

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 643**

21 Número de solicitud: 202030476

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**22.05.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.11.2021**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT JAUME I (100.0%)  
AVDA. DE VICENT SOS BAYNAT, S/N  
12071 CASTELLON DE LA PLANA (Castellón) ES**

72 Inventor/es:

**SCALSCHI, Loredana Maria;  
VICEDO JOVER, Begonya;  
LLORENS VILARROCHA, Eugenio;  
GARCÍA AGUSTÍN, Pilar;  
FARVARDIN, Atefeh;  
CAMAÑES QUEROL, Gemma ;  
GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Ana Isabel y  
FALOMIR VENTURA, Eva**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

### Observaciones:

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

54 Título: **Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a estrés**

57 Resumen:

La presente invención está relacionada con proteínas y péptidos con actividad inductora de resistencia frente a estrés, frente a microorganismos, así como actividad biocida, bioestática y/o permite el control del crecimiento de microorganismos. La presente invención también comprende el procedimiento para obtenerlos que comprende el uso de 1-metil triptófano, composiciones que comprenden dichas proteínas y el uso de estas como medicamentos o productos fitosanitarios, así como el uso de estas en un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo.

ES 2 879 643 A1

## DESCRIPCIÓN

Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a estrés

### OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a estrés, el procedimiento para obtenerlos y composiciones que los comprenden, así como el uso de estos como medicamentos o productos fitosanitarios. La presente invención también comprende un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La interacción planta patógeno está en el punto de mira de numerosas investigaciones durante las últimas décadas. El control de las plagas y/o patógenos que atacan o dañan los  
15 cultivos es primordial para satisfacer las necesidades alimentarias de una población mundial en constante aumento. Los diferentes métodos utilizados hasta la fecha en el control de plagas se basan principalmente en la utilización de productos químicos que a menudo son perjudiciales para el medio ambiente, los animales o los insectos, e incluso para la salud humana. Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto nuevos métodos de control  
20 de patógenos basados en la resistencia innata de las plantas, así como algunos compuestos que son capaces de estimular dicha resistencia frente a patógenos de forma natural.

La estimulación de dichas respuestas defensivas es actualmente, uno de los mecanismos  
25 en desarrollo para la protección de cultivos. Se ha demostrado que la aplicación de ciertos compuestos naturales es capaz de estimular las defensas naturales de las plantas y afectando su resistencia al ataque de algunos patógenos. Una desventaja asociada a estos métodos es que a menudo pueden producir un impacto negativo en el crecimiento de la planta. Uno de los compuestos más utilizados en investigación es el ácido dL-β  
30 aminobutírico (BABA), que, pese a ser un compuesto que se ha detectado en las plantas, se ha desaconsejado su uso a nivel agronómico debido a que, en aplicación exógena, puede ser tóxico para éstas.

- Por ello, se ha postulado que la optimización artificial de las proteínas antimicrobianas de las plantas pronto representará una estrategia rápida y rentable para desarrollar nuevos pesticidas naturales diseñados para combatir plagas y patógenos de relevancia agronómica. En esta área, se identifican varias divulgaciones. El artículo de Bengtsson T. et al. tiene por objeto un estudio proteómico del apoplasto de las hojas de la patata llevado a cabo después del tratamiento de la planta con BABA,. Bengtsson T. et al, (BMC Genomics, 2014 **15**:315) divulga que dentro del grupo de proteínas cuya expresión experimenta un aumento en plantas tratadas, se encuentra la proteína antifúngica CBP20, o la Sn-1, una proteína del tipo Snakin, siendo este tipo de proteínas conocido por su papel antimicrobiano en la defensa de las plantas. El tratamiento que se realiza en la planta se lleva a cabo contra *Phytophthora* en el mismo lugar en el que se inocula el patógeno. Sin embargo, no se lleva a cabo ningún estudio sobre el efecto que puede tener el BABA ni la proteína por sí mismos contra el patógeno.
- El documento de Scalschi L et al. (Frontiers in microbiology, Aug 2019, **9**:2056), divulga un análisis de las modificaciones, a nivel transcriptómico y metabolómico, de la composición del apoplasto de las hojas de la planta del tomate inducidas por el tratamiento, por aplicación -por riego, del compuesto 1-metil-triptófano, el cual confiere resistencia a la planta frente al ataque del patógeno *Pseudomonas syringae*. El estudio comprende, entre otros aspectos, el análisis de la expresión de genes implicados en las rutas de defensa y como se incrementa la expresión de los genes que codifican ciertas proteínas, como ASR1 o PR-5, si bien este último trabajo hace referencia puntual solo a algunas proteínas y a nivel transcriptómico, pero no incluye un verdadero análisis proteómico.
- El líquido apoplástico se compone sobre todo de iones inorgánicos, metabolitos y proteínas y su contenido depende de muchos factores tales como, del estado de la planta, su nutrición o la respuesta contra el estrés biótico o abiótico al que esté sometida. Teniendo en cuenta que hay tantos factores que condicionan el contenido del apoplasto, se concluye que la efectividad del tratamiento con 1-metil-triptófano frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* puede ser causado en parte por la inhibición de la apertura estomática, regulada por la toxina bacteriana coronatina COR, ya que las plantas tratadas presentan niveles de ABA más altos y estomas más cerrados , lo que podría bloquear o prevenir la entrada de

bacteria. Los niveles de 1-metil-triptófano no parecieron tener ningún efecto antimicrobiano en la planta, resultados que fueron confirmados in vitro.

Las enfermedades provocadas por estos microorganismos, por ejemplo, en plantas de interés agrícola u ornamental requieren el uso de una alta cantidad de biocidas para prevenir o tratar dichas enfermedades provocando daños medioambientales. La falta de eficacia en algunos de estos productos conduce a la vez a cuantiosas pérdidas en el sector, lo que lleva en ocasiones al desabastecimiento y los incrementos de precios. La aparición en los microorganismos de resistencias frente a los productos utilizados obliga al uso de concentraciones mayores o, a la desestimación de estas moléculas. En algunos países todavía en vías de desarrollo o con renta económicas bajas, el uso de estos compuestos a altas concentraciones podría afectar gravemente a la salud, al bienestar de la población y al medio ambiente.

