

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 395**

21 Número de solicitud: 201631118

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**24.08.2016**

30 Prioridad:

**25.08.2015 BE 20155533**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.02.2017**

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

**06.06.2017**

Fecha de la concesión:

**14.03.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**21.03.2018**

73 Titular/es:

**DCM DE CEUSTER MESTSTOFFEN NV (100.0%)  
Fortsesteenweg 30, Sint-Katelijne-Waver  
2860 Amberes BE**

72 Inventor/es:

**HANSSEN, Inge**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

54 Título: **Preparación vírica y utilización correspondiente**

ES 2 603 395 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 395**

21 Número de solicitud: 201631118

57 Resúmen:

Preparación vírica y utilización correspondiente. La presente invención se refiere al uso de preparaciones víricas como tratamiento profiláctico (vacunación) de cultivos protegidos: pepino (*Cucumis sativus*), calabacín (*Cucurbita pepo*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) contra un virus de ARN monocatenario que pertenece al género Potexvirus, Tobamovirus, Potyvirus o Tospovirus. Se refiere al tamaño de partícula y a la distribución de tamaño de partícula en dicha preparación vírica. Una preparación vírica eficaz presenta una distribución bimodal comprendiendo dos fracciones principales, presentando la primera fracción de tamaño un tamaño de partícula de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , y presentando la segunda un tamaño de partícula de 50 a 500  $\mu\text{m}$ . La primera fracción es relevante para la infectividad y la segunda es relevante para la estabilidad de la preparación vírica. Ambas fracciones son relevantes para una vacunación eficaz en condiciones cambiantes.

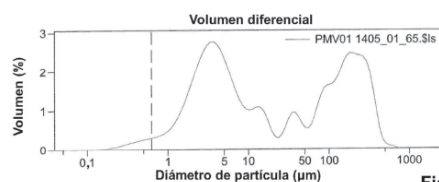


Fig. 3

ES 2 603 395 B1

## DESCRIPCIÓN

Preparación vírica y utilización correspondiente.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una preparación vírica para la inmunización de cultivos hortícolas frutales cultivados bajo protección, tales como pepino (*Cucumis sativus*), calabacín (*Cucurbita pepo*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) frente a virus de ARN monocatenario que pertenecen a los géneros *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Tospovirus*.

La invención se refiere además a la utilización de preparaciones víricas, particularmente como tratamiento profiláctico de plantas frente a infección con un virus de ARN monocatenario de los géneros mencionados anteriormente.

### **Antecedentes de la invención**

El virus del mosaico del pepino (también denominado a continuación en la presente memoria PepMV) en tomate es el modelo para esta invención y es aplicable, por extensión, a cualquier virus de ARN de los siguientes géneros: *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Tospovirus*. PepMV es una enfermedad principal de tomates de invernadero (*Solanum lycopersicum* L.). Se aisló en 1974 en Perú y se ha convertido en un problema muy importante en el cultivo de tomate. El virus pertenece taxonómicamente al género *Potexvirus* y a la familia *Flexiviridae*. Actualmente se conocen cuatro genotipos diferentes de PepMV, con el genotipo CH2 como el más dominante. Los genotipos presentan mutuamente el 75% o más de correspondencia en la secuencia de nucleótidos.

PepMV causa una amplia variedad de síntomas, de los cuales el jaspeado de la fruta es económicamente el más devastador. La infección se produce rápidamente debido a una transmisión rápida y mecánica. La vacunación de plantas jóvenes con un aislado de un virus que produce una infección vírica leve (del inglés "*mild*" en adelante referido como "aislado leve" o "aislado de virus leve") de PepMV puede aplicarse en el cultivo de tomates, con el fin de proteger a las plantas contra daños graves por un aislado agresivo del virus. Además, una infección en una etapa temprana en la temporada parece menos dañina que una más tardía en la temporada. Se conoce un estudio de síntomas y el mecanismo a partir de I.M. Hanssen y

B.P.H.J. Thomma, "Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops", *Molecular plant pathology*, 11(2010), 179-189.

5 Esta invención también se refiere a los géneros *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Tospovirus*, además de la especie PepMV y el género *Potexvirus*. Las especies de virus del moteado leve del pimiento, virus del mosaico del tabaco y virus del mosaico y moteado verde del pepino pertenecen al género *Tobamovirus*. Las especies de virus Y de la patata, virus de la mancha anular de la papaya, virus del mosaico de la sandía, virus del moteado del pimiento y virus del  
10 mosaico amarillo del calabacín pertenecen al género *Potyvirus*. Las especies de virus del bronceado del tomate y virus de las manchas necróticas del Impatiens pertenecen al género *Tospovirus*.

