

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 807**

51 Int. Cl.:

A01N 37/46 (2006.01)
A01N 63/50 (2010.01)
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2018 PCT/IB2018/051783**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18167733**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2018 E 18768312 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3609331**

54 Título: **Una composición sinérgica de un nematocida**

30 Prioridad:

17.03.2017 IN 201741009365

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2025

73 Titular/es:

**TELLURIS BIOTECH INDIA PRIVATE LIMITED
(100.00%)
Plot No. 93 Women s Cooperative Housing
Society, Road No.5, Jubilee Hills, Behind
Annapurna Studios
Hyderabad, Telangana 500 034, IN**

72 Inventor/es:

**POLINENI, VENU;
URREA, ALEJANDRO CALDERÓN y
POLACK, GLENDA W**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 3 016 807 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una composición sinérgica de un nematicida

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nematicidas, que son composiciones usadas en el campo agrícola para matar fitoparásitos, concretamente nematodos. Más en particular, la invención se refiere a una composición sinérgica de un nematicida que comprende al menos dos péptidos nematicidas que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2-4, en donde los péptidos se derivan de la proteína CED-4.

Antecedentes de la invención

Los nematodos constituyen una importante amenaza para la industria agrícola, ya que causan grandes pérdidas en el rendimiento, de este modo, afectando a la economía de forma significativa. Los nematodos son los segundos insectos más conocidos por causar graves daños a cultivos tales como los tomates y otras hortalizas, cítricos, patatas, arroz, cocos, trigo y otros cereales, plantas ornamentales y otras. Se ha descubierto que los nematodos, solos o junto con otros microorganismos del suelo, atacan casi todas las partes de la planta, incluidas las raíces, tallos, hojas, frutos y semillas. Se calcula que causan una pérdida de rendimiento del 12,3% (157 billones de dólares) en todo el mundo. De ellos, 40,3 millones de dólares proceden de la India (Singh et al., 2015).

Los nematodos del nudo de la raíz pertenecientes al género *Meloidogyne* son uno de los tres géneros de nematodos fitoparásitos más perjudiciales económicamente para los cultivos hortícolas y de campo. Son parásitos obligados de las raíces de varias plantas; y *Meloidogyne incognita* es una de las principales plagas en todo el mundo.

Los nematicidas son composiciones que se utilizan para matar estos fitoparásitos, los nematodos. La mayoría de los nematicidas utilizados son compuestos químicos muy tóxicos para el ser humano y también perjudiciales para las bacterias útiles del suelo. También se ha demostrado que varios nematicidas contaminan las aguas subterráneas y provocan el agotamiento de la capa de ozono. Uno de los nematicidas más conocidos, bromuro de metilo, ha sido prohibido en varios países, incluidos EE. UU. e India. Otro nematicida muy tóxico que se utiliza ampliamente en los cultivos de campo es el carbofurano; un solo grano de carbofurano puede matar aves en pocos minutos. Los nematicidas tales como el forato pueden atravesar fácilmente el suelo hasta llegar a las aguas subterráneas y contaminarlas.

Los graves inconvenientes asociados a los nematicidas químicos hacen necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para el control de los nematodos. Uno de estos métodos consiste en generar líneas de plantas transgénicas que expresen los genes transgénicos de resistencia a los nematodos. Sin embargo, se trata de un método largo y costoso que requiere amplias actividades de investigación previas. En muchos países, incluida la India, existe una feroz objeción a la introducción de líneas transgénicas basándose en varias cuestiones morales, éticas y nuevas medioambientales.

Un método eficaz consiste en generar composiciones de nematicidas que sean inocuas para el medio ambiente, no tóxicas y fáciles de generar y usar.

El documento US9125413B1 describe péptidos derivados de la proteína CED-4 de *Caenorhabditis elegans* que muestran una potente actividad nematicida. La proteína CED-4 que consiste en aminoácidos de SEQ ID NO. 1, pertenece a la familia de las proteínas de la apoptosis. La SEQ ID NO. 1 comprende:

MLCEIECRALSTAHTRLIHDFFPRDALTYLEGKNIFTEDHSELISKMSTRLERIANF
LRIYRRQASELGPLIDFFNYNNQSHLADFLEDYIDFAINEPDLLRPVVIAPQFSRQ
MLDRKLLLGNVPMQMTCTYIREYHVDRVIKKLDEMCDLDSFFLFLHGRAGSGKSV
IASQALSQSDQLIGINYDSIVWLKDSGTAPKSTFDLFTDILLMLKSEDDLLNFPSVE
HVTSVVLKRMICNALIDRPNTLFVFDVQVEETIRWAQELRLRCLVTTRDVEISNA
ASQTCEFIEVTSLEIDECYDFLEAYGMPMPVGEKEEDVLNKTIELSSGNPATLMM
FFKSCEPKTFEKMAQLNNKLESRLVGVCEITPYSYKSLAMALQRCVEVLSDedr
SALAFVVMPPGVDIPVKLWSCVIPVDICSNEEEQLDDEVADRLKRLSKRGALLS
GKRMPVLTFKIDHIIHMFLKHVVDAQTIANGISILEQRLLEIGNNNVSVPERHIPSH
FQKFRSSASEMPKTTTEETVIRPEDFPKFMQLHQKFYDSLKNFACC.