Por otro lado, la aparición de resistencias frente a los antibióticos usados en el control de microorganismos de interés clínico es uno de los problemas al que se está enfrentando la medicina actual. El control de estos patógenos tan peligrosos pasa por el uso de nuevas moléculas inocuas para la salud, a las que no han estado expuestos, que dificulten la adquisición de resistencia. En los últimos años, las proteínas de las plantas están comenzando a ser evaluadas frente a virus, microorganismos y parásitos de relevancia médica, así como su uso potencial en medicina como antiinflamatorio, anticancerígenos e inmunomoduladores.

Por lo tanto, existe necesidad de proporcionar un producto para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos y parásitos en seres vivos, concretamente en plantas, en animales y en humanos, y que, además, favorezca la resistencia de las plantas frente al estrés. Así como el desarrollo de métodos de obtención de estas a través de procesos respetuosos con el medioambiente que se puedan aplicar a nivel industrial.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención está relacionado con una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO1, o SEQ ID NO: 2 o una

secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2 donde dicha proteína presenta actividad inductora de resistencia frente a estrés en plantas.

5 Ambas proteínas aisladas presentan una actividad inductora de resistencia frente a microorganismos, de manera particular ambas proteínas presentan actividad biocida, bioestático y/o permite el control del crecimiento de microorganismos

El segundo aspecto de la presente invención está relacionado con un ácido nucleico aislado que codifica la proteína según la proteína del primer aspecto.

10

El tercer aspecto de la presente invención está relacionado con un vector que comprende un ácido nucleico del segundo aspecto.

15 El cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con una célula hospedadora que comprende la proteína del primer aspecto y/o un ácido nucleico del segundo aspecto, y/o un vector según el tercer aspecto de la invención.

El quinto aspecto de la presente invención está relacionado con un péptido obtenido de las proteínas aisladas del primer aspecto de la invención.

20

El sexto aspecto de la presente invención está relacionado con una planta transgénica que comprende una proteína según el primer aspecto, o un ácido nucleico según el segundo aspecto o un vector según el tercer aspecto o una célula hospedadora según el cuarto aspecto de la invención.

25

El séptimo aspecto de la presente invención está relacionado con un proceso de obtención de las proteínas del primer aspecto que comprende las siguientes etapas:

- 30
- i) Proporcionar una planta para su posterior tratamiento;
  - ii) Tratar la planta de la etapa i) con 1-metil-triptófano y un vehículo durante al menos 24 horas;
  - iii) Extraer las proteínas del primer aspecto del apoplasto de la planta tratada.
  - iv) opcionalmente, purificar las proteínas de la etapa iii)

El octavo y noveno aspecto de la presente invención están relacionados con la proteína según el primer aspecto o un ácido nucleico según el segundo aspecto, o un vector según el tercero aspecto, o una célula hospedadora según el cuarto aspecto un péptido según el quinto aspecto para su uso como medicamento o para su uso como fitosanitario  
5 respectivamente.

El décimo aspecto de la presente invención está relacionado con la proteína según el primer aspecto para su uso como inductora de resistencia frente al estrés en plantas. Preferiblemente, para su uso como inductora de resistencia frente a microorganismos.  
10

El undécimo aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende la proteína según el primer aspecto o un ácido nucleico según el segundo aspecto, o un vector según el tercer aspecto, o una célula hospedadora según el cuarto aspecto un péptido según el quinto aspecto y un excipiente químicamente aceptable.  
15

El duodécimo aspecto de la presente invención está relacionado con la composición del undécimo aspecto, para su uso como medicamento.

El decimotercero aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto, para su uso como fitosanitario.  
20

El decimocuarto aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto como inductora de resistencia frente al estrés en plantas y/o para su uso para el tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos.  
25

El decimoquinto aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto para su uso en el control del crecimiento de células neoplásicas.

El decimosexto aspecto de la presente está relacionado con un método de tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en un individuo necesitado de la misma, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del undécimo aspecto.  
30

El decimoséptimo aspecto de la invención está relacionado con un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo, que comprende las etapas:

a) aplicar una composición que comprende 1-metil-triptófano y un vehículo a una planta o a una parte de una planta durante por lo menos 24 horas para obtener por lo menos una de las proteínas según el primer aspecto,

o aplicar una composición que comprende por lo menos una de las proteínas aisladas según el primer aspecto;

b) donde al menos una de las proteínas obtenidas en la etapa a) tienen un efecto en la planta de manera que producen un incremento en la resistencia a, al menos, un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia a ese microorganismo en la planta en la ausencia de la aplicación de dicha composición;

c) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención está relacionado proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO:2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO 2, donde dicha proteína presenta actividad inductora de resistencia frente a estrés en plantas. Preferiblemente, frente al estrés biótico y/o abiótico. Más, preferiblemente, la proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 presenta actividad inductora de resistencia frente al estrés biótico y/o abiótico en plantas, donde la planta del trigo está excluida frente al estrés abiótico.

En la presente invención, la SEQ ID NO: 1 se refiere a la proteína cisteína proteinasa, CP3. En la presente invención, la SEQ ID NO: 2 se refiere a la proteína Heme-binding2

En la presente invención los términos "identidad de secuencia", "identidad", "similitud" e "idéntico", se consideran equivalentes y se pueden usar indistintamente. Se entiende que el término "identidad de secuencia" significa el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos obtenidas alineando las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado diferente de identidad, expresado como un porcentaje. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos de alineación de secuencia estándar conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, BLAST [Altschul S.F. et al. Herramienta básica de búsqueda de alineación local. J Mol Biol. 5 de octubre de 1990; 215 (3): 403 - 10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, son de dominio público en el sitio web del Centro Nacional de Información de Biología (NCBI). Las proteínas con la identidad de secuencia mencionada anteriormente para SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se consideran variantes de SEQ ID NO: 1 y de la SEQ ID NO 2 respectivamente y también se contemplan dentro de la presente invención. Concretamente una secuencia con al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % de identidad con la SEQ ID SEQ ID NO: 1, o con la SEQ ID NO: 2. Se contemplan también dentro la presente invención aquella secuencia análoga, derivada o equivalente a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y que comprende al menos un residuo de aminoácido alterado por una sustitución, adición, delección o modificación química de un aminoácido, en comparación con la proteína de la presente invención.