Las preparaciones víricas, que constituyen vacunas para plantas, están disponibles normalmente en forma de una suspensión. La suspensión se aplica a las hojas por medio de  
15 pulverización o frotamiento, dependiendo de la viscosidad de la suspensión. La inoculación se produce a través de los estomas y a través de pequeñas heridas que se generan por medio de la pulverización (a alta presión, 5-6 bar) o el frotamiento de la hoja. Si una preparación vírica se administrase a través del sistema radicular, la absorción en la planta tardaría demasiado.

20 La preparación vírica que se ha aplicado hasta ahora frente a PepMV es una suspensión de partículas vegetales molidas de plantas de tomate infectadas con el PepMV. Se utiliza agua como líquido portador. Las partículas de PepMV están presentes en las partículas vegetales molidas. El virus puede además disolverse en agua o formar una disolución coloidal que es invisible a simple vista. Una disolución coloidal de este tipo es efectivamente una suspensión  
25 de partículas muy pequeñas. Las partículas vegetales molidas son preferentemente hojas total o sustancialmente molidas.

Una preparación vírica de este tipo es una preparación basada en uno o más aislados. Un  
30 aislado se define como un virus que se ha aislado de una planta específica en un momento específico. Los aislados pueden diferir en cuanto al genotipo y/o la medida en la que están presentes los genotipos, una secuencia de ARN específica, patogenicidad, agresividad, origen, espectro de huéspedes, etc. Ejemplos de aislados son *Pep1*, *Pep28*, *Pep48*, *Pep107* tal como se especifica en el informe 322 de Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk (Países Bajos, enero de 2010), M. Schenk *et al*, "Bescherming en beheersing van pepinomozaïekvirus in de  
35 tomatenteelt: kasproef cross-protectie".

La concentración de la preparación vírica, determinada normalmente basándose en el número de partículas víricas por unidad de volumen, puede ajustarse en vista de la aplicación deseada. Ejemplos de aplicaciones son el tipo de planta de tomate, edad, momento (particularmente temporada o mes) de inoculación.

5

Se ha encontrado durante una evaluación de una preparación provisional en la práctica que las condiciones reales de aplicación en la práctica son a menudo mucho menos óptimas que las condiciones recomendadas experimentales. Desviaciones típicas de las condiciones recomendadas incluyen almacenamiento por debajo del óptimo y/o desviaciones en la temperatura ambiental del invernadero, la temperatura del líquido para pulverización, la humedad atmosférica, el nivel de irradiación de luz solar (UV) incidente, la circulación de aire, etc. Las desviaciones pueden producirse entre invernaderos, pero también en el transcurso del tiempo debido a condiciones meteorológicas, y/u otros cambios. Estas desviaciones pueden tener un impacto sobre el nivel de capacidad de infección de la preparación, y con ello sobre la colonización y distribución del virus a través de la planta. Esto conduce a una variación no deseada de la eficacia del tratamiento profiláctico de la planta con una preparación de PepMV. Esta invención pretende minimizar tal variación no deseada y, por tanto, optimizar la eficacia.

10

15

### Sumario de la invención

20

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar una vacuna, particularmente como preparación vírica, contra daños causado por PepMV, cuya eficacia en condiciones prácticas, a veces por debajo de las óptimas, permanece sustancialmente constante y fiable.

25

La invención en relación con ello se refiere a una preparación vírica que comprende partículas molidas de material vegetal, particularmente de cultivos hortícolas frutales, especialmente aquellos bajo protección, que contiene un virus de ARN monocatenario que pertenece a los tipos de géneros mencionados anteriormente, caracterizada por que las partículas molidas presentan una distribución de tamaño de partícula bimodal.

30

La invención también se refiere a una preparación vírica de este tipo para su utilización como vacuna para plantas en cultivos hortícolas frutales cultivados bajo protección, tales como plantas de tomate. La invención se refiere además a la utilización de la preparación vírica según la invención en un tratamiento profiláctico frente a infección de cultivos hortícolas frutales cultivados bajo protección, tales como tomate, con un virus de ARN monocatenario, tal como el virus del mosaico del pepino.

35

Se ha encontrado, de manera totalmente sorprendente, que una preparación vírica que comprende partículas más grandes presenta un mejor rendimiento. Las partículas más grandes potenciarán la estabilidad de la preparación vírica. Esto se ha optimizado posteriormente. Este hallazgo es sorprendente porque va en contra de las leyes científicas de solubilidad y el conocimiento de que la penetración de partículas en una planta puede dificultarse por el tamaño de las partículas. Normalmente se esperaba que partículas más pequeñas fueran ventajosas para maximizar la colonización, más particularmente en vista de una mejor solubilidad y un transporte más rápido al interior de la planta.

