

B2

74 Agente: **Coca Torrens, Manuela**

La presente invención se refiere a nuevos péptidos cíclicos que tienen propiedades antimicrobianas. Dichos péptidos tienen un número par de aminoácidos comprendido entre 4 y 10, y un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60%. La invención describe la síntesis y la utilización de los mencionados péptidos como agentes antimicrobianos frente a bacterias y hongos patógenos para plantas. También se refiere a composiciones que comprenden dichos péptidos y un agente auxiliar, y a un método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de las plantas provocadas por bacterias y hongos patógenos.

[illegible]

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

ES 2 281 274 B2

DESCRIPCIÓN

Péptidos cíclicos antimicrobianos.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a péptidos cíclicos que son tienen propiedades antimicrobianas, y que son particularmente eficaces frente a bacterias y hongos patógenos para las plantas.

10 **Estado de la técnica anterior**

La agricultura es un proceso para la producción de alimentos mediante el cultivo de ciertas plantas. El paso de la agricultura de subsistencia en la que se producía solamente lo necesario para satisfacer las necesidades del agricultor y de su familia, a la agricultura industrial que implica la existencia de grandes extensiones cultivadas, ha conducido a la necesidad de controlar las enfermedades de las plantas de forma efectiva a gran escala.

Un problema común en la agricultura es la reducción en el rendimiento causada por los ataques por microorganismos patógenos para las plantas, por ejemplo las bacteriosis causadas por las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria*, o *Clavibacter michiganensis*, o micosis causadas por diversos hongos como *Fusarium oxysporum*.

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

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

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

Otra forma de controlar las enfermedades causadas por los microorganismos patógenos de los vegetales consiste en el empleo de compuestos aislados de la propia naturaleza, por ejemplo los péptidos, que están presentes en plantas y animales, y algunos de los cuales presentan propiedades antimicrobianas.

En Broekaert *et al*, Plant. Physiol., 1995, 108, 1353-1358, se describe una familia de péptidos denominados defensinas vegetales que tienen una actividad antifúngica elevada. Dichos péptidos están constituidos por secuencias que comprenden entre 45 y 54 aminoácidos, y presentan puentes disulfuro formados entre dos aminoácidos cisteína situados en distintos puntos de la estructura.

En la solicitud de patente WO-A-95/11306 se describe un péptido de 30 aminoácidos aislado de la remolacha, que presenta propiedades bactericidas y fungicidas frente a microorganismos patógenos de los vegetales.

En la solicitud de patente WO-A-99/59412 se describe un péptido extraído de *Poenibacillus polymyxa* que inhibe las enfermedades causadas por hongos en plantas. Dicho péptido consta de un anillo formado por seis aminoácidos, y de una cadena lateral formada por dos aminoácidos.

En la solicitud de patente WO-A-97/30082 se describe la aplicación para el empleo en agricultura de un péptido formado por 25 aminoácidos aislado de un escorpión.

Otra forma de actuar contra los microorganismos patógenos de las plantas consiste en el empleo de compuestos resultantes de la modificación de péptidos o proteínas antimicrobianos aislados de la naturaleza. Por ejemplo como se describe en:

- la solicitud de patente EP-A-0472987, que se refiere a péptidos lineales de 23 aminoácidos, que son modificaciones de péptidos naturales pertenecientes al grupo de la magainina,
- la solicitud de patente WO-A-02/06324, que se refiere a péptidos lineales de 44 aminoácidos derivados del péptido natural denominado heliomicina, o
- la patente norteamericana US6015941, que se refiere a péptidos lineales formados por 17 aminoácidos derivados de la taquiplesina.

Como se describe en WO-A-96/008264, uno de los problemas de la utilización de compuestos antifúngicos y antibacterianos de origen natural es la limitación en cuanto a las cantidades comerciales disponibles, en parte debido a problemas de obtención y purificación.

Otra aproximación para disponer de péptidos antimicrobianos consiste en prepararlos por vía sintética.

En el contexto del desarrollo de péptidos con actividad antimicrobiana de amplio espectro, en la solicitud de patente WO-A-98/03192 se describen péptidos cíclicos formados por un número de aminoácidos comprendido entre 10 y 30, que pueden aplicarse para el tratamiento de infecciones y enfermedades microbianas en plantas causadas por bacterias y hongos. Los péptidos formados por secuencias de 10 aminoácidos comprenden combinaciones de los aminoácidos: alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, leucina, lisina, ornitina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano, valina y D-arginina. Sin embargo, los ensayos de actividad antimicrobiana sólo se realizan frente a bacterias patógenas para el ser humano, y no se describe su actividad frente a bacterias y/o hongos patógenos para las plantas.

En el marco de diseñar nuevos péptidos antimicrobianos, en Frece *et al*, Antimicrob. Agents Chemother., 2004, 48, 3349-3357, se describen péptidos constituidos por 19 aminoácidos, que comprenden la agrupación de aminoácidos glicina-serinaglicina en el centro de la molécula, y tienen estructura cíclica debido a la formación de un puente disulfuro entre los aminoácidos cisteína que se encuentran en posición terminal. Dichos péptidos presentan una buena eficacia frente a bacterias gram-positivas, que los hace susceptibles de ser aplicados en medicina, pero no se describe su actividad frente a hongos o a bacterias patógenas de los vegetales.

Subsiste pues la necesidad de disponer de compuestos que sean efectivos frente a infecciones y enfermedades de las plantas provocadas por microorganismos como bacterias y hongos, y que sean fáciles de sintetizar.

Los autores de la presente invención han desarrollado péptidos que resultan de fácil preparación y que presentan una elevada eficacia para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de las plantas.

Objeto de la invención

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

Otro objeto de la invención es la utilización de dichos péptidos como agentes antimicrobianos.

También es objeto de la invención una composición fitosanitaria que comprende los péptidos de la invención.

Forma parte también del objeto de la invención un método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de las plantas causadas por bacterias y hongos.

Descripción de las figuras

Figura 1

En la Figura 1 se muestra la estructura de los 56 decapeptidos cíclicos pertenecientes a la quimioteca preparada empleando el procedimiento Multipin™, en el que se emplean las SynPhase™ Lanterns comercializadas por la empresa Mimotopes (Australia), como soporte sólido.

Descripción detallada de la invención

Péptidos

El objeto de la presente invención es proporcionar péptidos cíclicos que tienen un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60%, y que responden a la fórmula general (I):



donde:

X es Lys o Leu,

Y es Phe o D-Phe,

n = 1, 3, o 5,

m = 1, 3, o 5, y

n + m = 2, 4, 6 o 8.