En el contexto de esta invención, se entiende por actividad inductora de la resistencia frente al estrés en plantas al proceso mediante el cual, a través de un tratamiento, se inducen las respuestas defensivas de la planta frente a un estrés.

En el contexto de esta invención, se entiende por estrés a las alteraciones que se producen en la planta como respuesta ante determinados factores biológicos, físicos, químicos y/o ambientales.

El estrés puede ser biótico o abiótico. Se entiende por estrés biótico al efecto causado sobre la planta por otros seres vivos, animales, plantas, microorganismos, insectos o nematodos.

En el contexto de esta invención el termino microorganismos se refiere a organismos microscópicos concretamente a protozoos, bacterias, virus, priones y hongos.



En el contexto de la presente invención el termino estrés abiótico se refiere al efecto causado por cualquier factor ambiental, físico o químico, como temperaturas extremas, exceso o deficiencia agua u oxígeno, el tipo de suelo y su pH, la deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados, exceso de sales o por la contaminación del aire que actúe sobre la planta, afectando a la respuesta bioquímica y fisiológica de la misma, pudiendo provocar daños, enfermedades o lesiones.

En una realización preferida, la proteína del primer aspecto comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, donde dicha proteína presenta actividad inductora de resistencia frente a estrés en plantas. Más preferiblemente, la proteína del primer aspecto comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 con al menos un 75% identidad con SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente con al menos un 80 %, incluso más preferiblemente con al menos un 85 %.

En una realización preferida, la proteína aislada del primer aspecto de la invención presenta actividad biocida, bioestático y/o actividad inductora de resistencia frente a microorganismos.

En el contexto de esta invención, se entiende por actividad biocida, a la actividad que tiene por objeto matar o detener el desarrollo de organismos vivos o impedir la acción de estos.

En el contexto de esta invención, se entiende por actividad biostática la capacidad de una sustancia de detener el crecimiento de los microorganismos y/o inhibir su capacidad de reproducción. Preferiblemente, frente a microorganismos seleccionados de una lista que consiste en virus, bacterias y hongos. En una realización más preferida la proteína aislada del primer aspecto presenta actividad biocida, bioestático y/o actividad inductora de resistencia frente microorganismos, donde el microorganismo es al menos una bacteria que se selecciona de una lista de géneros que consiste en: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Xylella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klepsiella*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Micrococcus* y/o los hongos que se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Botrytis*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Streptomyces*, *Apergillus*, *Cryptococcus* y *Malassezia*. En una realización más preferida la proteína aislada del primer aspecto

presenta actividad biocida, bioestático y/o actividad inductora de resistencia frente microorganismos, donde el microorganismo es por lo menos una bacteria que se seleccionan de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*,  
5 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Klepsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o por lo menos un hongo se seleccionan de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

La proteína aislada del primer aspecto se obtiene del apoplasto de plantas sometidas  
10 previamente a un tratamiento con 1-metil-triptófano. Preferiblemente, es obtenida mediante extracción directa del apoplasto de plantas sometidas previamente a un tratamiento con 1-metil triptófano o mediante clonación o síntesis química. En una realización particular, las plantas son de la familia de las solanáceas. Estas, pueden ser plantas solanáceas de interés agrícola u ornamental.

El apoplasto se define como la matriz extracelular, incluyendo la pared celular y los  
15 espacios intercelulares que contiene el líquido apoplástico. Por el líquido apoplástico fluye agua y otras sustancias como dióxido de carbono, sales minerales, nutrientes y moléculas secretadas por las células vegetales.

El segundo aspecto de la presente invención está relacionado con un ácido nucleico aislado  
20 que codifica la proteína según la proteína del primer aspecto. Particularmente, el ácido nucleico aislado del segundo aspecto que comprende una secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4.

El tercer aspecto de la presente invención está relacionado con un vector que comprende  
25 un ácido nucleico del segundo aspecto.

En la presente invención el término “vector” se refiere a una molécula de DNA linear o  
30 circular que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de la presente invención y que, está unido operativamente a nucleótidos adicionales (secuencias control) que proporcionan su expresión.

En la presente invención el término “unido operativamente” se refiere a una disposición de dos o más componentes, en donde dichos componentes están en una relación que les permite funcionar de manera coordinada.

- 5 El cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con una célula hospedadora que comprende la proteína del primer aspecto o un ácido nucleico del segundo aspecto, o un vector según el tercer aspecto de la invención.

10 En la presente invención, el término “célula hospedadora” se refiere a cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o conjugación con el ácido nucleico de la presente invención o con el vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico.

15 El quinto aspecto de la presente invención está relacionado con un péptido obtenido a partir de las proteínas aisladas del primer aspecto de la invención.

En la presente invención por "péptido" se refiere a polipéptidos consistentes 10-100 residuos de aminoácidos de la proteína de la presente invención más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, más preferiblemente 20 de aproximadamente 15 a 30 residuos de aminoácidos, en donde el grupo amino de un residuo de aminoácido está unido al grupo carboxilo de otro residuo de aminoácido por un enlace peptídico. Un péptido puede ser un péptido natural o un péptido diseñado y producido sintéticamente. El péptido de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, a partir de una proteína de la presente invención mediante escisión enzimática o 25 química, o puede prepararse usando técnicas convencionales de síntesis de péptidos (por ejemplo, síntesis en fase sólida) o técnicas de biología molecular (véase Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

30 El sexto aspecto de la presente invención está relacionado con una planta transgénica que comprende una proteína según el primer aspecto, y/o un ácido nucleico según el segundo aspecto y/o un vector según el tercer aspecto y/o una célula hospedadora según el cuarto aspecto de la invención.

En una realización preferida, la planta transgénica del sexto aspecto es resistente a microorganismos y/o estrés. Preferiblemente, la planta transgénica del sexto aspecto se selecciona de la familia de solanáceas. Las plantas solanáceas pueden ser de interés ornamental como de interés agrícola. Más preferiblemente, la planta se selecciona de una lista que consiste en tomate, berenjena, pimiento, patata, maíz, Petunia, Schizanthus, Salpiglossis y Datura.