El conocimiento que conduce a la invención es, sin embargo, que las partículas víricas pueden inactivarse debido a cualquier condición por debajo de las óptimas, tales como una temperatura ambiental (en el invernadero) (demasiado alta) o del líquido para pulverización, un nivel de radiación demasiado alto de luz solar. Estas condiciones por debajo de las óptimas resultaron ser particularmente relevantes durante la aplicación de la vacuna para plantas en el invernadero. Se entiende que partículas de virus en partículas vegetales molidas con un tamaño más grande presentan mayor resistencia frente a tal inactivación que las mismas partículas de virus en partículas vegetales molidas con un tamaño más pequeño. Un tamaño más pequeño es particularmente un tamaño de hasta 50  $\mu\text{m}$  y un tamaño más grande es particularmente cualquier tamaño por encima de 50  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de optimizar la preparación vírica para condiciones tanto óptimas como por debajo de las óptimas, se encontró además que una combinación de partículas vegetales molidas con un tamaño más pequeño y con un tamaño más grande da los mejores resultados. Las partículas pequeñas son más eficaces en la inoculación de las plantas pero menos estables. La inoculación de la planta con las partículas más grandes se produce más lentamente, pero garantiza una estabilidad potenciada de la preparación vírica.

En una forma de realización preferida, la preparación vírica comprende una primera fracción de tamaño y una segunda fracción de tamaño, en la que la primera fracción presenta un tamaño de partícula de 1 a 10  $\mu\text{m}$  y la segunda fracción presenta un tamaño de partícula de 50 a 500  $\mu\text{m}$ . Esta combinación resulta ser muy ventajosa y altamente eficaz. Ha resultado que una preparación vírica (o vacuna) de partículas menores de 1  $\mu\text{m}$  es inestable. Además ha resultado que una preparación vírica de partículas mayores de 500  $\mu\text{m}$  no da como resultado una inoculación eficaz. Realmente es sorprendente que la segunda fracción sea eficaz en la inmunización de la planta, ya que las partículas presentan un tamaño más grande que los

estomas a través de los cuales tiene que entrar el virus en las hojas de la planta. Los estomas presentan normalmente un tamaño de 5-25 micrómetros. Aún no se ha identificado el mecanismo de cómo las partículas grandes entran en las hojas de la planta. Supuestamente, las partículas más grandes se desintegran para dar partículas más pequeñas o los estomas se agrandan debido a la aplicación y/o presencia de la preparación vírica o ambas.

No se excluye que la preparación comprenda además una tercera fracción de tamaño con partículas con un tamaño de entre 10 y 50  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, el contenido de esta tercera fracción de tamaño es, sin embargo, como máximo del 50% y más preferentemente por lo menos del 25% del contenido de la primera fracción de tamaño. Además no se excluye que la preparación comprenda una cuarta fracción de tamaño con partículas menores de 1  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, el contenido de esta cuarta fracción de tamaño es como máximo del 10% y más preferentemente como máximo del 5% del contenido de la primera fracción de tamaño. Los contenidos en la presente memoria se basan en volumen.

En una forma de realización ventajosa de la distribución bimodal, la segunda fracción es una fracción de tamaño en el intervalo de 50-500  $\mu\text{m}$ , preferentemente 150-500  $\mu\text{m}$  o incluso 250-500  $\mu\text{m}$ . Se cree que el tamaño de partícula más grande de por lo menos 150  $\mu\text{m}$  es mejor debido a una mejor protección del material vírico dentro del material vegetal.

Se indica, para evitar cualquier duda, que el tamaño de partícula se ha determinado por medio de una medición en contador Coulter. El pico de la primera fracción de tamaño se sitúa preferentemente en el intervalo de 2-8 micrómetros. El pico de la segunda fracción de tamaño se sitúa preferentemente en el intervalo de 200-300 micrómetros.

Preferentemente, la primera y la segunda fracción de tamaño presentan una relación en volumen de 1 a 1, con desviaciones de hasta el 25% en ambos sentidos. En un ejemplo, la primera fracción de tamaño contiene por lo menos el 25% del volumen total de partículas molidas, preferentemente por lo menos el 30% y más preferentemente por lo menos el 35%. La misma preferencia se aplica a la segunda fracción de tamaño. Los porcentajes en volumen se determinan en la presente memoria en base a los intervalos de 1-10  $\mu\text{m}$  y 50-500  $\mu\text{m}$  para la primera y la segunda fracciones de tamaño.