ES 2 281 274 B2

El término “ciclo” que se encuentra al principio de la secuencia de aminoácidos en la fórmula general (I) significa que el péptido es cíclico, de modo que el grupo α -carboxílico del aminoácido Gln está unido mediante un enlace peptídico con el grupo α -amino del primer aminoácido X perteneciente al grupo (X)_n.

Las abreviaturas empleadas para los aminoácidos en esta descripción siguen la normativa de la Comisión para la Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB, según se describe en J. Biol. Chem., 1972, 247, 977-983. De esta forma, Lys significa L-lisina, Leu es L-leucina, Phe es L-fenilalanina, D-Phe es D-fenilalanina, y Gln es L-glutamina.

Los compuestos que pertenecen a este grupo de péptidos presentan actividad antimicrobiana.

Dicha actividad es particularmente efectiva frente a microorganismos patógenos de las plantas como por ejemplo el hongo *Fusarium oxysporum*, y las bacterias *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

Preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



donde:

X es Lys o Leu,

Y es Phe, y

m = 1, y n = 1, o

m = 3, y n = 1, 3, o 5.

Más preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



donde:

X es Lys o Leu,

Y es Phe, y

m = 3, y n = 5.

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos se cuentan los definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 23, y cuya estructura se muestra en la Tabla I:

TABLA I

SEQ_ID_NO:	Estructura
1	ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln)
2	ciclo(Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
3	ciclo(Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
4	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
5	ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
6	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)

7	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
8	ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
9	ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
10	ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
11	ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
12	ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
13	ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
14	ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
15	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
16	ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
17	ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
18	ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
19	ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
20	ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
21	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
22	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
23	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)

Los péptidos objeto de la invención son cíclicos y comprenden entre 4 y 10 aminoácidos, y tienen un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60%.

Esto significa que en el caso de un péptido de 4, 6 o 8 aminoácidos, el péptido contiene dos, tres o cuatro residuos de lisina respectivamente, que representa el 50% molar de lisina en todos los casos.

En el caso de un péptido de 10 aminoácidos, el péptido puede contener 4, 5 o 6 residuos de lisina, que responde respectivamente al 40%, 50% o 60% molar de lisina.

Para describir la estructura de los péptidos de la invención se va a emplear como ejemplo el péptido ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln), que corresponde a la fórmula general (I) en la que $n = m = 1$, $n+m = 2$, X es Lys, e Y es Phe.

Se trata de un péptido cíclico que comprende 4 aminoácidos. Los enlaces peptídicos que forman la estructura de este péptido en el sentido de izquierda a derecha son los siguientes:

- El grupo α -carboxílico de la primera lisina está unido con el grupo α -amino de la fenilalanina.

ES 2 281 274 B2

- El grupo α -carboxílico de la fenilalanina está enlazado con el grupo α -amino de la segunda lisina.
- El grupo α -carboxílico de la segunda lisina está unido al grupo α -amino de la glutamina.
- El grupo α -carboxílico de la glutamina forma un enlace peptídico con el grupo α -amino de la primera lisina, cerrando de esta forma el anillo.

Una característica de los péptidos de la invención es su estructura cíclica. Según se describe en WO-A-98/03192, los péptidos cíclicos son más resistentes a los procesos proteolíticos en comparación con sus homólogos lineales. De este modo se puede prolongar más tiempo su presencia en la planta y también su actividad antimicrobiana. Este hecho no se traduce en una persistencia negativa en el medio ambiente, ya que dichos péptidos acaban degradándose finalmente por las rutas biológicas habituales.

En la fórmula general (I) de los péptidos de la presente invención, el aminoácido Y puede ser Phe o D-Phe, es decir, L-fenilalanina o D-fenilalanina.

Según se describe en WO-A-96/08264, la introducción de aminoácidos de la serie D en un péptido contribuye a incrementar la estabilidad de dicho péptido, ya que es menos sensible a las rutas biológicas que degradan los aminoácidos de la serie L. No obstante, existen otras rutas alternativas que incluso degradan aminoácidos de la serie D, por lo que esta mayor estabilidad no implica una persistencia de dichos péptidos en el medio ambiente.

Los péptidos descritos en la invención tienen una longitud comprendida entre 4 y 10 aminoácidos que los hace apropiados para ser preparados empleando los procedimientos habituales de síntesis de péptidos en fase sólida. Entre dichos procedimientos se pueden mencionar:

- el procedimiento que usa la resina 4-metilbencidrilamina (MBHA) funcionalizada con grupos amino, como soporte sólido para llevar a cabo las reacciones sucesivas de acoplamiento entre los diferentes aminoácidos que integran el péptido y la etapa de ciclación, y
- el procedimiento MultipinTM, en el que se emplean las SynPhaseTM Lanterns comercializadas por la empresa Mimotopes (Australia). En la página web <http://www.mimotopes.com/>, se puede encontrar información sobre dicha técnica.

Ambos procedimientos son bien conocidos por el experto en la materia y se encuentran descritos por ejemplo en S.A.Kates, F.Albericio Eds., Solid-Phase Synthesis. A practical guide, Marcel Dekker, New York, 2000 (ISBN: 0-8247-0359-6), o en K. Burgess Eds., Solid-Phase Organic Synthesis, Wiley, John & Sons, New York, 1999 (ISBN: 0471318256).

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

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

Dicho espaciador, una vez se ha unido con su grupo carboxílico a un grupo amino de la resina MBHA, presenta un grupo amino libre que permite el anclaje de un aminoácido que tenga un grupo carboxílico libre.

Las SynPhaseTM Lanterns comerciales utilizadas son del tipo Rink amida y ya llevan incorporadas este espaciador bifuncional.

Si el aminoácido tiene un grupo carboxílico libre en la cadena lateral, como por ejemplo el ácido glutámico o el ácido aspártico, entonces se puede unir al soporte sólido a través de dicha cadena lateral, manteniendo disponibles el otro grupo carboxílico y el grupo amino para la formación de nuevos enlaces peptídicos.

La técnica MultipinTM se puede emplear para la construcción de quimiotecas de péptidos de forma muy conveniente, como se describe en los Ejemplos.

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

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

En la primera etapa se procede al anclaje del ácido glutámico a la resina, o a la SynPhaseTM Lantern, a través del grupo carboxílico libre de su cadena lateral. Los otros dos grupos reactivos del ácido glutámico se mantienen protegidos para evitar reacciones secundarias: por ejemplo, el grupo α -carboxílico en forma de éster alílico, y el grupo α -amino protegido por el grupo Fmoc.

A continuación se elimina el grupo protector Fmoc del grupo α -amino del ácido glutámico, y se incorpora el siguiente aminoácido del péptido que tiene el grupo α -amino protegido por el grupo Fmoc. El enlace se establece entre el grupo carboxílico del nuevo aminoácido y el grupo amino del ácido glutámico.

