ejemplo, Onychiurus armatus.

15 Aún otros ejemplos son del orden de los Diplópodos, por ejemplo, Blaniulus guttulatus.

Aún otros ejemplos son del orden de los Dípteros, por ejemplo, Aedes spp., Agromyza spp., Anastrepha spp., Anopheles spp., Asphondylia spp., Bactrocera spp., Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis capitata, Chironomus spp., Chrysomyia spp., Chrysops spp., Cochliomyia spp., Contarinia spp., Cordylobia anthropophaga, Culex spp., Culicoides spp., Culiseta spp., Cuterebra spp., Dacus oleae, Dasyneura spp.,
 20 Delia spp., Dermatobia hominis, Drosophila spp., Echinocnemus spp., Fannia spp., Gasterophilus spp., Glossina spp., Haematopota spp., Hydrellia spp., Hylemyia spp., Hyppobosca spp., Hypoderma spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Lutzomyia spp., Mansonia spp., Musca spp., Nezara spp., Oestrus spp., Oscinella frit, Pegomyia spp., Phlebotomus spp., Phorbia spp., Phormia spp., Prodiptosis spp., Psila rosae, Rhagoletis
 25 spp., Sarcophaga spp., Simulium spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tannia spp., Tetanops spp., Tipula spp.

Aún otros ejemplos son del orden de los Heterópteros, por ejemplo, Anasa tristis, Antestiopsis spp., Boisea spp., Blissus spp., Calocoris spp., Campylomma livida, Cavalerius spp., Cimex spp., Collaria spp., Creontiades dilutus, Dasynus piperis, Dichelops furcatus, Diconocoris hewetti, Dysdercus spp., Euschistus spp., Eurygaster spp., Heliopeltis spp., Horcias nobilellus, Leptocoris spp., Leptoglossus phyllopus, Lygus spp.,
 30 Macropes excavatus, Miridae, Monalonion atratum, Nezara spp., Oebalus spp., Pentomidae, Piesma quadrata, Piezodorus spp., Psallus spp., Pseudacysta persea, Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scaptocoris castanea, Scotinophora spp., Stephanitis nashi, Tibraca spp., Triatoma spp.

Aún otros ejemplos son del orden de los Homópteros, por ejemplo, Acyrthosipon spp., Acrogonia spp., Aeneolamia spp., Agonosceana spp., Aleurodes spp., Aleurolobus barodensis, Aleurothrixus spp., Amrasca spp., Anuraphis cardui, Aonidiella spp., Aphanostigma pin, Aphis spp., Arboridia apicalis, Aspidiella spp., Aspidiotus spp., Atanus spp., Aulacorthum solani, Bemisia spp., Brachycaudus helichrysi, Brachycolus spp., Brevicoryne brassicae, Calligypona marginata, Carneiocephala fulgida, Ceratovacuna lanigera, Cercopidae, Ceroplastes spp.,
 40 Chaetosiphon fragaefolii, Chionaspis tegalensis, Chlorita onukii, Chromaphis juglandicola, Chrysomphalus ficus, Cicadulina mbila, Coccomytilus halli, Coccus spp., Cryptomyzus ribis, Dalbulus spp., Dialeurodes spp., Diaphorina spp., Diaspis spp., Drosicha spp., Dysaphis spp., Dysmicoccus spp., Empoasca spp., Eriosoma spp., Erythroneura spp., Euscelis bilobatus, Ferrisia spp., Geococcus coffeae, Hieroglyphus spp., Homalodisca coagulata, Hyalopterus arundinis, Icerya spp., Idiocerus spp., Idioscopus spp., Laodelphax striatellus, Lecanium spp., Lepidosaphes spp., Lipaphis erysimi, Macrosiphum spp., Mahanarva spp.,
 45 Melanaphis sacchari, Metcalfiella spp., Metopolophium dirhodum, Monellia costalis, Monelliopsis pecanis, Myzus spp., Nasonovia ribisnigri, Nephrotettix spp., Nilaparvata lugens, Oncometopia spp., Orthezia praelonga, Parabemisia myricae, Paratrioza spp., Parlatoria spp., Pemphigus spp., Peregrinus maidis, Phenacoccus spp., Phloeomyzus passerinii, Phorodon humuli, Phylloxera spp., Pinaspis aspidistrae, Planococcus spp., Protopulvinaria pyriformis, Pseudaulacaspis pentagona, Pseudococcus spp., Psylla spp., Pteromalus spp., Pyrrilla spp., Quadraspidiotus spp., Quesada gigas, Rastrococcus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoides titanus, Schizaphis graminum, Selenaspidus articulatus, Sogata spp., Sogatella furcifera, Sogatodes spp., Stictocephala festina, Tenalaphara malayensis, Tinocallis caryaefoliae, Tomaspis spp., Toxoptera spp., Trialeurodes spp., Trioza spp., Typhlocyba spp., Unaspis spp., Viteus vitifolii, Zygina spp.
 55

Aún otros ejemplos son del orden de los Himenópteros, por ejemplo, Acromyrmex spp., Athalia spp., Atta spp., Diprion spp., Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Solenopsis invicta, Tapinoma spp., Vespa spp.

60 Aún otros ejemplos son del orden de los Isópodos, por ejemplo, Armadillidium vulgare, Oniscus asellus, Porcellio scaber.

Aún otros ejemplos son del orden de los Isópteros, por ejemplo, Coptotermes spp., Cornitermes cumulans, Cryptotermes spp., Incisitermes spp., Microtermes obesi, Odontotermes spp., Reticulitermes spp.
 65

Aún otros ejemplos son del orden de los Lepidópteros, por ejemplo, Acronicta major, Adoxophyes spp., Aedia

- leucomelas, *Agrotis* spp., *Alabama* spp., *Amyelois transitella*, *Anarsia* spp., *Anticarsia* spp., *Argyroplote* spp., *Barathra brassicae*, *Borbo cinnara*, *Bucculatrix thurberiella*, *Bupalus piniarius*, *Busseola* spp., *Cacoecia* spp., *Caloptilia theivora*, *Capua reticulana*, *Carpocapsa pomonella*, *Carposina niponensis*, *Chematobia brumata*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocerus* spp., *Cnephasia* spp., *Conopomorpha* spp.,
- 5 *Conotrachelus* spp., *Copitarsia* spp., *Cydia* spp., *Dalaca* noctuides, *Diaphania* spp., *Diatraea saccharalis*, *Earias* spp., *Ecdytolopha aurantium*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Eldana saccharina*, *Ephestia* spp., *Epinotia* spp., *Epiphyas postvittana*, *Etiella* spp., *Eulia* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Galleria mellonella*, *Gracillaria* spp., *Grapholitha* spp., *Hedylepta* spp., *Helicoverpa* spp., *Heliothis* spp., *Hofmannophila pseudospretella*, *Homoeosoma* spp., *Homona* spp., *Hyponomeuta padella*, *Kakivoria*
- 10 *flavofasciata*, *Laphygma* spp., *Laspeyresia molesta*, *Leucinodes orbonalis*, *Leucoptera* spp., *Lithocolletis* spp., *Lithophane antennata*, *Lobesia* spp., *Loxagrotis albicosta*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma neustria*, *Maruca testulalis*, *Mamestra brassicae*, *Mocis* spp., *Mythimna separata*, *Nymphula* spp., *Oiketicus* spp., *Oria* spp., *Orthaga* spp., *Ostrinia* spp., *Oulema oryzae*, *Panolis flammea*, *Parnara* spp., *Pectinophora* spp., *Perileucophaea* spp., *Phthorimaea* spp., *Phyllocnistis citrella*, *Phyllonorycter* spp., *Pieris* spp., *Platynota stultana*, *Plodia interpunctella*, *Plusia* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Prodenia* spp., *Protoparce* spp.,
- 15 *Pseudaletia* spp., *Pseudoplusia includens*, *Pyrausta nubilalis*, *Rachiplusia* nu, *Schoenobius* spp., *Scirpophaga* spp., *Scotia segetum*, *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Stathmopoda* spp., *Stomopteryx subsecivella*, *Synanthedon* spp., *Tecia solanivora*, *Thermesia gemmatilis*, *Tinea pellionella*, *Tineola bisselliella*, *Tortrix* spp., *Trichophaga tapetzella*, *Trichoplusia* spp., *Tuta absoluta*, *Virachola* spp.
- 20
- Aún otros ejemplos son del orden de los Ortópteros, por ejemplo, *Acheta domesticus*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Dichroplus* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Melanoplus* spp., *Periplaneta* spp., *Pulex irritans*, *Schistocerca gregaria*, *Supella longipalpa*.
- 25
- Aún otros ejemplos son del orden de los Sifonápteros, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp., *Ctenocephalides* spp., *Tunga penetrans*, *Xenopsylla cheopis*.
- Aún otros ejemplos son del orden de los Sinfílidos, por ejemplo, *Scutigerella* spp.
- 30
- Aún otros ejemplos son del orden de los Tisanópteros, por ejemplo, *Anaphothrips obscurus*, *Baliothrips biformis*, *Drepanothrips reuteri*, *Enneothrips flavens*, *Frankliniella* spp., *Heliothrips* spp., *Hercinothrips femoralis*, *Rhipiphorothrips cruentatus*, *Scirtothrips* spp., *Taeniothrips cardamoni*, *Thrips* spp.
- Aún otros ejemplos son del orden de los Zygentomos (=Thysanura), por ejemplo, *Lepisma saccharina*, *Thermobia domestica*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*, *Thermobia domestica*.
- 35
- En otras realizaciones, las plagas del filo Mollusca, en particular, de la clase de los Bivalvia, por ejemplo, *Dreissena* spp. también son plagas vegetales importantes.
- 40
- En otra realización, plagas de la clase de los Gasterópodos son plagas vegetales importantes, por ejemplo, *Anion* spp., *Biomphalaria* spp., *Bulinus* spp., *Deroceras* spp., *Galba* spp., *Lymnaea* spp., *Oncomelania* spp., *Pomacea* spp., *Succinea* spp.
- 45
- Aún en otra realización las plagas vegetales son del filo Nematoda y son plagas vegetales importantes, es decir, nemátodos fitoparasitarios, lo cual significa nemátodos parasitarios de las plantas que causan daño a las plantas. Los nemátodos de las plantas abarcan nemátodos parasitarios de las plantas y nemátodos que viven en el suelo. Los nemátodos parasitarios de las plantas incluyen, entre otros, ectoparásitos tales como *Xiphinema* spp., *Longidorus* spp., y *Trichodorus* spp.; semiparásitos tales como *Tylenchulus* spp.; endoparásitos migratorios tales como *Pratylenchus* spp., *Radopholus* spp., y *Scutellonema* spp.; parásitos
- 50 sedentarios tales como *Heterodera* spp., *Globodera* spp., y *Meloidogyne* spp., y endoparásitos del tallo y la hoja tales como *Ditylenchus* spp., *Aphelenchoides* spp., y *Hirshmaniella* spp. Además, nemátodos del suelo parasitarios que dañan las raíces son nemátodos formadores de quistes del género *Heterodera* o *Globodera*, y/o nemátodos del nudo radicular del género *Meloidogyne*. Las especies dañinas de estos géneros son, por ejemplo, *Meloidogyne incognata*, *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode), *Globodera pallida* y
- 55 *Globodera rostochiensis* (nemátodo del quiste de la patata). Aún otros géneros importantes de importancia como plagas vegetales comprenden *Rotylenchulus* spp., *Paratrichodorus* spp., *Pratylenchus penetrans*, *Radolophus similis*, *Ditylenchus dipsaci*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema* spp., *Bursaphelenchus* spp., y similares, en particular, *Aphelenchoides* spp., *Bursaphelenchus* spp., *Ditylenchus* spp., *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Longidorus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Trichodorus*
- 60 spp., *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema* spp.
- En aún otra realización, las plagas vegetales son virus y las formulaciones agroquímicas de la invención están dirigidas a tratar una infección viral o a inhibir la infectividad viral en una planta, el fitovirus se selecciona entre un alfamovirus, un allexivirus, un alfacriptovirus, un anulavirus, un apscaviroide, un
- 65 *aureusvirus*, un *avenavirus*, un *avsunviridae*, un *badnavirus*, un *begomovirus*, un *benyvirus*, un *betacriptovirus*, un *betaflexiviridae*, un *bromovirus*, un *bymovirus*, un *capilovirus*, un *carlavirus*, un *carmovirus*,

un caulimovirus, un cavemovirus, un queravirus, un closterovirus, un cocadviroide, un coleviroide, un comovirus, un crinivirus, un cucumovirus, un curtovirus, un cytorhabdovirus, un diantovirus, un enamovirus, un umbravirus y virus satélite tipo B, un fabavirus, un fijivirus, un furovirus, un hordeivirus, un hostuviroide, un idaeovirus, un ilarvirus, un ipomovirus, un luteovirus, un maclomovirus, un macluravirus, un marafivirus, un mastrevirus, un nanovirus, un necrovirus, un nepovirus, un nucleorhabdovirus, un oleavirus, un ophiovirus, un oryzavirus, un panicovirus, un pecluvirus, un petuvirus, un fitoreovirus, un polerovirus, un pomovirus, un pospiviroides, un potexvirus, un potyvirus, un reovirus, un rhabdovirus, un rymovirus, un sadwavirus, un virus tipo SbCMV, un sequivirus, un sobemovirus, un tenuivirus, un virus satélite tipo TNsatV, un tobamovirus, un topocuvirus, un tospovirus, un tricovirus, un tritimovirus, un tungrovirus, un tymovirus, un umbravirus, un varicosavirus, un vitivirus, o un waikavirus.

FORMAS DEL ANTÍGENO OBJETIVO

Sobre la base de la divulgación de la presente invención se apreciará que para aplicaciones agroquímicas y de control biológico, los polipéptidos de las composiciones como se describen en la presente pueden estar dirigidos contra o específicamente unirse a varias formas diferentes del objetivo de una plaga, por ejemplo, un objetivo fúngico. También se espera que los polipéptidos de las composiciones como se divulgan en la presente invención se unirán a un número de análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de origen natural o sintéticos. Más particularmente, se espera que los polipéptidos de las composiciones como se divulgan en la presente invención se unirán al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos del objetivo que (todavía) contienen el sitio de unión, parte o dominio del objetivo natural al cual se unen esos polipéptidos.

FORMULACIONES

Se contempla que el contenido polipeptídico contenido en la composición agroquímica o para control biológico como se divulga en la presente invención puede variar dentro de un amplio rango y generalmente queda a criterio del fabricante modificar el rango de concentración de un polipéptido en particular de acuerdo con la plaga específica del cultivo que ha de ser atenuada.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones agroquímicas que comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2, donde dicho dominio variable de cadena pesada está presente en una cantidad eficaz para proteger o tratar una planta o parte de dicha planta de una infección y otra interacción biológica con dicho fitopatógeno.

En una realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser al menos el 0,0001 % en peso.

En una realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser hasta el 50 % en peso.

En una realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,0001 % y el 50 % en peso.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones agroquímicas que comprenden al menos un polipéptido, donde la concentración del al menos un polipéptido en la composición agroquímica está comprendida entre el 0,001 % y el 50 % en peso.

En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,001 % y el 50 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre 0,01 % y 50 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,1 % y el 50 % en peso.

En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 1 % y el 50 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 10 % y el 50 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,0001 % y el 40 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,001 % y el 40 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,01 % y 40 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,1 % y el 40 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 1 % y el 40 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,0001 % y el 30 % en peso. En aún otra realización específica, la

concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,001 % y el 30 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,01 % y el 30 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,01 % y el 30 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,0001 % y el 10 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,001 % y el 10 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,01 % y el 10 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,1 % y el 10 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 1 % y el 10 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,0001 % y el 1 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,001 % y el 1 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,01 % y el 1 % en peso. En aún otra realización específica, la concentración del polipéptido contenido en la composición agroquímica puede ser entre el 0,1 % y el 1 % en peso.

En realizaciones particulares, las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención comprenden al menos un polipéptido, el cual está formulado en una solución acuosa.

En realizaciones particulares adicionales, las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención comprenden al menos un polipéptido y además comprenden un portador agroquímicamente adecuado y/o uno o más adyuvantes adecuados.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender, además del polipéptido antiplaga descrito anteriormente, portadores sólidos o líquidos que son aceptables para el tratamiento de plagas de plantas y/o partes de plantas y/o tensioactivos que también son aceptables para el tratamiento de plagas de plantas y/o partes de plantas. En particular, se pueden usar portadores inertes y los comúnmente empleados y tensioactivos comúnmente empleados. Estas composiciones no solo cubren composiciones listas para ser aplicadas a las plantas y/o partes de plantas que se han de tratar por inmersión o usando un dispositivo adecuado, sino también las composiciones comerciales concentradas que tienen que diluirse antes de la aplicación a las plantas y/o partes de plantas.

Estas composiciones agroquímicas de acuerdo con la invención también pueden contener cualquier otro ingrediente de otra clase tal como, por ejemplo, coloides protectores, adhesivos, espesantes, agentes tixotrópicos, agentes penetrantes, estabilizantes, secuestrantes, agentes texturizantes, agentes saborizantes, mejoradores de sabor, azúcares, edulcorantes, colorantes y similares. Más generalmente, las sustancias activas, es decir, el al menos un dominio variable de cadena pesada, se puede combinar con cualquier aditivo sólido o líquido correspondiente a las técnicas de formulación usuales.

Estas composiciones agroquímicas de acuerdo con la invención también pueden contener otros ingredientes activos de cualquier clase tales como, por ejemplo, otros ingredientes activos antibacterianos o antifúngicos.

El término "portador", en la presente divulgación, denota una sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética con la cual se combina la sustancia activa antiplaga para facilitar su aplicación a plantas y/o una o más partes de una planta. Por lo tanto, este portador es generalmente inerte y debería ser aceptable en el sector agrícola. El portador puede ser sólido (arcillas, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos y similares) o líquido (agua, alcoholes, en particular butanol, y similares).

El tensioactivo puede ser un agente emulsionante, un agente dispersante o un agente humectante de tipo iónico o no iónico o una mezcla de dichos tensioactivos. Se pueden mencionar, por ejemplo, sales de ácidos poliácridicos, sales de ácidos lignosulfónicos, sales de ácidos fenosulfónicos o naftalenosulfónicos, policondensados de óxido de etileno con alcoholes grasos o con ácidos grasos o con aminas grasas, fenoles sustituidos (en particular alquilfenoles o arilfenoles), sales de ésteres de ácidos sulfosuccínicos, derivados de taurina (en particular alquiltauratos), ésteres fosfóricos de fenoles o alcoholes polioxiethylados, ésteres de ácidos grasos y polioles, y derivados de los compuestos anteriores que contienen un grupo funcional sulfato, sulfonato y fosfato. La presencia de al menos un tensioactivo es generalmente esencial cuando el portador inerte no es soluble en agua y cuando el agente vector para la aplicación es agua.

Las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención son en sí mismas formas sólidas o líquidas bastante diversas.

Como formas de composición sólida, se pueden mencionar polvos espolvoreables (con un contenido de

sustancia activa que puede ser hasta del 100 %) y gránulos, en particular aquellos obtenidos por extrusión, por compactación, por impregnación de un portador granulado, por granulación usando un polvo como material de partida (el contenido de sustancia activa en esos gránulos es entre el 0,5 y el 80 % en estos últimos casos). Tales composiciones sólidas se pueden usar opcionalmente en la forma de un líquido que es viscoso en mayor o menor grado, según el tipo de aplicación deseada, por ejemplo, mediante dilución en agua.

Como formas de composición líquida o formas destinadas a constituir composiciones líquidas durante la aplicación, se pueden mencionar soluciones, en particular concentrados solubles en agua, emulsiones, concentrados en suspensión, polvos humectables (o polvo para pulverización), aceites y ceras.

Los concentrados en suspensión, que se pueden aplicar por pulverización, se preparan para obtener un producto fluido estable que no forma un depósito y usualmente contiene entre 10 y 75 % de sustancia activa, entre 0,5 y 15 % de tensioactivos, entre 0,1 y 10 % de agentes tixotrópicos, entre 0 y 10 % de aditivos adecuados, tales como antiespumantes, inhibidores de corrosión, estabilizadores, agentes de penetración y adhesivos, y como portador, agua o un líquido orgánico en el cual la sustancia activa no es soluble o no es muy soluble; algunos sólidos orgánicos o sales inorgánicas se pueden disolver en el portador para ayudar a prevenir la sedimentación o como antiagregantes para el agua.

Las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención se pueden usar como tales, en la forma en la que están preparadas o como formas de uso preparadas a partir de estas, tales como dispensador en aerosol, suspensión en cápsulas, concentrado para nebulizar en frío, concentrado para nebulizar en caliente, gránulos encapsulados, granos finos, concentrado en suspensión para tratamiento de semillas, solución lista para usar, polvo espolvoreable, concentrado emulsionable, emulsión aceite en agua, emulsión agua en aceite, macrogránulo, microgránulo, polvo dispersable en aceite, concentrado en suspensión miscible en aceite, líquido miscible en aceite, espumas, pasta, semillas recubiertas con un pesticida, concentrado en suspensión, suspensiones-emulsiones-concentrados, concentrado soluble, suspensiones, polvo soluble, gránulo, gránulos o comprimidos solubles en agua, polvo soluble en agua para tratamiento de semillas, polvo humectable, materiales naturales y sintéticos impregnados con compuesto activo, microencapsulado en materiales poliméricos y en recubrimientos para semillas, partículas biológicas microencapsuladas, por ejemplo, las descritas en los documentos WO2018/201160, WO2018/201161 y WO2019/060903, como así también formulaciones para nebulizar en frío y en caliente con ULV (volumen ultra bajo, por sus siglas en inglés), gas (bajo presión), producto generador de gas, producto para aplicar en la varilla de la planta, polvo para tratamiento de semillas en seco, solución para tratamiento de semillas, líquido ULV, suspensión ULV, gránulos o comprimidos dispersables en agua, polvo dispersable en agua para tratamiento como suspensión.

Estas formulaciones se preparan en una forma conocida al mezclar los compuestos activos o las combinaciones de compuestos activos con aditivos convencionales, tales como, por ejemplo, extensores y también disolventes o diluyentes, emulsionantes, dispersantes y/o agentes de unión o fijación, agentes humectantes, repelentes de agua, si resulta apropiado, secantes y estabilizadores UV, colorantes, pigmentos, desespumantes, conservantes, espesantes secundarios, adhesivos, giberelinas y agua, como así también auxiliares de proceso adicionales.

Estas composiciones no incluyen solamente composiciones que están listas para aplicar a la planta o semilla que se ha de tratar por medio de un dispositivo adecuado, tal como un pulverizador o dispositivo para espolvorear, sino también composiciones concentradas comerciales que se deben diluir antes de la aplicación al cultivo.

MÉTODOS PARA PROTECCIÓN O TRATAMIENTO DE PLANTAS

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para proteger o tratar una planta o una parte de una planta de una infección u otra interacción biológica con un fitopatógeno, que comprenden al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta, una composición agroquímica que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2. La composición que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o el polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 se pueden aplicar en condiciones eficaces para proteger o tratar la planta o parte de la planta frente a la infección o la interacción biológica con el fitopatógeno.

En realizaciones particulares, estos métodos comprenden aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta una composición agroquímica como se divulga en la presente invención, por ejemplo, con una tasa de aplicación mayor que 50 g de la composición agroquímica por hectárea, tal como, entre otras, una tasa de aplicación mayor que 75 g de la composición agroquímica por hectárea, tal como una tasa de aplicación mayor que 100 g de la composición agroquímica por hectárea, o en particular una tasa de aplicación mayor que 200 g de la composición agroquímica por hectárea.

En realizaciones particulares, estos métodos comprenden aplicar directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta una composición agroquímica como se divulga en la presente invención, por ejemplo, con una tasa de aplicación entre 50 g y 200 g de la composición agroquímica por hectárea, tal como, entre otras, una tasa de aplicación entre 50 g y 200 g de la composición agroquímica por hectárea, en particular una tasa de aplicación entre 75 g y 175 g de la composición agroquímica por hectárea, tal como entre 75 g y 150 g de la composición agroquímica por hectárea o entre 75 g y 125 g por hectárea.

En aún otra realización, la invención proporciona métodos para combatir o inhibir plagas vegetales, métodos que comprenden aplicar una composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención a una planta, tal como un cultivo, o a una parte de una planta o cultivo, por ejemplo, con una tasa de aplicación menor que 50 g de dicho polipéptido por hectárea. En realizaciones específicas la tasa de aplicación es menor que 45 g/ha, menor que 40 g/ha, menor que 35 g/ha, menor que 25 g/ha, menor que 20 g/ha, menor que 15 g/ha, menor que 10 g/ha, menor que 5 g/ha, menor que 1 g/ha o incluso cantidades menores de polipéptido/ha.

Se entiende que según el cultivo y la presión ambiental de las plagas vegetales el agricultor puede variar la tasa de aplicación. Estas variaciones en las tasas de aplicación se especifican en la hoja técnica entregada con la composición agroquímica específica.

En aún otra realización, la invención proporciona el uso de composiciones agroquímicas o para control biológico que comprenden al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 para combatir o inhibir plagas vegetales.

En aún otra realización, la invención proporciona el uso de polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 para combatir o inhibir plagas vegetales.

La aplicación de una composición agroquímica o para control biológico o un polipéptido de acuerdo con la invención a un cultivo se puede realizar usando cualquier método para aplicar una composición agroquímica o para control biológico a un cultivo, que incluye, entre otros, pulverización (que incluye pulverización de alto volumen (HV, por sus siglas en inglés), de bajo volumen (LV, por sus siglas en inglés) y de ultra bajo volumen (ULV, por sus siglas en inglés), cepillado, revestimiento, goteo, recubrimiento, inmersión, diseminación, nebulización, aplicación como gotitas, nebulización o aerosol.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, los métodos para proteger o tratar una planta o una parte de una planta de una infección u otra interacción biológica con un fitopatógeno como se divulga en la presente invención, comprende aplicar la composición agroquímica directa o indirectamente a la planta o una parte de la planta, por ejemplo, mediante pulverización, atomizado, espumado, nebulización, cultivo en hidrocultivo, cultivo en hidroponía, recubrimiento, sumersión y/o incrustamiento.

En ciertas realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para inhibir, prevenir, reducir o controlar el crecimiento de un fitopatógeno, que comprenden al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a una planta o parte de una planta, una composición agroquímica que comprende al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

En ciertas otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos para eliminar un fitopatógeno, que comprenden al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a una planta o parte de una planta, una composición agroquímica o un polipéptido como se divulga en la presente invención.

Alternativamente, la tasa de aplicación de la composición agroquímica de acuerdo con la invención, lo cual significa la cantidad de la composición agroquímica que se aplica al cultivo, es tal que se aplica al cultivo por hectárea menos de 50 g, 45 g, 40 g, 35 g, 30 g, 25 g, 20 g, 15 g, 10 g, 5 g, 1 g o incluso menos que 1 g del polipéptido, comprendido en la composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención.