La invención, es decir, la utilización de una distribución bimodal de tamaño de partícula en preparaciones víricas, es aplicable a cualquier virus de ARN monocatenario que pertenece a los géneros *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Tospovirus*. Es particularmente adecuado

para cultivos hortícolas frutales cultivados bajo protección tales como calabacín (*Cucurbita pepo*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

5 Preferentemente, la preparación consiste completamente de aislados y material vegetal, sin aditivos adicionales tales como tensioactivos. Se ha encontrado que una preparación sin aditivos es suficientemente estable y homogénea para la aplicación prevista. Además, puede clasificarse como una preparación “ecológica”.

10 En una forma de realización preferida, la preparación vírica se aplica a la planta que va a vacunarse como una composición para pulverización y se aplica mediante pulverización. La composición para pulverización es más particularmente una dispersión diluida de dichas partículas en un medio para pulverización, tal como agua o un medio acuoso, por ejemplo, una composición con un pH predefinido. La composición para pulverización se prepara de manera  
15 adecuada mezclando la preparación vírica con un medio para pulverización. La preparación vírica se pulveriza de manera adecuada a las plantas con un equipo para pulverización siguiendo los procedimientos e instrucciones proporcionadas por el fabricante. Preferentemente las plantas se pulverizan poco después de plantarlas, tal como en el plazo de dos semanas tras plantarlas.

20 Se considera preferible que la primera y la segunda fracción de la preparación vírica contengan el mismo aislado, ya que se desea normalmente aplicar un aislado de virus específico en la planta. Además, esto da mayor certeza al usuario de que las plantas se han vacunado con el tipo deseado de aislado de virus. Sin embargo, no se excluye que la primera fracción contenga  
25 un aislado de virus diferente de la segunda fracción.

En una forma de realización preferente de la preparación vírica, la primera fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula medio basado en volumen en el intervalo comprendido entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, la segunda fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula  
30 medio basado en volumen comprendido entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ .

### **Breve introducción a las figuras**

Estos y otros aspectos de la invención se aclararán adicionalmente haciendo referencia a las  
35 figuras, en las que:



La figura 1 muestra unos valores de Ct obtenidos mediante RT-qPCR para infección (y colonización) por medio de una primera y segunda fracciones con un tamaño de partícula diferente, en las que la inoculación se llevó a cabo con muestras recientes;

5 La figura 2 muestra unos valores de Ct para infección por medio de las mismas fracciones mostradas en la figura 1, en las que la infección se llevó a cabo con muestras que se habían dejado a temperatura ambiente durante 11 días antes de la inoculación;

10 La figura 3 muestra una distribución de tamaño de partícula para una primera forma de realización de una preparación vírica según la invención.

### Ejemplos

15 Los ejemplos comprenden datos experimentales que demuestran el efecto del tamaño de partícula sobre la colonización.

Dado que los virus de plantas son parásitos obligados, no es posible la producción de un virus de plantas *in vitro*. Por tanto, la producción de virus de plantas sólo puede realizarse en plantas huésped. Una vacuna para plantas que contiene un aislado de virus leve consistirá siempre de partes de plantas homogeneizadas derivadas de plantas infectadas con el virus que produce una infección leve. Con el fin de obtener una vacunación eficaz, se necesita una buena infección y, posteriormente, una buena colonización de las plantas por el aislado leve. Puede suponerse que una vacuna para plantas que contiene partículas infecciosas de virus debe consistir de partículas de plantas muy finas que pueden entrar en la planta a través de los estomas y pequeñas heridas. Por tanto, cuando se desarrolla una vacuna para plantas, parece deseable producir un concentrado con partículas muy finas.

20 En la práctica, se ha observado que una vacuna para plantas que consiste en partículas muy finas no dio como resultado una eficacia de vacunación lo suficientemente alta. Con el fin de estudiar el impacto del tamaño de partícula, se produjeron fracciones con tamaños de partícula diferentes. Para obtener tamaños de partícula diferentes, se utilizaron diferentes métodos de mezclado y tamizado. Se realizaron mediciones del tamaño de partícula utilizando un analizador de tamaño de partícula de LS (Beckman Coulter).