5 Este proceso de eliminación del grupo protector Fmoc y la incorporación del nuevo aminoácido se repite hasta que se completa un péptido con una estructura lineal.

10 En el caso del aminoácido lisina, el grupo amino de la cadena lateral está protegido por el grupo Boc (t-butiloxi-carbonilo), que es estable a las condiciones de eliminación del grupo Fmoc.

Una vez finalizados los acoplamientos se elimina el éster alílico que protege el grupo α -carboxílico del ácido glutámico, y se elimina el grupo Fmoc que protege el grupo α -amino del último aminoácido incorporado.

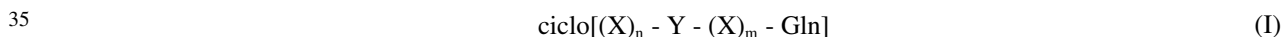
15 Seguidamente se procede a la ciclación entre el grupo α -carboxílico del ácido glutámico y el grupo α -amino del último aminoácido incorporado. De esta forma se obtiene un péptido cíclico unido al soporte sólido, bien sea la resina o la SynPhaseTM Lantern.

20 La escisión del péptido del soporte sólido se realiza en condiciones ácidas e implica la ruptura del enlace entre el grupo amino y el grupo bencidrilo del linker, conduciendo a la formación del residuo de glutamina (Gln), que se encuentra presente en el péptido de la invención, como se puede observar en la fórmula general (I). Al mismo tiempo que se libera el péptido del soporte sólido se eliminan los grupos Boc de los residuos de lisina.

25 Tras un proceso convencional de aislamiento, los péptidos de la invención se obtienen con un buen rendimiento, habitualmente comprendido entre el 70% y el 80%, en forma de sólidos pulverulentos, y se caracterizan mediante análisis por HPLC, espectrometría de masas (ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS).

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

También forma parte de la invención la utilización de los péptidos cíclicos que tienen un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60% y que responden a la fórmula general (I):



donde:

40 X es Lys o Leu,

Y es Phe o D-Phe,

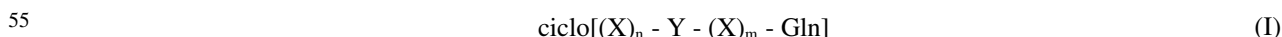
45 n = 1, 3, o 5,

m = 1, 3, o 5, y

n + m = 2, 4, 6 o 8

50 como agentes antimicrobianos.

Preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



donde:

60 X es Lys o Leu,

Y es Phe, y

m = 1, y n = 1, o

65 m = 3, y n = 1, 3, o 5

ES 2 281 274 B2

Más preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



donde:

X es Lys o Leu,

Y es Phe, y

m = 3, y n = 5

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos se cuentan los péptidos definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_D_NO: 23.

Preferiblemente los péptidos de la invención se utilizan como agentes antimicrobianos frente a bacterias y a hongos patógenos para las plantas.

Preferiblemente las bacterias patógenas para las plantas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

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

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

Clavibacter michiganensis es una bacteria gram positiva que causa la podredumbre angular de la patata (*C. michiganensis* subsp. *sepedonicum*) y el chancro bacteriano del tomate (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*). Se trata de enfermedades de cuarentena de muy difícil control, ya que el patógeno se mantiene viable en el suelo en restos de material infectados y se transmite por semillas.

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

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

De forma preferida el hongo patógeno para las plantas es *Fusarium oxysporum*.

Fusarium constituye un género de hongos habitantes del suelo y ubicuos, en el que se incluyen muchas razas y especies fitopatógenas causantes de numerosas enfermedades de importancia económica principalmente en cultivos hortícolas. Las enfermedades vasculares que provocan causan la pérdida de turgencia de la planta y con frecuencia su muerte debido al colapso del sistema conductor. Las principales enfermedades están causadas por el género *Fusarium oxysporum* que se subdivide en diversas formas especiales o razas atendiendo a la planta huésped afectada, como *lycopersici* que afecta a tomate, *melonis* al melón, *conglutinans* a diversas cucurbitáceas, *cubense* a platanera, *dianthi* al clavel, etc. Al ser un patógeno de suelo es de muy difícil control, principalmente debido a que los métodos clásicos se basan en la desinfección mediante bromuro de metilo, cuyo uso está prohibido en la actualidad, y a que en general los fungicidas existentes son poco eficaces en el control de dicho patógeno.

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

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

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

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

Composiciones fitosanitarias

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

- 5 - un péptido que tiene un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60%, y que está definido por la fórmula general (I)



10

donde:

X es Lys o Leu,

15

Y es Phe o D-Phe,

m = 1, 3, o 5,

n = 1, 3, o 5, y

20

n + m = 2, 4, 6 o 8, y

un agente auxiliar.

25

Preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



30

donde:

X es Lys o Leu,

35

Y es Phe, y

m = 1, y n = 1, o

m = 3, y n = 1, 3, o 5

40

Más preferiblemente los péptidos responden a la fórmula general (I):



45

donde:

X es Lys o Leu,

50

Y es Phe, y

m=3, y n = 5

55

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos se cuentan los péptidos definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 23.

60

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

65

La cantidad de péptido que forma parte de la composición fitosanitaria puede ser variable en función de factores tales como el tipo de planta, la concentración de las bacterias y hongos patógenos en la planta, la extensión de la enfermedad, etc. La concentración efectiva del péptido se puede determinar y ajustar fácilmente mediante métodos de rutina bien conocidos en microbiología por el experto en la materia. Habitualmente la concentración en materia activa se encuentra comprendida entre 0,1 y 0,5 g/l.

El agente auxiliar que acompaña los péptidos de la invención en dichas composiciones fitosanitarias puede tener varias funciones, como por ejemplo, facilitar la dosificación del péptido, proporcionar un producto fácilmente manipulable, mejorar el mojado de las plantas.

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

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

Más preferiblemente el disolvente es agua.

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

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

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

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

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

35 La composición fitosanitaria de la invención se puede aplicar de forma preventiva a las plantas para evitar la aparición de las infecciones y enfermedades causadas por bacterias y hongos. El tratamiento preventivo tiene su base en que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos para las plantas.

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

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

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

50 De forma preferida el hongo patógeno para las plantas es *Fusarium oxysporum*.

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

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

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

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

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

5 Ensayos biológicos

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

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

Se ha comprobado que las composiciones que comprenden los péptidos de la invención disueltos en agua a concentraciones comprendidas entre 3,12 y 6,25 μM son efectivas para inhibir el crecimiento de bacterias como *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*, a concentraciones entre 6,25 y 12,5 μM inhiben el crecimiento de las bacterias *Erwinia amylovora* y *Clavibacter michiganensis*, y a concentraciones inferiores a 6,25 μM inhiben el crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum*.