De acuerdo con los métodos divulgados en la presente invención, la composición agroquímica o para control biológico se puede aplicar una vez al cultivo, o se puede aplicar dos o más veces seguidas con un intervalo cada dos aplicaciones. De acuerdo con el método de la presente invención, la composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención se puede aplicar sola o mezclada con otros materiales, preferentemente otras composiciones agroquímicas o para control biológico, al cultivo; alternatively, la composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención se puede aplicar separadamente al cultivo con otros materiales, preferentemente, otras composiciones agroquímicas o para control biológico, aplicadas en momentos diferentes al mismo cultivo. De acuerdo con el método de la presente invención, la composición agroquímica o para control biológico de acuerdo con la invención se puede aplicar al cultivo de forma profiláctica, o alternatively, se puede aplicar una vez que la plaga objetivo ha sido identificada en el cultivo particular que se ha de tratar.

Las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención se pueden aplicar directamente a una planta, un cultivo o a una o más partes de la planta mediante los métodos mencionados anteriormente, tal como directamente a la planta entera o directamente a una o más partes de la planta, ya sea en la etapa precosecha como poscosecha. La aplicación en la precosecha puede tener un efecto poscosecha. En ciertas realizaciones adicionales, las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención se pueden aplicar directamente a una o más partes de la planta con los métodos mencionados anteriormente, tales como directamente a los tallos, las hojas, los tubérculos, las cañas, los brotes, las semillas, los frutos, las raíces, flores, los granos, las yemas, etc.

El método de tratamiento divulgado en la presente invención también se puede usar en el campo de la protección de productos almacenados frente al ataque de fitopatógenos. En este método de tratamiento, la aplicación de una composición de la invención puede ser precosecha o poscosecha. De acuerdo con la presente invención, se entiende que la expresión "productos almacenados" denota sustancias naturales de origen vegetal o animal y sus formas procesadas, las cuales han sido tomadas de su ciclo de vida natural y para las cuales se busca una protección de largo plazo. Los productos almacenados de origen vegetal, tales como plantas, o sus partes, por ejemplo, tallos, hojas, tubérculos, semillas, frutos o granos, se pueden proteger en el estado recién cosechado o en forma procesada, tal como presecado, humectado, molido, picado, presionado o tostado. La definición de productos almacenados también comprende madera, ya sea en forma de madera en bruto, tal como madera para construcción, postes de luz y barreras, o en la forma de artículos terminados, tales como muebles u objetos realizados con madera. Los productos almacenados de origen animal son cueros crudos, cueros curtidos, pieles, pelos y similares. Las combinaciones de acuerdo con la presente invención pueden prevenir efectos desventajosos tales como deterioro, decoloración y moho. Preferentemente, se entiende que "productos almacenados" denota sustancias naturales de origen vegetal y sus formas procesadas, más preferentemente frutos y sus formas procesadas, tales como pomáceas, frutos de hueso, frutos rojos y cítricos y sus formas procesadas.

Las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención también se pueden aplicar indirectamente a una planta, un cultivo o a una o más partes de la planta mediante los métodos mencionados, tal como indirectamente a la planta entera o indirectamente a una o más partes de la planta, ya sea en la etapa precosecha como poscosecha. Las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención se pueden aplicar cerca de la cosecha, tal como aproximadamente tres semanas antes de la cosecha, por ejemplo, dos semanas antes de la cosecha o una semana antes de la cosecha o menos que una semana antes de la cosecha. La aplicación en la precosecha puede tener un efecto poscosecha. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención se pueden aplicar indirectamente a una planta, un cultivo o una o más partes de la planta mediante los métodos mencionados anteriormente, tales como aplicando la composición agroquímica en los alrededores o en el medio en el cual la planta o la única o las varias partes de la planta son cultivadas o almacenadas, tales como, por ejemplo, entre otros, el aire, el suelo, el cultivo hidropónico, el hidrocultivo, o el medio líquido, tal como, por ejemplo, el medio líquido acuoso o agua, en el cual la planta o la única o más partes de la planta son cultivadas o almacenadas.

Las composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención se pueden aplicar directamente como un componente de una estrategia de manejo integral de plagas.

Por lo tanto, se deberá entender generalmente en el contexto de esta solicitud que el tratamiento de plantas y partes de plantas con las composiciones agroquímicas según se divulga en la presente invención se lleva a cabo directamente o por la acción sobre su entorno, hábitat o área de almacenamiento por medio de los métodos normales de tratamiento, por ejemplo, regado (encharcado), riego por goteo, pulverización, vaporización, atomización, al voleo, espolvoreo, espumado, diseminación, y como un polvo. También es posible aplicar las composiciones mediante el método de volumen ultra bajo, o inyectar la preparación con el compuesto activo o el propio compuesto activo en el suelo.

En realizaciones particulares, los métodos para proteger o tratar una planta o una parte de una planta de una infección u otra interacción biológica con un fitopatógeno como se divulgan en la presente invención, comprenden aplicar la composición agroquímica directa o indirectamente a la planta o a una parte de la planta, ya sea en una etapa anterior a la cosecha o posterior a la cosecha.

De acuerdo con realizaciones específicas, el producto cosechado es una fruta, flor, nuez o un vegetal, es preferente una fruta o un vegetal con piel no comestible, preferentemente seleccionado entre aguacates, plátanos, llantenos, limones, pomelos, melones, naranjas, piñas, kiwis, guayabas, mandarinas, mangos, calabacines, fresas, uvas y calabaza, más preferentemente plátanos, naranjas, limones y melocotones, en particular plátanos. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, el producto cosechado es una flor cortada de plantas ornamentales, preferentemente seleccionada entre, astromelia, clavel, crisantemo, fresia, gerbera, gladiolo, gipsófila (*Gypsophila spec.*), helianto, hortensias, lirios, lisianto, rosas y flores de verano.

Las especies de plantas a las cuales se pueden aplicar las composiciones agroquímicas divulgadas en la presente invención pueden ser, por ejemplo, entre otras, maíz, semilla de soja, alfalfa, algodón, girasol, semillas de aceite de brassica, tales como *Brassica napus* (por ejemplo, canola, colza), *Brassica rapa*, *B. juncea* (por ejemplo, mostaza (de campo)) y *Brassica carinata*, *Arecaceae* sp. (por ejemplo, aceite de palma, coco), arroz, trigo, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, centeno, cebada, mijo y sorgo, triticale, lino, nueces, uva y vides y diversos frutos y vegetales de diversas taxonomías botánicas, por ejemplo, *Rosaceae* sp. (por ejemplo, pomáceas tales como manzanas y peras, pero también frutas de hueso, tales como, albaricoques, cerezas, almendras, ciruelas y melocotones, y frutos rojos, tales como fresas, frambuesas, grosellas rojas y negras y grosella espinosa), *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp. (por ejemplo, olivo), *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp. (por ejemplo, aguacate, canela, alcanfor), *Musaceae* sp. (por ejemplo, plataneros y plantaciones), *Rubiaceae* sp. (por ejemplo, café), *Theaceae* sp. (por ejemplo, té), *Sterculiaceae* sp., *Rutaceae* sp. (por ejemplo, limones, naranjas, mandarinas y pomelos), *Solanaceae* sp. (por ejemplo, tomates, patatas, pimentones, pimientos, berenjenas, tabaco), *Liliaceae* sp., *Compositae* sp. (por ejemplo, lechuga, alcachofa y achicoria, que incluye raíz de achicoria, endivias y achicoria común), *Umbelliferae* sp. (por ejemplo, zanahorias, perejil, cilantro, apionabo), *Cucurbitaceae* sp. (por ejemplo, pepinos – que incluyen pepinillos, calabazas, sandías, calabazas y melones), *Alliaceae* sp. (por ejemplo, puerros y cebollas), *Cruciferae* sp. (por ejemplo, col blanca, col lombarda, brócoli, coliflor, coles de Bruselas, pak choi, colinabo, rábanos, rábanos picantes, berro y col china), *Leguminosae* sp. (por ejemplo, cacahuetes, guisantes, lentejas y judías - por ejemplo, judías comunes y habas), *Chenopodiaceae* sp. (por ejemplo, acelga, remolacha forrajera, espinaca, remolacha), *Linaceae* sp. (por ejemplo, cáñamo), *Cannabaceae* sp. (por ejemplo, cannabis), *Malvaceae* sp. (por ejemplo, quimbombó, cacao), *Papaveraceae* (por ejemplo, amapola), *Asparagaceae* (por ejemplo, espárrago); plantas útiles y plantas ornamentales en el jardín y maderas, que incluyen césped, pasto y estevia rebaudiana; y en cada caso los tipos genéticamente modificados de esas plantas.

En una realización preferida de los métodos de tratamiento divulgados en la presente invención, el cultivo se selecciona del grupo que consiste en cultivos de campo, pastos, frutos y vegetales, césped, árboles y plantas ornamentales.

En ciertos aspectos, la presente invención también proporciona métodos de tratamiento poscosecha para proteger o tratar una planta cosechada o una parte cosechada de la planta de una infección u otra interacción biológica con un fitopatógeno, que al menos comprende el paso de aplicar directa o indirectamente a la planta cosechada o a una parte cosechada de la planta, una composición agroquímica como se divulga en la presente invención, en condiciones eficaces para proteger o tratar la planta cosechada o una parte cosechada de la planta frente a la infección o la interacción biológica con el fitopatógeno. De acuerdo con realizaciones específicas, el producto cosechado es una fruta, flor, nuez o un vegetal, se prefiere una fruta o un vegetal con piel no comestible, preferentemente seleccionado entre aguacates, plátanos, llantenes, limones, pomelos, melones, naranjas, piñas, kiwi, guayabas, mandarinas, mangos y calabaza, más preferentemente plátanos, naranjas, limones y melocotones, en particular plátanos. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, el producto cosechado es una flor cortada de plantas ornamentales, preferentemente seleccionada entre, astromelia, clavel, crisantemo, fresia, gerbera, gladiolo, gipsófila (*Gypsophila spec*), helianto, hortensias, lirios, lisianto, rosas y flores de verano. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, el producto cosechado es hierba cortada o madera.

Los trastornos poscosecha son, por ejemplo, manchas lunares, quemaduras, descomposición senescente, mancha amarga, escaldadura, corazón acuoso, pardeamiento, descomposición vascular, daño por CO₂, deficiencia de CO₂ u O₂ y reblandecimiento.

Las enfermedades fúngicas pueden ser causadas, por ejemplo, por los siguientes hongos: *Mycosphaerella* spp., *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella frag a ae*, *Mycosphaerella citri*; *Mucor* spp., e.g. *Mucor piriformis*; *Monilinia* spp., e.g. *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*; *Phomopsis* spp., *Phomopsis natalensis*; *Colletotrichum* spp., e.g. *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*; *Verticillium* spp., e.g. *Verticillium theobromae*; *Nigrospora* spp.; *Botrytis* spp., e.g. *Botrytis cinerea*; *Diplodia* spp., e.g. *Diplodia citri*; *Pezicula* spp.; *Alternaria* spp., e.g. *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*; *Septoria* spp., e.g. *Septoria depressa*; *Venturia* spp., e.g. *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*; *Rhizopus* spp., e.g. *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*; *Glomerella* spp., e.g. *Glomerella cingulata*; *Sclerotinia* spp., e.g. *Sclerotinia fruiticola*; *Ceratocystis* spp., e.g. *Ceratocystis paradoxa*; *Fusarium* spp., e.g. *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*; *Cladosporium* spp., e.g. *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cladosporium musae*; *Penicillium* spp., e.g. *Penicillium funiculosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*; *Phytophthora* spp., e.g. *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasitica*; *Phacidiopycnis* spp., e.g. *Phacidiopycnis malurum*; *Gloeosporium* spp., e.g. *Gloeosporium album*, *Gloeosporium perennans*, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium singulata*; *Geotrichum* spp., e.g. *Geotrichum candidum*; *Phlyctaena* spp., e.g. *Phlyctaena vagabunda*; *Cylindrocarpon* spp., e.g. *Cylindrocarpon mail*; *Stemphylium* spp., e.g. *Stemphylium vesicatum*; *Thielaviopsis* spp., e.g. *Thielaviopsis paradoxa*; *Aspergillus* spp., e.g. *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* us; *Nectria* spp., e.g. *Nectria galligena*;

Cercospora spp., e.g. Cercospora angreii, Cercospora apii, Cercospora atrofiliiformis, Cercospora musae, Cercospora zeae- maydis.

5 En aspectos adicionales, la presente invención proporciona usos de composiciones agroquímicas como se divulgan en la presente invención como agentes antiplaga, tales como, por ejemplo, un agente biostático o un agente pesticida, inclusive, entre otros, un agente fungistático o fungicida.

10 En una realización en particular, las plagas vegetales que combate el método de acuerdo con la presente invención son hongos fitopatógenos, como se definió anteriormente. Como resultado de la aplicación del método de acuerdo con la presente invención se puede reducir el número de lesiones, el tamaño de las lesiones y la extensión de la esporulación de los patógenos fúngicos.

MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN Y FABRICACIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS

15 Se divulgan métodos para preparar o generar las secuencias polipeptídicas, tales como el polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID:2, como así también métodos para producir ácidos nucleicos que codifican estas y células huésped, productos y composiciones que comprenden estas secuencias polipeptídicas. Algunos ejemplos preferidos pero no limitantes de tales métodos se tornarán evidentes a partir de la descripción en la presente invención.

20 Como resultará claro para el experto, un método particularmente útil para preparar secuencias polipeptídicas como se divulgan en la presente invención comprende los siguientes pasos:

- 25 (a) expresar una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente invención o un vector o una construcción genética una secuencia nucleotídica que codifica esa secuencia polipeptídica y
- (b) opcionalmente aislar y/o purificar la secuencia polipeptídica.

30 En realizaciones particulares contempladas en la presente invención, las secuencias polipeptídicas específicas para una plaga se pueden obtener mediante métodos que suponen generar una biblioteca aleatoria de secuencias de aminoácidos y cribar esta biblioteca para detectar una secuencia de aminoácidos capaz de unirse específicamente a una plaga objetivo.

35 Por consiguiente, en realizaciones particulares, los métodos para preparar una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente invención comprenden los pasos de

- a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de aminoácidos; y
- b) cribar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de aminoácidos que se pueden unir y/o tener afinidad por la plaga objetivo
- 40 y
- c) aislar la secuencia o las secuencias de aminoácidos que se pueden unir y/o tener afinidad por la plaga objetivo.

45 En tal método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias polipeptídicas puede ser cualquier conjunto, colección o biblioteca de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina (como se describe en la presente invención), tal como un conjunto, colección o biblioteca no tratados previamente de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina; un conjunto, colección o biblioteca sintéticos o semisintéticos de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina; y/o un

50 conjunto, colección o biblioteca de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina que han sido sometidos a maduración de la afinidad.

En realizaciones particulares de este método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmune de secuencias de fragmentos de

55 inmunoglobulina, por ejemplo, derivado de un mamífero que ha sido adecuadamente inmunizado con un objetivo de una plaga o con un determinante antigénico adecuado sobre la base de esta o derivado de esta, tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle antigénico u otro epítipo de esta. En un aspecto en particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro u otros epítopos extracelulares.

60 En los métodos mencionados, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias polipeptídicas se puede presentar en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), para facilitar el cribado. Los métodos, las técnicas y los organismos huésped adecuados para presentar y cribar (un conjunto, una colección o una biblioteca de) secuencias de aminoácidos resultarán obvios para el experto en la técnica,

65 por ejemplo, sobre la base de la divulgación ulterior en la presente invención. También se hace referencia a la reseña de Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En otras realizaciones, los métodos para generar las secuencias polipeptídicas como se divulgan en la presente invención comprenden al menos los siguientes pasos:

- 5 a) proporcionar una colección o muestra de células que expresan secuencias polipeptídicas;
- b) cribar dicha colección o muestra de células para detectar células que expresen una secuencia de aminoácidos que se pueda unir con y/o tenga afinidad por un objetivo de la plaga;
- y
- 10 c) ya sea (i) aislar dicha secuencia de aminoácidos; o bien (ii) aislar de dicha célula una secuencia de ácidos nucleicos que codifique dicha secuencia de aminoácidos, seguido de la expresión de dicha secuencia de aminoácidos.

La colección o la muestra de células puede ser, por ejemplo, una colección o muestra de células B. También, en este método la muestra de células puede derivar de un mamífero que ha sido adecuadamente inmunizado con un objetivo fúngico, o con un determinante antigénico adecuado basado o derivado de este, tal como una parte, un fragmento, una región, un dominio, un bucle antigénico de este u otro epítipo de este. En una realización en particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro u otros epítipos extracelulares.

20 En otras realizaciones, el método para generar una secuencia polipeptídica dirigida contra un objetivo de una plaga puede comprender al menos los pasos de:

- a) proporcionar un conjunto, una colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos polipeptídica;
- 25 b) cribar dicho conjunto, colección o genoteca de secuencias de ácidos nucleicos para detectar secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que puede unirse con el objetivo de la plaga y/o tiene afinidad con este;
- y
- 30 c) aislar dicha secuencia de ácidos nucleicos, seguido de la expresión de dicha secuencia de aminoácidos.

En los métodos mencionados anteriormente, el objetivo de la plaga puede ser una fracción lipídica de la membrana plasmática de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo). Dicha fracción lipídica puede obtenerse mediante cromatografía. Por ejemplo, dicha fracción lipídica puede obtenerse por un método que comprende:

35 fraccionar las hifas de un hongo (por ejemplo, *Botrytis cinerea* u otro hongo) mediante extracción de lípidos totales por cromatografía de capa fina y selección de la fracción con un Factor de Retención (Rf, por sus siglas en inglés) más alto que la fracción de ceramida y más bajo que la fracción de fosfolípidos no polares.

40 En los métodos mencionados anteriormente, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifica secuencias de aminoácidos puede ser, por ejemplo, un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, una colección o una biblioteca de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina no tratados previamente; un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección o biblioteca sintéticos o semisintéticos de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina que han sido sometidos a maduración de la afinidad.

50 En particular, en dicho método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos codifica un conjunto, colección o biblioteca de polipéptidos (tal como dominios V_H o dominios V_{HH}). Por ejemplo, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos puede codificar un conjunto, colección o biblioteca de anticuerpos de dominio o anticuerpos de dominio simple, o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de aminoácidos que son capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o un anticuerpo de dominio simple. En realizaciones específicas, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias nucleotídicas codifica un conjunto, una colección o una biblioteca de secuencias V_{HH} .

60 En los métodos mencionados, anteriormente el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias nucleotídicas se puede presentar en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), para facilitar el cribado. Los métodos, las técnicas y los organismos hospederos adecuados para presentar y cribar (un conjunto, una colección o una biblioteca de) secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de aminoácidos resultarán obvios para el experto en la técnica, por ejemplo, sobre la base de la divulgación ulterior en la presente invención. También se hace referencia a la reseña de Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

65 La invención también se relaciona con secuencias polipeptídicas que se pueden obtener o se obtienen

mediante los métodos mencionados anteriormente, o de forma alternativa por un método que comprende uno de los métodos mencionados anteriormente y además al menos los pasos de determinar la secuencia nucleotídica o la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de inmunoglobulina; y de expresar o sintetizar dicha secuencia de aminoácidos en forma conocida *per se*, tal como mediante expresión en una célula huésped u organismo huésped adecuado o mediante síntesis química.

ASLAMIENTO DE SECUENCIAS POLIPEPTÍDICAS

En algunos casos, los métodos para producir las secuencias de aminoácidos que se unen específicamente a un objetivo fúngico como se contempla en la presente pueden comprender además el paso de aislar de la biblioteca de secuencias de aminoácidos al menos un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 que tenga afinidad de unión detectable por un objetivo de una plaga, o efecto detectable *in vitro* sobre este.

Estos métodos pueden además comprender un paso de amplificar una secuencia que codifica al menos un polipéptido que tiene afinidad de unión detectable por un objetivo de una plaga, o efecto detectable *in vitro* sobre la actividad de este. Por ejemplo, un clon de fago que exhiba una secuencia de aminoácidos en particular, obtenida de un paso de selección de un método descrito en la presente invención, se puede amplificar mediante reinfección de una bacteria hospedera y la incubación en un medio de cultivo.

En realizaciones particulares, estos métodos pueden abarcar la determinación de la secuencia de una o más secuencias de aminoácidos capaces de unirse a un objetivo de una plaga.

Cuando una secuencia polipeptídica, comprendida en un conjunto, una colección o una biblioteca de secuencias de aminoácidos, se presenta sobre una célula, un fago o una partícula adecuada, es posible aislar de dicha célula o fago o partícula, la secuencia de nucleótidos que codifica esa secuencia de aminoácidos. De esta forma, la secuencia de nucleótidos del miembro o de los miembros de la biblioteca de secuencias de aminoácidos seleccionada se puede determinar mediante un método rutinario de secuenciación.

En realizaciones particulares adicionales, los métodos para producir un polipéptido como se contemplan en la presente invención comprenden el paso de expresar dichas secuencia o secuencias de nucleótidos en un organismo huésped en condiciones adecuadas, para así obtener la secuencia de aminoácidos real buscada. Este paso se puede realizar por métodos conocidos por el experto en la técnica.

Además, las secuencias polipeptídicas obtenidas que tienen afinidad de unión detectable por la actividad de un objetivo de una plaga, o efecto detectable *in vitro* sobre este, se pueden sintetizar como construcción proteica soluble, opcionalmente después de que su secuencia haya sido identificada.

Por ejemplo, las secuencias polipeptídicas obtenidas, o que se pueden obtener o seleccionadas mediante los métodos mencionados anteriormente se pueden sintetizar usando métodos de síntesis química o recombinante conocidos en la técnica. Además, las secuencias de aminoácidos obtenidas, que se pueden obtener o seleccionadas mediante los métodos mencionados anteriormente se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética. Por lo tanto, los métodos para sintetizar las secuencias polipeptídicas obtenidas, que se pueden obtener o seleccionadas por los métodos mencionados anteriormente pueden comprender transformar o infectar una célula huésped con un ácido nucleico o un vector que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene afinidad de unión detectable por la actividad de un objetivo de una plaga, o efecto detectable *in vitro* sobre este. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos que tienen afinidad de unión detectable por la actividad de un objetivo de una plaga, o efecto *in vitro* detectable sobre este, se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante. El ADN que codifica las secuencias de aminoácidos se puede sintetizar fácilmente usando procedimientos convencionales. Una vez preparado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión, los cuales luego se pueden transformar o transfectar en células huésped tales como *E. coli* o cualquier sistema de expresión adecuado, para obtener la expresión de secuencias de aminoácidos en las células huésped recombinantes y/o en el medio en el cual residen estas células huésped recombinantes.

Se deberá entender, como es sabido para el experto en la técnica de la expresión y purificación de proteínas, que el polipéptido producido a partir de un vector de expresión usando un sistema de expresión adecuado se puede etiquetar (generalmente en el extremo N terminal o C terminal de la secuencia de aminoácidos), por ejemplo, con una etiqueta His u otra etiqueta de secuencias para su fácil purificación.

La transformación o transfección de ácidos nucleicos o vectores en células huésped se puede realizar mediante una variedad de medios conocidos por el experto en la técnica que incluyen coprecipitación de fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrana, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biobalística.

Las células huésped adecuadas para la expresión de las secuencias polipeptídicas deseadas pueden ser cualquier célula eucariota o procariota (por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli*, células de levadura, células de mamífero, células aviares, células de anfibios, células vegetales, células de peces y células de insectos), ya sea ubicadas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células huésped se pueden ubicar en una planta o un animal transgénico.

Por lo tanto, la aplicación también proporciona métodos para la producción de secuencias polipeptídicas que tienen afinidad de unión detectable por un objetivo de una plaga, o efecto *in vitro* detectable sobre la actividad de este mismo que comprende transformar, transfectar o infectar una célula huésped con secuencias de aminoácidos o vectores que codifican dichas secuencias de ácidos nucleicos y expresar las secuencias de aminoácidos en condiciones adecuadas. La aplicación también proporciona métodos para la producción de secuencias polipeptídicas que tienen afinidad de unión detectable por un objetivo de una plaga, o efecto *in vitro* detectable sobre la actividad de este que comprende proporcionar una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos o un vector que codifica el polipéptido y expresar el polipéptido en condiciones adecuadas. Los métodos de la invención pueden además comprender aislar el polipéptido, por ejemplo, aislar el polipéptido del medio de cultivo celular o el caldo de fermentación, o del interior de la célula huésped (por ejemplo, después de un paso de lisado de la célula huésped).

En aún otra realización, la invención además proporciona métodos para la fabricación ("o la producción de", que es una expresión equivalente) de una composición agroquímica o para control biológico como se divulga en la presente invención.

En realizaciones particulares, la invención proporciona métodos para producir una composición agroquímica como se divulga en la presente invención, que al menos comprende los siguientes pasos:

- obtener al menos un polipéptido, el cual se une específicamente a una plaga, y
- formular el polipéptido o un fragmento funcional de este en una composición agroquímica.

En realizaciones particulares de estos métodos, el paso de obtener al menos un polipéptido, el cual se une específicamente a una plaga comprende:

- (a) expresar una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido, el cual se une específicamente a una plaga, y opcionalmente
- (b) aislar y/o purificar el polipéptido.

En otras realizaciones particulares de estos métodos, el paso de obtener al menos un polipéptido, el cual se une específicamente a una plaga comprende:

- a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias polipeptídicas;
- b) cribar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias polipeptídicas para detectar secuencias que específicamente se unen a una plaga y/o tienen afinidad por esta, y opcionalmente
- c) aislar las secuencias polipeptídicas que se unen específicamente a una plaga y/o tienen afinidad por esta.

La presente solicitud además divulga métodos para la fabricación ("o la producción " la cual es una expresión equivalente) de una composición agroquímica o para control biológico como se divulga en la presente invención, que comprenden formular una secuencia de aminoácidos o polipeptídica de entre 80 y 200 aminoácidos, u otros subrangos adecuados como se definió anteriormente en la presente, con actividad pesticida junto con al menos un agente agroquímico auxiliar comúnmente empleado.

Los métodos de fabricación adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, mezcla con cizallamiento alto o bajo, molienda húmeda o seca, fundición por goteo, encapsulado, emulsionado, recubrimiento, incrustación, pilling, granulado por extrusión, granulado por lecho fluido, coextrusión, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización, atomizado, polimerización por adición o condensación, polimerización interfacial, polimerización *in situ*, coacervación, encapsulado por pulverización, dispersiones fundidas en frío, evaporación del disolvente, separación de fases, extracción con disolventes, polimerización sol-gel, recubrimiento en lecho fluido, recubrimiento total, fusión, absorción o adsorción pasiva o activa.

Específicamente, las secuencias de aminoácidos o los polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos como se divulgan en la presente invención, u otros subrangos adecuados según se definió anteriormente en la presente, se pueden preparar mediante síntesis química.