35 La preparación vírica consistía en gran medida en dos fracciones:

1. Fracción A: Tamaño de partícula de entre 1 y 10 µm

2. Fracción B: Tamaño de partícula de entre 50 y 500 µm

5 La relación en volumen de la primera y segunda fracción de tamaño en este experimento fue de 1:1. Las fracciones contenían un aislado de CH2 leve del virus PepMV. El aislado leve era el nr 1906 del número de registro GenBank JN835466, y es una cepa avirulenta de tipo natural aislada de un cultivo comercial de tomates en Bélgica. Basándose en la secuenciación del  
10 genoma completo, el genoma estaba compuesto por un ARN monocatenario de 6410 nucleótidos de longitud con 5 marcos de lectura abiertos (ORF): ORF1 codifica para una polimerasa dependiente de ARN de 164 kDa, ORF2-4 forman el triple PepMV (bloque de gen TGB). ORF5 codifica para una proteína de cubierta (CP) de 25 kDa. El mejor método para la detección, identificación y diferenciación de genotipos es la PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real de TaqMan (RT-qPCR). La formulación contiene por lo menos  $5 \cdot 10^5$   
15 copias de genoma por µl de producto.

La infectividad de cada fracción se verificó tras inocular dos plantas de tomate (SG 46-649, Syngenta Seeds) mediante frotamiento de 3 ml de producto con concentración de virus similar sobre la segunda y tercera hojas totalmente desarrolladas. Las plantas se cultivaron en  
20 cámaras climáticas en condiciones controladas (temperatura diurna de 22°C y 16 h de fotoperiodo). Se tomó una muestra de hoja de cada planta inoculada 5 días tras la inoculación. La concentración de virus se determinó utilizando un ensayo RT-qPCR de TaqMan (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009, J. Virol. Methods, Vol. 162, páginas 46-55). Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 1. Con el fin de evaluar la estabilidad de las dos fracciones en  
25 condiciones por debajo de las óptimas, se almacenaron dos réplicas de cada fracción a 20°C durante 11 días. La temperatura de almacenamiento óptima para tales preparaciones víricas es de 4°C. Tras 11 días de almacenamiento a 20°C, se realizó la inoculación de plantas de tomate con las dos réplicas de cada fracción como se describió anteriormente. Se tomaron muestras de hojas de las plantas inoculadas 7 días tras la inoculación. Los resultados se muestran en la  
30 figura 2.

La fracción A demostró tener una infectividad inicial alta, dando como resultado concentraciones muy altas de virus en las plantas de prueba de tomate en cámaras climáticas 5 días tras la inoculación (figura 1). La fracción B demostró tener una infectividad inicial más  
35 baja en comparación con la fracción A, pero una infectividad más alta cuando se almacenó durante 11 días a 20°C (figura 2). Esto indica una mejor estabilidad de la fracción B. Dado que

una vacuna para plantas aplicada en condiciones prácticas debe tener (1) una infectividad inicial alta y (2) una buena estabilidad durante el almacenamiento y la aplicación, una mezcla de las dos fracciones dará la mejor eficacia de vacunación en condiciones prácticas. Por tanto, se adaptaron los procedimientos de producción para obtener una vacuna para plantas que  
5 contenía principalmente estas dos fracciones (figura 3).

La figura 1 muestra valores de Ct obtenidos mediante RT-qPCR (sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™, Applied Biosystems). Se inocularon plantas de tomate con preparaciones víricas recientes (sin almacenamiento). Se midieron los valores 5 días tras la inoculación con  
10 las fracciones de tamaño diferentes: fracción A (tamaño de partícula entre 1 y 10 µm) y fracción B (tamaño de partícula entre 50 y 500 µm). Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la concentración del virus en la planta. Cada punto representa el valor medio de las 2 muestras con errores estándar.

La figura 2 muestra valores de Ct obtenidos mediante RT-qPCR (sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™, Applied Biosystems) 7 días tras la inoculación con las diferentes fracciones, cuando se inocularon plantas de tomate con las diferentes fracciones tras  
15 almacenamiento a 20°C durante 11 días: fracción A (tamaño de partícula entre 1 y 10 µm) y fracción B (tamaño de partícula entre 50 y 500 µm). Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la concentración del virus en la planta. Cada punto representa el valor medio  
20 de las 2 muestras con errores estándar.

Las muestras de la figura 1 (inoculación directa) y la figura 2 (inoculación tras 11 días de almacenamiento) son representativas de posibles condiciones de utilización. Particularmente,  
25 el almacenamiento a 20°C durante 11 días es representativo de almacenamiento incorrecto, dado que la preparación vírica se almacena normalmente a 4°C. A partir de la infección y, por tanto, la colonización del virus en la planta, se deduce que la vacunación fue satisfactoria.