El séptimo aspecto de la presente invención está relacionado con un proceso de obtención de las proteínas del primer aspecto que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- i) Proporcionar una planta para su posterior tratamiento;
- ii) Tratar la planta de la etapa i) con una mezcla de 1-metil-triptófano y un vehículo durante por lo menos 24 horas;
- iii) Extraer del apoplasto de la planta tratada las proteínas del primer aspecto.
- iv) opcionalmente, purificar las proteínas de la etapa iii)

En una realización particular del proceso del séptimo aspecto, la planta de la etapa i) se puede obtener por siembra de semilla o por estaquilla.

En una realización preferida del proceso del séptimo aspecto, el tratamiento de la etapa ii) se lleva a cabo vía radicular o vía aérea. Más preferiblemente, el tratamiento de la planta en la etapa ii) realiza por medio de un método de riego por goteo o pulverización.

En una realización preferida del proceso del séptimo aspecto, la planta se trata con 1-metil-triptófano durante por lo menos 24 horas hasta 96 horas. Más preferiblemente, durante por lo menos 24 horas hasta 65 horas. Tiempos inferiores no permiten obtener una respuesta eficaz para la planta. Con este rango de tiempo se previene y/o se reduce la formación de impurezas y productos de degradación no deseados y se optimiza la obtención de las proteínas de acuerdo al primer aspecto de la invención, permitiendo la absorción del 1-metil-triptófano en su totalidad por la planta.

En una realización preferida del proceso del séptimo aspecto, la mezcla de la etapa ii) comprende una mezcla de 1-metil-triptófano y un vehículo, y donde la mezcla tiene un pH en un rango entre 4,5-8. El vehículo puede ser una solución nutritiva o como una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8. Preferiblemente, el pH de la disolución acuosa y

de la mezcla de la etapa ii) es entre 5 hasta 6,5. En el contexto de la presente invención, se entiende como disolución nutritiva a la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950), solución nutritiva desarrollada para el cultivo de plantas sin suelo o sustrato, para cultivo hidropónico, que proporciona todos los nutrientes esenciales para el desarrollo de la planta, disolviendo las sales fertilizantes en agua para preparar la solución de nutrientes. La solución de Hoagland comprende entre otros componentes, Na, K, quelatos de hierro, tales como Fe EDTA (etilendinitrilo tetraacetato ferrato) para mejorar la estabilidad de las plantas, fue definida por Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950- en The water-culture method for growing plants without soil. California. Agricultural Experiment Station. Circular 347. 32 p.

En una realización preferida del proceso del séptimo aspecto, la mezcla de 1-metil-triptófano (1-MT) y vehículo es una disolución acuosa, preferiblemente, en la etapa ii) se trata la planta de la etapa i) con entre 5-100 mL de una disolución acuosa de 1-metil-triptófano con una molaridad en un rango entre 0,1 micro molar hasta 20 mM. La molaridad de 1-MT ayuda a optimizar el rendimiento en la obtención de las proteínas según el primer aspecto de la invención.

El octavo y noveno aspecto de la presente invención están relacionados con la proteína según el primer aspecto o un ácido nucleico según el segundo aspecto, o un vector según el tercer aspecto, o una célula hospedadora según el cuarto aspecto un péptido según el quinto aspecto para su uso como medicamento o para su uso como fitosanitario respectivamente. Más preferiblemente, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos, tanto en su uso como medicamento como en su uso como fitosanitario.

El décimo aspecto de la presente invención está relacionado con la proteína según el primer aspecto para su uso como inductora de resistencia frente al estrés en plantas. Preferiblemente, para su uso como inductora de resistencia frente a microorganismos.

En una realización preferida del octavo, noveno y décimo aspecto, los microorganismos se seleccionan de una lista que consiste en *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum* *Micrococcus*

*luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. y *Serratia marcescens*.

5 El undécimo aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende con la proteína según el primer aspecto o un ácido nucleico según el segundo aspecto, o un vector según el tercer aspecto, o una célula hospedadora según el cuarto aspecto un péptido según el quinto aspecto y un excipiente químicamente aceptable.

10 En la presente invención por "excipiente" se refiere a cualquier componente que no tiene actividad terapéutica y que es no tóxico, principalmente se refiere a vehículos y tampones tales como soluciones salinas, soluciones acuosas, emulsiones, diluyente, un aglutinante, disgregante, coadyuvante y/o lubricante.

15 En una realización preferida, la composición según el undécimo aspecto comprende un excipiente puede ser un diluyente, un aglutinante, disgregante y/o lubricante.

20 En una realización preferida, la composición del undécimo aspecto es en una forma sólida, semisólida, líquida, gel, parche transdérmico, aerosol o en forma de micropartículas. Opcionalmente, la composición puede estar recubierta. Las micropartículas, poseen un tamaño de partícula medio, D50, entre 50 hasta 500 micras (en volumen)

25 El término "Dx" en el contexto de la invención significa que x % de las partículas de la sustancia o composición (basado en volumen) tienen un diámetro igual o inferior a un valor especificado por Dx. Por lo tanto, un D50 de 50 micras significa que el 50% de las partículas, medido en volumen, tienen un diámetro igual o inferior a 50  $\mu\text{m}$ . Del mismo modo que se usa D50 como medida para determinar el tamaño de partícula, D90 también se puede usar para este propósito. Por lo tanto, D90, significa que el 90% de la población de partículas (basado en volumen) tiene un diámetro igual o inferior al valor de D90, establecido. El tamaño de partícula se puede medir a través de varios métodos  
30 convencionales incluyendo microscopía electrónica utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM).

El duodécimo aspecto de la presente invención está relacionado con la composición del undécimo aspecto, para su uso como medicamento.

El decimotercero aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto, para su uso como fitosanitario.

- 5 El catorceavo aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto como inductora de resistencia frente al estrés en plantas y/o para su uso para el tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos.

- 10 El decimoquinto aspecto de la presente está relacionado con la composición del undécimo aspecto para su uso en el control del crecimiento de células neoplásicas.

En una realización particular, la composición del undécimo, duodécimo y decimoquinto aspecto es adecuada para uso farmacéutico, veterinario, agrícola y/o fitosanitario.

- 15 El decimosexto aspecto de la presente está relacionado con un método de tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en un individuo necesitado de la misma, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del undécimo aspecto.