Se divulga además que las secuencias de aminoácidos o los polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos, u otros subrangos adecuados como se definió anteriormente en la presente invención, se pueden preparar mediante sistemas de expresión microbiana recombinante *in vitro* y su aislado para uso ulterior. Tales

secuencias de aminoácidos o polipéptidos pueden estar en lisados celulares brutos, suspensiones, coloides, etc., o alternativamente se pueden purificar, refinar, tamponar y/o procesar adicionalmente antes de la formulación con agentes agroquímicos auxiliares de uso corriente.

- 5 Las metodologías específicamente recombinantes generalmente suponen insertar una molécula de ADN que expresa una secuencia de aminoácidos, proteína o polipéptido de interés en un sistema de expresión con respecto al cual la molécula de ADN es heteróloga (es decir, no está presente normalmente en el huésped). La molécula de ADN heterólogo se inserta en el sistema de expresión o vector con orientación en el sentido apropiado y el marco de lectura correcto. El vector contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de las secuencias codificadoras de proteínas insertadas. La transcripción del ADN depende de la presencia de un promotor. De forma similarmente, la traducción del ARNm en procariotas depende de la presencia de las señales procariotas apropiadas que difieren de aquellas de eucariotas. Para obtener una reseña sobre la maximización de expresión génica, véase Roberts y Lauer, *Methods in Enzymology* 68:473 1979). Independientemente de las secuencias reguladoras específicas empleadas, la molécula de ADN es clonada en el vector usando procedimientos de clonación convencionales en la técnica, según describen Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y. (1989). Una vez que la molécula de ADN aislada que codifica la proteína ha sido clonada en un sistema de expresión, esta está lista para ser incorporada en una célula huésped. Tal incorporación se puede llevar a cabo mediante las diversas formas de transformación, dependiendo del sistema vector/célula huésped. Las células huésped adecuadas incluyen, entre otras, bacterias, virus, levadura, células de mamíferos, insectos, plantas y similares. Opcionalmente, las células huésped recombinantes pueden ser células huésped que expresan un sistema de secreción funcional tipo III nativo o recombinante. Esto se describe en detalle en la patente US 6.596.509. Como consecuencia de la expresión del sistema de secreción funcional tipo III, las células expresarán el polipéptido y entonces secretarán la proteína en el medio de cultivo. Esto puede simplificar el aislamiento y la purificación del polipéptido. Las células huésped recombinantes se pueden cultivar en cámaras de fermentación apropiadas, preferentemente en condiciones de temperatura y nutrientes que optimizan el crecimiento de las células huésped y la expresión del polipéptido. Los expertos en la técnica son capaces de identificar condiciones óptimas para las células huésped particulares. Después de la fermentación, por ejemplo, la suspensión bacteriana se puede diluir en, por ejemplo, un volumen aproximadamente 2 a 5 veces superior de un tampón para ajustar el pH entre aproximadamente 5,5 y 10, más preferentemente hasta un pH entre aproximadamente 7 y 9, e incluso más preferentemente hasta un pH de aproximadamente 8,0. Los tampones adecuados son ampliamente conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, tampón potasio fosfato o un tampón Tris-EDTA. La concentración del tampón puede ser entre aproximadamente 0,001 mM y aproximadamente 0,5 M. Después del ajuste del pH, la solución en suspensión (bacteriana) recibe tratamiento térmico hasta una temperatura de aproximadamente 60-130 °C, preferentemente hasta una temperatura de aproximadamente 95-125 °C. El tratamiento térmico se puede realizar durante cualquier período adecuado. En una realización, el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un período de aproximadamente cinco minutos hasta aproximadamente 30 minutos. A continuación, la suspensión calentada es enfriada. Una temperatura de enfriado adecuada es, sin limitación, aproximadamente 35-55 °C, preferentemente aproximadamente 45 °C. Después del enfriamiento, las células bacterianas en la suspensión bacteriana son lisadas, si se requiere, para liberar el polipéptido. La lisis celular se puede llevar a cabo, por ejemplo, poniendo en contacto la suspensión bacteriana con una lisozima. La concentración de lisozima puede estar comprendida entre aproximadamente 2 ppm y 100 ppm. Alternativamente, en la lisis celular pueden intervenir métodos no químicos, tales como alta presión o tratamiento con ultrasonidos, los cuales son ampliamente conocidos por personas con capacitación normal en la técnica. Puede resultar deseable, después de la lisis celular, incubar la suspensión bacteriana. Los tiempos adecuados de incubación pueden variar. Por ejemplo, puede resultar deseable incubar la suspensión bacteriana durante un período de aproximadamente 30-45 minutos a una temperatura de aproximadamente 40-42 °C. Después de la lisis, el polipéptido deseado se puede extraer adicionalmente eliminar los desperdicios celulares y las proteínas desnaturalizadas resultantes del paso previo de tratamiento térmico. En una realización, el extracto es centrifugado durante aproximadamente 10-20 minutos para eliminar algunos de los desperdicios celulares. Las velocidades de centrifugado adecuadas pueden oscilar entre aproximadamente 4.000 y 20.000 rpm y el tiempo de centrifugado puede oscilar entre aproximadamente 10 minutos y 20 minutos. A continuación, se pueden eliminar desperdicios celulares adicionales mediante tratamiento térmico y centrifugado del sobrenadante para obtener un extracto líquido que está sustancialmente libre de desperdicios celulares al eliminar más de aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % de sólidos totales. Este tratamiento térmico posterior se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 60 °C durante aproximadamente dos horas, a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 10 minutos, o aproximadamente a 121 °C con 103 kPa (15 psi) de presión durante aproximadamente 5 minutos. Estas temperaturas y tiempos pueden variar según otras condiciones. El método para elaborar una composición líquida estable que contiene una secuencia de aminoácidos o un polipéptido como se divulgan en la presente invención además supone introducir en el extracto líquido un agente biocida y, opcionalmente, uno o ambos entre un inhibidor de proteasa y un tensioactivo no iónico, obteniendo por lo tanto una composición líquida que comprende el polipéptido. En una realización, se introduce un inhibidor de proteasa en el extracto líquido sin un tensioactivo no iónico. En otra realización, se introduce un tensioactivo no iónico en el extracto líquido sin un inhibidor de proteasa. En una

realización adicional, se introducen ambos, un tensioactivo no iónico y un inhibidor de proteasa en el extracto líquido. En aún otra realización adicional, no se introducen ni un tensioactivo no iónico ni un inhibidor de proteasa en el extracto líquido. Alternativamente, la estabilidad de la composición líquida como se divulga en la presente invención se puede evaluar usando, por ejemplo, análisis HPLC (cromatografía en columna de alto rendimiento, por sus siglas en inglés) u otros procedimientos adecuados que pueden identificar la cantidad de una proteína o un polipéptido específico. La estabilidad de la secuencia de aminoácidos o los polipéptidos en una composición como se divulga en la presente invención se puede determinar al comparar la cantidad de la proteína en la composición líquida envejecida con la de una composición líquida de preparación reciente o con una cuantificación anterior realizada sobre la misma composición. La medición de la estabilidad de la proteína se correlaciona estrechamente con una retención de su actividad.

Los agentes agroquímicos auxiliares de uso común son ampliamente conocidos en la técnica e incluyen, entre otros disolventes acuosos u orgánicos, agentes de tamponamiento, acidificantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes diseminantes, agentes que aumentan la pegajosidad, adhesivos, portadores, rellenos, espesantes, emulsionantes, dispersantes, agentes secuestrantes, agentes antisedimentación, agentes de coalescencia, modificadores de reología, agentes desespumantes, fotoprotectores, agentes anticongelantes, biocidas, penetrantes, aceites minerales o vegetales, pigmentos y agentes para control de deriva, o cualquier combinación adecuada de estos.

En aún otra realización, la invención proporciona un polipéptido de entre 80 y 200 aminoácidos o los subrangos divulgados en la presente invención anteriormente, obtenidos por selección de afinidad a cierto objetivo de una plaga vegetal, el cual es capaz de inhibir el crecimiento y/o la actividad de una plaga vegetal con una concentración inhibitoria mínima entre aproximadamente 0,00001 y 1 μ M.

En realizaciones particulares de los métodos divulgados en la presente invención para proteger, prevenir, curar o tratar una planta de una infección por un hongo, los polipéptidos o las composiciones divulgadas en la presente invención se aplican directa o indirectamente a la planta mediante pulverización, atomizado, espumado, nebulización, en hidrocultivos/hidroponía, recubrimiento, sumersión y/o incrustamiento.

SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias polipeptídicas que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2. Estas secuencias de ácidos nucleicos también pueden estar en la forma de un vector o un constructo genético o un polinucleótido. Las secuencias de ácidos nucleicos que se divulgan en la presente invención pueden ser secuencias sintéticas o semisintéticas, secuencias nucleotídicas que han sido aisladas de una biblioteca (y en particular, una biblioteca de expresión), secuencias nucleotídicas que han sido preparadas mediante PCR usando cebadores superpuestos, o secuencias nucleotídicas que han sido preparadas usando técnicas para sintetizar ADN conocidas *per se*.

La presente invención incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquier polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

CONSTRUCCIONES, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED

Los constructos genéticos divulgados en la presente invención para la comprensión de la invención pueden ser ADN o ARN, y preferentemente son ADN bicatenario. Los constructos genéticos de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped o el organismo huésped previstos en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista, o en una forma adecuada para replicación independiente, mantenimiento y/o herencia en el organismo huésped previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en la forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC (cromosomas artificiales de levadura, por sus siglas en inglés) o un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, un organismo huésped y/o un sistema de expresión adecuados).

Por consiguiente, en otro aspecto adicional, la presente invención también proporciona para la comprensión de la invención vectores que comprenden una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquier polipéptido que comprende la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona huéspedes o células huésped que expresan o son capaces de expresar una o más secuencias de aminoácidos como se divulgan en la presente invención. Los ejemplos de huéspedes o células huésped adecuados para expresión de las secuencias de aminoácidos, polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 serán evidentes para el experto en la técnica.

La solicitud también divulga polipéptidos de entre 80 a 200 aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, permanecen estables en la composición agroquímica o para control biológico, según se definió, lo cual significa que la integridad y la actividad pesticida del polipéptido, según se definió, se mantienen durante el almacenamiento y/o las condiciones de utilización de la composición agroquímica, lo cual puede incluir temperaturas elevadas, ciclos congelamiento-descongelamiento, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación UV, presencia de productos químicos perjudiciales y similares. Con la mayor preferencia, estos polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos, permanecen estables en la composición agroquímica cuando la composición agroquímica se almacena a temperatura ambiente durante un período de dos años o cuando la composición agroquímica se almacena a 54 °C durante un período de dos semanas. En particular, los polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos comprendidos en una composición agroquímica retienen al menos aproximadamente el 70 % de actividad, más particularmente al menos aproximadamente del 70 % al 80 % de actividad, con la mayor particularidad aproximadamente del 80 % al 90 % de actividad, después de haber estado almacenados en la composición agroquímica a temperatura ambiente durante un período de dos años o cuando la composición agroquímica que contiene el polipéptido está almacenada a 54 °C durante un período de dos semanas.

En aún otra realización, para usar en los métodos divulgados en la presente invención, la solicitud divulga secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de entre 80 y 200 aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, donde los polipéptidos se obtienen mediante selección de afinidad a un objetivo fitopatógeno específico, polipéptido el cual es capaz de inhibir el crecimiento y/o la actividad de una plaga de un cultivo con una concentración inhibitoria mínima de aproximadamente 0,00001 a 1 µM.

A continuación, se ilustrará la presente invención por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de antígeno de fase inferior de Folch de *Fusarium oxysporum* para usar como agente de inmunización, presentación de fagos y ensayos de cribado

Se extrajeron sucesivamente hifas y conidia de *Fusarium oxysporum* a temperatura ambiente usando cloroformo:metanol con las siguientes proporciones 2:1 y 1:2 (v/v). Los extractos se combinaron y secaron, y el extracto lipídico crudo se particionó como describen Folch et al. (1957(1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497–509.). Los lípidos de la capa inferior de Folch se recuperaron y se usaron para inmunización.

Ejemplo 2. Preparación de fracción mono-hexósido de ceramida de *Fusarium oxysporum* para usar en presentación de fagos y ensayos de cribado.

Se preparó la fracción mono-hexósido de ceramida de *Fusarium oxysporum* como se describe en el método de Barreto-Bergter et al. (2011 Barreto-Bergter E, Sasaki G y, de Souza LM. (2011). Structural analysis of fungal cerebroside. Front Microbiol. 2: 239.) se obtuvo de Eliana Barreto-Bergter.

Ejemplo 3: Identificación del antígeno de fase inferior de Folch de *Fusarium oxysporum* que se une a VHH

3.1 Inmunizaciones

Se generaron VHH de llamas inmunizadas con un extracto de fase inferior de Folch de *Fusarium oxysporum*. Las llamas fueron inmunizadas de acuerdo con protocolos estándar con 6 refuerzos de extracto de fase inferior de Folch de *Fusarium oxysporum* identificados por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). Se raspó de la placa sílice con adsorción del extracto de fase inferior de Folch y se suspendió en tampón fosfato. La suspensión se sometió a ultrasonidos, se mezcló con adyuvante incompleto de Freund, y se usó para inyecciones subcutáneas. Todas las llamas permanecieron saludables durante el proceso de inmunización y se tomaron muestras de sangre antes y después de las inmunizaciones.

3.2 Construcción de bibliotecas

Para la construcción de bibliotecas, se prepararon células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras de sangre de las llamas inmunizadas usando Ficoll-Hypaque de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se extrajo ARN total de estas células y se usó como material de partida para RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa, por sus siglas en inglés) para amplificar los fragmentos génicos que codificaban VHH. Estos fragmentos se clonaron en un vector fagémido pASF20. pASF20 es un vector de expresión derivado de pUC119 que contiene el promotor lacZ, una secuencia líder sintética, un sitio de clonación múltiple, una secuencia codificante de la proteína pIII de colifago, un gen de resistencia a la ampicilina, y un origen de fago M13 para producción monocatenaria. En marco con la secuencia codificante VHH, el vector codifica un marcador peptídico (His)6 C terminal y un marcador peptídico c-myc. Se

prepararon fagos de acuerdo con los métodos estándar (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual; Brian K. Kay, Jill Winter, Dr. John McCafferty). Se obtuvieron bibliotecas con una diversidad clonal igual o mayor que $1E+08$ y se produjeron fagos asegurando la presentación de la diversidad del anticuerpo.

3.3 Selecciones

Se realizaron dos rondas de selección mediante "panning" (*N. del T.: selección por medio de la interacción con el antígeno de interés inmovilizado*) como sigue: Se recubrieron placas de poliestireno Maxisorp con múltiples pocillos con la fracción lipídica fúngica en cloroformo/metanol al 5 % en todo momento. En la primera ronda de selección, se seleccionaron 25 μ l de fago ($1,00E+11$ fago/condición de selección) de las bibliotecas usando cuatro condiciones diferentes: dos concentraciones de fracciones lipídicas diferentes (fúngica; *Fusarium oxysporum*) (50 μ g/ml y 5 μ g/ml) y dos condiciones en blanco diferentes ($CHCl_3$ /MeOH al 5 % y PBS) para control de base. Para la segunda ronda de selecciones, además de las condiciones para la primera ronda de selecciones, se incluyó una concentración de antígeno inferior (0,5 μ g/ml). Para la segunda ronda de selecciones, el aporte de fagos se redujo 10 veces en comparación con el aporte de la primera ronda de selección, esto para reducir la selección de uniones de fagos inespecíficas.

Se observaron buenos enriquecimientos en la primera ronda de selección, especialmente para los resultados de la condición de selección 50 μ g/ml. Se rescataron los productos de fagos de esta selección, se precipitaron y se usaron como aporte en una segunda ronda de selecciones. En esta ronda de selección, se observaron enriquecimientos significativamente más altos para las condiciones de recubrimiento con antígeno, a excepción de la condición de selección 0,5 μ g/ml.

Se recogieron colonias individuales de células TG1 de *E. Coli* infectadas con grupos de fagos eluidos seleccionados obtenidos después de la segunda ronda de selecciones mediante "panning" en placas de 96 pocillos, placas maestras (MP) que contenían 100 μ l de medio 2xTY que contenía glucosa al 2 % y 100 μ g/ml de carbenicilina por pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Las placas maestras se almacenaron en glicerol al 20 % a -80 °C y se usaron para la producción de extracto periplásmico, cribado y secuenciación.

Ejemplo 4: Cribado para la detección de unión de VHH a fracciones lipídicas de Fusarium oxysporum

Para verificar si VHH se unía a fracciones lipídicas de *Fusarium oxysporum*, se evaluó la unión mediante ELISA. Se cribó cada clon individual para detectar la unión a pocillos recubiertos con 10 μ g/ml de fracción lipídica fúngica en $CHCl_3$ /MeOH al 5 % y pocillos recubiertos solamente con $CHCl_3$ /MeOH al 5 %. Se consideró que los clones eran positivos cuando la proporción entre las señales de unión a OD450 nm de pocillos recubiertos con antígeno frente al correspondiente pocillo blanco fue mayor que 2 veces. Sobre la base del valor de corte definido aplicado a 360 clones individuales ensayados, se obtuvo una tasa de aciertos general del 14,2 %.

Ejemplo 5: VHH 10G11 inhibe el crecimiento de Botrytis cinerea en una manera dependiente de la dosis en un ensayo antifúngico in vitro

Se evaluó la actividad antifúngica de VHH 10G11Q (SEQ ID NO: 1) *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* R16.

Se prepararon diluciones dobles de VHH 10G11Q purificado en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron a 20 μ l de estas diluciones y a 20 μ l de agua como control, 80 μ l de suspensión de esporas fúngicas ($1E+05$ esporas/ml en caldo de patata y dextrosa (PDB) de fortaleza media), comenzando con una concentración final de VHH 10G11Q de 10 μ M. Las placas de ensayo se incubaron durante 36 horas a 25 °C usando el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte Zoom. Todos los ensayos se realizaron en al menos 2 réplicas.

Los resultados del ensayo de actividad antifúngica, que se muestran en la figura 1, indicaron un claro patrón de inhibición de crecimiento dependiente de la dosis, expresado como el % de crecimiento fúngico (área objeto verde total) en función de la concentración (μ M) de VHH 10G11Q.

Ejemplo 6: VHH 10G11 inhibe de forma más potente el crecimiento de Botrytis cinerea en un ensayo antifúngico in vitro en comparación con la glucosilceramida que se une a VHH 41D01

Los documentos WO2014/177595 A1 y WO2014/191146 A1 describen la unión de anti-glucosilceramida a VHH, siendo que VHH 41D01 muestra la actividad antifúngica más prominente, para diversas cepas de ensayo, incluso *Botrytis cinerea* R16.

Se compararon las características inhibitorias del crecimiento de VHH 10G11Q (SEQ ID NO: 1) con las de VHH 41D01 *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* R16.

Se prepararon diluciones dobles de VHH 10G11Q y 41D01 purificadas en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron a 20 µl de estas diluciones y a 20 µl de agua como control, 80 µl de suspensión de esporas fúngicas (1 E+05 esporas/ml en caldo de patata y dextrosa (PDB) de fortaleza media), comenzando con una concentración final de VHH 10G11Q de 40 µM. Las placas de ensayo se incubaron durante 48 horas a 25 °C usando el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte Zoom. Todos los ensayos se realizaron en al menos 2 réplicas.

Los resultados del ensayo de actividad antifúngica, que se muestran en la figura 2, sorprendentemente indicaron un patrón de inhibición de crecimiento más prominente para VHH 10G11Q en comparación con VHH bioactivo 41D01.

Ejemplo 7: Mutagénesis de sitio dirigido

Se realizó la mutagénesis de sitio dirigido de VHH como sigue a continuación. Secuencias nucleotídicas que codificaban secuencias variantes de VHH fueron construidas sintéticamente como fragmentos génicos y ulteriormente se clonaron en el plásmido pPpT4GAPαS (Näätsaari et al (2012), Plos One, 7(6): e39720) adecuado para la transformación en *Pichia pastoris*. Este plásmido contiene el promotor P_{AOX} para impulsar la expresión del fragmento génico clonado. Se emplearon técnicas de clonación convencionales durante la construcción de plásmidos que contienen las variantes de secuencias de VHH deseadas. Los clones exitosos se secuenciaron para confirmar la presencia y clonación correcta de la variante de secuencia de VHH deseada. Los plásmidos linealizados, a continuación, se transformaron en células competentes *Pichia pastoris* ATCC 76273™ usando protocolos de electroporación convencionales. Los transformantes exitosos se usaron posteriormente para producir las variantes de secuencias de VHH. Los transformantes se cultivaron primero en BMGY (medio complejo glicerol tamponado) y luego se transfirieron a medio BMMY (medio complejo metanol tamponado) para iniciar la inducción (Weidner et al (2020), J Vis Exp, 36: 1862). A continuación, los VHH se purificaron usando filtración y/o técnicas cromatográficas comúnmente conocidas en la técnica.

Ejemplo 8: Escaneo de Ala de VHH 10G11

Se evaluó el total de 3 regiones CDR del VHH 10G11 mediante escaneo de Ala para determinar el impacto de sustituciones simples de aminoácidos sobre el efecto antifúngico de VHH 10G11 (SEQ ID NO: 18 a 51). Las variantes de 10G11 se construyeron y produjeron como se describe en el Ejemplo 7 y se realizaron a continuación ensayos antifúngicos como se describe en el Ejemplo 5. Sorprendentemente, 10G11 mostró un desempeño sostenido en la mayoría de las sustituciones de los aminoácidos individuales en las regiones CDR con alanina como lo indica claramente el efecto antifúngico sostenido de los mutantes (figura 3). Se construyeron sustituciones simples de aminoácidos adicionales usando una glicina (R26G; SEQ ID NO: 18 y D35G; SEQ ID NO: 27), una serina (R53S; SEQ ID NO: 32 y T56S; SEQ ID NO: 36) o asparagina (K58N; SEQ ID NO: 39) en vez de alanina, con resultados similares (figura 3).

Ejemplo 9: La versión con marca His del VHH 10G11 mejoró la actividad antifúngica

Las marcas His se añaden comúnmente a los polipéptidos para purificaciones usando cromatografía de afinidad. Durante pruebas de rutina usando ensayos antifúngicos como se describen en el Ejemplo 5 se halló sorprendentemente que el polipéptido 10G11Q con la adición C terminal de una marca 6xHis (SEQ ID NO: 148) tuvo una actividad antifúngica mejorada de manera significativa (figura 4). Dado que se construyó una marca His de 6 aminoácidos histidina cargados positivamente, esto indicó que las cargas positivas podrían beneficiar las interacciones antifúngicas de 10G11.

Ejemplo 10: Modelo *in silico* de VHH 10G11Q

Para tener una mejor comprensión de la molécula 10G11, se modeló su estructura 3-D usando una estrategia *in silico*. Se llevaron a cabo búsquedas BLAST en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, de sus siglas en inglés) para obtener coordenadas estructurales de anticuerpos con CDR con las mismas longitudes que la molécula 10G11 a ser modelada. Se usó la matriz Blosum 62 con una penalización por apertura de hueco de 13. Dentro de los primeros 250 aciertos, cada estructura con la misma longitud de CDR que la molécula 10G11 en investigación se usó para un intento de modelado por homología. Primeramente, los residuos que difieren entre la estructura PDB obtenida y la molécula 10G11 son mutados. Luego, las cadenas laterales de estos residuos se modelan de acuerdo con sus preferencias observadas como se halló en la biblioteca de rotámeros Dunbrack 2010 (Shapovalov y Dunbrack, (2011), Structure, 19(6):844-58). Cuando resultó apropiado, las cadenas laterales en vecindad directa también se modelaron para acomodar la mutación modelada. Este modelo se usó como una guía para determinar los residuos aminoacídicos importantes de la molécula.

El modelo obtenido con indicación de las 3 regiones CDR se muestra en la figura 5. En el diagrama de cintas

de 10G11 se visualiza una selección de las cadenas laterales expuestas y los aminoácidos se indican de acuerdo con la numeración de Kabat (la figura 5 también exhibe la secuencia de línea germinal e indica las sustituciones que llevan a la secuencia 10G11. Esta además proporciona la correspondiente numeración de Kabat). Estos residuos aminoácidos se seleccionaron como los mejores candidatos para sustituciones de aminoácidos dirigidas debido a que están expuestas las cadenas laterales y se sospechó un mínimo de interferencia estructural.

Ejemplo 11: Actividad antifúngica de variantes con carga 10G11

Como se observó a partir de los resultados de ensayo desplegados en la figura 3, cuatro de cada cinco mutantes que mostraron una disminución en la actividad antifúngica estaban caracterizados por una sustitución de un aminoácido con carga positiva por una variante sin carga. Junto con la observación de una variante con marca His con carga positiva que había aumentado la actividad antifúngica (figura 4), se investigó adicionalmente el efecto de la carga. Para ello, se produjeron diferentes variantes con carga 10G11 como se describe en el Ejemplo 7 y se ensayó su actividad antifúngica como se describe en el Ejemplo 5. Se diseñaron las siguientes sustituciones para reducir la carga general de la molécula 10G11 en la interfaz de unión a antígeno de la molécula:

- Mutante 1: Sustitución R26A en CDR1 (SEQ ID NO: 7)
- Mutante 2: Sustituciones R53A y K58A en CDR2 (SEQ ID NO: 8)
- Mutante 3: Sustituciones R96A y R100cA en CDR3 (SEQ ID NO: 9)
- Mutante 4: Sustitución R26A en CDR1, sustituciones R53A y K58A en CDR2 y sustituciones R96A y R100cA en CDR3 (SEQ ID NO: 10)
- Mutante 5: Sustitución R26A en CDR1, sustituciones R53A y K58A en CDR2, sustituciones R96A y R100cA en CDR3 y sustituciones K76N y K77T en la región constante. (SEQ ID NO: 11)

Estos mutantes que tienen una carga general reducida muestran una reducción o ausencia de actividad antifúngica (figura 6). Esto subraya aún más la hipótesis de que las cargas positivas son importantes para la actividad de 10G11. Por lo tanto, se diseñaron las siguientes variantes con carga positiva sobre la base del análisis estructural según se describió en el Ejemplo 10.

- Mutante 6: Sustituciones S27H, I28H y S30H en CDR1 (SEQ ID NO: 12)
- Mutante 7: Sustituciones W100aH y T100bH en CDR3 (SEQ ID NO: 13)
- Mutante 8: Sustituciones S27H, I28H y S30H en CDR1 y sustituciones W100aH y T100bH en CDR3 (SEQ ID NO: 14)
- Mutante 9: Sustituciones S27K, I28K y S30K en CDR1 (Véase la figura 7) (SEQ ID NO: 15)
- Mutante 10: Sustituciones W100aK y T100bK en CDR3 (SEQ ID NO: 16)
- Mutante 11: Sustituciones S27K, I28K y S30K en CDR1 y sustituciones W100aK y T100bK en CDR3 (Véase la figura 8) (SEQ ID NO: 17)

La figura 6 muestra que los mutantes 6 y 7 tienen actividad antifúngica a la par de 10G11. Los mutantes 8, 9, 10 y 11 muestran un significativo aumento en la actividad antifúngica, donde el mutante 11 alcanza un aumento de 5 veces en la actividad antifúngica sobre 10G11.