Es destacable en los resultados mostrados en la figura 2, en comparación a los de la figura 1,  
30 que los valores de Ct de las fracciones A y B (la primera y segunda fracciones de tamaño) han cambiado en sentidos mutuamente opuestos. Mientras que los valores de Ct de las plantas inoculadas con la primera fracción fueron mucho más bajos que los de la segunda fracción en los resultados mostrados en la figura 1, puede observarse lo contrario en la figura 2. Por tanto, de manera eficaz, los valores de Ct de las plantas inoculadas con la primera fracción de  
35 tamaño han aumentado con un factor de 2, mientras que los valores de Ct de las plantas inoculadas con la segunda fracción han disminuido con un factor de 3. Esto demuestra que la

infectividad de la segunda fracción con partículas más grandes aumenta con el tiempo, mientras que la infectividad en la primera fracción disminuye. Se observa que las diferencias en la infectividad son considerables, ya que se toma como norma general que una diferencia de 3 unidades de Ct corresponde con un factor de 10 en la concentración. El aumento resultante en el valor de Ct de la primera fracción de tamaño desde 11 hasta aproximadamente 22 corresponde, por tanto, con una disminución en la concentración de un factor de  $10^3$ - $10^4$ . La disminución en el valor de Ct obtenido con la segunda fracción de tamaño desde 34 hasta 10 corresponde, por tanto, con un aumento de la concentración del virus con un factor de  $10^8$ .

La figura 3 muestra el resultado de una medida de tamaño de partícula por medio de un analizador de tamaño de partícula de LS (Beckman Coulter) en la vacuna para plantas compuesta sustancialmente por dos fracciones: fracción A (tamaño de partícula entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ ) y fracción B (tamaño de partícula entre 50 y 500  $\mu\text{m}$ ). La distribución es sustancialmente bimodal, con los picos primarios a 4  $\mu\text{m}$  y a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ . Además, pueden verse algunos picos más pequeños adicionales, particularmente a 15, 40 y 100  $\mu\text{m}$ . El pico a 100  $\mu\text{m}$  pertenece eficazmente a la segunda fracción. La contribución de los picos a 15 y 40  $\mu\text{m}$  es de aproximadamente el 5%. Estos no dan lugar a ninguna desventaja.

En resumen, la invención se refiere a la utilización de preparaciones víricas como tratamiento profiláctico (vacunación) de cultivos protegidos: pepino (*Cucumis sativus*), calabacín (*Cucurbita pepo*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) frente a virus de ARN monocatenario parte del género *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* y *Tospovirus*.

La invención se refiere más particularmente al tamaño de partícula y a la distribución de tamaño de partícula en una preparación vírica de este tipo. Una preparación vírica eficaz presenta una distribución bimodal que comprende dos fracciones principales, en las que la primera fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula de 1 a 10  $\mu\text{m}$  y la segunda fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula de 50 a 500  $\mu\text{m}$ . La primera fracción es relevante para la infectividad y la segunda fracción de tamaño es relevante para la estabilidad de la preparación vírica. Ambas fracciones son relevantes para una vacunación eficaz en condiciones cambiantes como se encuentran en la práctica.

REIVINDICACIONES

1. Preparación vírica, que comprende unas partículas molidas de material vegetal, provista de un virus de ARN monocatenario que pertenece al género *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* o *Tospovirus*, caracterizada por que las partículas molidas presentan una distribución de tamaño de partícula bimodal que presenta una primera fracción de tamaño y una segunda fracción de tamaño, en la que la primera fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula comprendido entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  y la segunda fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula comprendido entre 50 y 500  $\mu\text{m}$ .
2. Preparación vírica según la reivindicación 1, caracterizada por que el material vegetal se selecciona a partir de un cultivo hortícola frutal cultivado bajo protección.
3. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que la primera y segunda fracción de tamaño presentan mutuamente una relación en volumen de 1 a 1, con unas desviaciones de hasta el 25% en ambos sentidos.
4. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la primera fracción de tamaño contiene por lo menos el 25% del volumen total de partículas molidas, preferentemente por lo menos el 30% y más preferentemente por lo menos el 35%.
5. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la segunda fracción de tamaño contiene por lo menos el 25% del volumen total de partículas molidas, preferentemente por lo menos el 30%, y más preferentemente por lo menos el 35%.
6. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, caracterizada por que la primera fracción de tamaño y segunda fracción de tamaño contienen un mismo aislado del virus.
7. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, caracterizada por que la primera fracción de tamaño contiene un primer aislado del virus y la segunda fracción de tamaño contiene un segundo aislado del virus.
8. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, caracterizada por que la primera fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula medio basado en volumen en el intervalo comprendido entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ .

9. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, caracterizada por que la segunda fracción de tamaño presenta un tamaño de partícula medio basado en volumen comprendido entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ .