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

La actividad hemolítica de los péptidos es una característica que generalmente se determina para aquellos compuestos que pueden llegar a entrar en contacto con el cuerpo humano. Este sería el caso si frutas u hortalizas tratadas con los péptidos de la invención contuvieran restos de los mismos y fuesen consumidos por las personas, o al ser manipulados por operarios durante su aplicación o preparación.

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

Se ha comprobado que los péptidos de la invención presentan una actividad hemolítica que se puede clasificar como baja, ya que la mayoría de ellos presentan una HD_{50} superior a 375 μM . HD_{50} es la concentración de péptido a la que se produce la liberación del 50% de la hemoglobina en el bioensayo referido. Se observa, pues, que la concentración a la que los péptidos tendrían una actividad hemolítica significativa es entre diez y cien veces superior a la concentración a la que son activos para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos para las plantas.

Los ejemplos que se exponen a continuación se deben interpretar como un medio auxiliar para una mejor comprensión de la invención, y no como limitaciones al objeto de la misma.

Ejemplos

En los ejemplos que siguen se emplean las siguientes abreviaciones: Al: alilo; Boc: tert-butiloxycarbonilo; DIEA: N,N-diisopropiletilamina; DMF: N,N-dimetilformamida; EDTA, ácido etilendiaminotetracético; ESI-MS: espectrometría de masas con ionización por electrospray; FAB-MS: espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (Fast Atom Bombardment - Mass Spectrometry); Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonilo; HBTU: hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metil]-N-metilmetanaminio; HOBt: 1-hidroxibenzo-triazol; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MALDI-TOF: ionización desorción por láser asistida por una matriz - Tiempo de vuelo (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight); MBHA: 4-metilbencidrilamina; MWI: radiación por microondas; NMM: N-metilmorfolina; NMP: N-metilpirrolidona; Ph: fenilo; Py-BOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxitris(pirrolidino)fosfonio; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano; TIS: tris(isopropil)silano; UV: ultravioleta.

Los productos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu-OAI, Fmoc-Leu-OH, la resina MBHA funcionalizada con grupos amino, el espaciador bifuncional Fmoc-Rink-Linker (número CAS: 145469-56-3), HBTU, PyBOP, y HOBt se obtuvieron de Senn Chemicals. Las SynPhaseTM Lanterns del tipo Rink amida de poliestireno de la serie D se obtuvieron de la empresa Mimotopes (Clayton, Australia). Los productos TFA, NMP, Pd(PPh₃)₄, N,N-diethylitocarbamato sódico, y TIS se obtuvieron de Aldrich. Los productos piperidina, NMM, y DIEA se obtuvieron de Fluka.

ES 2 281 274 B2

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

- Se han empleado aminoácidos que tienen el grupo α -amino protegido con el grupo Fmoc.
- Para la protección de la cadena lateral de la lisina se ha empleado el grupo *tert*-butiloxycarbonilo (Boc).
- En las reacciones llevadas a cabo sobre soporte de resina se emplearon jeringas de 5 o 10 ml que tenían incorporado un filtro microporoso de polipropileno.
- En las reacciones llevadas a cabo con las SynPhase™ Lanterns del tipo Rink amida de la empresa Mimotopes, se emplearon recipientes de vidrio de 5 a 50 ml, y jeringas de plástico de 10 a 50 ml.
- Todas las transformaciones y lavados se llevaron a cabo a 25°C, a no ser que se indique lo contrario.
- Los experimentos con radiación de microondas se llevaron a cabo en el aparato Ethos SEL de la empresa Milestone, equipado con un sistema de magnetron dual de 1.600 vatios. El tiempo, la temperatura de reacción, y la potencia se controlaron mediante el paquete informático EasyControl que va incorporado al equipo de microondas. La temperatura se controlaba a través de un sistema automático de control de la temperatura por fibra óptica, ATC-400F0, sumergido en un recipiente de referencia Milestone.
- El análisis por HPLC se llevó a cabo a 1,0 ml/min empleando una columna de fase reversa Kromasil (4,6 x 40 mm; tamaño de partículas de 3,5 μ m). Se emplearon gradientes lineales con TFA acuoso al 0,1% y TFA en acetonitrilo al 0,1%, con una relación comprendida entre 0,98:0,02 y 0,98:0,1 durante un período de tiempo de 7 minutos con detección UV a una longitud de onda de 220 nm.
- Los espectros ESI-MS fueron adquiridos empleando un instrumento cuadrupolo Navigator; el instrumento se operó en el modo positivo de iones (ES+) con un voltaje en la muestra de 3 kV.
- Los espectros MALDI-TOF fueron adquiridos mediante un instrumento Ultra-flex de la empresa Bruker.
- Todas las relaciones entre los disolventes son volumen/volumen, a no ser que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1

Preparación de ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) en fase sólida empleando como soporte sólido resina MBHA

En una jeringa de 5 ml de capacidad, equipada con un filtro microporoso en la parte inferior, se colocaron 200 mg de resina MBHA con una funcionalización de 0,3 mmol/g, equivalentes a 0,06 mmoles de grupos amino, y se llenó la jeringa con di-solvente para hinchar-lavar la resina de acuerdo con la siguiente secuencia: CH₂Cl₂ (5 x 0,5 min), una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (4:6, 1 x 20 min), CH₂Cl₂ (5 x 0,5 min), una mezcla de DIEA y CH₂Cl₂ (5:95, 3 x 1 min), CH₂Cl₂ (5 x 0,5 min), y NMP (5 x 0,5 min). La expresión CH₂Cl₂ (5 x 0,5 min) se refiere a que se realizaron 5 lavados con cloruro de metileno de 0,5 minutos cada uno. Después de cada etapa de lavado se elimina el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold de Promega Distribuidora).

El espaciador bifuncional se acopló a la resina por tratamiento con 97 mg de Fmoc-Rink-Linker (0,18 mmoles), 68 mg de HBTU (0,18 mmoles) y 31 μ l de DIEA (0,18 mmoles) en 1 ml de NMP. Se mantuvo durante toda la noche y se comprobó que el test de ninhidrina era negativo (Kaiser *et al*, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

Después de lavar la resina con NMP (5 x 2 min), ésta se trató con una mezcla de piperidina y NMP (3:7, 2 x 8 min) para eliminar el grupo Fmoc presente en el grupo amino del espaciador bifuncional, y, a continuación, se lavó con NMP (5 x 2 min).