Tres péptidos derivados de SEQ ID NO. 1 demostraron tener actividad nematocida a concentraciones eficaces de aproximadamente 1 mg/ml, comprendiendo los péptidos las siguientes secuencias:

- 1) Péptido 2 que consiste en 15 aminoácidos DLLRPWIAPQFSRQ (tramo de 99-113 aminoácidos, **SEQ ID NO. 2**),
- 2) Péptido 3 que consiste en 19 aminoácidos RQMLDRKLLGNVPKQMTTC (tramo de 112-130 aminoácidos, **SEQ ID NO. 3**), y
- 3) Péptido 12 que consiste en 12 aminoácidos FPKFMQLHQKFY (tramo de 529-540 aminoácidos, **SEQ ID NO. 4**).

Sin embargo, la síntesis de péptidos es una técnica costosa; y para que una composición sea rentable hay que reducir el coste de producción. Generalmente, el coste de síntesis de 50 mg de péptidos en el intervalo de 10-20 aminoácidos se sitúa en el intervalo de 25.000 - 30.000 INR y 240-250 dólares. Por lo tanto, es importante producir composiciones con un coste de producción reducido.

La presente invención tiene en cuenta los inconvenientes de la técnica anterior y proporciona un método para controlar los nematodos utilizando péptidos antiparasitarios, que no son tóxicos ni perjudiciales para el medio ambiente.

Objeto de la invención

En consecuencia, el objeto principal de la invención es proporcionar una composición de un nematocida que comprende péptidos nematocidas.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica que comprende al menos dos péptidos derivados de la proteína CED-4 de SEQ ID NO. 1 en donde el péptido que consiste en las secuencias de aminoácidos de

- a. DLLRPWIAPQFSRQ (SEQ ID NO. 2),
- b. RQMLDRKLLGNVPKQMTTC (SEQ ID NO. 3), y
- c. FPKFMQLHQKFY (SEQ ID NO. 4).

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica que muestre actividad nematocida, en donde la concentración de los péptidos es inferior a 1 mg/ml.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica con un coste de producción reducido.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica que no sea tóxica para los seres humanos.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica que no tenga una actividad de amplio espectro y que no sea perjudicial para los microorganismos del suelo.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición nematocida sinérgica que sea fácil de sintetizar, no requiera la generación de plantas transgénicas y sea muy económica.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición de un nematocida utilizado con fines agrícolas para matar fitoparásitos, concretamente nematodos. Más en particular, la invención se refiere a una composición sinérgica de un nematocida que comprende péptidos nematocidas.

En la realización principal de la invención la invención proporciona una composición del nematocida que comprende péptidos derivados de la proteína CED-4 de SEQ ID NO. 1. Más específicamente, la composición comprende una combinación sinérgica de al menos dos péptidos que consiste en las secuencias amino:

- a. DLLRPWIAPQFSRQ (**SEQ ID NO. 2**), péptido 2 que comprende 15 aminoácidos,
- b. RQMLDRKLLGNVPKQMTTC (**SEQ ID NO. 3**), péptido 3 que comprende 19 aminoácidos, y
- c. FPKFMQLHQKFY (**SEQ ID NO. 4**), péptido 12 que comprende aminoácidos.

Los péptidos muestran individualmente una actividad nematocida del 100 % a concentraciones tan bajas como 1 mg/ml.

Sin embargo, la combinación de al menos dos péptidos actúa de forma sinérgica y reduce la concentración de cada uno de los péptidos a 0,4 mg/ml para una actividad nematocida del 100 %. La reducción significativa de la cantidad de péptido necesaria para la actividad reduce enormemente el coste de producción, de este modo, la composición única resulta muy económica.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un gráfico que muestra el efecto del tratamiento de la mezcla que comprende Péptido 2 y Péptido 3; Péptido 2 y Péptido 12; Péptido 3 y Péptido 12; y los Péptidos 2,3 y 12 frente a los nematodos en placas de 96 pocillos.

5

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con más detalle a continuación en el presente documento.