Finalmente, la realización de un ensayo prolongado de incubación antifúngica, donde el montaje experimental descrito en el Ejemplo 5 fue seguido durante un período de 14 días, mostró un efecto sostenido en la prevención de la excrecencia de esporas por el mutante 9 y el mutante 11 durante el tiempo de evaluación, contrariamente a 10G11 que, aunque altamente potente, permitió que la excrecencia de esporas se reiniciara después de 3 días (figura 9).

Ejemplo 12: 10G11 se une a la Fracción 3 del extracto de fase inferior de Folch

Para investigar a la pareja de interacción putativa de 10G11 y sus variantes, se extrajeron lípidos de hifas de *Botrytis cinerea* como se describió en el ejemplo 1. Para el fraccionamiento adicional de extracto lipídico total se usó cromatografía de capa fina (TLC; Skipski et al (1965), Biochimica et Biophysica Acta, 106(2): 386-396). El extracto se identificó sobre una placa de vidrio de gel de sílice y se hizo correr en un tanque de cromatografía lleno con 100 ml de la mezcla cloroformo/metanol (85/15, v/v). Las bandas lipídicas separadas por TLC se tiñeron con alfa-naftol permitiendo la detección visual de lípidos. Se identificaron cuatro fracciones (figura 10): Fracción 1, la fracción de lípidos polares; Fracción 2, con un Factor de Retención (Rf) similar al estándar de referencia de glucosilceramida (GlcCer de Tamogitake), que probablemente sean ceramidas; Fracción 3, con un Rf ligeramente superior al estándar de referencia; y Fracción 4, los fosfolípidos (PL) no polares. Para obtener suficiente material de las Fracciones separadas, se puede usar cromatografía rápida de fase normal (Gorden, M.H. (2015). Encyclopedia of Analytical Science (Segunda edición), Elsevier). Por lo tanto, el TLE se disolvió en CH₂Cl₂ por adición de unas pocas gotas de MeOH y se cargó en un cartucho rápido de fase normal de 4 g con partículas de 15 µm. La columna se hizo correr con CH₂Cl₂/MeOH (85/15,

v/v) como eluyente. Finalmente, se filtraron las Fracciones a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm (membrana de nailon), y se secaron. A continuación, los liposomas del extracto lipídico verdadero y sus fracciones individuales se prepararon mediante el método de hidratación de película delgada con la adición de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Trucillo et al, 2020. Processes 8(9):1022; Zhang, 2017. Liposomes 1522:1 7-22). El DPH es casi no fluorescente en medios acuosos y exhibe potente fluorescencia cuando es intercalado en membranas lipídicas. Cualquier disrupción de las membranas lipídicas llevaría a una disminución de la señal fluorescente. A continuación, se ensayó la interacción de 10G11 con estos liposomas. Los resultados en la figura 11 muestran que 10G11 interactúa con los lípidos presentes en el extracto de lípidos totales (TLE), Fracción 3 y Fracción 4. Además, esto muestra que 10G11 lleva a la ruptura de las vesículas apuntando hacia un efecto interesante de disrupción de membrana mediante 10G11.

La unión de 10G11 a la Fracción 3 fue confirmada además por interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés). La BLI es una técnica analítica óptica libre de marcas para medir interacciones biomoleculares (Kamat et al, 2017. Analytical biochemistry 536: 16-31; Wallner et al. 2013. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 72: 150–154). Este análisis confirmó la unión de 10G11 con la Fracción 3 (figura 12).

Ejemplo 13: Uniones adicionales a la Fracción 3

El método mencionado anteriormente para la formación de liposomas (Ejemplo 12) se modificó con la adición de un lípido biotinilado (12:0 Biotinyl MG (1-(12-N-biotin)aminododecanoil-rac-glicerol), Sigma Aldrich), para permitir el uso de estos liposomas con ELISA usando placas recubiertas con estreptavidina (placas de alta capacidad recubiertas con estreptavidina, transparentes, 96 pocillos, bloqueadas con tampón SuperBlock™, Thermo Fisher Scientific). Usando este método para detectar uniones adicionales a la Fracción 3 se identificaron dos moléculas de unión a la Fracción 3 adicionales con SEQ ID NO: 3 (10E11Q) y SEQ ID NO: 5 (12C03Q) como se muestra en la figura 13.

Ejemplo 14: Modo de acción

Se observó el efecto de 10G11 sobre esporas de *Botrytis cinerea* al nivel de las esporas que son inhibidas en el comienzo de la excrecencia de esporas y sorprendentemente una porción sustancial de esporas también es lisada debido a la actividad de 10G11 tal como fue evidenciado por una súbita pérdida de integridad estructural durante la toma de imágenes microscópicas en el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte Zoom (figura 14). La acción disruptiva de liposomas de 10G11 (Ejemplo 12) subraya aún más que la lisis de las esporas se puede atribuir a la acción de 10G11.

Ejemplo 15: Control de roya de la soja en soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* en invernadero

Cuatro réplicas de plantas de soja cultivadas en macetas (4 plantas por maceta) se pulverizaron con 125 ml de suspensión acuosa que contenía una concentración de ingrediente activo como se describe en la tabla 1. Se realizaron dos aplicaciones con un intervalo de 14 días. Las plantas fueron inoculadas una vez con *Phakopsora pachyrhizi* dos días después de la primera aplicación (aplicación A) de ingrediente activo. Las características inhibitorias del crecimiento de 10G11Q se compararon con las de una molécula VHH no antifúngica de referencia, un control sin tratamiento y el químico sistémico Quadris Top SBX (azoxistrobina, difeconazol).

Tabla 1. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Sin tratamiento (inoculado con <i>P. pachyrhizi</i>)	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	2 (AB)
10G11	500 g ia/ha	2 (AB)
10G11	750 g ia/ha	2 (AB)
VHH de referencia	250 g ia/ha	2 (AB)
VHH de referencia	500 g ia/ha	2 (AB)
VHH de referencia	750 g ia/ha	2 (AB)
Quadris Top SBX	198,5-212,6 g/100m ² (7-7,5 oz/A)	2 (AB)

La gravedad de la enfermedad se registra como gravedad porcentual en una escala de 0-100 %. Los registros comenzaron cuando aparecieron los primeros síntomas seguidos de evaluación semanal al menos hasta 3 semanas después de la segunda aplicación (aplicación B) del ingrediente activo. Las clasificaciones de gravedad porcentual están separadas sobre la base de la posición en la planta: Gravedad porcentual en canopia baja, Gravedad porcentual en canopia media y Gravedad porcentual en canopia alta para seguir bien el avance de la enfermedad y siguiendo el desarrollo natural de la enfermedad en la naturaleza.

Los resultados que se muestran en la figura 15 indican un prominente patrón de inhibición del crecimiento relacionado con la dosis para 10G11 hasta 3 semanas después de la segunda aplicación en comparación con

el VHH de referencia y el control inoculado, sin tratamiento en la canopia baja.

Las indicaciones de tiempo en los gráficos sobre el eje X se refieren al momento del registro de la gravedad de la enfermedad o la incidencia. Estas son relativas y están indicadas por el número de días después de la aplicación cuando se produjo el registro. Por ejemplo, un registro 13 Días After (después) de la segunda aplicación (aplicación B) se representará como 13DAB. Este código es aplicable a las figuras 15 a 28.

Los resultados que se muestran en la figura 16 indican un prominente patrón de inhibición del crecimiento relacionado con la dosis para 10G11 hasta 3 semanas después de la segunda aplicación en comparación con el VHH de referencia y el control inoculado, sin tratamiento en la canopia media.

Los resultados que se muestran en la figura 17 indican un prominente patrón de inhibición del crecimiento relacionado con la dosis para 10G11 hasta 3 semanas después de la segunda aplicación en comparación con el VHH de referencia y el control inoculado, sin tratamiento en la canopia alta.

En general, 10G11 a razón de 750g ia/ha a menudo muestra una actividad a la par del producto químico de referencia Quadris Top SBX.

Ejemplo 16: Control de antracnosis en calabaza provocada por *Colletotrichum orbiculare* en invernadero

Cuatro réplicas de plantas de calabaza cultivadas en macetas (2 plantas por maceta) se pulverizaron con 125 ml de suspensión acuosa que contenía una concentración de ingrediente activo como se describe en la tabla 2. Se realizaron cuatro aplicaciones con intervalos de 6 o 7 días. Las plantas fueron inoculadas una vez con *Colletotrichum orbiculare* dos días después de la primera aplicación (aplicación A) de ingrediente activo. La eficacia de 10G11Q se comparó con la de un control sin tratamiento y la referencia química Bravo WS (clorotalonil).

Tabla 2. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11Q	175 g ia/ha	4 (ABCD)
10G11Q	350g ia/ha	4 (ABCD)
10G11Q	700g ia/ha	4 (ABCD)
Bravo WS	0,828 litros/100m2 (28 onzas líquidas/A)	4 (ABCD)

La gravedad de la enfermedad se registra como gravedad porcentual en una escala de 0-100 %. Los registros comenzaron cuando aparecieron los primeros síntomas seguidos de evaluación regular hasta 2 semanas después de la cuarta aplicación (aplicación D) del ingrediente activo.

Los resultados que se muestran en la figura 18 indican un claro patrón de inhibición del crecimiento relacionado con la dosis para 10G11Q hasta 2 semanas después de la última aplicación en comparación con el control inoculado, sin tratamiento.

Ejemplo 17: Control de *Botrytis cinerea* en vid en el campo

Se trataron cuatro réplicas de 10 viñas (33,6 m2 por parcela) con 8 litros de solución pulverizada, correspondiente a un volumen de pulverización de 600 l/ha, de acuerdo con la práctica local. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 3. Se realizaron cuatro aplicaciones en etapas específicas de desarrollo fenológico de las viñas: BBCH 77, BBCH 79, BBCH 81 y BBCH 85 (de acuerdo con la escala normalizada BBCH). No se realizó infección artificial, y la primera pulverización se colocó preventivamente, sobre la base de la presión pronosticada de la enfermedad. La eficacia de 10G11 se comparó con la de un control sin tratamiento y la referencia química Teldor (fenhexamida). Además, se ensayaron una rotación química de Switch (fludioxonil + ciprodinil) y Teldor y una rotación de Switch y 10G11.

Tabla 3. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	4 (ABCD)
10G11	500 g ia/ha	4 (ABCD)
10G11	750 g ia/ha	4 (ABCD)
Teldor	1 kg/ha	4 (ABCD)

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Switch	1 kg/ha	2 (AC)
Teldor	1 kg/ha	2 (BD)
Switch	1 kg/ha	2 (AC)
10G11	500 g ia/ha	2 (BD)

La gravedad de la enfermedad se registra como gravedad porcentual en una escala de 0-100 % (PESSEV). El registro comenzó cuando aparecieron los primeros síntomas, justo antes de la cuarta aplicación. Se realizaron evaluaciones adicionales a los 13 y 20 días después de la última aplicación. En cada evaluación, se estimó el porcentaje de la superficie de racimos afectados por la enfermedad en 100 racimos seleccionados aleatoriamente por parcela.

Los resultados que se muestran en la figura 19 indican un claro desempeño, relacionado con la dosis de 10G11 hasta 20 días después de la última aplicación.

Ejemplo 18: Control de moho pulverulento (*Uncinula necator*) en vid en el campo

Se trataron cuatro réplicas de 10 viñas (25 m² por parcela) con 8 o 10 litros de solución pulverizada, correspondiente a un volumen de pulverización de 600 u 800 l/ha, de acuerdo con la práctica local y la etapa del crecimiento de las viñas. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 4. Se realizaron ocho aplicaciones, separadas en promedio por 10 días. No se realizó infección artificial y la primera pulverización se realizó en la etapa previa a la floración, antes de los primeros síntomas de moho pulverulento. La eficacia de 10G11 se comparó con la del control sin tratamiento y la referencia química Topas 10 EC (penconazol). Además, se evaluó una rotación química de Tiovit Jet (azufre), Vivando (metrafenona), Sercadis (fluxapiroxad), Prosper 500 EC (espiroxamina) y Karathane Star (meptildinocap). Un séptimo tratamiento reemplazó parte de los productos químicos en esta rotación química por 10G11 como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	Nro. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	8 (ABCDEFGH)
10G11	500 g ia/ha	8 (ABCDEFGH)
10G11	750 g ia/ha	8 (ABCDEFGH)
Topas 10 EC	0,3 l/ha	8 (ABCDEFGH)
Tiovit Jet	8 kg/ha	4 (ABGH)
Vivando	0,2 l/ha	1 (C)
Sercadis	0,15 l/ha	1 (C)
Prosper 500 EC	0,6 l/ha	2 (DF)
Karathane Star	0,6 l/ha	1 (E)
Tiovit Jet	8 kg/ha	3(ABG)
Vivando	0,2 l/ha	1 (C)
10G11	500 g ia/ha	1 (CFH)
Prosper 500 EC	0,6 l/ha	1 (D)
Karathane Star	0,6 l/ha	1 (E)

Las evaluaciones de eficacia se realizaron en hojas al evaluar el porcentaje de área foliar afectada en 100 hojas seleccionadas aleatoriamente de la misma posición en el brote. Además, se evaluó la infección por moho pulverulento en frutos como el porcentaje del área infectada de 50 racimos seleccionados aleatoriamente por parcela. Las evaluaciones continuaron hasta 4 semanas después de la última aplicación.

Los resultados que se muestran en las figuras 20 y 21 indican un claro desempeño relacionado con la dosis de 10G11 hasta cuatro semanas después de la aplicación, a pesar de una muy elevada presión de la enfermedad. Se observó una buena reducción de los síntomas del moho pulverulento tanto en hojas como racimos.

Ejemplo 19: Control de moho pulverulento en tomate provocado por *Oidium neolycopersici*

Se trataron cuatro réplicas de 15 plantas de tomate (9,9 m² por parcela) con 3,96 litros de solución pulverizada, correspondiente a un volumen de pulverización de 1.000 l/ha, de acuerdo con la práctica local. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 5. Se realizaron cinco aplicaciones separadas por 7 días. No se realizó infección artificial y la primera pulverización tuvo lugar cuando se observaron los primeros síntomas. La eficacia de 10G11 se comparó con la del control sin tratamiento y la referencia química Topas (penconazol). Además, se evaluó una rotación química de Systhane Forte (miclobutanil), Ortiva (azoxistrobina), Signum (boscalid + piraclostrobina) y Topas.

Un séptimo tratamiento reemplazó parte de los productos químicos en esta rotación química por 10G11 como se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	5 (ABCDE)
10G11	500 g ia/ha	5 (ABCDE)
10G11	750 g ia/ha	5 (ABCDE)
Topas	0,02 %(v/v)	5 (ABCDE)
Systhane Forte	0,04 %(v/v)	1 (A)
Ortiva	0,1 %(v/v)	1 (B)
Signum	0,15 %(v/v)	1 (C)
Topas	0,02 %(v/v)	2 (DE)
Systhane Forte	0,04 %(v/v)	1 (A)
10G11	500 g ia/ha	2 (BD)
Signum	0,15 %(v/v)	1 (C)
Topas	0,02 %(v/v)	1 (E)

Se registró el porcentaje del área foliar afectada por la enfermedad (gravedad de la enfermedad) en 10 hojas por parcela seleccionadas aleatoriamente. Se calculó, sobre la base de estos valores, el porcentaje de incidencia (PESINC; % de hojas afectadas). Las evaluaciones se realizaron semanalmente y continuaron hasta 1 semana después de la última aplicación.

Los resultados que se muestran en la figura 22 y 23 indican un claro desempeño, relacionado con la dosis de 10G11 hasta una semana después de la última aplicación. Se observó un buen desempeño de 10G11 en estas condiciones de presión leve de la enfermedad, resultando en una clara reducción de la gravedad y la incidencia del moho pulverulento del tomate.

Ejemplo 20: Control de moho pulverulento en fresas provocado por *Podosphaera aphanis* en invernadero

Se trataron cuatro réplicas de 20 plantas de fresa (3 m² por parcela) con 0,576 o 0,72 litros de solución pulverizada, correspondiente a un volumen de pulverización de 400 o 500 l/ha, de acuerdo con la práctica local. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 6. Se realizaron seis aplicaciones separadas por 7 días. No se realizó infección artificial y la primera pulverización tuvo lugar antes de que aparecieran los primeros síntomas. La eficacia de 10G11 se comparó con la del control sin tratamiento y la referencia química Topas 2.5 WG (penconazol). Además, se evaluó una rotación química de Ganzo (miclobutanil), Topas 2.5 WG (penconazol) y Signum (boscalid + piraclostrobina). Un séptimo tratamiento reemplazó parte de los productos químicos en esta rotación química por 10G11 como se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	6 (ABCDEF)
10G11	500 g ia/ha	6 (ABCDEF)
10G11	750 g ia/ha	6 (ABCDEF)
Topas 2.5 WG	2 kg/ha	6 (ABCDEF)
Ganzo	0,38 l/ha	2 (AD)
Topas 2.5 WG	2 kg/ha	2 (BE)
Signum	1,5 kg/ha	2 (CF)
Ganzo	0,38 l/ha	2 (AD)
10G11	500 g ia/ha	2 (BE)
Signum	1,5 kg/ha	2 (CF)

Se realizaron evaluaciones de la eficacia sobre 20 hojas por parcela, evaluando el porcentaje de área foliar afectada (PESSEV) y el porcentaje de hojas afectadas (PESINC) en la parcela completa. Las evaluaciones se realizaron semanalmente y continuaron hasta 2 semanas después de la última aplicación.

Los resultados que se muestran en la figura 24 y 25 indican un claro desempeño, relacionado con la dosis de 10G11 hasta dos semanas después de la última aplicación. Después de la aplicación de 10G11 se obtuvo una buena reducción tanto de la incidencia como de la gravedad del moho pulverulento.

Ejemplo 21: Control de *Botrytis cinerea* en fresa

Se trataron cuatro réplicas de 20 plantas de fresa (3 m² por parcela) con 0,576 o 0,72 litros de solución pulverizada, correspondiente a un volumen de pulverización de 400 o 500 l/ha, de acuerdo con la práctica local. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 7. Se realizaron seis aplicaciones separadas por 7 días. No se realizó infección artificial y la primera pulverización tuvo lugar con la aparición de la floración. La eficacia de 10G11 se comparó con la de un control sin tratamiento y la referencia química Teldor (fenhexamida). Además, se evaluó una rotación química de Switch (ciprodinil + fludioxonil), Teldor (fenhexamida) y Scala (pirimetanil). Un séptimo tratamiento reemplazó parte de los productos químicos en esta rotación química por 10G11 como se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Lista de tratamientos

Tratamiento	Tasa	No. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	250 g ia/ha	6 (ABCDEF)
10G11	500 g ia/ha	6 (ABCDEF)
10G11	750 g ia/ha	6 (ABCDEF)
Teldor	1 kg/ha	6 (ABCDEF)
Switch	0,8 kg/ha	2 (AD)
Teldor	1 kg/ha	2 (BE)
Scala	2 l/ha	2 (CF)
Switch	0,8 kg/ha	2 (AD)
10G11	500 g ia/ha	2 (BE)
Scala	2 l/ha	2 (CF)

Las evaluaciones de la eficacia se realizaron en frutos en el momento de la cosecha y se evaluó el número y el peso de frutos sanos y enfermos. Luego, se colocaron 50 frutos sanos por parcela en almacenamiento refrigerado (2 °C) durante 2 días, después de lo cual continuó la evaluación poscosecha durante 5 días más a temperatura ambiente (7-10 °C). Se evaluó la incidencia de Botrytis y la gravedad en los frutos almacenados a los 0, 2 y 5 días con almacenamiento a temperatura ambiente.

Los resultados que se muestran en las figuras 26 y 27 indican un claro desempeño de 10G11 y relacionado con la dosis tanto al momento de la cosecha como en la poscosecha. La aplicación de 10G11 en el campo durante la floración resultó en una incidencia reducida de Botrytis en el momento de la cosecha. El desempeño de 10G11 se confirmó en la poscosecha, donde se observó una reducción relacionada con la dosis de la gravedad de Botrytis en frutos almacenados.

Ejemplo 22: Control de moho pulverulento en pepino provocado por *Podosphaera xanthii* en invernadero

Se trataron cuatro réplicas de 10 plantas por parcela de plantas de pepino (4 m² por parcela) con un volumen de pulverización entre 1.000 y 1.875 l/ha según la altura del cultivo. La mezcla de pulverización contenía una concentración de ingrediente activo como la descrita en la tabla 8. Se realizaron ocho aplicaciones separadas por 7 días. No se realizó infección artificial y la primera pulverización tuvo lugar con la aparición de la floración. Se comparó la eficacia de 10G11 con la de un control sin tratamiento, una referencia química Topaz (penconazol), una referencia biológica Sonata (cepa *Bacillus pumilis* QST 2808) en combinación con el adyuvante Elasto G5 y una rotación química de Takumi (ciflufenamida), Flint (trifloxistrobina) y Topaz.

Tabla 8. Lista de tratamiento *LWA (por sus siglas en inglés)= área de la pared foliar

Tratamiento	Tasa	Nro. de aplicaciones
Control sin tratamiento	sin aplicaciones	0
10G11	125 g ai/ha LWA*	8 (ABCDEFGH)
10G11	250 g ai/ha LWA*	8 (ABCDEFGH)
10G11	500 g ai/ha LWA*	8 (ABCDEFGH)
Topaz	0,5 l/ha	8 (ABCDEFGH)
Takumi	0,15 l/ha	
Flint	12,5 g/100 l	
Topaz	0,5 l/ha	
Sonata	10 l/ha	8 (ABCDEFGH)
Elasto G5	250 ml/100 l	8 (ABCDEFGH)

Se realizaron evaluaciones de la eficacia sobre 40 hojas por parcela, evaluando el porcentaje de área foliar afectada (PESSEV). Las evaluaciones se realizaron semanalmente y continuaron hasta dos semanas después de la última aplicación.

Los resultados que se muestran en la figura 28 indican un claro desempeño, relacionado con la dosis de

10G11 hasta 1 semana después de la séptima aplicación. El desempeño disminuyó cuando la presión de la enfermedad alcanzó valores muy graves a partir de la octava aplicación.

Ejemplo 23: Características de unión de 10G11

Se determinaron varias características de unión de 10G11.

Se generaron gráficos de microplacas usando la característica de gráfico de tiempo en el menú gráfico/exportar de programa Base Analysis Software IncuCyte®. Los datos sin procesar para la confluencia de las muestras tratadas en la fase media de crecimiento logarítmico se exportaron a GraphPad Prism 8 y se representaron gráficamente como una función semi logarítmica de las concentraciones estándar. Los valores CI50 se extrapolaron después de ajustar los datos con una curva de regresión logística de cuatro parámetros. La sensibilidad al patógeno se midió sobre la base de la CI50, que se refiere a la concentración (μM) que inhibe el 50 % de la germinación de esporas y/o el crecimiento micelial. La CI50 calculada es $0,76 \pm 0,10 \mu\text{M}$. El estándar de VHH irrelevante no muestra ninguna actividad antifúngica con cantidades equimolares (Fig. 1).

Para estimar el valor de la constante de disociación K_d de la unión de 10G11 a la Fracción 3, se usó el montaje ELISA con liposomas biotinilados de la Fracción 3 como se describe en el Ejemplo 13. Se añadió el polipéptido 10G11 en las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 2,5, 5 y $10 \mu\text{M}$, preparado mediante dilución en serie en tampón fosfato. El gráfico ELISA de absorción obtenido se muestra en la figura 29. Este gráfico se usó para estimar la constante de disociación K_d usando GraphPad. Donde se usó ajuste por regresión no lineal. Esto dio por resultado un rango de CI50 entre $0,76$ - $1,55 \mu\text{M}$. Esto se puede convertir a un valor estimado para la constante de disociación K_d dentro del rango de $0,76 \mu\text{M}$ a $1,55 \mu\text{M}$.

Ejemplo 24 - Sustitución de la región CDR2

Se realizaron variantes de la molécula 10G11 en las regiones CDR1 y CDR3 dado que se mostró que CDR2 no era importante para la actividad antifúngica a juzgar por la pérdida de actividad antifúngica cuando se revirtió CDR2 a la secuencia de línea germinal (figura 30). Por el contrario, el reemplazo de CDR3 con una región CDR3 no relacionada (del VHH de referencia) no obstaculizó la actividad antifúngica (figura 30). Lo que indica que CDR3 podría ser más apta para modificaciones aminoacídicas sin perder actividad antifúngica.

REIVINDICACIONES

1. Composición agroquímica que comprende al menos un polipéptido, polipéptido el cual es capaz de unirse a un hongo, provocando así el retardo del crecimiento de una espora de dicho hongo y/o la lisis de una espora del hongo, polipéptido el cual comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
2. Composición agroquímica, según la reivindicación 1, en la que la concentración de dicho al menos un polipéptido en dicha composición está comprendida entre el 0,0001 % y el 50 % en peso.
3. Composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, un portador agroquímicamente adecuado y/o uno o más adyuvantes adecuados.
4. Composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho hongo es un hongo fitopatogénico.
5. Composición agroquímica, según la reivindicación 4, en la que el género de dicho hongo fitopatogénico se selecciona entre el grupo que comprende *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Gaeumanomyces*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nectria*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Phoma*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Podosphaera*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Scerotium*, *Sclerotinia*, *Septoria*, *Thielaviopsis*, *Uncinula*, *Venturia*, *Verticillium*, *Magnaporthe*, *Blumeria*, *Mycosphaerella*, *Ustilago*, *Melampsora*, *Phakospora*, *Monilinia*, *Mucor*, *Rhizopus*, y *Aspergillus*.
6. Uso de una composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como un agente antifúngico en las plantas.
7. Método para proteger o tratar una planta o una parte de dicha planta contra una infección con un hongo fitopatogénico que comprende al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a dicha planta o a una parte de dicha planta, una composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en condiciones eficaces para proteger o tratar dicha planta o una parte de dicha planta contra dicha infección con dicho hongo fitopatogénico.
8. Método de tratamiento poscosecha para proteger o tratar una planta cosechada o una parte cosechada de dicha planta de una infección con un hongo fitopatogénico que comprende al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a dicha planta cosechada o a una parte cosechada de dicha planta, una composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en condiciones eficaces para proteger o tratar dicha planta cosechada o una parte cosechada de dicha planta de dicha infección con dicho hongo fitopatogénico.
9. Método de inhibición del crecimiento de un hongo fitopatogénico, o de eliminación del mismo que comprende al menos el paso de aplicar directa o indirectamente a una planta o a una parte de dicha planta una composición agroquímica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 10 Polipéptido, según la reivindicación 1.