Seguidamente la resina se trató con 74 mg de Fmoc-Glu-OA1 (0,18 mmoles), 68 mg de HBTU (0,18 mmoles) y 31 μ l de DIEA (0,18 mmoles) en 1 ml de NMP. Después de 4 h se comprobó que el test de ninhidrina era negativo. A continuación se lavó con NMP (5 x 2 min).

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

El ciclo de acoplamiento-desprotección se repitió para el resto de los aminoácidos protegidos con el grupo N^o-Fmoc: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, y Fmoc-Leu-OH. En cada etapa se procedió al lavado con NMP (5 x 2 min).

El éster alílico C-terminal del ácido glutámico incorporado al péptido fue eliminado bajo atmósfera de nitrógeno por tratamiento con 347 mg de Pd(PPh₃)₄ (0,3 mmoles) en 3 ml de una mezcla de cloroformo, ácido acético y NMM (37:2:1) durante 5 h bajo agitación. Pasado este tiempo la resina fue lavada con THF (3 x 2 min), NMP (3 x 2 min), una mezcla de DIEA y CH₂Cl₂ (1:19, 3 x 2 min), N,N-dietilditiocarbamato sódico (0,03 M en NMP, 3 x 15 min), NMP (10 x 1 min), CH₂Cl₂ (3 x 2 min), y NMP (3 x 1 min).

ES 2 281 274 B2

Después de eliminar el grupo Fmoc del último aminoácido acoplado y proceder a los lavados como ya se ha descrito anteriormente, se obtuvo el péptido lineal Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Glu unido a la resina. En este estadio, el péptido contiene aún el residuo de ácido glutámico, ya que la glutamina no se forma hasta la escisión del péptido cíclico de la resina.

5

La ciclación del péptido se llevó a cabo mediante tratamiento con 156 mg de PyBOP (0,3 mmoles), 40 mg de HOBt (0,3 mmoles), y 104 μ l de DIEA (0,6 mmoles) en 1 ml de NMP. Después de 24 horas a 25°C, el test de ninhidrina fue negativo.

- 10 A continuación se lavó la resina con NMP (6 x 1 min) y CH_2Cl_2 (6 x 1 min), y se escindió el péptido cíclico de la resina mediante un tratamiento con 2 ml de una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5) durante 2 horas. Se recogieron los filtrados en un vial mediante una presión positiva de nitrógeno. La resina se lavó con una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5, 2 x 0,5 ml). Los filtrados se combinaron y se evaporaron casi a sequedad bajo una corriente de nitrógeno hasta obtener un aceite. Dicho aceite se precipitó con éter dietílico, se centrifugó, y el éter se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces. Finalmente, el producto sólido obtenido se disolvió en agua, y se liofilizó.
- 15

Se obtuvo un sólido pulverulento cuya estructura se analizó por HPLC y se confirmó por ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS.

20 Ejemplo 2

Preparación de ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) en fase sólida empleando como soporte sólido una SynPhase™ Lantern

- 25 Se partió de una SynPhase™ Lantern del tipo Rink amida de poliestireno de la serie D formada por nueve discos unidos entre sí, equivalentes a 35 μ moles. Se cortó un fragmento de Lantern que comprendía cinco discos, equivalente a 19,44 μ moles, que se colocó en un recipiente provisto con un tapón y se hinchó con CH_2Cl_2 (5 min). La eliminación del grupo protector Fmoc presente en el soporte sólido se llevó a cabo por tratamiento con 1 ml de una mezcla de piperidina, CH_2Cl_2 y NMP (1:2:2, 2 x 45 min). Los lavados se llevaron a cabo en jeringas de 10 ml, cubriendo el fragmento con NMP (3 x 5 min) y CH_2Cl_2 (2 x 5 min). Después de cada etapa de lavado se elimina el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple.
- 30

- El fragmento de Lantern se colocó a continuación en un recipiente cenado que contenía 1 ml de una solución en NMP de 49 mg de Fmoc-Glu-OAl (120 mM), 46 mg de HBTU (120 mM), y 42 μ l DIEA (240 mM). Después de 24 horas, el fragmento de Lantern se lavó con NMP (3 x 5 min), y CH_2Cl_2 (2 x 5 min).
- 35

Las siguientes etapas de acoplamiento con los aminoácidos restantes se llevaron a cabo mediante ciclos repetidos de eliminación del grupo Fmoc, acoplamiento y lavados, como ya se ha descrito anteriormente.

- 40 Una vez finalizadas las etapas de acoplamiento, el éster alnico C-terminal fue eliminado bajo atmósfera de nitrógeno por tratamiento durante 6 h con 87 mg de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (75 mM) en 1 ml de una mezcla de cloroformo, ácido acético y NMM (37:2:1). El fragmento de Lantern fue lavado con una mezcla de cloroformo, ácido acético y NMM (37:2:1, 3 x 2 min), una mezcla de DIEA y CH_2Cl_2 (1:19, 3 x 5 min), N,N-dietilditiocarbamato sódico (0,03 M en NMP, 3 x 15 min), NMP (5 x 5 min), y CH_2Cl_2 (5 x 5 min).
- 45

Después de eliminar el grupo Fmoc y proceder a los lavados como ya se ha descrito anteriormente, se obtuvo un péptido lineal unido a la SynPhase™ Lantern.

- 50 La ciclación del péptido se llevó a cabo mediante tratamiento con 162 mg de PyBOP (311 μ moles), 42 mg de HOBt (311 μ moles), y 109 μ l de DIEA (622 μ moles) en 1 ml de NMP. Después de 24 horas a 25°C, se lavó el fragmento de Lantern con NMP (3 x 5 min) y CH_2Cl_2 (3 x 5 min), y se escindió el péptido cíclico de dicho fragmento mediante un tratamiento con una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5) durante 1 hora. El fragmento de Lantern se sacó con unas pinzas y la mezcla acidolítica se evaporó casi a sequedad bajo una corriente de nitrógeno hasta obtener un aceite. Dicho aceite se precipitó con éter dietílico, se centrifugó, y el éter se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces. Finalmente el producto sólido obtenido se disolvió en agua, y se liofilizó.
- 55

Se obtuvo un sólido pulverulento, cuya estructura se analizó por HPLC y se confirmó por ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS.