- 20 El decimoséptimo aspecto de la invención está relacionado con un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo, que comprende por lo menos las etapas:

- 25 d) aplicar una composición que comprende 1-metil-triptófano y un vehículo a una planta o a una parte de una planta durante por lo menos 24 horas para obtener por lo menos una de las proteínas según el primer aspecto,

o aplicar a la planta una composición que comprende por lo menos una de las proteínas aisladas según el primer aspecto y un vehículo;

- 30 e) donde por lo menos una de las proteínas de la etapa a) tienen un efecto en la planta de manera que dicha proteína produce un incremento en la resistencia a por lo menos un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia ese microorganismo en la planta en la ausencia de la aplicación de dicha composición;

- f) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

5 En una realización preferida del método del decimoséptimo aspecto de la invención, el tiempo de la etapa a) está en un rango entre 24 horas hasta 65 horas y la composición de la etapa d) comprende un vehículo que es una solución nutritiva o una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8 y donde la composición del apartado a) tiene un pH en un rango entre 4,5-8.

10

En una realización preferida del método del decimoséptimo aspecto, la composición es una disolución acuosa y se aplica a la planta entre 5-100 mL de dicha disolución acuosa de 1-metil-triptófano con una molaridad en un rango entre 0,1 micro molar hasta 20 mM.

15 En una realización preferida del método del decimoséptimo aspecto el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o un hongo que se  
20 seleccionan de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

En una realización preferida del método decimoséptimo aspecto de la invención, la planta de la etapa a) ha sido previamente infectada con un organismo patógeno. Preferiblemente,  
25 la planta es de la familia solanáceas.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1- Obtención de proteínas del apoplasto de plantas.

30 Proteínas aisladas que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 respectivamente.

Tomates de la variedad Ailsa Craig de 1 mes de edad se trataron con 20 mL of 1-metil-triptófano (5 mM) disuelto en una solución nutritiva at pH = 6 durante 48 h. Después se



procedió a la extracción de las proteínas del del apoplasto mediante el método descrito a continuación en el ejemplo 4.

Ejemplo 2. Tratamiento e inoculación de plantas: Tomates de la variedad Ailsa Craig

- 5 A continuación, se procedió a evaluar la respuesta de la planta frente a microorganismos cuando esta se trató con 1-MT. Para ello se procedió a la infección de Tomates de la variedad Ailsa Craig con *Pseudomonas syringae* mediante la inmersión del tomate en la suspensión de *Pseudomonas syringae* del ejemplo 3. La bacteria se cultivó como se describe en el ejemplo 3. Se infectaron las hojas de la planta del tomate sin tratamiento
- 10 previo y las plantas de tomate previamente tratadas con 1-metil-triptófano según el ejemplo 1 48 horas antes de la infección. Se infectan las plantas con la bacteria. Después de 48 y 72 horas de la infección se toman muestras del apoplasto de parte de las plantas. Durante ese tiempo, hasta completar las 72 h, las plantas se mantuvieron a 25 °C, con una humedad de entre el 80 hasta el 100% y alternado periodos de luz y oscuridad (16 horas
- 15 de luz y 8 de oscuridad) para evaluar la evolución de la infección.

	Control: planta infectada y no tratada con 1-MT	Planta infectada y tratada con 1-MT
% de área de hoja con síntomas	80%	20%

20 Tabla 1: Porcentaje de área foliar (%) con síntomas de la enfermedad producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* en plantas del tomate infectadas y tratadas con 1-MT (con tratamiento con 1-MT como en el ejemplo1) frente a plantas infectadas y no tratadas con 1-MT (control).

- 25 Tal y como indica los resultados de la tabla 1 el tratamiento con 1-MT consiguió reducir de manera significativa el % de área foliar que presentaba síntomas de la enfermedad. De manera que en la planta no tratada con 1-MT, el porcentaje del área de la hoja con síntomas ascendía al 80% mientras que en la planta tratada el porcentaje se redujo a un 20%.

Además, se comprobó que la población bacteriana fue significativamente inferior en plantas tratadas frente a las no tratadas mostrándose una reducción promedio del 80% en el número de unidades formadoras de colonias por mL (ufc/mL) tras el tratamiento, lo cual demostró que el tratamiento es capaz de detener el desarrollo de la bacteria en el interior de la planta.

### Ejemplo 3- Cultivo de la bacteria

La bacteria, *Pseudomonas syringae* pv. Tomato, cepa DC3000, mantenida en crioconservación, se cultivó en placas KB que contenían los antibióticos apropiados durante 1 día a 28°C en oscuridad. Posteriormente, se cultivó en KB líquido durante 6h en a 28°C en agitación (180rpm) para obtener el inóculo en fase exponencial de crecimiento. A continuación, se hizo una suspensión en MgSO<sub>4</sub> (10 mM) estéril a una concentración de 5x10<sup>5</sup> ufc/mL.

### Ejemplo 4: Método de extracción del apoplasto usados para los ejemplos 1 y 2.

A partir de hojas recolectadas de plantas tratadas con 1-metil triptófano de plantas infectadas o sin infectar, se procedió a extraer el apoplasto.

La extracción de apoplasto se llevó a cabo 48 horas después del tratamiento con 1-MT utilizando el método de infiltración-centrifugación descrito por O'Leary et al. (2014). Para las plantas que fueron infectadas con *Pseudomonas syringae*, la extracción de apoplasto se llevó a cabo 48 horas después de la inoculación de *Pseudomonas syringae* utilizando el método de infiltración-centrifugación descrito por O'Leary et al., J. Vis. Exp., 2014: 52113.

Para cada tratamiento se utilizaron la tercera y cuarta hoja de 10 plantas de un mes de edad. El método consistió en dos pasos. En el primer paso se sustituyó el espacio de aire apoplástico por agua destilada estéril, la cual se mezcla bien con el fluido apoplástico nativo. El segundo paso consistió en la recuperación de la mezcla de infiltración/apoplástica centrifugando suavemente las hojas. La contaminación citoplasmática del apoplasto se estimó como se describe en Rico y Preston (Mol. Plant. Microbe Interact., 2008, **21**: 269–282). Antes de los siguientes análisis, el extracto de apoplasto se diluyó dos veces en agua destilada y se filtró usando una jeringa con un filtro de celulosa de tamaño de poro de 0,2 micras, para evitar la contaminación bacteriana. Este procedimiento se aplicó también a la extracción del apoplasto de plantas de control.