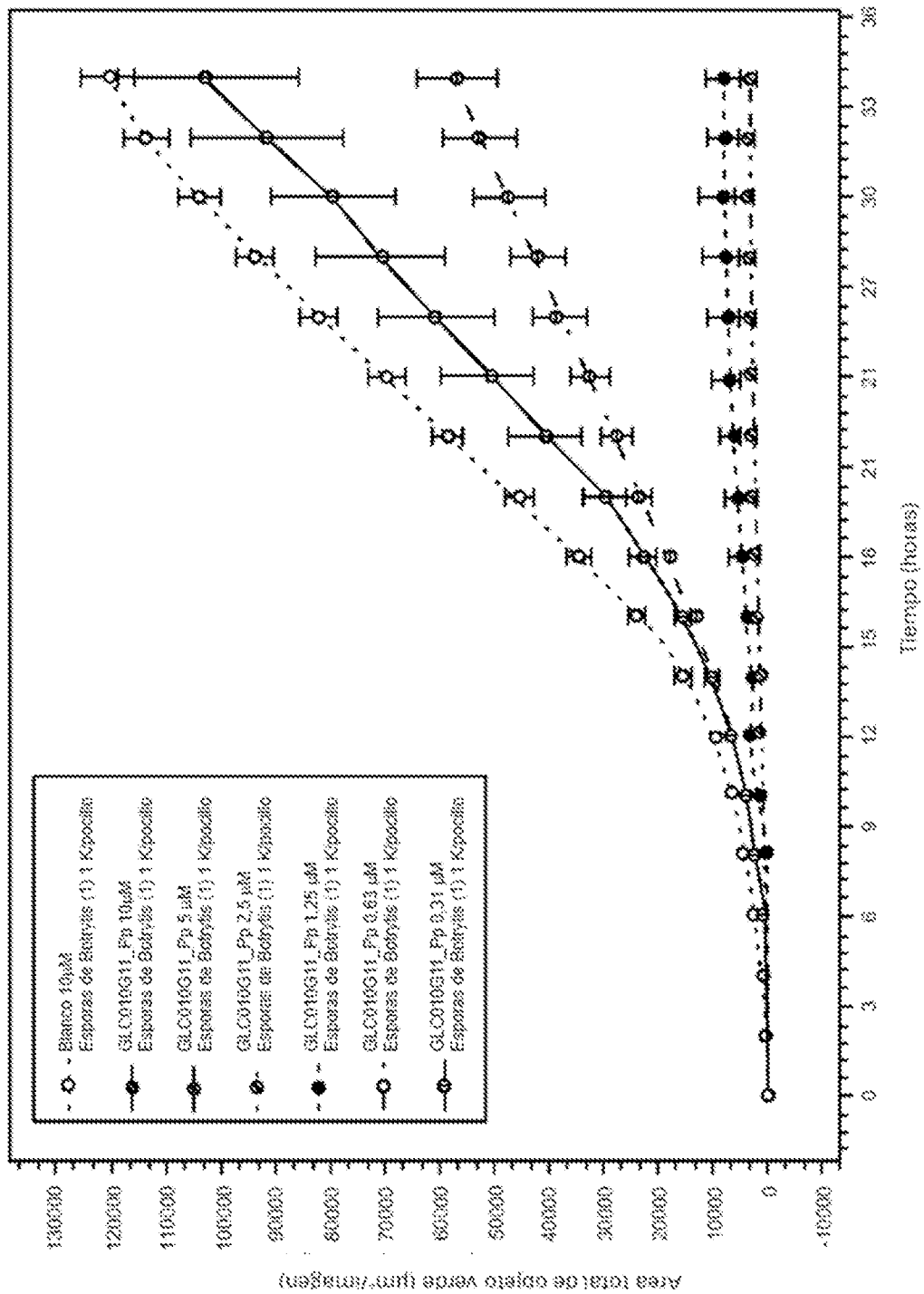


FIG. 1

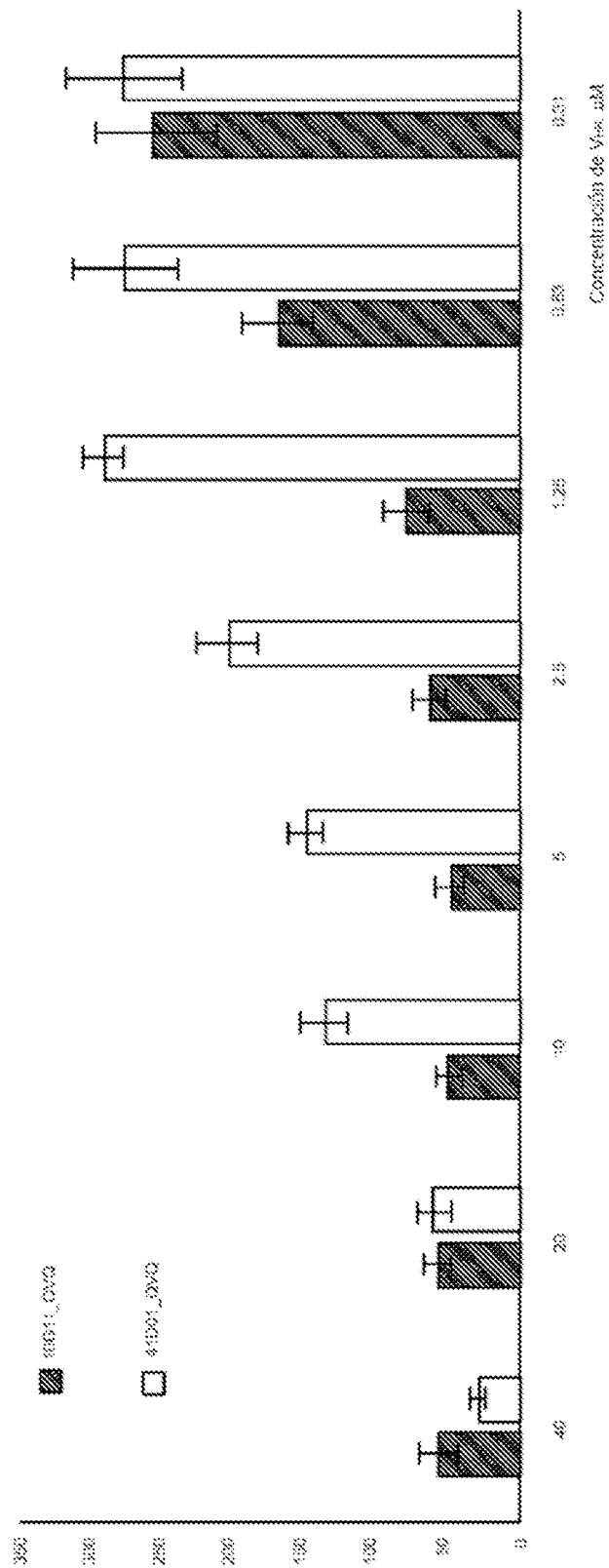
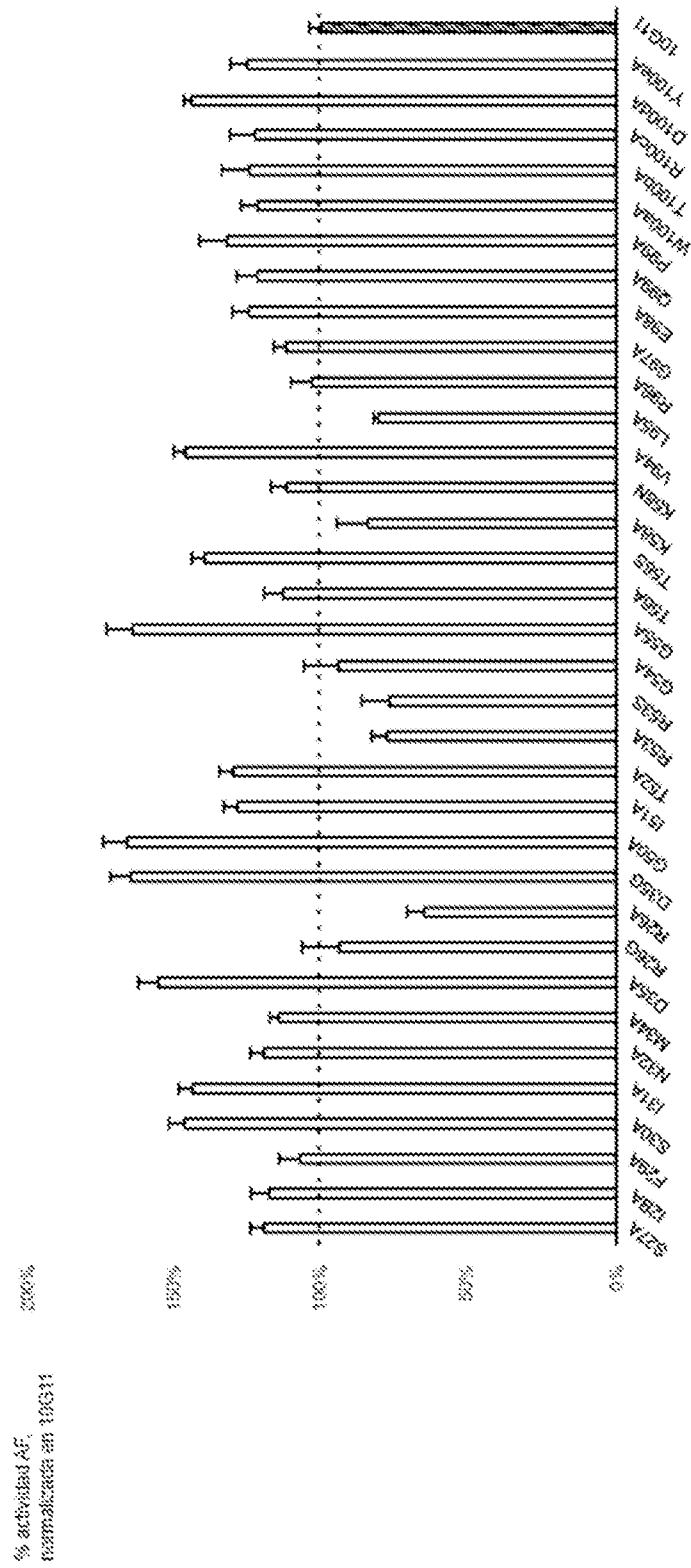


FIG. 2



WEL

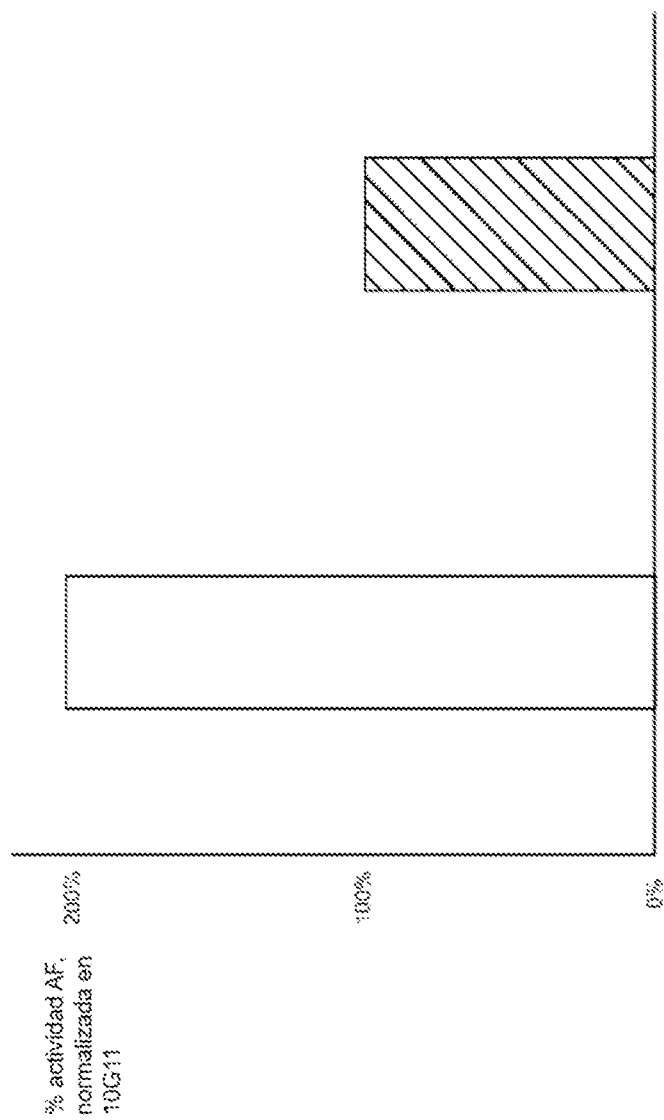
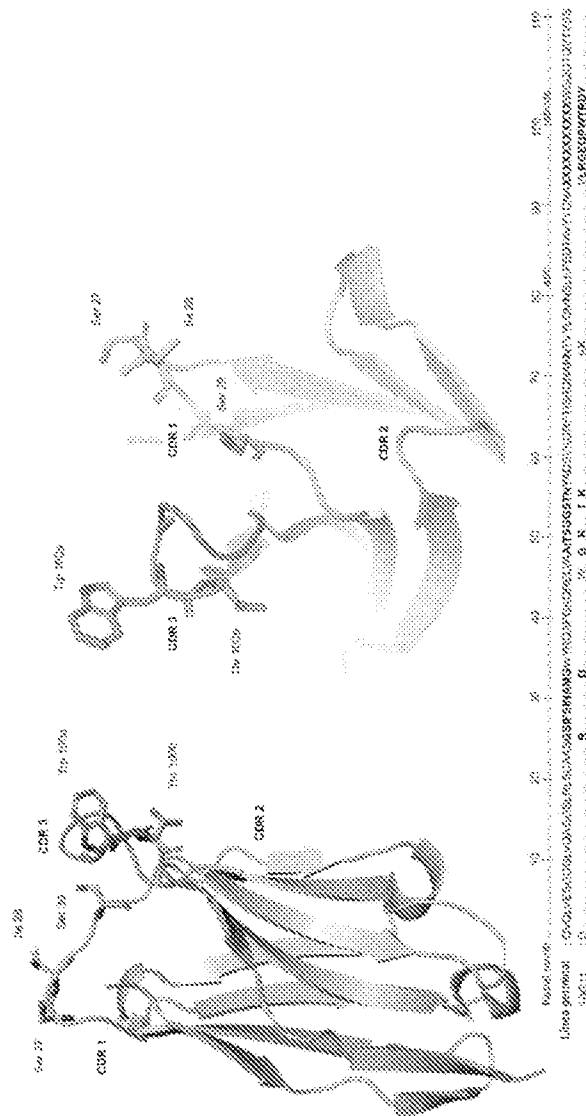


FIG. 4



56

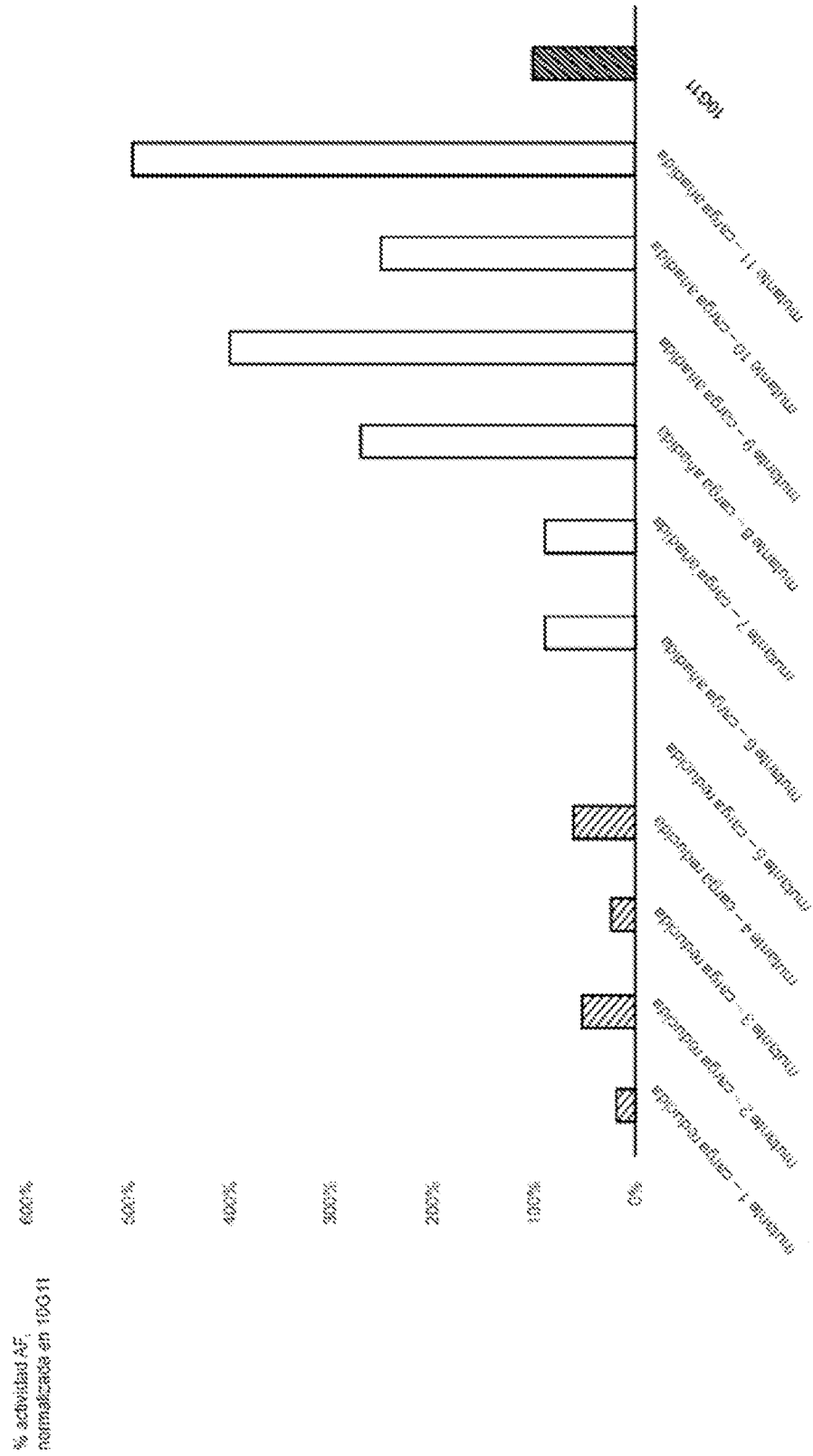
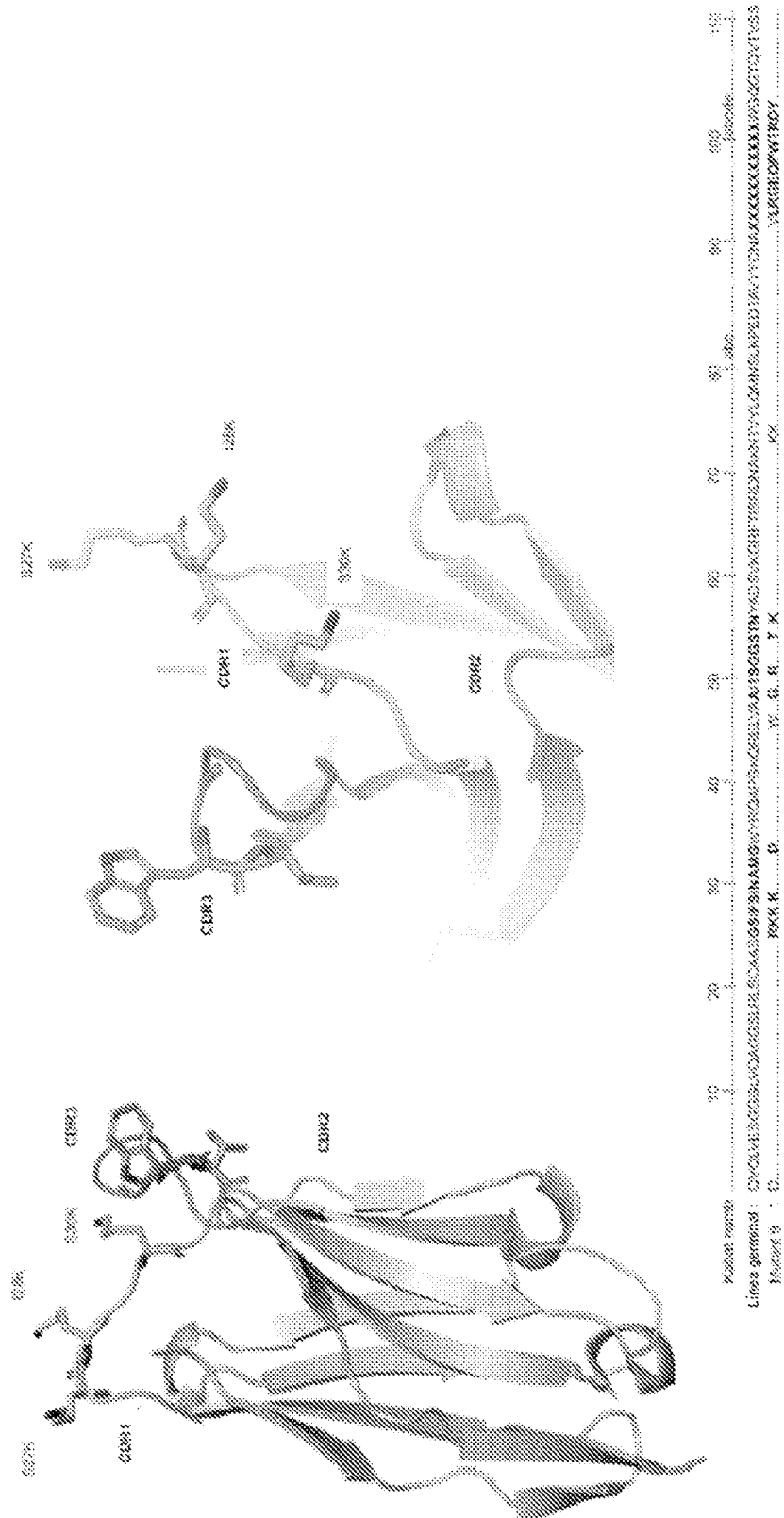
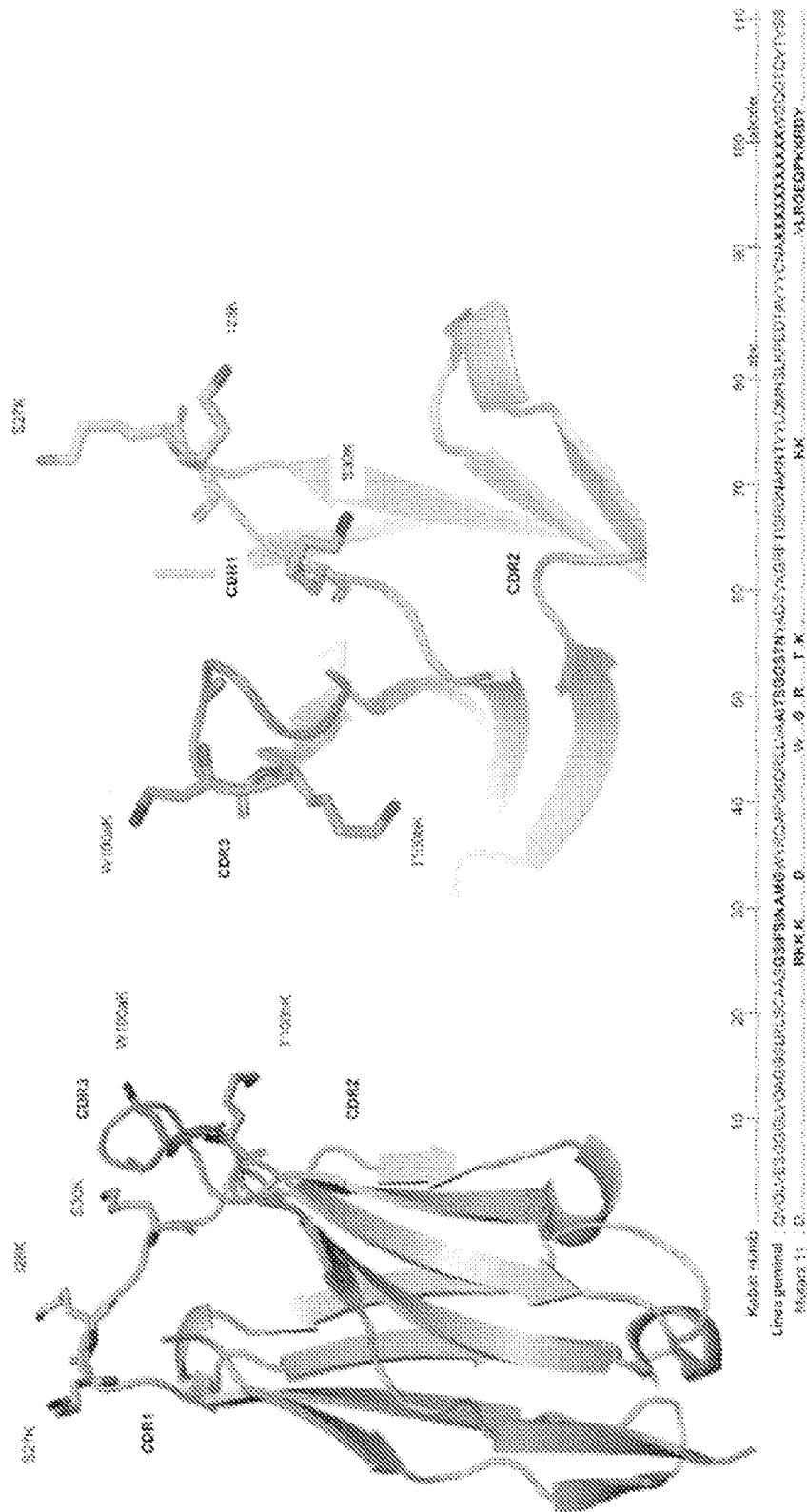