60 Ejemplo 3

Preparación de ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) en fase sólida empleando como soporte sólido una SynPhase™ Lantern y realizando la ciclación empleando radiación de microondas

- 65 Se partió de una SynPhase™ Lantern de 35 μ moles del tipo Rink amida de poliestireno de la serie D, de la que se cortó un fragmento que comprendía cinco discos unidos entre sí, equivalente a 19,44 μ moles, que se colocó en un recipiente de vidrio provisto con un tapón y se hinchó con CH_2Cl_2 (5 min). La eliminación del grupo protector Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con 1 ml de una mezcla de piperidina, CH_2Cl_2 y NMP (1:2:2, 2 x 45 min). Los lavados

ES 2 281 274 B2

se llevaron a cabo sumergiendo el fragmento en NMP (3 x 5 min) y CH₂Cl₂ (2 x 5 min) empleando jeringas de 10 ml. Después de cada etapa de lavado se elimina el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple.

El fragmento de Lantern se colocó a continuación en un recipiente cenado que contenía 1 ml de una solución en NMP de 49 mg de Fmoc-Glu-OAI (120 mM), 46 mg de HBTU (120 mM), y 42 µl DIEA (240 mM). Después de 24 horas, el fragmento se lavó con NMP (3 x 5 min), y CH₂Cl₂ (2 x 5 min).

Las siguientes etapas de acoplamiento con el resto de los aminoácidos se llevaron a cabo mediante ciclos repetidos de eliminación del grupo Fmoc, acoplamiento y lavados, como ya se ha descrito anteriormente.

Una vez finalizadas las etapas de acoplamiento, el éster alílico C-terminal fue eliminado bajo atmósfera de nitrógeno por tratamiento durante 6 h con 87 mg de Pd(PPh₃)₄ (75 mM) en 1 ml de una mezcla de cloroformo, ácido acético y NMM (37:2:1). El fragmento de Lantern fue lavado con una mezcla de cloroformo, ácido acético y NMM (37:2:1, 3 x 2 min), una mezcla de DIEA y CH₂Cl₂ (1:19, 3 x 5 min), N,N-dietilditiocarbamato sódico (0,03 M en NMP, 3 x 15 min), NMP (5 x 5 min), y CH₂Cl₂ (5 x 5 min).

Después de eliminar el grupo Fmoc y proceder a los lavados como ya se ha descrito anteriormente, se obtuvo un péptido lineal unido a la SynPhaseTM Lantern.

La ciclación del péptido se llevó a cabo colocando el fragmento de Lantern en un vial de vidrio y tratándolo con 162 mg de PyBOP (311 µmoles), 42 mg de HOBt (311 µmoles), y 109 µl de DIEA (622 µmoles) en 1 ml de NMP.

El vial se colocó en un recipiente apropiado para la radiación de microondas. Primeramente se aplicó durante 5 minutos una rampa de radiación de microondas hasta un máximo de 500 vatios, para llegar a una temperatura de 50°C. La potencia de la radiación de microondas se regulaba mediante un termostato que se fijó a una temperatura máxima de 50°C. Se continuó la irradiación para mantener la temperatura a 50°C durante 15 minutos. La masa de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se aplicaron dos ciclos de 15 minutos de radiación de microondas.

Una vez finalizado el periodo de irradiación, se eliminó el disolvente y el fragmento de Lantern se lavó en NMP (3 x 5 min) y CH₂Cl₂ (3 x 5 min). El péptido cíclico se escindió del fragmento de Lantern mediante un tratamiento con una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5) durante 1 hora. El fragmento de Lantern se sacó con unas pinzas y la mezcla acidolítica se evaporó casi a sequedad bajo una corriente de nitrógeno hasta obtener un aceite. Dicho aceite se precipitó con éter dietílico, se centrifugó, y el éter se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces. Finalmente el producto sólido obtenido se disolvió en agua, y se liofilizó.

Se obtuvo un sólido pulverulento, cuya estructura se analizó por HPLC y se confirmó por ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS.

Ejemplos 4 a 6

Preparación de péptidos de la invención en fase sólida empleando como soporte sólido una SynPhaseTM Lantern y realizando la ciclación empleando radiación de microondas

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 3, se prepararon los péptidos cíclicos que muestra la Tabla II:

TABLA II

Ejemplo	Péptido	n	m
4	ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 1	1	1
5	ciclo(Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 2	1	3
6	ciclo(Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 3	3	3

En todos los casos los péptidos cíclicos se analizaron por HPLC y se confirmó su estructura por ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS.

Ejemplo 7

Preparación de una quimioteca de péptidos cíclicos en fase sólida empleando como soporte sólido SynPhase™ Lanterns

Se preparó una quimioteca de 56 péptidos cíclicos de 10 aminoácidos a partir de 28 SynPhase™ Lanterns del tipo Rink amida de poliestireno de la serie D comerciales, cada una de las cuales se dividió en dos.

Los fragmentos de Lantern se marcaron con “spindles” y “cogs” de colores, comercializados por Mimotopes, para identificar las posiciones que contenían un residuo de leucina.

Todos los fragmentos de Lantern se colocaron en un único recipiente de vidrio provisto con un tapón y se cubrieron con CH₂Cl₂ durante 5 minutos para hincharlos. Para eliminar el grupo protector Fmoc se trataron con 30 ml de una mezcla de piperidina-CH₂Cl₂-NMP (1:2:2, 2 x 45 min).

Los lavados se llevaron a cabo sumergiendo los fragmentos en NMP (3 x 5 min) y CH₂Cl₂ (2 x 5 min) empleando jeringas de plástico. Después de cada etapa de lavado se elimina el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple.

A continuación los fragmentos de Lantern se colocaron en un recipiente provisto de un tapón que contenía 30 ml de una solución de 1,47 g de Fmoc-Glu-OAl (120 mM), 1,36 g de HBTU (120 mM), y 1,25 ml de DIEA (240 mM) en NMP. Al cabo de 24 horas, se lavaron los fragmentos con NMP (3 x 5 min) y CH₂Cl₂ (2 x 5 min).

Los acoplamientos subsiguientes se llevaron a cabo mediante ciclos repetidos de eliminación del grupo Fmoc, acoplamiento con un nuevo aminoácido, y lavados, tal como ya se ha descrito anteriormente.

Para cada acoplamiento con Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Leu-OH, los fragmentos de Lantern se clasificaron y se separaron en dos grupos, de modo que 21 fragmentos se trataron con una solución que contenía Fmoc-Leu-OH, y 35 fragmentos con Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Después de cada etapa de acoplamiento, los fragmentos de Lantern se introducían en una única jeringa de plástico para realizar los lavados.

A continuación se separaban nuevamente en dos grupos para el acoplamiento subsiguiente de Fmoc-Lys(Boc)-OH o Fmoc-Leu-OH, o se colocaban en un mismo recipiente para el acoplamiento de Fmoc-Phe-OH.