Ejemplo 5. Método de extracción de proteínas y péptidos de las plantas tratadas

Posteriormente, se realizó una extracción de las proteínas y los péptidos de las plantas del tomate tanto de las que se habían sido tratadas con 1-metil-triptófano (ejemplo1) como las que no (control) y de las que habían sido previamente infectadas, tratadas o sin tratar (ejemplo 2). Las proteínas se extrajeron desde el apoplasto obtenido según ejemplo 4.

Primero se realizó una separación de la fracción peptídica y la proteínica mediante precipitación. Para ello, se añadió acetonitrilo (ACN) y tras homogenizar la mezcla se centrifugó a velocidad máxima (14000rpm). La fracción sobrenadante contenía los péptidos y el precipitado las proteínas. El precipitado se secó en speedvac y se re-suspendió en tampón de lisis. Se solubilizan en el tampón de lisis (7M Urea, 1M TioUrea, 4% CHAPS, 25 mM Tris\_HCl) para así solubilizar el mayor número de proteínas.

Primero se realizó el análisis de la fracción de proteína por SWATH, en un gel 1D\_SDS\_PAGE para eliminar contaminantes, limpiar muestras y proceder con la digestión en gel de las proteínas, cortándose posteriormente y digiriéndose con tripsina como se describe en Shevchenko et al., Proc. Nat. Acad. of Scien., of the U. S. A. 1996; 93:14440-14445).

Posteriormente se realizó el análisis del proteoma/peptidoma mediante cromatografía líquida seguida de espectroscopia de masas (LC-MSMS). Para ello se cargaron 1,5 µg de la muestra agrupada (muestras de fracción de proteínas) en una columna trampa (columna NanoLC, 3 µ C18-CL, 75umx15cm; Eksigent) y se trató con 0.1% de trifluoroacético (TFA) a 3 µl / min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en una columna analítica (columna LC, 3 µ C18-CL, 75umx12cm, Nikkyo) equilibrada añadiendo 5% ACN y 0.1% ácido fórmico (AF). La elución de proteínas se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35% de ACN durante 180 minutos a una velocidad de flujo de 300 nl /min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Los péptidos eluidos se ionizaron aplicando 2,8 kV al emisor de pulverización.

Los archivos de datos sin procesar (.wiff) obtenidos del experimento SWATH fueron analizados por el software PeakView v.2.1 (Sciex) bajo criterios y configuraciones restringidos: cinco péptidos, cinco transiciones, umbral de confianza del péptido al 95% y umbral de descubrimiento falso al 1%. Los datos cuantitativos obtenidos por Peak View se analizaron con Marker View 1.3 (Sciex). Para determinar las diferencias entre los diferentes

tipos de muestras propuestas en este estudio, se realizó una transformación logarítmica de los datos. La biblioteca Glmnet de R se utilizó para aplicar una regresión logística con penalización por LASSO y Elastic net como métodos de selección para variables (proteínas) que muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos.

5

Las proteínas expresadas diferencialmente se anotaron utilizando el software Blast2GO versión 5.1.13. Las secuencias de proteínas se compararon con la base de datos SwissProt utilizando el servicio público NCBI Blast (QBLAST). El programa de alineamiento se configuró como blastp con un valor de expectativa de explosión (valor E)  $1 \times 10^{-5}$ . Las coincidencias significativas del análisis Blast2GO se ordenaron en categorías (componente celular, función molecular y proceso biológico). La alineación Blast clásica que se derivaba de los péptidos señal N- terminales y la proteína secretada no clásica se predijeron usando SignalP (versión 4.1).

10

15 Una vez secuenciado el proteoma del apoplasto de plantas tratadas con 1-metil-triptófano (ejemplo1) se identificaron las proteínas aisladas que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: XP\_004243707.1 o SEQ ID NO: XP\_004244317.1. respectivamente. Estas proteínas pueden ser producidas, purificadas y aplicadas en plantas para evitar el crecimiento de bacterias u otros patógenos. Además, pueden ser  
20 usadas, tal como se describe en los aspectos, octavo, decimo, undécimo, duodécimo, decimocuarto, decimoquinto y decimosexto, frente a microorganismos de interés clínicos.

Ejemplo 6. Síntesis de proteínas aisladas que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2

25 Las proteínas aisladas que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2 de acuerdo con el primer aspecto, se han obtenido también mediante transformación de *E. coli* usando el Sistema pET. Para ello, los genes diana se han clonado en el plásmido pET-14b bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Su expresión se indujo proporcionando una fuente de ARN polimerasa de T7 en la célula  
30 huésped. Una vez clonados, los plásmidos se transfirieron a huéspedes de expresión como *E. coli* BL21 que contienen una copia cromosómica del gen de ARN polimerasa de T7 bajo control del promotor lacUV5, cuya expresión se induce mediante la adición de Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosido (IPTG). Las proteínas se han purificado utilizando el kit "HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit" de ThermoFisher", siguiendo las instrucciones del

fabricante. Las proteínas purificadas se usaron a continuación para probar su actividad antimicrobiana *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con proteína recombinante purificada a una concentración de 12 a 70 µg/ml o con PBS (solución salina tamponada con fosfato (Thermo Scientific). El pH del medio se ajustó a 5,8, antes de añadir la bacteria.

Ejemplo 7. Tratamiento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* con las proteínas aisladas que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2.

Una suspensión que comprende las proteínas obtenidas en el ejemplo 1 o en el ejemplo 6 se ha aplicado, *in vitro*, a un cultivo de *Pseudomonas syringae* en medio líquido (medio mínimo M9) a una concentración inicial de 10<sup>6</sup> ufc/ml con una concentración de la proteína de 12 a 70 µg/ml. El pH del medio se ajustó a 5,8, antes de añadir la bacteria. El crecimiento bacteriano se monitorizó midiendo la densidad óptica cada 10 min durante 72 h. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

Tiempo en horas	Bacterial titer (OD600 nm)	
	Control	Proteína aislada según SEQ ID NO: 1
0	0,08	0,085
36	0,21	0,18
48	0,31	0,16
72	0,35	0,15

Tabla 2: Resultados de la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae* *in vitro* en presencia de la proteína (proteína aislada según SEQ ID NO: 1) frente al control (sin presencia de la proteína).