10 La presente invención se refiere a una composición sinérgica que tiene capacidad para matar fitoparásitos, específicamente, nematodos. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición sinérgica de un nematicida que comprende péptidos nematicidas, en donde, los péptidos proceden de la secuencia de la proteína CED-4.

15 En la realización principal de la presente invención, la invención proporciona una composición sinérgica de un nematicida que comprende al menos dos péptidos derivados de la proteína CED-4 de SEQ ID NO.1. Más específicamente, la composición comprende una combinación de los siguientes péptidos en proporción 1:1:

- 20 a. Péptido 2, un péptido de 15 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia DLLRPWIAPQFSRQ (SEQ ID NO. 2),
- b. Péptido 3, una longitud de 19 aminoácidos que comprende la secuencia RQMLDRKLLGNVPKQMTTC (SEQ ID NO. 3), y
- c. Péptido 12, una longitud de 12 aminoácidos que comprende la secuencia FPKFMQLHQKFY (SEQ ID NO. 4).

25 Al menos dos péptidos que contienen aminoácidos de SEQ ID NO. 2-4 en una proporción de 1:1 actúan como un nematicida altamente potente que muestra una actividad nematicida del 100 % a concentraciones totales de péptidos tan bajas como 0,8 mg/ml. La combinación de dos péptidos aporta un efecto sinérgico y la combinación actúa a una concentración más baja en comparación con los péptidos individuales por sí solos. La composición sinérgica redujo en un 20 % las necesidades de concentración total de péptido, de este modo, la invención resulta muy económica, además, la composición es ambientalmente más segura que los otros métodos existentes y más fácil que la generación de líneas transgénicas con actividades nematicidas.

30

EJEMPLO 1 - Procedimientos implicados:

35 A) Propagación de *M. incognita*

Las plantas de tomate se inocularon con juveniles de *M. incognita* y se mantuvieron en una cámara de crecimiento. Al menos dos meses después, de las raíces se extrajeron los huevos de *M. incognita* para los experimentos. A continuación, se explica el procedimiento seguido para extraer los huevos de *M. incognita*. Los tejidos radiculares se picaron a mano con una cuchilla quirúrgica y un vidrio de reloj, o bien con un procesador de alimentos. A continuación, el tejido picado se introdujo en un frasco y se lavó con una dilución de lejía al 10 %. En condiciones estériles, a continuación, la solución de raíces se vertió a través de tamices (tamiz de 60 unidades en la parte superior y tamiz de 500 unidades en la parte inferior). La recogida de huevos brutos se realizó desde el fondo del tamiz de 500 recuentos en 5 ml cada uno de la mezcla de huevo y lejía en tubos Falcon de 15 ml. A continuación, se introdujeron 5 ml de solución de sacarosa al 70 % en cada tubo Falcon. A continuación, se colocó suavemente una capa de 1 ml de agua estéril bidestilada sobre las mezclas de sacarosa en cada tubo Falcon. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm. Los embriones que estaban suspendidos entre la solución de sacarosa y la capa de agua de 1 ml se recogieron en un total de 3 ml (capa superior de 3 ml de la solución) de cada tubo Falcon en tubos Falcon frescos de 15 ml. Se añadieron 10 ml de una solución de lejía al 5 % y se agitaron los huevos en un vórtex durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron los tubos Falcon durante 5 minutos a 2.000 rpm. A continuación, se extrajo el sobrenadante, se enjuagaron los huevos en 10 ml de agua bidestilada estéril y se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 2.000 rpm. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después del último lavado, se extrajeron 5 ml de sobrenadante, mientras que los 5 ml de agua restantes se mezclaron con los huevos y se colocaron en una placa Petri de 5 ml. A continuación, los huevos se colocaron en una incubadora a 25-27 °C, y los gusanos juveniles (estadio J2) eclosionaron al cabo de aproximadamente 10 días. Los gusanos se conservaron en una incubadora a 25-27 °C.

55

B) Preparación de las soluciones de ensayo y colocación de los nematodos

60 Los péptidos liofilizados se disolvieron en las cantidades necesarias en agua bidestilada para obtener las concentraciones requeridas.

Se pipetearon 100 µl de las soluciones peptídicas con las concentraciones requeridas en 30 pocillos de una placa de 96 pocillos y se transfirió un gusano a cada pocillo desde una reserva de J2 *M. incognita* extraído. Para un control negativo, se colocaron 30 gusanos en 100 µl de agua bidestilada estéril para cada experimento.

65

C) Monitorización de los nematodos

El bioensayo está diseñado para comprobar la capacidad de los péptidos y las chalconas, para matar a los gusanos (% de mortalidad). Cada prueba se realizó en una placa de 96 pocillos con un nematodo en cada pocillo (30 pocillos en total). Los nematodos se incubaron en las soluciones de tratamiento durante 5 días. La viabilidad de los nematodos se comprobó con un microscopio de disección examinando cada uno de ellos para ver si se movía tras perturbarlo con una sonda.