Una vez finalizados todos los acoplamientos para obtener péptidos lineales de 10 aminoácidos, se procedió a la eliminación del éster alílico C-terminal, a la eliminación del grupo protector Fmoc, y a los lavados siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Todas estas etapas se realizaron colocando todos los fragmentos de Lantern en un único recipiente o jeringa.

La ciclación de cada uno de los péptidos se llevó a cabo en recipientes individuales siguiendo el tratamiento descrito en el Ejemplo 2.

A continuación se procedió a la escisión del péptido cíclico del soporte sólido, y al aislamiento de cada uno de los péptidos siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Para ello, cada fragmento de Lantern se colocó en un recipiente individual.

Los péptidos obtenidos se analizaron por HPLC y se confirmó su estructura por ESI-MS, MALDI-TOF o FAB-MS.

En la Figura 1 se incluyen las estructuras de los 56 decapeptidos cíclicos sintetizados en este Ejemplo 7.

Ejemplo 8

Ensayos de actividad antimicrobiana

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los péptidos de la invención se emplearon las siguientes cepas de bacterias patógenas: *Erwinia amylovora* PMW6076 (INRA, Angers, Francia), *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* 2323-3 (IVIA, Valencia, España), y *Pseudomonas syringae* 94 (INTEA, Universitat de Girona, España).

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

Las muestras de *E. amylovora* PMV6076 y *P. syringae* se obtuvieron después de un crecimiento de 24 horas a 25°C, y la muestra de *X. vesicatoria* 2323-3 se recogió después de 48 horas a 25°C en agar LB. En todos los casos se resuspendieron en agua estéril para obtener una suspensión ajustada a una absorbancia de 0,2 a 600 nm, que correspondía aproximadamente a 10⁸ unidades formadoras de colonias/ml.

ES 2 281 274 B2

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), los péptidos se solubilizaron en agua estéril milli-Q hasta una concentración final de 1000 μM y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm de poro.

Se realizaron diluciones de los péptidos de la invención para obtener soluciones a las concentraciones 750, 500, 250, 125, 62,5, y 31,2 μM .

Se mezclaron 20 μl de cada dilución con 20 μl de la suspensión del indicador bacteriano correspondiente, 160 μl de medio líquido TSB (Tryptone Soy Broth), hasta un volumen total de 200 μl en cada pocillo de una microplaca. Así las concentraciones efectivas a las que se sometían las suspensiones de bacterias fueron 75, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 μM .

Se llevaron a cabo tres replicados para cada cepa, concentración y péptido en ensayo.

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

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

Las microplacas se incubaron a 25°C durante 48 horas con una agitación de 20 segundos antes de la medida de la absorbancia cada hora. Cada experimento se realizó por triplicado. Como CIM se tomó la concentración de péptido más baja a la que no se producía crecimiento bacteriano al final del experimento.

En la Tabla III se presenta el rango de concentraciones entre las que se encuentra la CIM, expresada en μM , después de 48 horas de incubación a 25°C, para diferentes péptidos de la invención frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*:

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA III

Péptido	<i>E.amylovora</i>	<i>C.michiganensis</i>	<i>X.vesicatoria</i>	<i>P.syringae</i>
ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 1	>100	50-75	12,5-25	25-50
ciclo(Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 2	>100	25-50	25-50	25-50
ciclo(Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 3	>100	6,25-12,5	12,5-25	25-50
ciclo(Lys-Leu-Lys-D-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	>100	50-100	25-50	25-50
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	>100	6,25-12,5	6,25-12,5	12,5-25
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-D-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	>100	6,25-12,5	12,5-25	25-50
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 4	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 5	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 6	12,5-25	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5

ES 2 281 274 B2

5	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 7	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
10	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 8	25-50	N.D.	6,25-12,5	12,5-25
15	ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 9	25-50	N.D.	25-50	6,25-12,5
20	ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 10	25-50	N.D.	6,25-12,5	3,12-6,25
25	ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 11	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
30	ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 12	50-75	N.D.	6,25-12,5	3,12-6,25
35	ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 13	25-50	N.D.	6,25-12,5	3,12-6,25
40	ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 14	12,5-25	N.D.	25-50	6,25-12,5
45	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 15	>100	N.D.	6,25-12,5	3,12-6,25
50					
55					
60					
65					

ES 2 281 274 B2

5	ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys- Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 16	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
10	ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu- Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 17	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
15	ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys- Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 18	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
20	ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys- Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 19	50-75	N.D.	6,25-12,5	3,12-6,25
25	ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys- Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln) SEQ_ID_NO: 20	25-50	N.D.	6,25-12,5	6,25-12,5
30	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys- Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO : 21	6,25-12,5	N.D.	3,12-6,25	3,12-6,25
35	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys- Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO : 22	12,5-25	N.D.	3,12-6,25	3,12-6,25
40	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys- Phe-Lys-Leu-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 23	25-50	N.D.	6,25-12,5	12,5-25
45	ciclo(Leu-Leu-Leu-Lys- Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)	25-50	N.D.	6,25-12,5	12,5-25
50	ciclo(Leu-Lys-Leu-Leu- Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)	25-50	N.D.	3,12-6,25	12,5-25

(N.D. : No determinado)

Se puede observar que los péptidos de la invención presentan una buena eficacia para inhibir el crecimiento de las bacterias *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*, que son representativas de bacterias patógenas para las plantas.

Además de los resultados de actividad antibacteriana que presentan los péptidos de la Tabla 3, el resto de decapeptidos de la quimioteca preparada en el Ejemplo 7, y cuya estructura se encuentra en la Figura 1, se ha ensayado frente a *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*, y se ha comprobado que todos inhiben el crecimiento de al menos dos de dichas especies bacterianas.

Para la determinación de la actividad antifúngica se cultivó la cepa del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* FOL 3 raza 2 (ATCC 201829, aislado en España), primero en medio de agar-patata-dextrosa (PDA). Las microesporas se obtuvieron después de un crecimiento en caldo de dextrosa y patata (PDB) durante 7 días a 25°C en un agitador rotatorio a 125 rpm. La suspensión de las esporas se filtró y se ajustó a 10^4 microesporas/ml empleando la cámara de conteo Thoma.

Los péptidos de la invención se solubilizaron en agua estéril milli-Q hasta una concentración final de 1000 μ M y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m de poro.

Con dicha solución se realizaron diluciones de los péptidos para obtener soluciones a las concentraciones 750, 500, 250, 125, 62,5, y 31,2 μ M.

A continuación se mezclaron 20 μ l de cada dilución de péptido con 80 μ l de la suspensión de hongo, y con 100 μ l de medio PDB a doble concentración, hasta obtener un volumen total de 200 μ l en un pocillo de una placa. De este modo se obtuvieron suspensiones de esporas expuestas a las concentraciones de 75, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 μ M. Las placas se incubaron a 22°C durante 144 horas con series de 1 minuto de agitación seguido de 9 minutos de reposo.