FIG. 6



764



OL

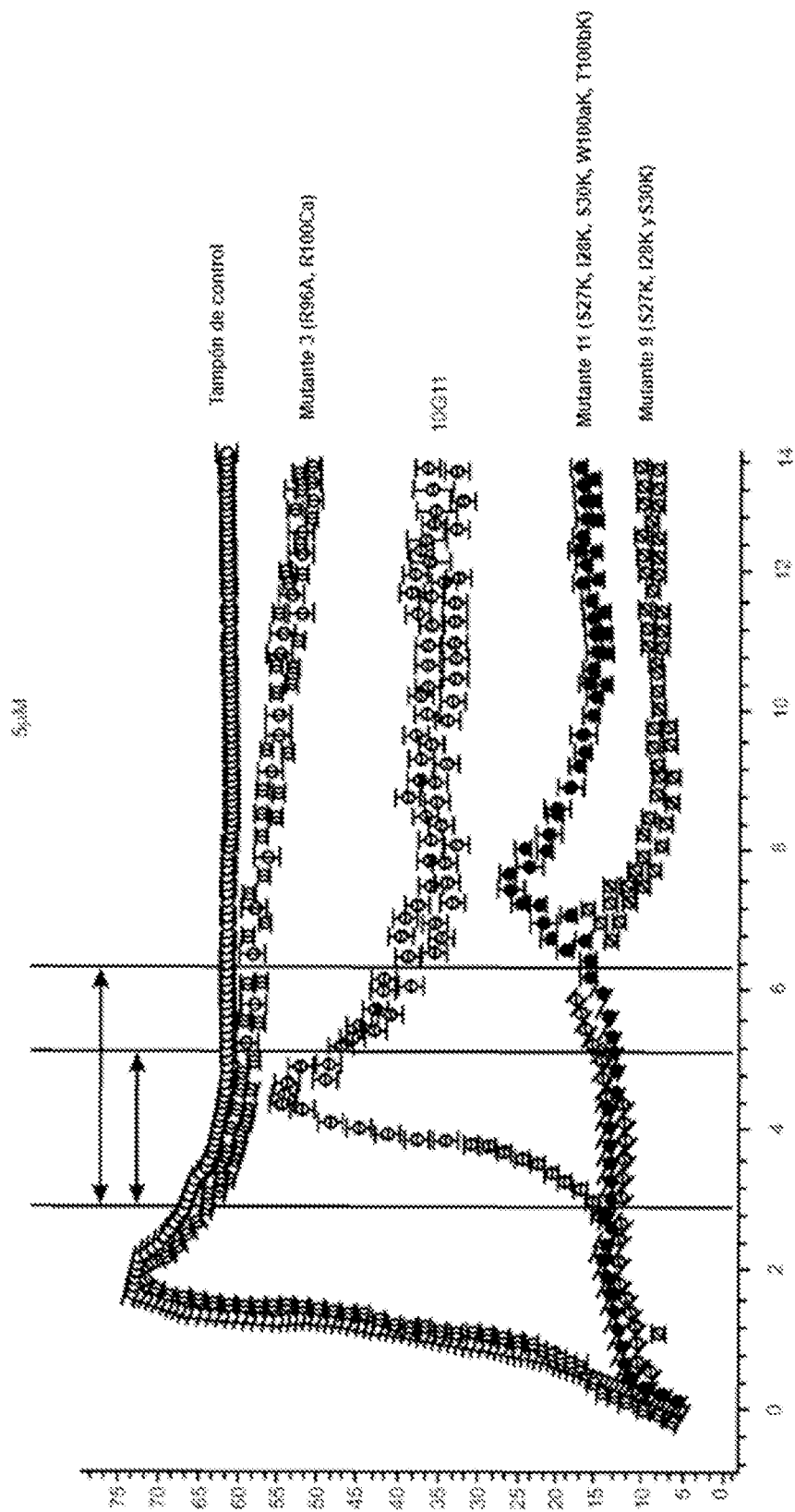


FIG. 9

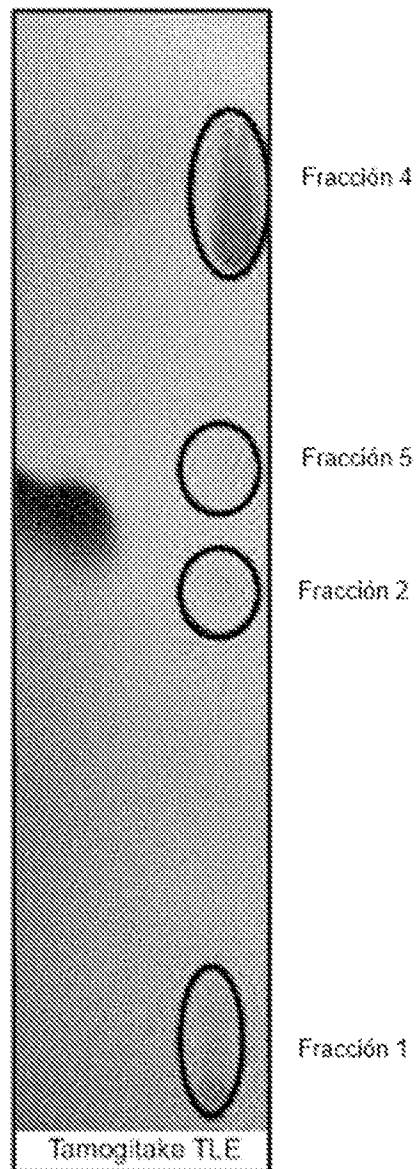


FIG. 10

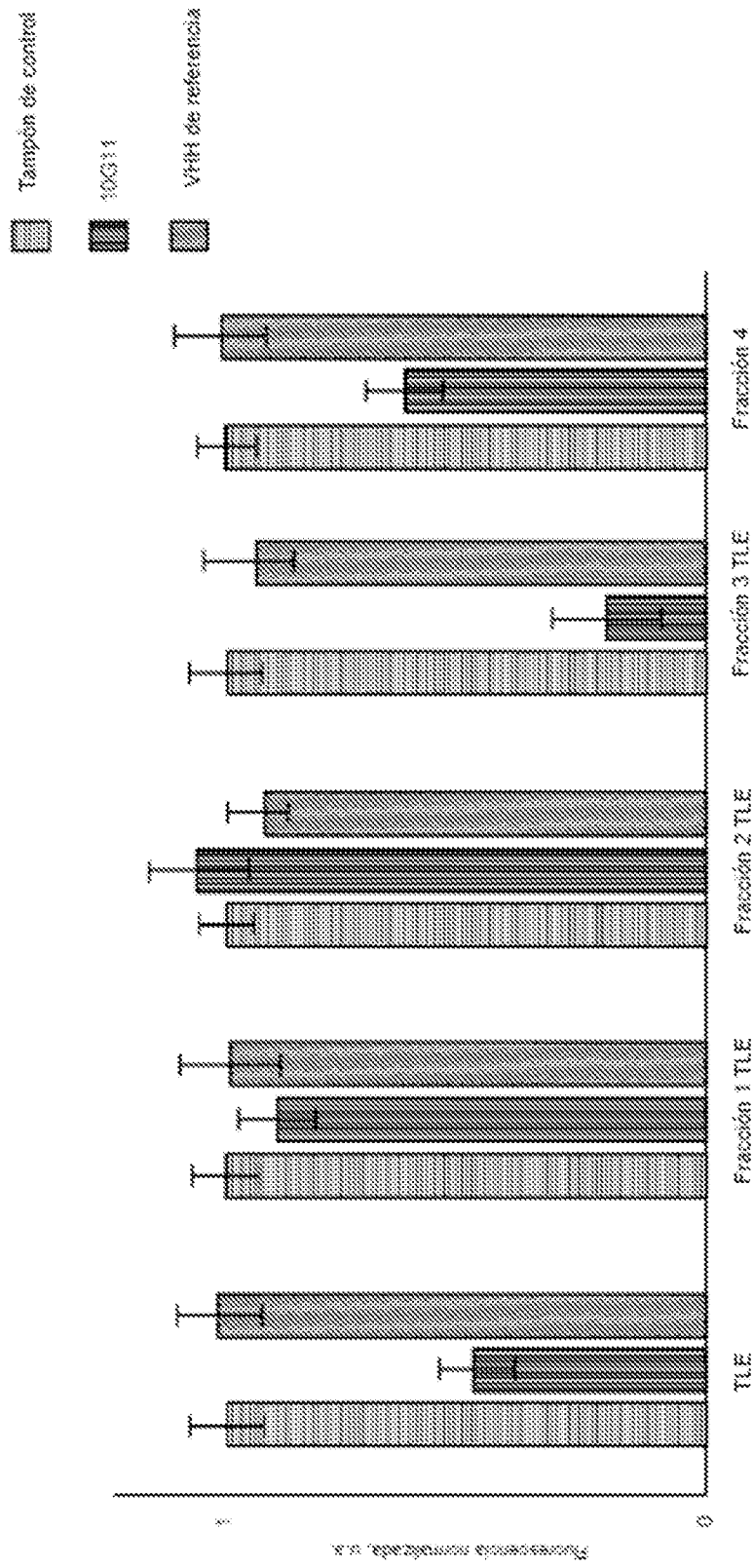


FIG. 11

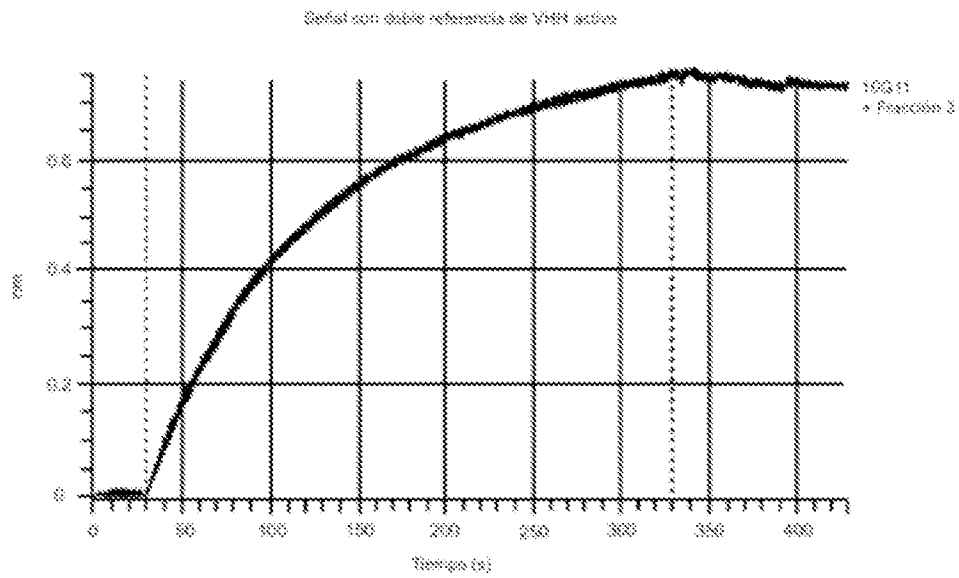
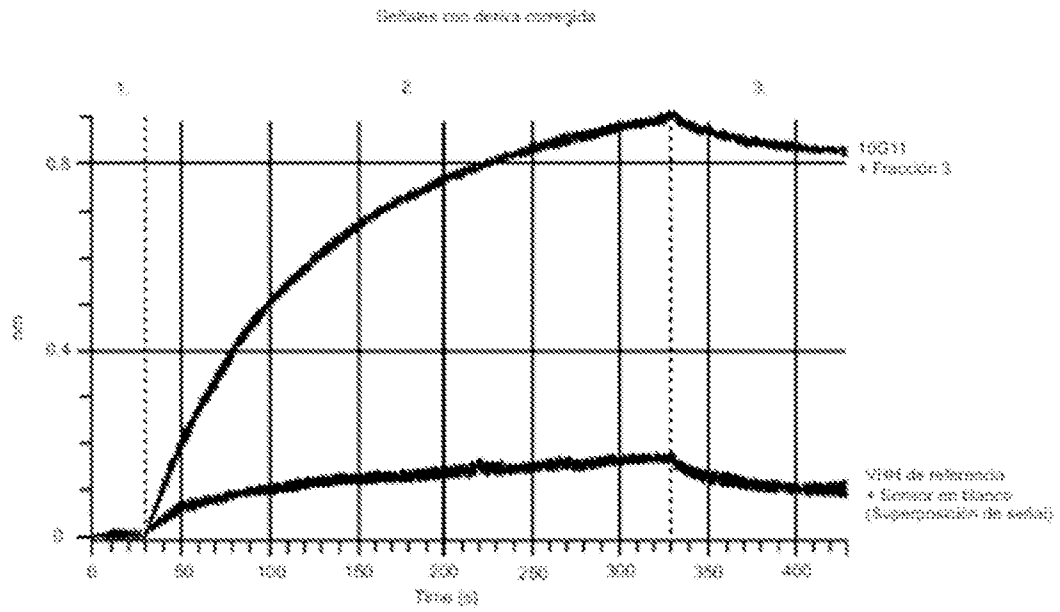