EJEMPLO 2 - Eficacia de la composición nematicida que comprende una combinación de péptidos nematicidas

Como se representa en la figura 1, la incubación de nematodos juveniles en fase J2 en agua causó alrededor del 10-20 % de muerte de nematodos en el día 5, lo que sirvió de control negativo. La incubación de nematodos juveniles con Péptido 2, Péptido 3 o Péptido 12 solos, a una concentración de 0,8 mg/ml, provocó la muerte de alrededor del 60 - 66 % de los nematodos juveniles en el día 5. Sin embargo, la composición nematicida que comprendía una combinación de Péptido 2 y Péptido 3, Péptido 2 y Péptido 12, o Péptido 3 y Péptido 12 en una proporción de 1:1 provocó la muerte de casi el 100 % de los nematodos juveniles en el día 5, en donde la concentración total de los péptidos era de 0,8 mg/ml. Por otro lado, la combinación de los Péptidos 2,3 y 12 en una proporción de 1:1:1 también provocó la muerte del 100 % de los nematodos juveniles en el día 5.

Estos resultados sugieren que los péptidos derivados de la proteína CED-4 actúan de forma sinérgica como composición nematicida cuando se combinan entre sí.

REIVINDICACIONES

1. Una composición sinérgica para controlar nematodos que comprende al menos dos péptidos derivados de la proteína CED-4,

en donde,

dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2-4;

la proporción de los péptidos es 1:1 o 1:1:1; y

la composición tiene una eficacia sinérgica contra los nematodos del 100 % a una concentración de 0,8 mg/ml.

2. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde, la composición comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 y tiene una longitud de 15 aminoácidos.

3. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde, la composición comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 y tiene una longitud de 19 aminoácidos.

4. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde, la composición comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 y tiene una longitud de 12 aminoácidos.

5. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la composición comprende, además, al menos un diluyente, un emulsionante y/o un tensioactivo.

6. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la composición comprende, además, al menos un compuesto agroquímicamente activo.

7. La composición como se reivindica en la reivindicación 6, en donde dicho compuesto agroquímicamente activo se selecciona entre sustancias capaces de tratar plantas, fungicidas, bactericidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, protectores selectivos, reguladores del crecimiento vegetal, nutrientes vegetales y agentes de control biológico.

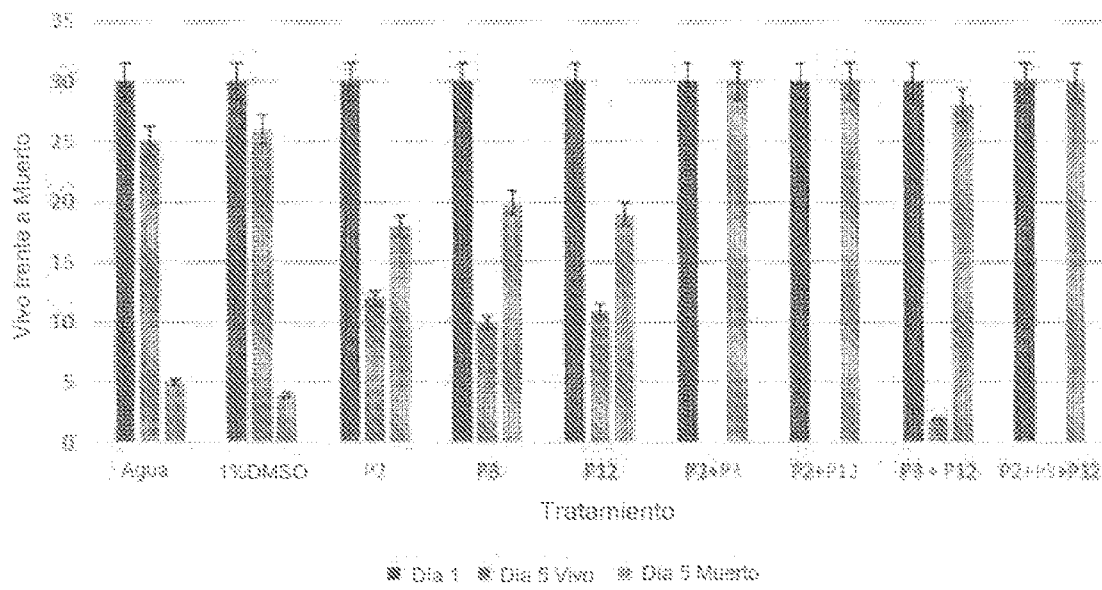


Figura 1