5

10. Preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización como una vacuna en cultivos protegidos, particularmente pepino (*Cucumis sativus*), calabacín (*Cucurbita pepo*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

10

11. Utilización de una preparación vírica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un tratamiento profiláctico contra daños por un virus de ARN monocatenario que pertenece a los géneros *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus* o *Tospovirus*.

15

12. Utilización según la reivindicación 11, caracterizada por que la preparación vírica se utiliza en un tratamiento profiláctico contra daños por el virus del mosaico del pepino en plantas de tomate.

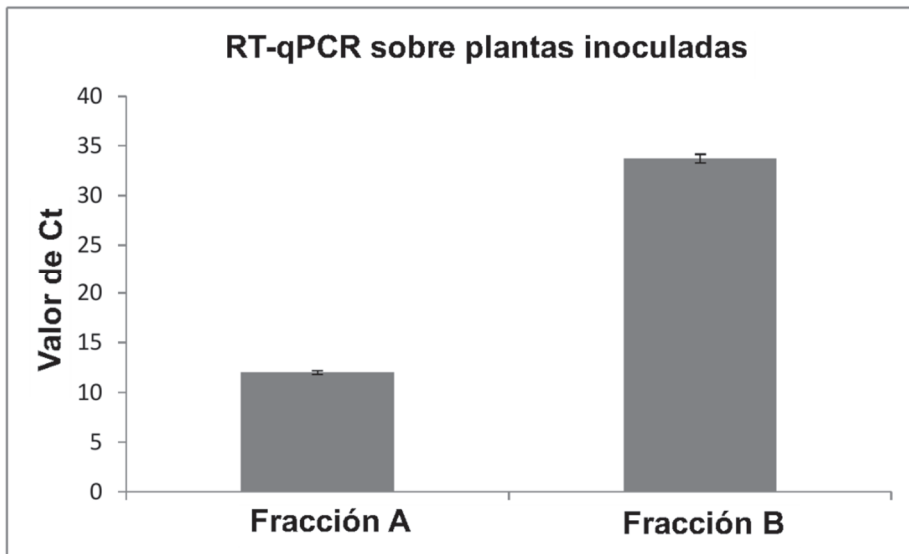


Fig. 1

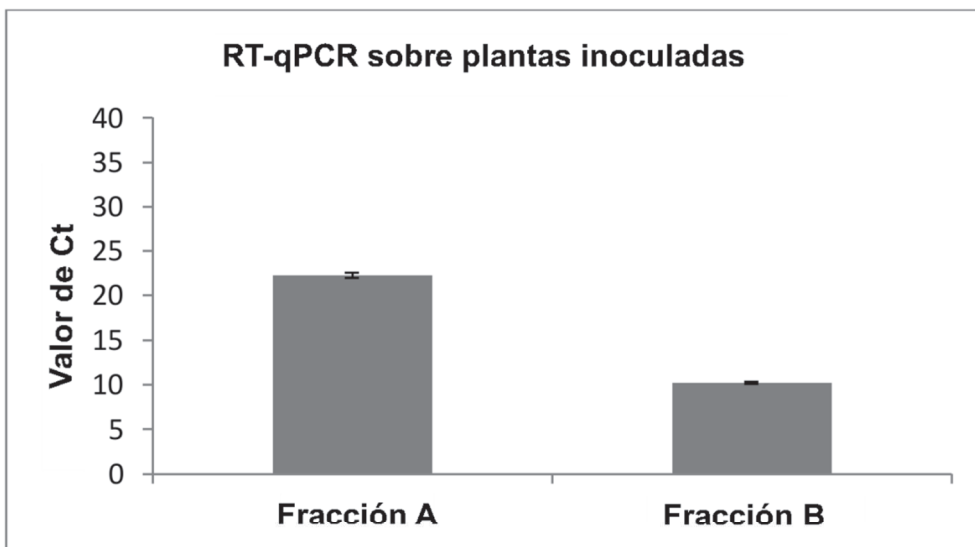


Fig. 2

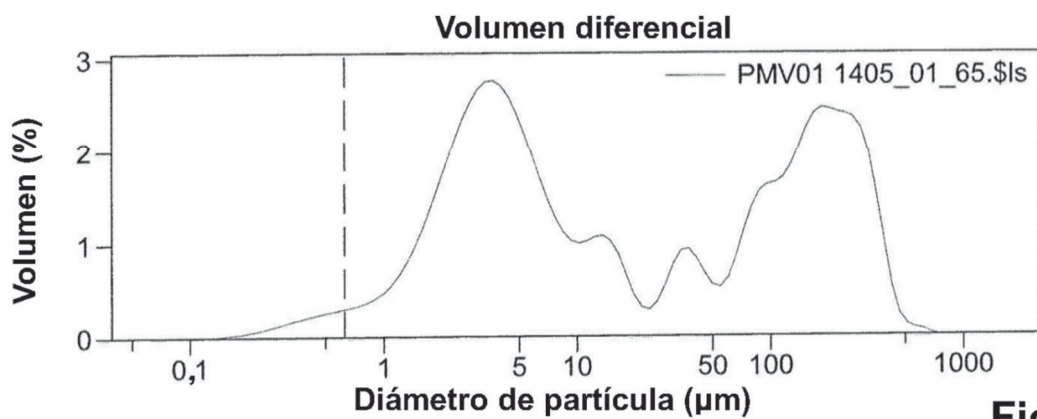


Fig. 3



②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201631118

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 24.08.2016

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad: **25-08-2015**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N7/02** (2006.01)  
**A01N63/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHEWACHONG, G. M. <i>et al.</i> Generation of an attenuated, cross-protective <i>Pepino mosaic virus</i> variant through alignment-guided mutagenesis of the viral capsid Protein. <i>Phytopathology</i> . Enero 2015, Vol. 105, Nº 1, páginas 126 – 134. ISSN 0031-949X <DOI:10.1094/PHYTO-01-14-0018-R> Especialmente página 129, epígrafe “Cross-protection experiments” de “Materiales y Métodos”.	1-12
A	SACRISTÁN, S. <i>et al.</i> Contact transmission of <i>Tobacco mosaic virus</i> : a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. <i>Journal of Virology</i> . Mayo 2011, Vol. 85, Nº 10, páginas 4974 – 4981. ISSN 0022-538X (impreso) ISSN 1098-5514 (electrónico) <DOI: 10.1128/JVI.00057-11> Especialmente página 4975, primer párrafo del epígrafe “Efficiency of contact transmission under controlled conditions” de “Resultados”.	1-12
A	CHEWACHONG, G. M. <i>et al.</i> Efficient “vaccination” of <i>Nicotiana benthamiana</i> and tomato plants using a lab-attenuated strain of <i>Pepino mosaic virus</i> . Joint Meeting APS-MSA, Texas. [en línea] Agosto 2013. [recuperado el 24.05.2017] Recuperado de internet: <URL: <a href="http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2013_Meeting_Abstracts/aps2013abO86.htm">http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2013_Meeting_Abstracts/aps2013abO86.htm</a> >	1-12