FIG. 12

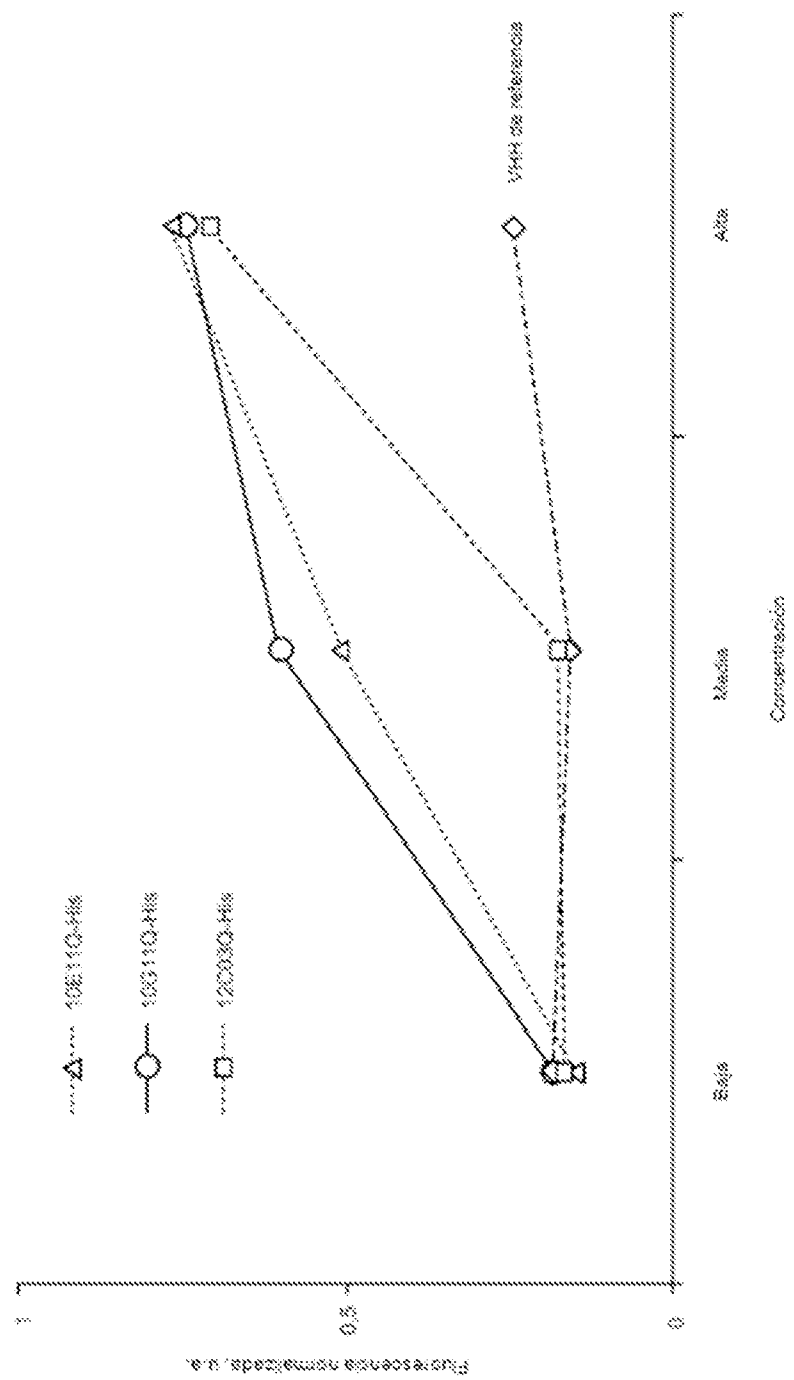


FIG. 13

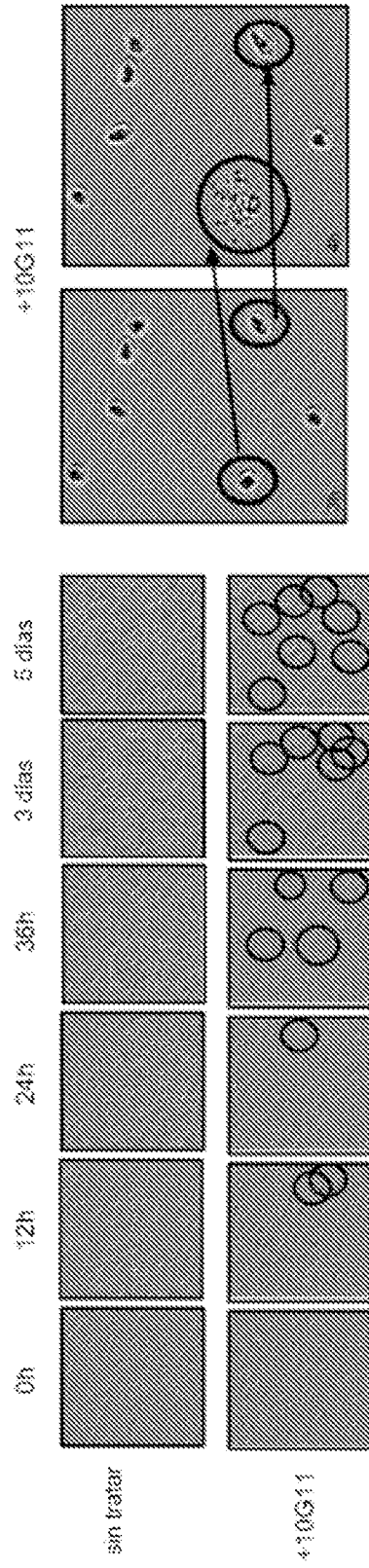


FIG. 14

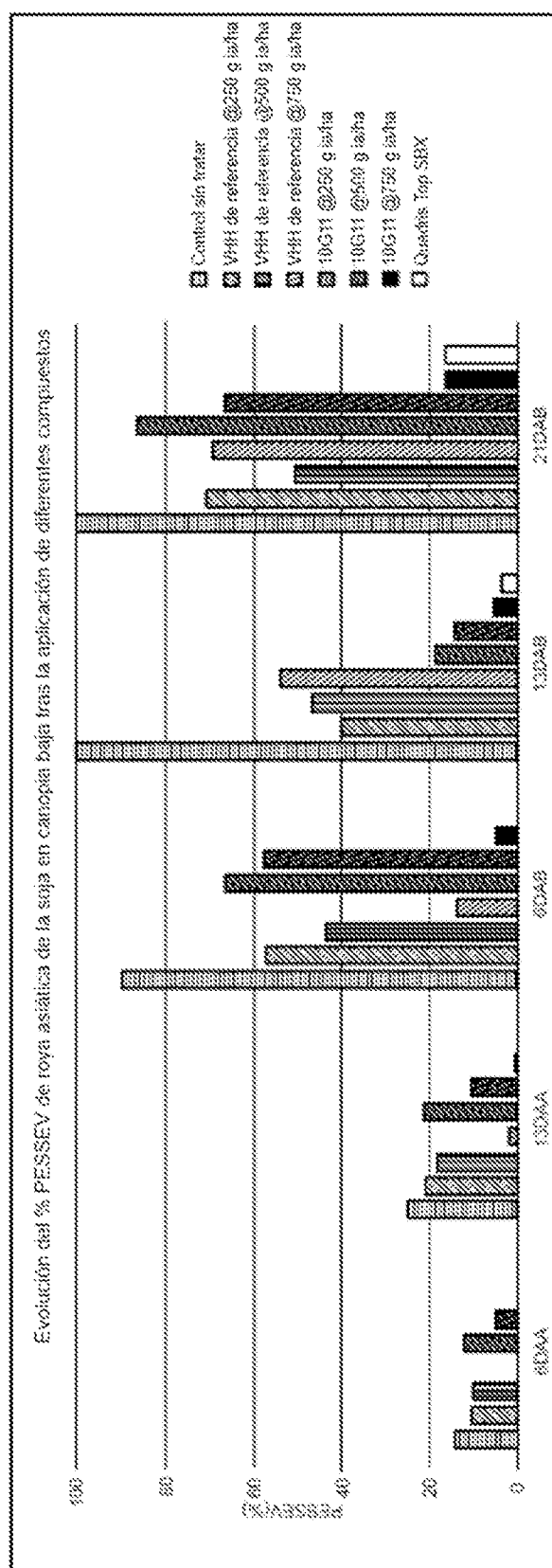


FIG. 15

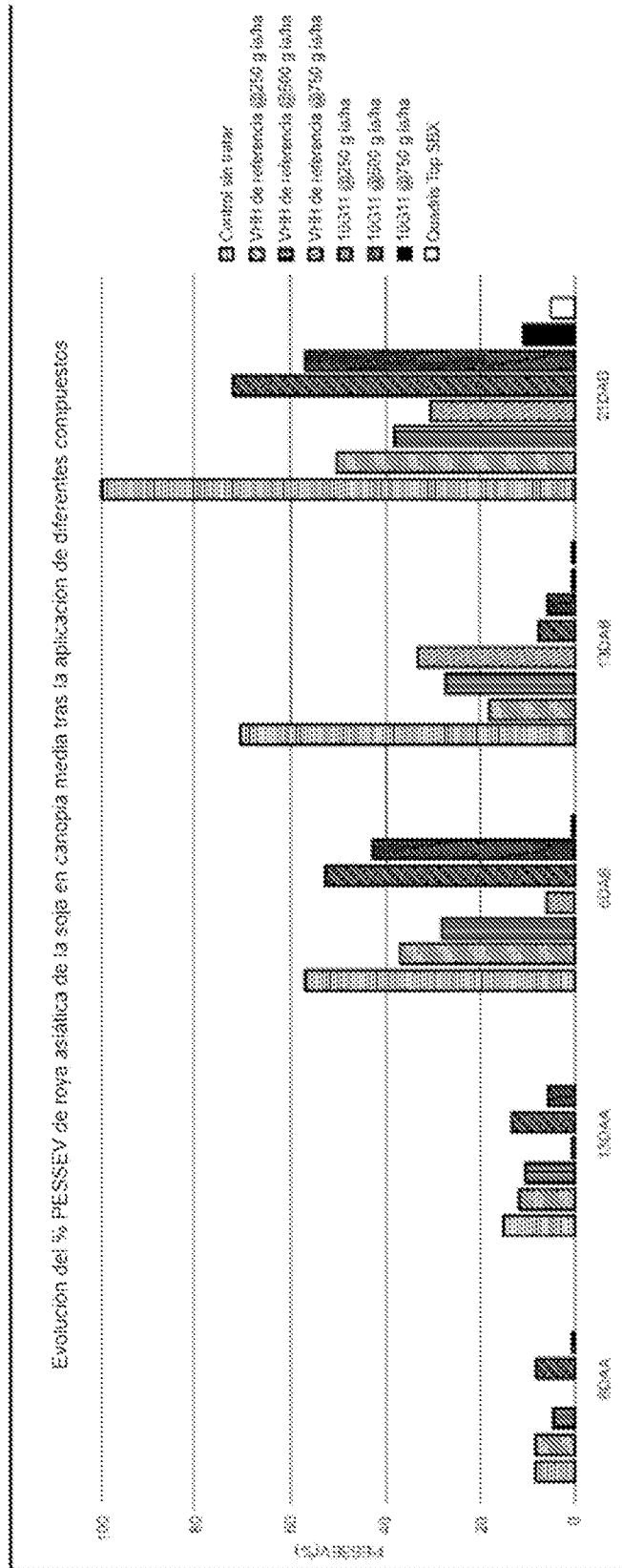


FIG. 16

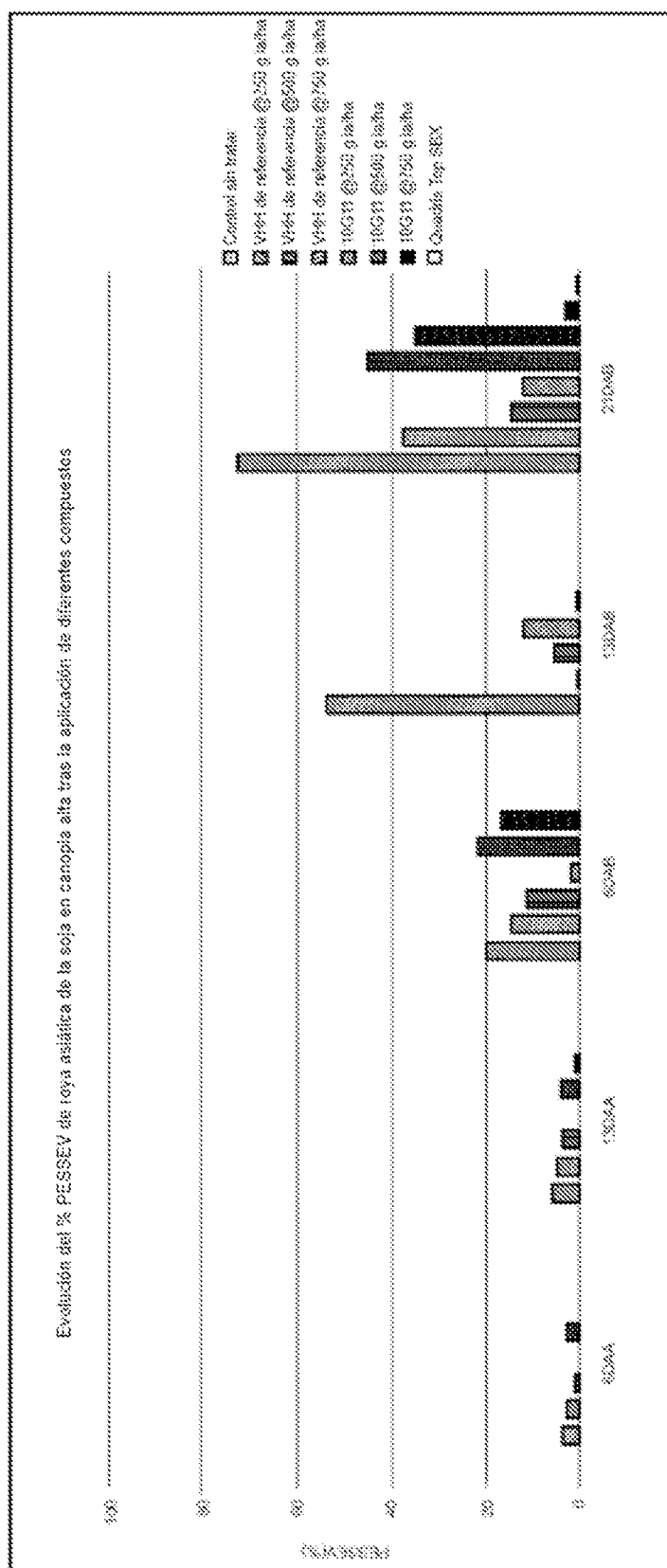


FIG. 17

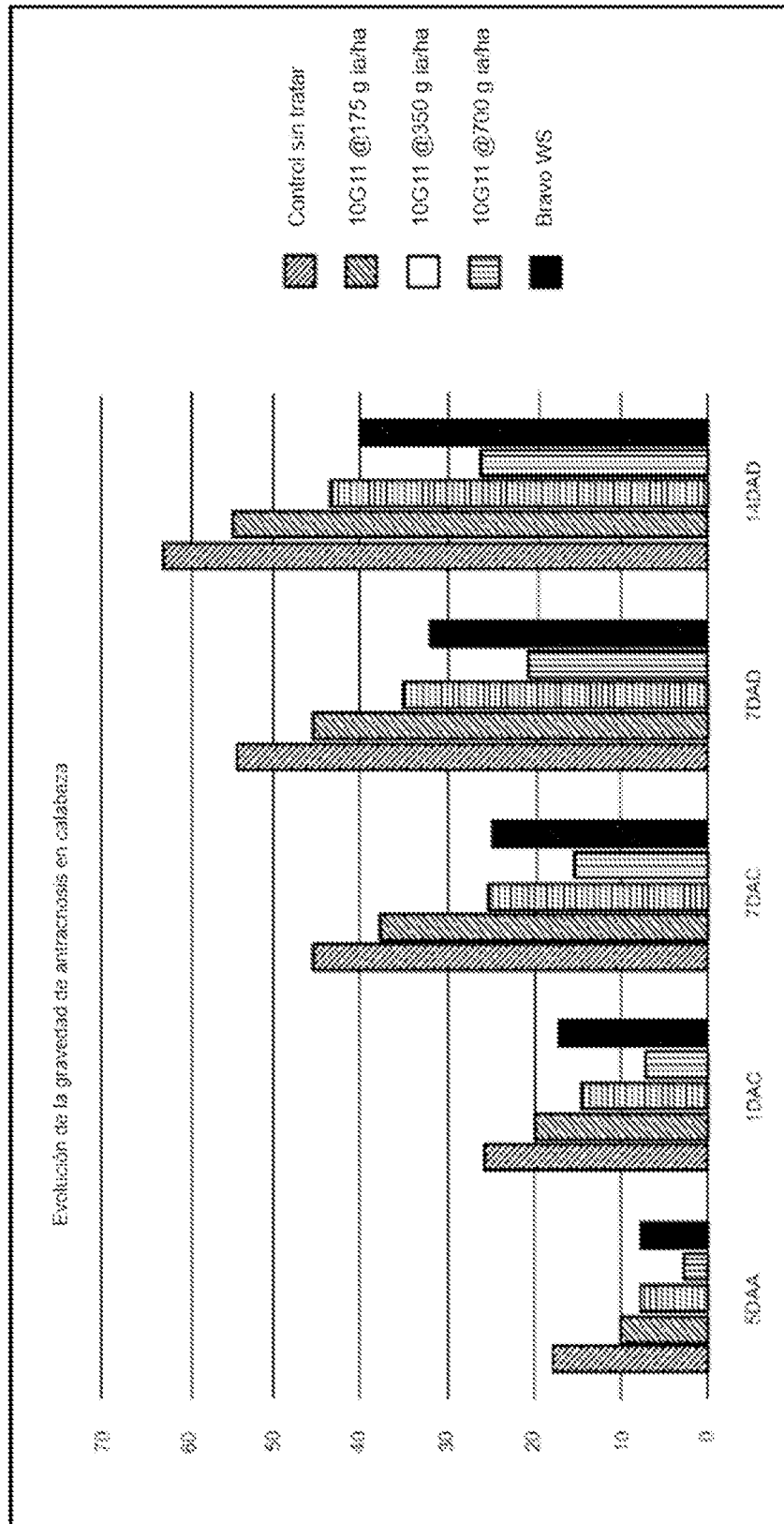


FIG. 18

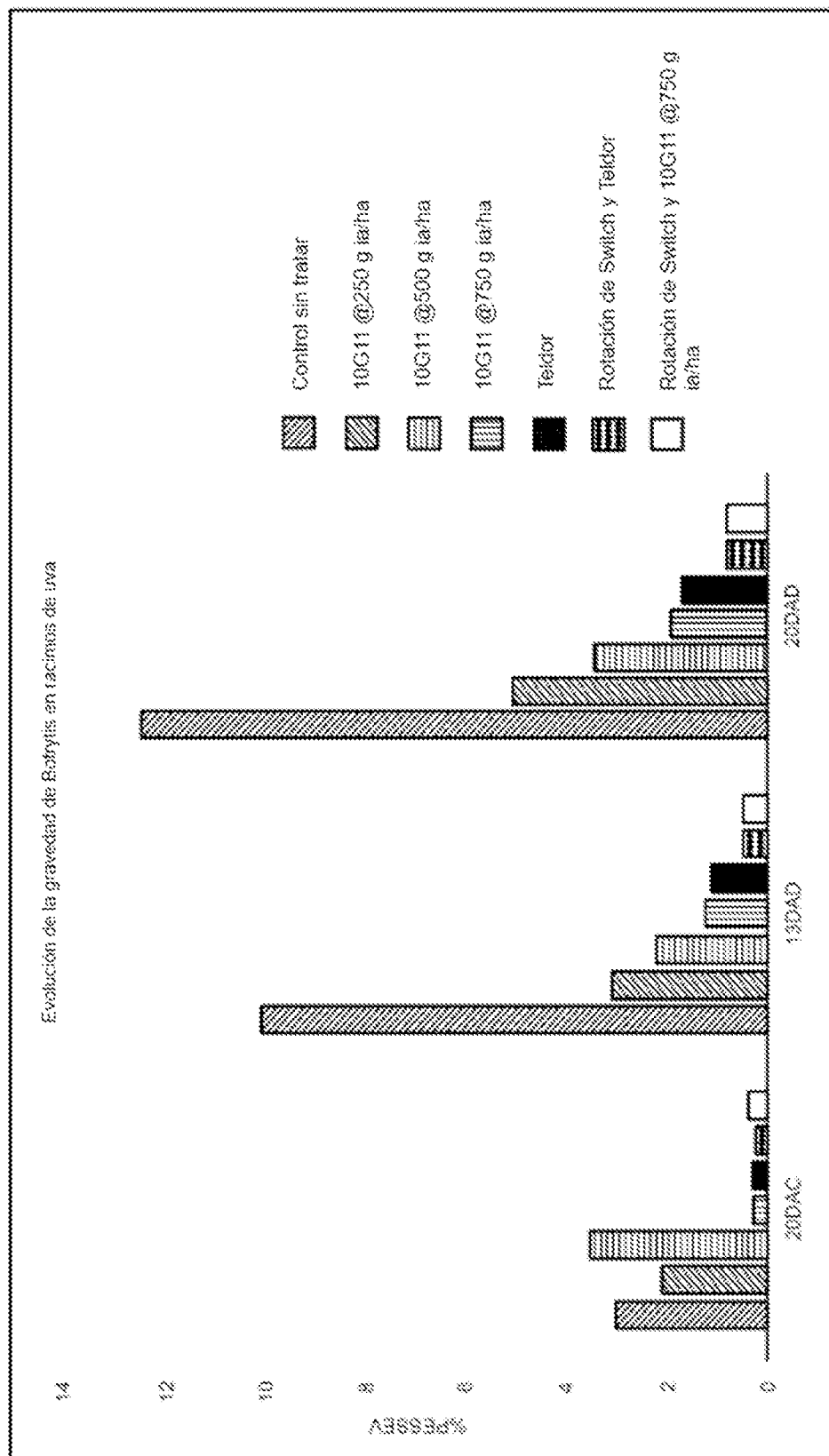


FIG. 19

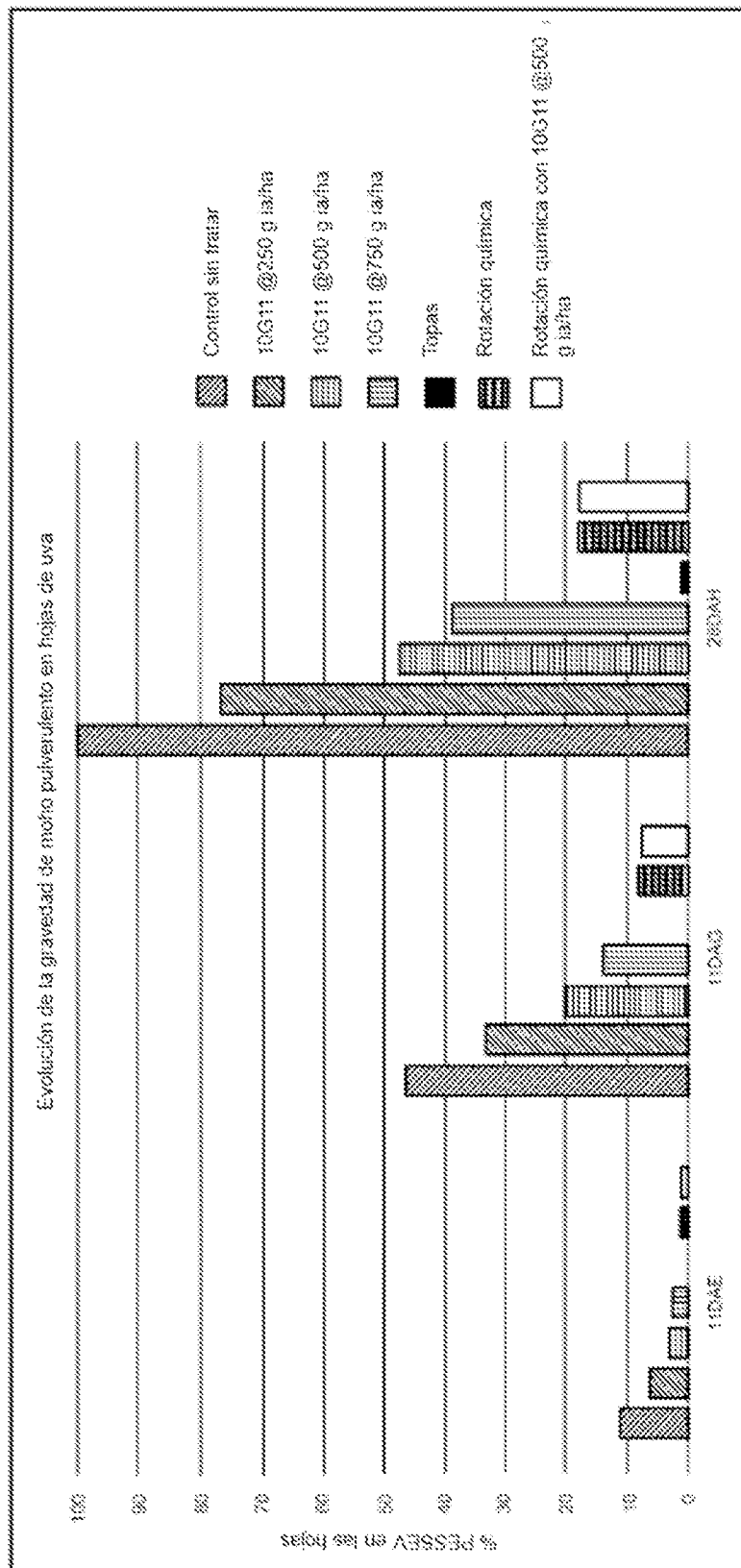


FIG. 20

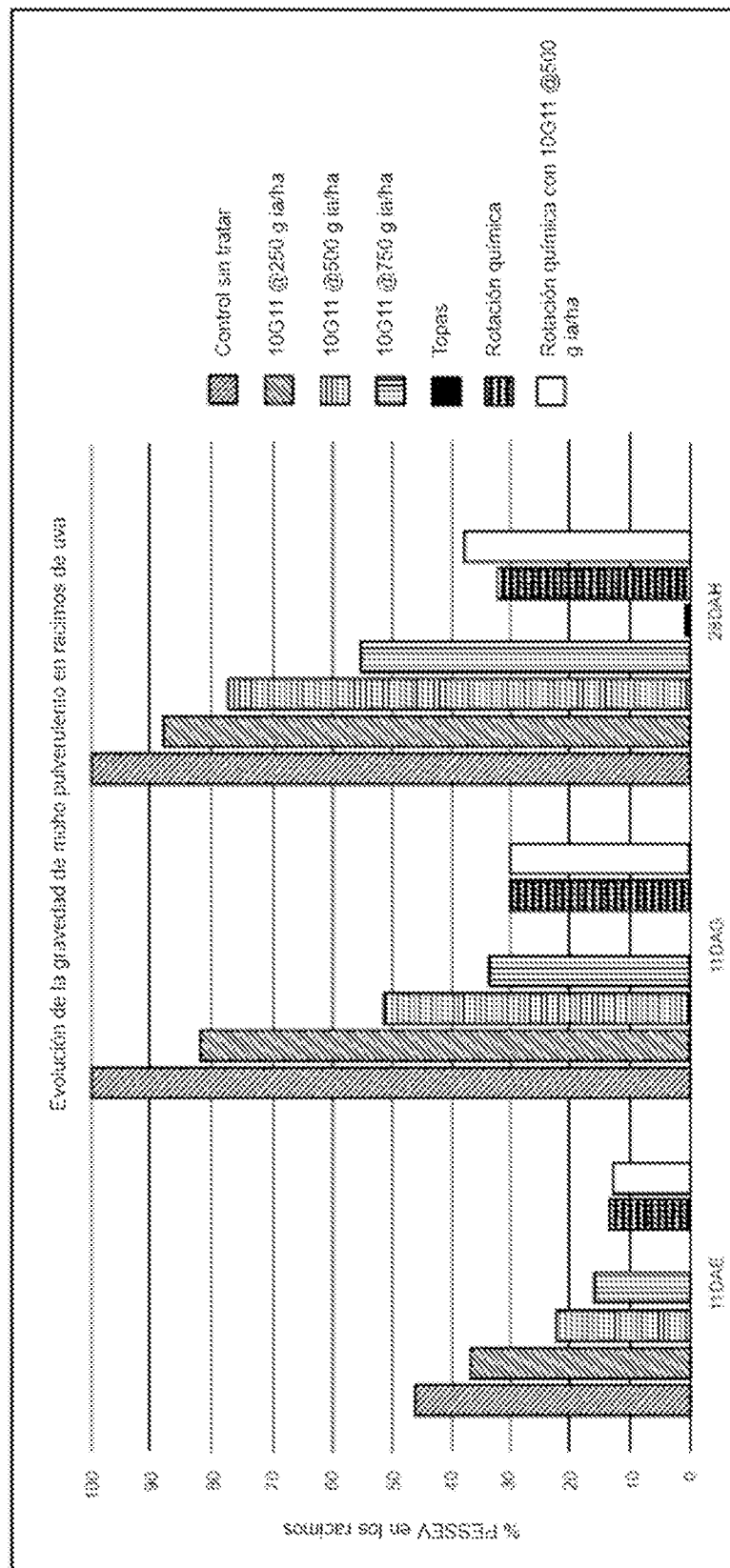


FIG. 21

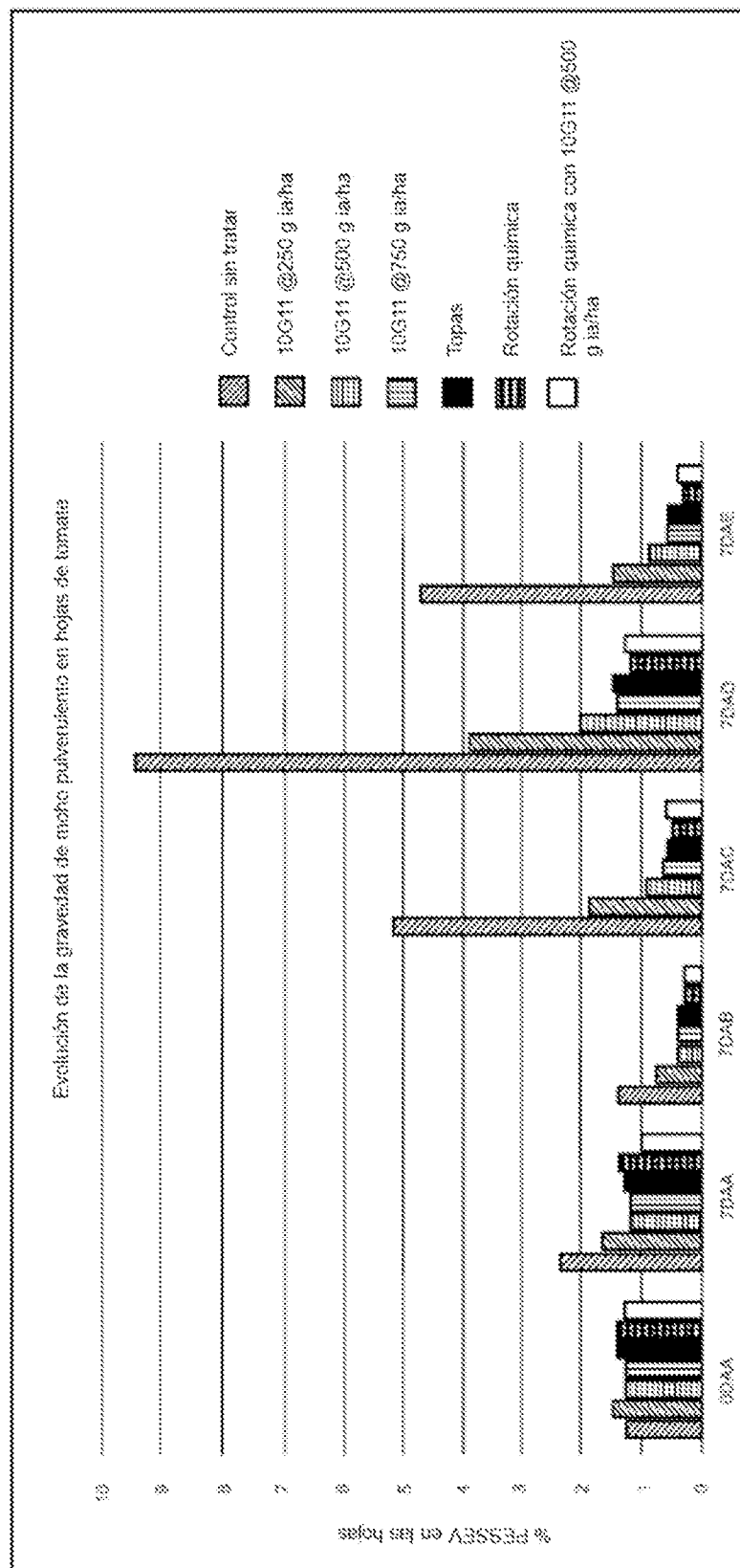


FIG. 22

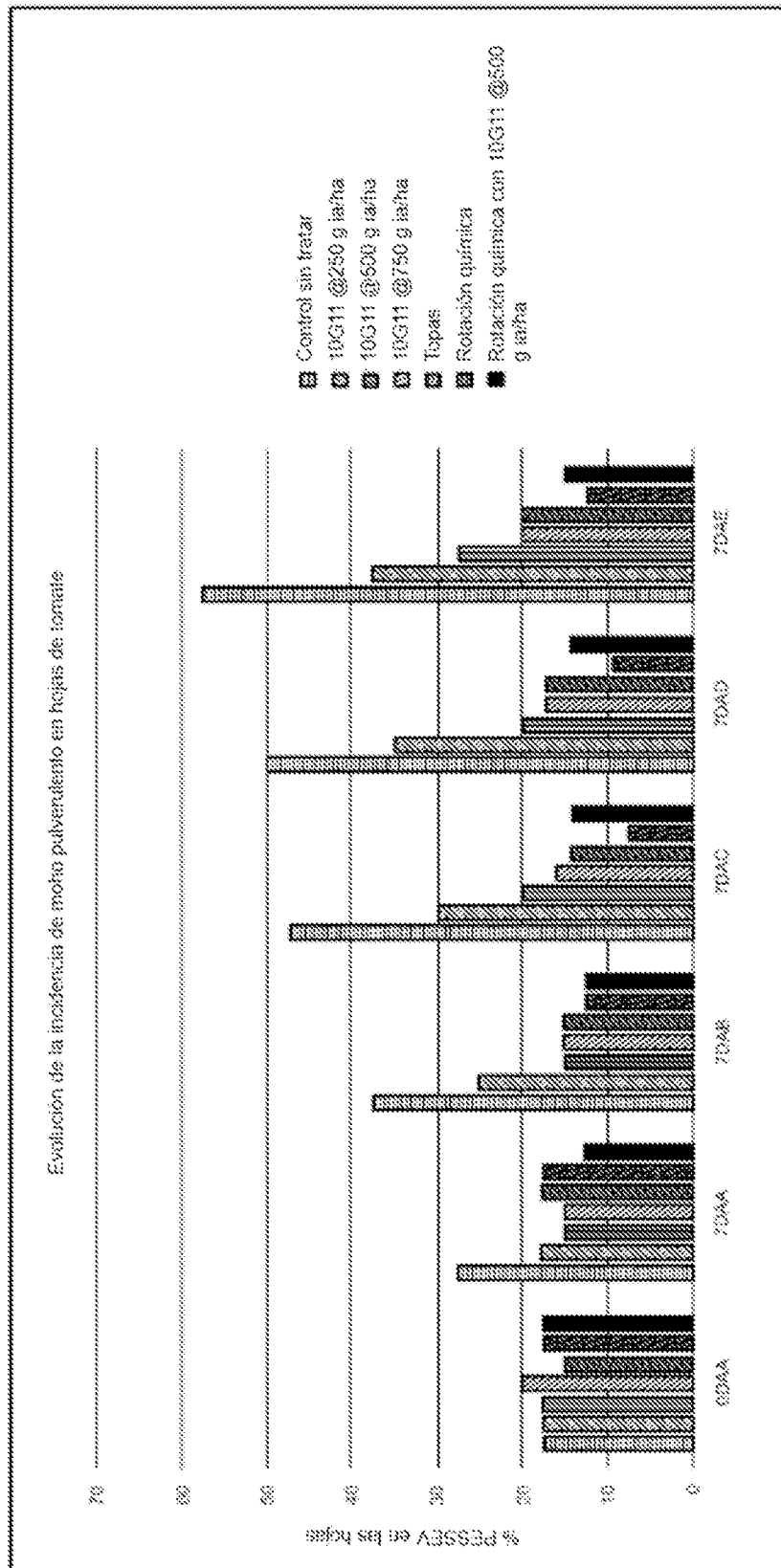


FIG. 23

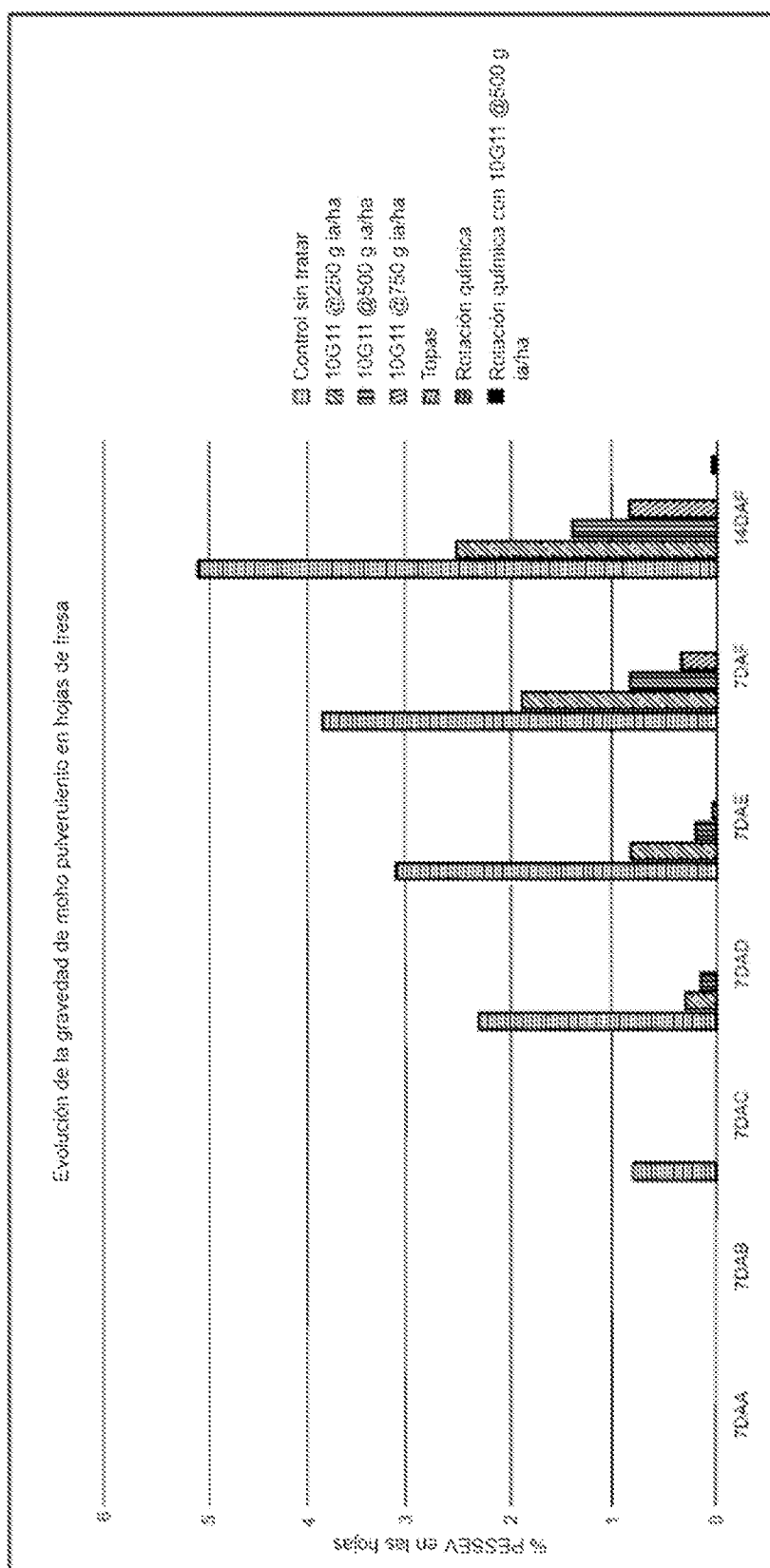
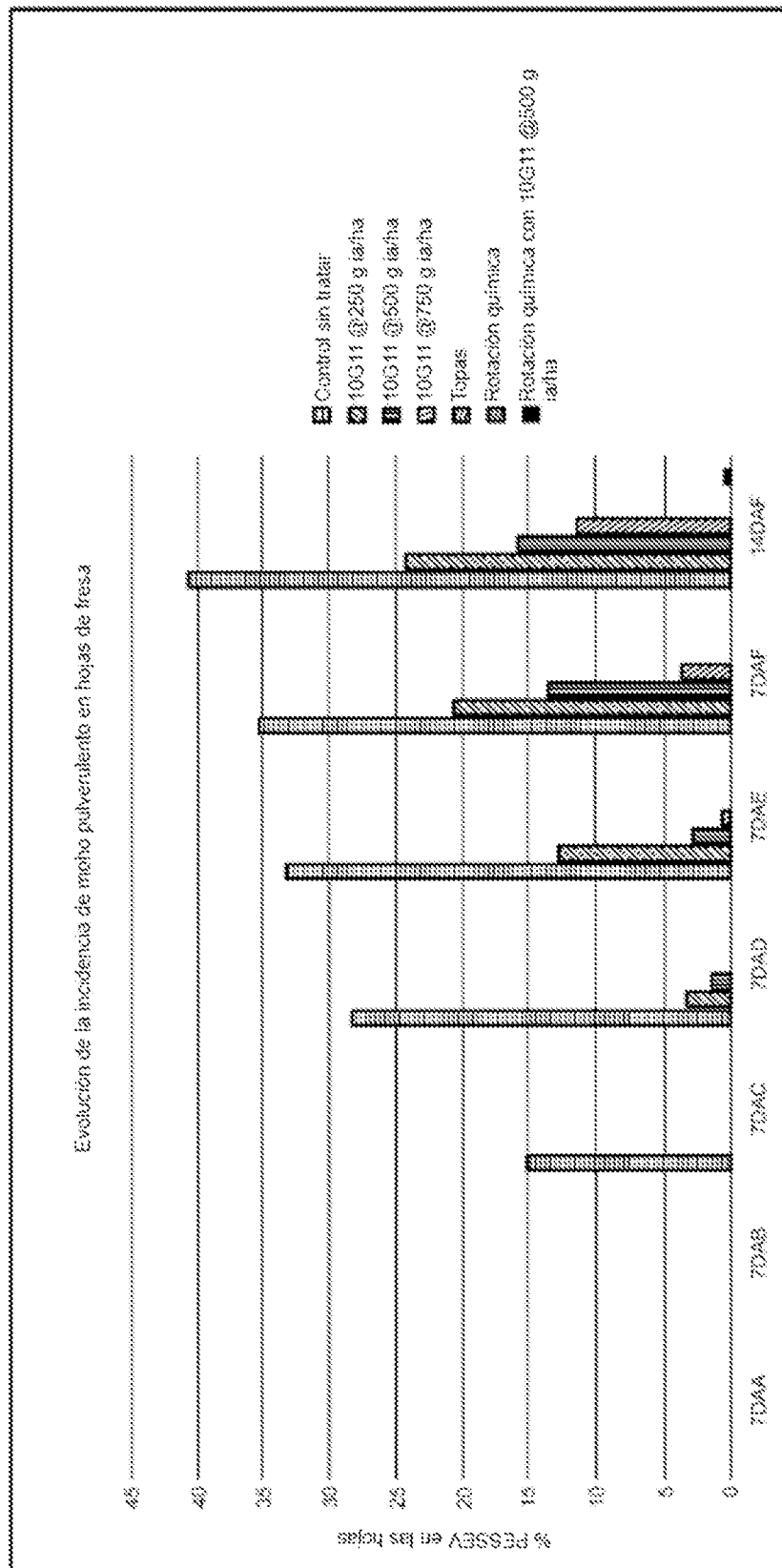