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

La intensidad de crecimiento se determinó mediante el área bajo la curva y los cálculos se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en K.L.Reynolds, y D.A.Enher, Statistical comparison of epidemics pág. 34-37, en D.A. Francis Neher (Eds.), Exercises in plant disease epidemiology. APS. Press. 1997, Minnesota.

En la Tabla IV se presenta el rango de concentraciones entre los que se encuentra la concentración inhibitoria mínima (CIM), expresada en μ M, después de 144 horas de incubación para varios péptidos de la invención frente al hongo patógeno para las plantas *Fusarium oxysporum*:

TABLA IV

Péptido	<i>F. oxysporum</i>
ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 1	50-75
ciclo(Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 2	50-75
ciclo(Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 3	12,5-25
ciclo(Lys-Leu-Lys-D-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	50-100
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	3,12-6,25
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-D-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)	12,5-25

Se puede observar que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento del hongo patógeno para las plantas *Fusarium oxysporum*.

Ejemplo 8

Ensayos de actividad hemolítica

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

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

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

Los péptidos se solubilizaron en tampón TRIS hasta una concentración final 125, 250, 500 y 750 µM.

Se emplearon tres replicados para cada péptido y concentración.

Se mezclaron 65 µl de la suspensión de eritrocitos al 10% en volumen con 65 µl de la solución de péptido en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Micro-Amp® (Applied Biosystems, EE.UU.) (5% en volumen de eritrocitos), y se incubó la mezcla durante 1 h a 37°C bajo agitación. De este modo las suspensiones de eritrocitos se sometieron a concentraciones de péptidos de 62,5, 125, 250 y 375 µM.

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

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

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

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

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

donde Op era la densidad óptica medida para una concentración de péptido determinada, Ob era la densidad óptica de la solución tampón, y Om era la densidad óptica para el control positivo con melitina.

La Tabla V presenta los resultados de actividad hemolítica para diferentes concentraciones de péptidos de la invención, expresada como el porcentaje de hemólisis calculado según la ecuación anterior:

TABLA V

Péptido	125 µM	250 µM	375 µM
ciclo(Lys-Phe-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 1	0	0	0
ciclo(Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 2	4,32	8,12	15,12

5	ciclo(Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln) SEQ_ID_NO : 3	55,42	61,35	70,26
10	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 4	9,59	20,82	22,47
15	ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 5	0,38	2,57	6,79
20	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 6	25,38	42,12	35,62
25	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 7	4,29	11,85	13,08
30	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 8	18,56	27,11	36,23
35	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO : 21	13,03	13,24	17,08
40	ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln) SEQ_ID_NO : 22	9,60	11,77	14,50
45	ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln) SEQ_ID_NO: 23	1,23	6,29	9,74
50	ciclo(Leu-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)	72,41	88,89	87,58
	ciclo(Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)	26,65	32,31	49,12

55 En todos los casos se observa que la concentración en la que se llegaría a producir una hemólisis significativa es entre 10 y 100 veces superior a la concentración en la que el péptido presenta actividad antimicrobiana.

REIVINDICACIONES

1. Péptidos cíclicos **caracterizados** porque tienen un contenido molar de lisina comprendido entre el 40% y el 60%, y que responden a la fórmula general (I):



donde:

X es Lys y/o Leu,

Y es Phe o D-Phe,

n = 1, 3, o 5,

m = 1, 3, o 5, y

n + m = 2, 4, 6 o 8.

2. Péptidos cíclicos según la reivindicación 1 **caracterizados** porque en la fórmula general (I)

X es Lys y/o Leu,

Y es Phe, y

m = 1, y n = 1, o

m = 3, y n = 1, 3, o 5.

3. Péptidos cíclicos según la reivindicación 2 **caracterizados** porque en la fórmula general (I)

X es Lys y/o Leu,

Y es Phe, y

m = 3, y n = 5.

4. Péptidos cíclicos según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizados** porque están defmidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 3.

5. Péptidos cíclicos según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizados** porque están defmidos por las secuencias de aminoácidos SEQ_ID_NO: 4 a SEQ_ID_NO: 23.

6. Utilización de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de una composición antimicrobiana.

7. Utilización según la reivindicación 6 como agentes antimicrobianos frente a bacterias y a hongos patógenos para las plantas.

8. Utilización según la reivindicación 7 **caracterizado** porque las bacterias patógenas para las plantas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

9. Utilización según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el hongo patógeno para las plantas es *Fusarium oxysporum*.

10. Utilización según las reivindicaciones 6 a 9 **caracterizado** porque las plantas se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

11. Composición fitosanitaria **caracterizada** porque comprende un péptido según las reivindicaciones 1 a 5, y un agente auxiliar.

12. Composición según la reivindicación 11 **caracterizada** porque el péptido se encuentra a una concentración comprendida entre 0,1 g/l y 0,5 g/l.

13. Composición según las reivindicaciones 11 y 12 **caracterizada** porque el agente auxiliar se selecciona entre el grupo formado por disolventes, tensioactivos, agentes tamponantes, filtros de la radiación ultravioleta y/o sus mezclas.

ES 2 281 274 B2

14. Composición según la reivindicación 13 **caracterizada** porque el disolvente es agua.

5 15. Método para prevenir y tratar infecciones y enfermedades de plantas causadas por bacterias y hongos **caracterizado** porque comprende poner en contacto la planta con una composición fitosanitaria según las reivindicaciones 11 a 14.

10 16. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque las bacterias patógenas para las plantas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

17. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque el hongo patógeno para las plantas es *Fusarium oxysporum*.

15 18. Método según las reivindicaciones 15 a 17 **caracterizado** porque las plantas se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

20 19. Método según las reivindicaciones 15 a 18 **caracterizado** porque la composición se pone en contacto con las partes de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por semillas, raíces, tallos, hojas, o frutos, o con el suelo o cualquier medio de crecimiento que rodee las raíces de las plantas.

25 20. Método según las reivindicaciones 15 a 19 **caracterizado** porque la composición se pone en contacto con la planta por pulverización, por inmersión o riego.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

Estructura
ciclo(Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Leu-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)

FIGURA 1 (continuación)

Estructura
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Lys-Leu-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Lys-Leu-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)
ciclo(Leu-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Lys-Lys-Gln)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 281 274

⑫ Nº de solicitud: 200503137

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4342751 A (MOORE, R.E. et al.) 03.08.1982, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.04.2007

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 5/12 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
A01N 37/44 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)