Tras monitorizar el crecimiento de la bacteria se ha observado un efecto en el crecimiento de la bacteria producido por la proteína (medida como la absorbancia por densidad de longitud), el cual ha resultado en una reducción muy significativa del crecimiento de la bacteria *in vitro*. Las bacterias en presencia de la proteína aislada según SEQ ID NO: 1 dejaron de crecer de manera significativa a las 36h después de comenzar el tratamiento

con la proteína aislada según SEQ ID NO: 1, mientras que en ausencia del tratamiento siguieron creciendo hasta 72 horas después. Del crecimiento de la bacteria se redujo a la mitad después de 48h y a hasta un 60%, parando su crecimiento, después de 72 horas.

5

Tiempo en horas	Bacterial titer (OD600 nm)	
	Control	<u>Proteína aislada según SEQ ID NO: 2</u>
0	0,1	0,095
10	0,12	0,13
24	0,42	0,16
36	0,65	0,14

10

Tabla 3: Resultados de la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae* in vitro en presencia de la proteína (Proteína aislada según SEQ ID NO: 2) frente al control (sin presencia de proteína).

15

Las bacterias en presencia de la proteína aislada según SEQ ID NO: 2 pararon su crecimiento a las 10h del comienzo del tratamiento con la proteína aislada según SEQ ID NO: 2. Contrariamente, en ausencia de este tratamiento, el crecimiento siguió de manera continua y muy rápida hasta las 48h posteriores, en las que entraron en fase estacionaria. La reducción del crecimiento llegó hasta un 60% a las 24 horas y a más de un 80 % en 48 horas.

20

Los rangos de concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la proteína aislada según SEQ ID NO: 2 fueron testados: 70, 50, 25, 12.5, 6, 3 y 1.5. Se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano en las concentraciones testadas, desde 70 hasta una concentración de  $3\mu\text{g/ml}$ .

25

Además, la proteína aislada según SEQ ID NO: 2 ha demostrado un efecto inductor de defensa en planta, ya que las plantas a las que se les infiltró la proteína y posteriormente (24 h después) se inocularon con *Pseudomonas syringae* mostraron un descenso de los síntomas en plantas tratadas sistémicamente de hasta un 43% y un descenso de las poblaciones bacterianas de hasta un 60%.

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, donde dicha proteína presenta actividad inductora de resistencia frente a estrés en plantas.
2. La proteína aislada según la reivindicación anterior, que presenta actividad biocida, bioestático y/o presenta actividad inductora de resistencia frente a microorganismos.
- 10 3. La proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que presenta actividad inductora de resistencia frente virus, bacterias y/o hongos.
4. La proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que presenta actividad inductora de resistencia frente a bacterias que se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter*,  
15 *Erwinia*, *Xylella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klepsiella*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Micrococcus* y/o frente a por lo menos un hongo que se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Botrytis*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Streptomyces*, *Apergillus*, *Cryptococcus* y *Malassezia*.
5. La proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el  
20 microorganismo es por lo menos una bacteria que se seleccionan de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klepsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o por lo menos un hongo  
25 que se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
6. La proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, obtenida del apoplasto de plantas sometidas previamente a un tratamiento con 1-metil triptófano.

7. La proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, obtenida mediante extracción directa del apoplasto de plantas sometidas previamente a un tratamiento con 1-metil triptófano.
- 5 8. Ácido nucleico aislado que codifica la proteína según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 8, que comprende una secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4.
10. Vector que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9.
- 10 11. Célula hospedadora que comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y/o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, y/o un vector según la reivindicación 10.
12. Péptido obtenido a partir de las proteínas aisladas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15 13. Planta transgénica que comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y/o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, y/o un vector según la reivindicación 10 y/o una célula hospedadora según la reivindicación 11.
- 20 14. Planta transgénica según la reivindicación 13, donde la planta transgénica es resistente a microorganismos y/o estrés.
15. Planta transgénica según las reivindicaciones 13-14, donde la planta se selecciona de la familia de solanáceas.
- 25 16. Planta transgénica según las reivindicaciones 16-17, donde la planta se selecciona de una lista que consiste en que consiste en tomate, berenjena, pimiento, patata, Petunia, Schizanthus, Salpiglossis y Datura.
17. Proceso de obtención de las proteínas según las reivindicaciones 1-7, que comprende las siguientes etapas:



- i) proporcionar una planta para su posterior tratamiento;
  - ii) tratar la planta de la etapa i) con una mezcla de 1-metil triptófano y un vehículo durante por lo menos 24 horas;
  - iii) extraer del apoplasto de la planta tratada las proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
  - iv) opcionalmente, purificar las proteínas de la etapa iii).
- 5 18. El proceso de obtención de proteínas según la reivindicación anterior donde la planta de la etapa i) se puede obtener por siembra de semilla o por estaquilla.
- 10 19. El proceso de obtención de proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 17-18 donde el tratamiento de la etapa ii) se lleva a cabo vía radicular o vía aérea.
20. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-19 donde el tratamiento de la planta se realiza por medio de un método de riego por goteo o pulverización.
21. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-20 donde la planta se trata con una mezcla de 1-metil triptófano durante por lo menos 24 horas hasta 65 horas.
- 15 22. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-21 donde la mezcla de la etapa ii) tiene un pH en un rango entre 4,5-8.
23. El proceso según la reivindicación anterior, donde el pH está en un rango entre 5 hasta 6,5.
- 20 24. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 17-23, donde en la etapa ii) se trata la planta de la etapa i) con entre 5-100 mL de una disolución acuosa de 1-metil triptófano con una molaridad en un rango entre 0,1 micro molar hasta 20 mM.
- 25 25. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o un vector según la reivindicación 10, o una célula hospedadora según la reivindicación 11 o un péptido según la reivindicación 12 para su uso como medicamento.

26. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o un vector según la reivindicación 10, o una célula hospedadora según la reivindicación 12 para su uso como fitosanitario.
- 5 27. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 25-26 para su uso como inductora de resistencia frente al estrés en plantas.
28. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 25-27, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos.
- 10 29. La proteína según las reivindicaciones 28, donde el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o un hongo que se seleccionan de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
- 15 30. Una composición que comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o un vector según la reivindicación 10, o una célula hospedadora según la reivindicación 11, o un péptido según la reivindicación 12 y un excipiente químicamente aceptable.
- 20 31. La composición según la reivindicación anterior que presenta una forma sólida, semisólida, líquida, gel, parche transdérmico, aerosol o en forma de micropartículas.
32. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-31, para su uso como medicamento.
- 25 33. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-31, para su uso como fitosanitario.
34. La composición según con cualquiera de las reivindicaciones 30-33 adecuada para uso farmacéutico, veterinario, agrícola o fitosanitario.

35. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-34 para su uso como inductora de resistencia frente al estrés en plantas.
36. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-35, para su uso para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos.
- 5 37. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-34, su uso en el control del crecimiento de células neoplásicas.
38. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 30-37, donde el excipiente puede ser un diluyente, un aglutinante, disgregante y/o lubricante.
- 10 39. Método de tratamiento o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en un individuo necesitado de la misma, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 30-32 o 36-38.
40. Método para incrementar la resistencia de una planta frente al menos un microorganismo, que comprende por lo menos las etapas:
- 15 g) aplicar una composición que comprende 1-metil triptófano y un vehículo a una planta o a una parte de una planta durante por lo menos 24 horas para obtener por lo menos una de las proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7,
- o aplicar una composición a una planta que comprende por lo menos una de las proteínas aisladas según las reivindicaciones 1-7 y un vehículo;
- 20 h) donde por lo menos una de las proteínas de la etapa a) tienen un efecto en la planta de manera que dicha proteína produce un incremento en la resistencia a por lo menos un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia ese microorganismo en la planta en la ausencia de la aplicación de dicha composición;
- 25 i) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

41. El método de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el tiempo de la etapa a) está en un rango entre 24 horas hasta 65 horas.
42. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-40, donde el vehículo es una solución nutritiva o una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8 y donde el pH de la composición esta en un rango entre 4,5-8.
43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40-42, donde la composición es una disolución acuosa y se aplica entre 5-100 mL de dicha disolución acuosa de 1-metil triptófano con una molaridad en un rango entre 0,1 micro molar hasta 20 mM.
44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40-43, donde el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, y/o un hongo que se seleccionan de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
45. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40-44, donde la planta de la etapa a) ha sido previamente infectada con un organismo patógeno.



- ②① N.º solicitud: 202030476  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.05.2020  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K14/415** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	PROTEIN [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -. Accession No. XP_004243707.1 cysteine proteinase 3-like [Solanum lycopersicum]; [PLN 08-AUG-2018]. Available from: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004243707.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004243707.1</a>	1-5 26-31, 33-36, 38
X Y	PROTEIN [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -. Accession No. XP_004244317.1 heme-binding protein 2-like [Solanum lycopersicum]; [PLN 08-AUG-2018]. Available from: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004244317.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004244317.1</a>	1-5 26-31, 33-36, 38
X	Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -. Accession No. XM_004243659.4 PREDICTED: Solanum lycopersicum cysteine proteinase 3-like (LOC101252200), mRNA; [PLN 08-AUG-2018]. Available from: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_004243659.4">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_004243659.4</a>	8-11
X	Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -. Accession No. XM_004244269.4 PREDICTED: Solanum lycopersicum heme-binding protein 2-like (LOC10125514), mRNA; [PLN 08-AUG-2018]. Available from: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_004244269.4">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_004244269.4</a>	8-11
X	SCALSCHI LOREDANA et al. "1-Methyltryptophan Modifies Apoplast Content in Tomato Plants Improving Resistance Against <i>Pseudomonas syringae</i> ". Frontiers in Microbiology AUG 31 2018. , 31/08/2018, Vol. 9, Páginas Article No.: 2056, ISSN 1664-302X(print) ISSN 1664-302X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fmicb.2018.02056>. (ver apartados "Abstract" y "MATERIALS AND METHODS")	17-24, 40-45

#### 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: 1-5, 8-11, 17-24, 26-31, 33-36, 38, 40-45

Fecha de realización del informe  
03.03.2021

Examinador  
M. d. García Coca

Página  
1/3



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202030476  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 22.05.2020  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C07K14/415** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GRUDKOWSKA MALGORZATA et al. "Multifunctional role of plant cysteine proteinases". Acta Biochimica Polonica 2004. , 30/11/2003, Vol. 51, Nº 3, Páginas 609-624, ISSN 0001-527X. (ver apartado "The response of cysteine proteinases to abiotic and biotic stresses").	26-31, 33-36, 38
Y	SHANMUGABALAJI VENKATASALAM et al. "Characterization of a Plastoglobule-Localized SOUL4 Heme-Binding Protein in <i>Arabidopsis thaliana</i> ". Frontiers in Plant Science JAN 31 2020. , 31/01/2020, Vol. 11, Páginas Article No.: 2, ISSN 1664-462X(print) ISSN 1664-462X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fpls.2020.00002>. (ver apartado "Introduction").	26-31, 33-36, 38
A	CAMANES GEMMA et al. "An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in <i>Solanum lycopersicum</i> , and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Pseudomonas syringae</i> ." Plant Journal OCT 2015. , 30/09/2015, Vol. 84, Nº 1, Páginas 125-139, ISSN 0960-7412(print) ISSN 1365-313X(electronic), <DOI: doi:10.1111/tpj.12964>. todo el documento.	1-5, 8-11, 17-24, 26-31, 33-36, 38, 40-45
A	ANA ISABEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ. "New approaches to control <i>Pseudomonas syringae</i> disease in tomato plants" (Tesis Doctoral). Universitat Jaume I. Escola de Doctorat, 01/03/2019, <DOI: http://dx.doi.org/10.6035/14104.2019.627852>. todo el documento.	1-5, 8-11, 17-24, 26-31, 33-36, 38, 40-45

#### 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: 1-5, 8-11, 17-24, 26-31, 33-36, 38, 40-45

Fecha de realización del informe  
03.03.2021

Examinador  
M. d. García Coca

Página  
2/3

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

C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBASE/Elsevier, NCBI, EMBL/EBI y Bases de Datos TXT