FIG. 24



5204

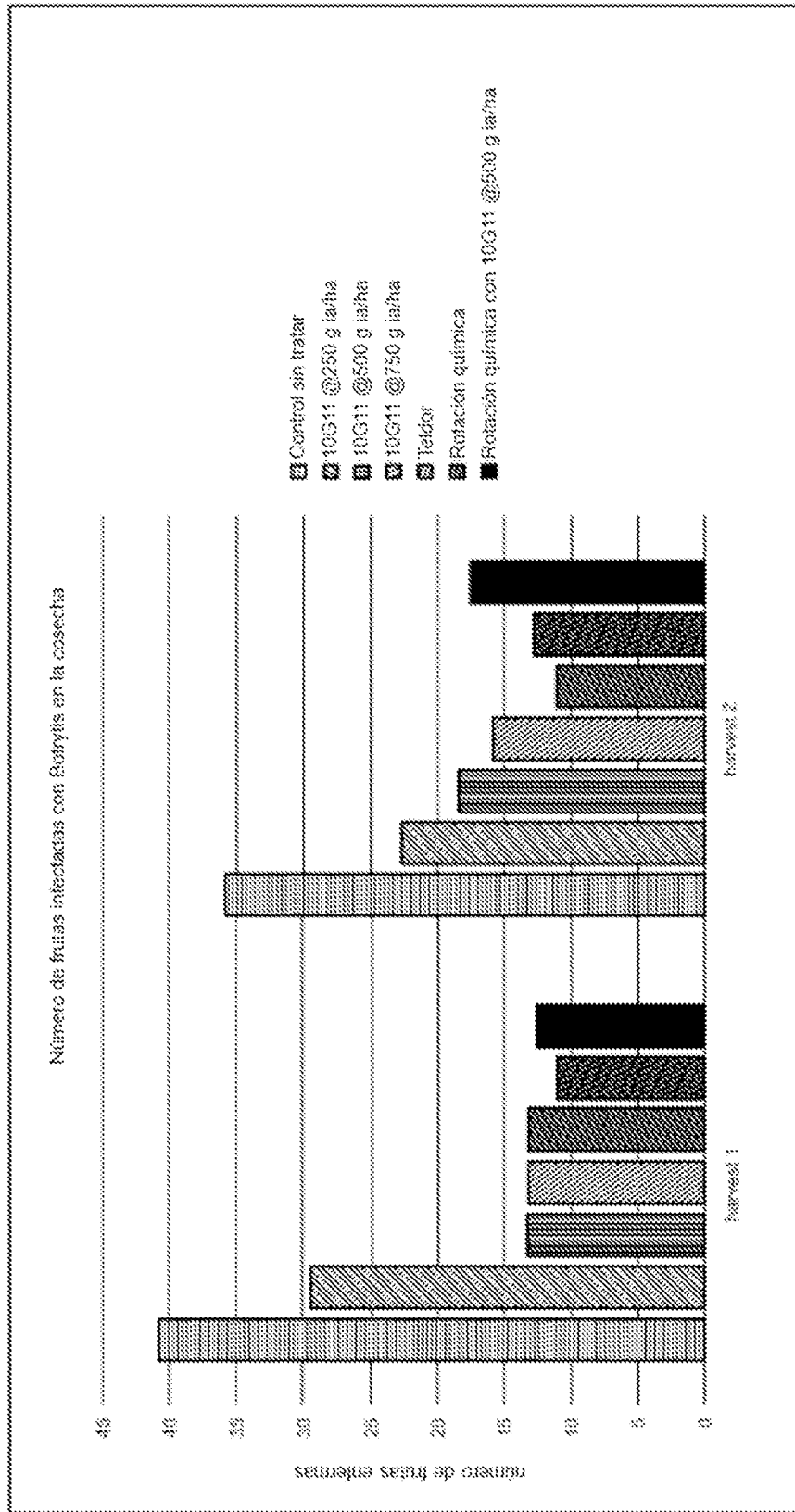


FIG. 26

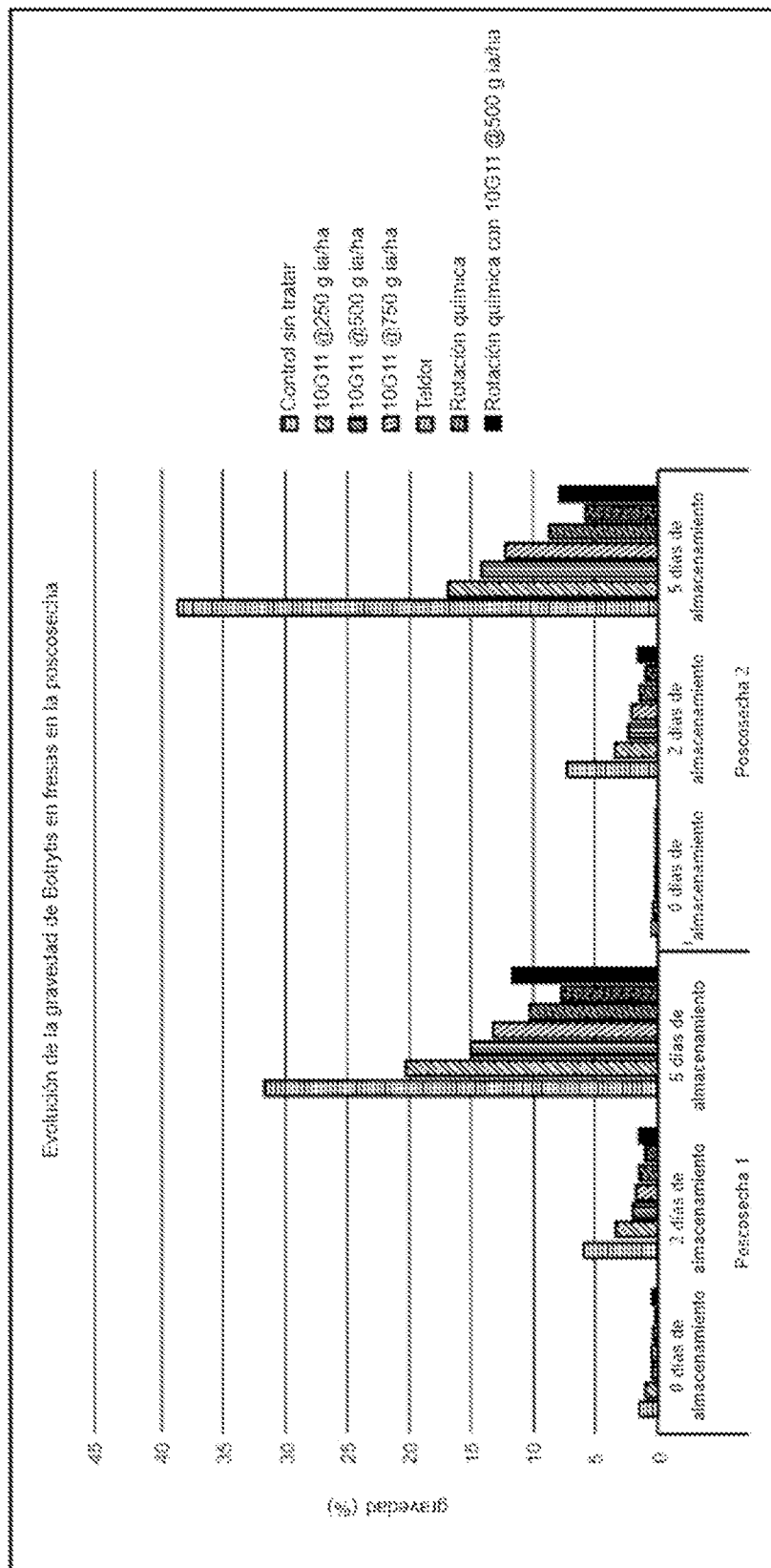


FIG. 27

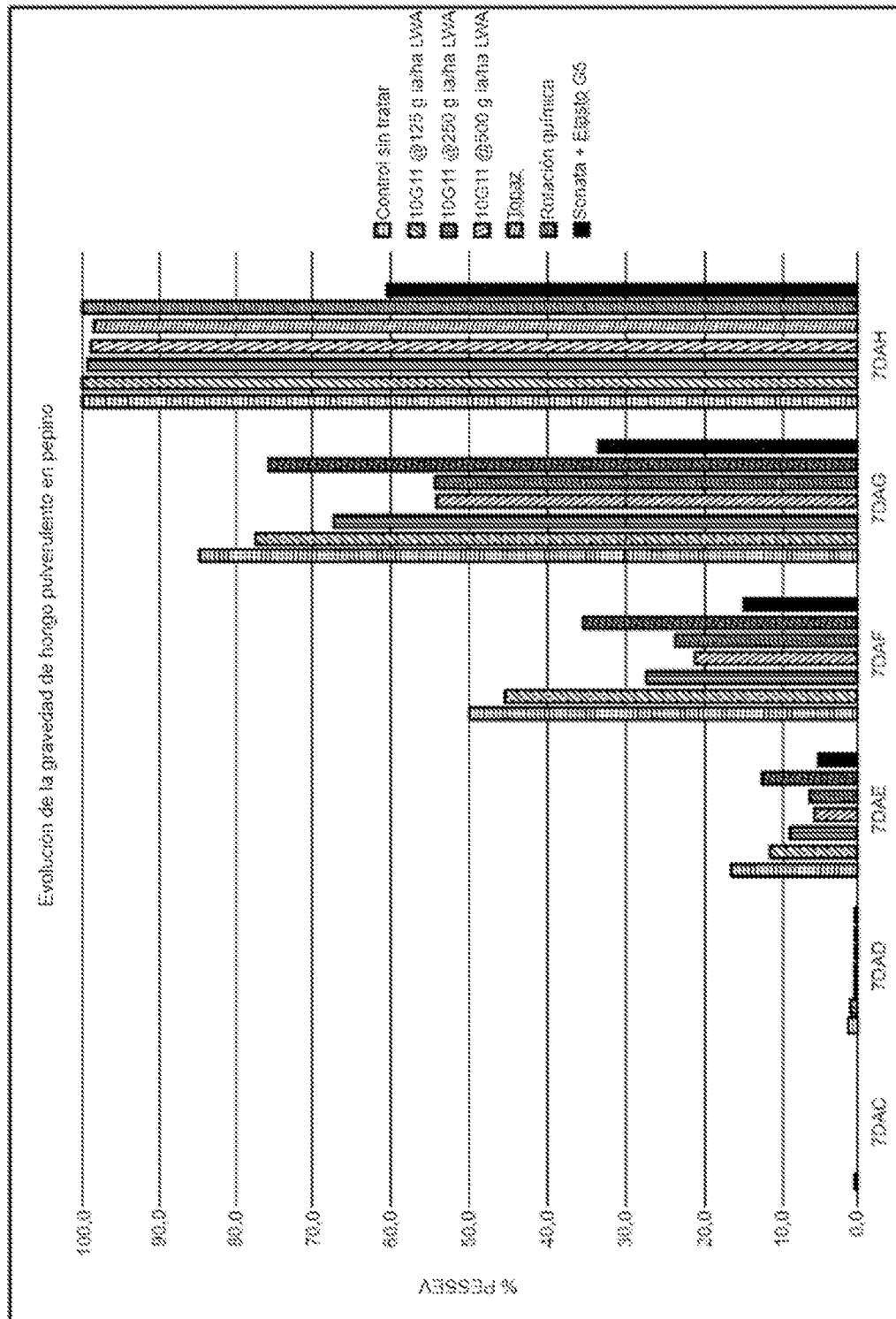


FIG. 28

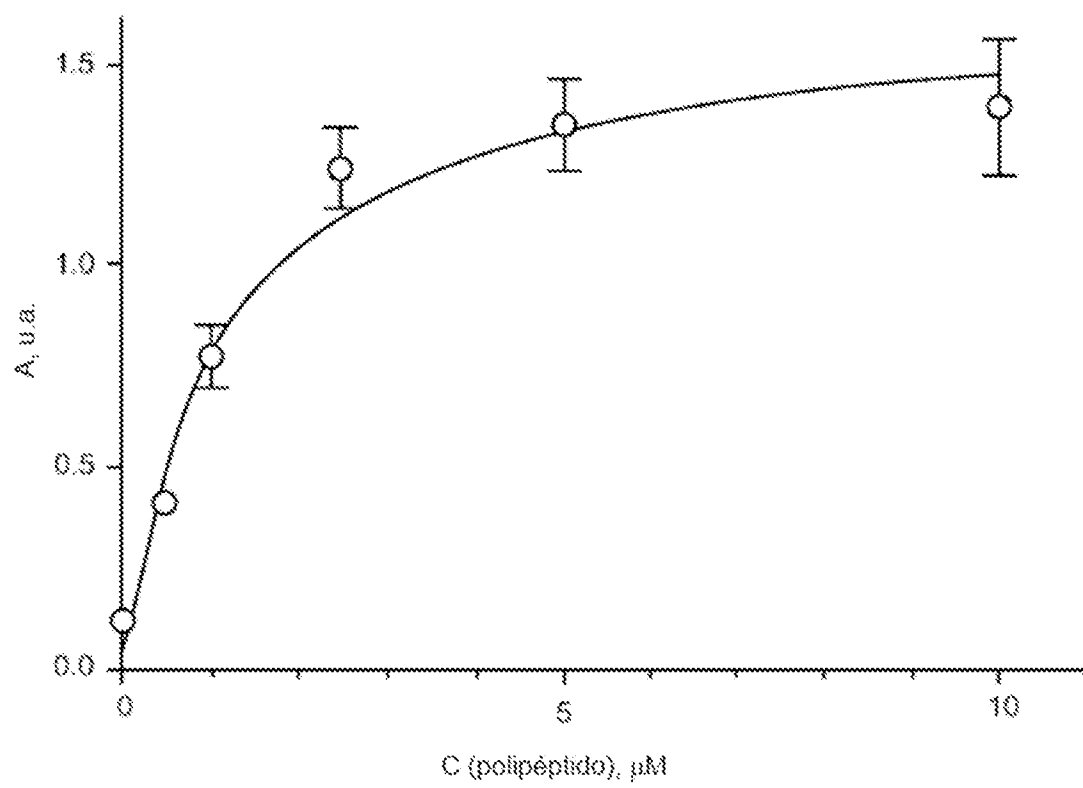


FIG. 29

SE2 ID NO	Nombre	Secuencia	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	100110	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	100111	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3	100112	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
4	100113	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
5	120000	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
6	120001	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
7	Mutante 1	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
8	Mutante 2	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
9	Mutante 3	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
10	Mutante 4	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
11	Mutante 5	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
12	Mutante 6	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
13	Mutante 6	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
14	Mutante 7	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
15	Mutante 8	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
16	Mutante 9	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
17	Mutante 10	QVQLVSSGGLVQPGGSLRLSCAASGDSISIMMWXGQAPKQEWAGITSESTTEYADSTVGEFTISIDMAEKVTLPQMSLKPESTAVTICNVLGGSPFTEDLWGQDQPTVS	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4

FIG. 30

Mutante 1	
solo AIA	
18	
Mutante 2	
solo AIA	
19	
Mutante 3	
solo AIA	
20	
Mutante 4	
solo AIA	
21	
Mutante 5	
solo AIA	
22	
Mutante 6	
solo AIA	
23	
Mutante 7	
solo AIA	
24	
Mutante 8	
solo AIA	
25	
Mutante 9	
solo AIA	
26	

FIG. 30 (continued)

Mutante 10 solo	
MA	
27	
Mutante 11 solo	
MA	
28	
Mutante 12 solo	
MA	
29	
Mutante 13 solo	
MA	
30	
Mutante 14 solo	
MA	
31	
Mutante 15 solo	
MA	
32	
Mutante 16 solo	
MA	
33	
Mutante 17 solo	
MA	
34	

FIG. 30 (continued)

35	Mutante 18 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
36	Mutante 19 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
37	Mutante 20 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
38	Mutante 21 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
39	Mutante 22 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
40	Mutante 23 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
41	Mutante 24 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
42	Mutante 25 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899
43	Mutante 26 solo ALA	00010203040506070809101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899

FIG. 30 (continued)

44	Metanle 27 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDISSASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
45	Metanle 28 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
46	Metanle 29 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
47	Metanle 30 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
48	Metanle 31 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
49	Metanle 32 solo ALA	2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
50	Metanle 33 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS
51	Metanle 34 solo ALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLCQASGDSISIMHWYQAPKQKQKNTKAGLTQGGSTTTPADSTVGTPTISQDAKAKVTLQNSLSRSTETATVYCNWLGSSQMTSSALWQKQSTQPTVYSS

FIG. 30 (continued)

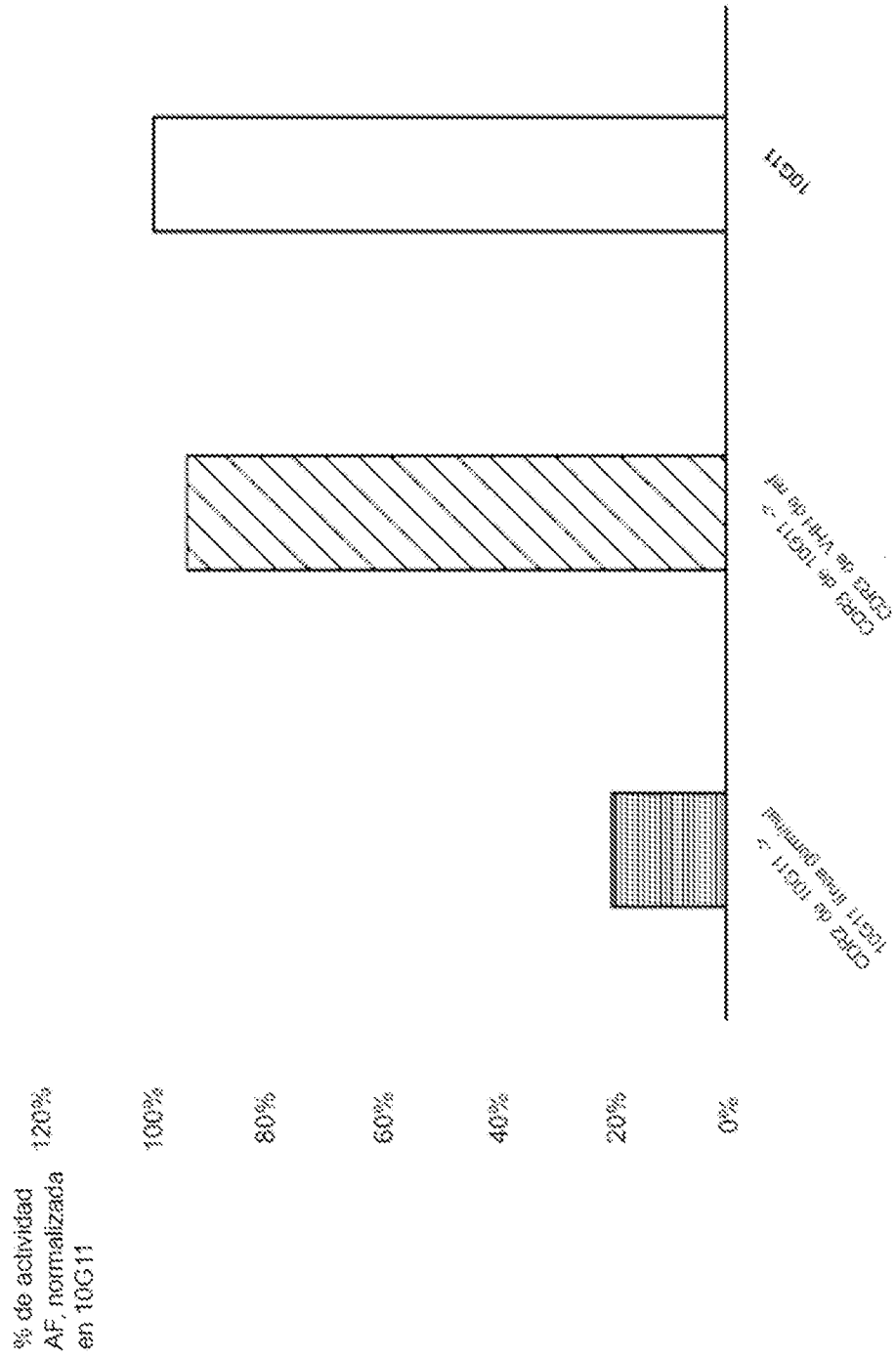


FIG. 31

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2010019442 A
- WO 2014177595 A
- WO 2014191146 A
- WO 9404678 A
- WO 9504079 A
- WO 9634103 A
- WO 9425591 A
- WO 9937681 A
- WO 0040968 A
- WO 0043507 A
- WO 0065057 A
- WO 0140310 A
- WO 0144301 A
- EP 1134231 A
- WO 0248193 A
- WO 9749805 A
- WO 0121817 A
- WO 03035694 A
- WO 03054016 A
- WO 03055527 A
- WO 03050531 A
- WO 0190190 A
- WO 03025020 A
- EP 1433793 A
- WO 04041867 A
- WO 04041862 A
- WO 04041865 A
- WO 04041863 A
- WO 04062551 A
- WO 2010066740 A
- EP 0368684 A
- WO 06030220 A
- WO 06003388 A
- WO 2018201160 A
- WO 2018201161 A
- WO 2019060903 A
- US 6596509 B
- WO 2014177595 A1
- WO 2014191146 A1

Literatura no patente citada en la descripción

- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989
- **AUSUBEL et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1999
- **CHOTHIA et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 877-883
- **KABAT et al.** Sequence of proteins of immunological interest. US Public Health Services
- **HAMERS-CASTERMAN et al.** *Nature*, 03 June 1993, vol. 363 (6428), 446-8
- **HALABY et al.** *Protein Eng.*, 1999, vol. 12, 563-71
- **BLAKE et al.** *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, 29321-29329
- **TRAMONTANO et al.** *J. Mol. Recognition*, 1994, vol. 7, 9-24
- **NYGREN P.A.** *FEBS J.*, 2008, vol. 275, 2668-2676
- **STUMPP et al.** *Drug Discovery Today*, 2008, vol. 13, 695-701
- **SKERRA et al.** *FEBS J.*, 2008, vol. 275, 2677-2683
- **KOLMAR et al.** *FEBS J.*, 2008, vol. 275, 2684-2690
- **DIMITROV DS.** *mAbs*, 2009, vol. 1, 26-28
- **BARRETO-BERGTER E; SASSAKI G; DE SOUZA LM.** Structural analysis of fungal cerebrosides. *Front Microbiol.*, 2011, vol. 2, 239
- **NÄÄTSAARI et al.** *Plos One*, 2012, vol. 7 (6), e39720
- **WEIDNER et al.** *J Vis Exp*, 2020, vol. 36, 1862
- **SHAPOVALOV; DUNBRACK.** *Structure*, 2011, vol. 19 (6), 844-58
- **SKIPSKI et al.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1965, vol. 106 (2), 386-396
- **WARD et al.** *Nature*, 12 October 1989, vol. 341 (6242), 544-6
- **HOLT et al.** *Trends Biotechnol.*, 2003, vol. 21 (11), 484-490
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- **HUANG et al.** *PNAS*, 2006, vol. 103, 14302-14306
- **KNIGHT AJ ; BEHM CA.** *Ex. Parasitol.*, 19 September 2011
- **GOURGUES et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 297, 1197
- **MANAVATHU EK et al.** *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, December 1999, 2950
- **HOOGENBOOM.** *Nature Biotechnology*, 2005, vol. 23 (9), 1105-1116
- **ROBERTS; LAUER.** *Methods in Enzymology*, 1979, vol. 68, 473
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Springs Laboratory, 1989
- **FOLCH et al.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 226, 497-509
- **GORDEN, M.H.** Encyclopedia of Analytical Science. Elsevier, 2015
- **TRUCILLO et al.** *Processes*, 2020, vol. 8 (9), 1022
- **ZHANG.** *Liposomes*, 2017, vol. 1522, 1 7-22
- **KAMAT et al.** *Analytical biochemistry*, 2017, vol. 536, 16-31
- **WALLNER et al.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, vol. 72, 150-154