A	WELTER, S. <i>et al.</i> <i>Pepino mosaic virus</i> infection of tomato affects allergen expression, but not the allergenic potential of fruits. <i>Plos One</i> . Junio 2013, Vol. 8, Nº 6, Nº artículo e65116. ISSN 1932-6203 (impreso) ISSN 1932-6203 (electrónico) <DOI: 10.1371/journal.pone.0065116> Especialmente página 2, epígrafe “Plant Material” de “Materiales y Métodos”.	1-10

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  
23.05.2017

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/4



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

C12N, A01N

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, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPE TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.05.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHEWACHONG, G. M. et al. Phytopathology. Enero 2015, Vol. 105, Nº 1, páginas 126 - 134.	01.2015
D02	SACRISTÁN, S. et al. Journal of Virology. Mayo 2011, Vol. 85, Nº 10, páginas 4974 - 4981.	05.2011
D03	CHEWACHONG, G. M. et al. Efficient "vaccination" of <i>Nicotiana benthamiana</i> and tomato plants using a lab-attenuated strain of <i>Pepino mosaic virus</i> . Joint Meeting APS-MSA, Texas. Agosto 2013.	08.2013
D04	WELTER, S. et al. Plos One. Junio 2013, Vol. 8, Nº 6, Nº artículo e65116.	06.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La reivindicación 1 tiene por objeto, una preparación vírica que comprende unas partículas molidas de material vegetal provistas de un virus de ARN monocatenario que pertenece a los géneros Potexvirus, Tobamovirus, Potyvirus o Topovirus, caracterizada por que dichas partículas molidas presentan una distribución de tamaño bimodal, con una fracción con un tamaño de partícula de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  y una segunda fracción con un tamaño de partícula de entre 50 y 500  $\mu\text{m}$ .

Estas composiciones se utilizan en la profilaxis de infecciones virales (reivindicaciones 11 y 12).

Es importante mencionar que según los solicitantes, la presencia de partículas vegetales de 1-10  $\mu\text{m}$  y de 50 - 500  $\mu\text{m}$  hace que dichas composiciones presenten una mayor eficiencia a la hora de la transmisión del virus a la planta.

D01 divulga la necesidad de generar composiciones estables del *virus del mosaico del pepino* (PepMV) con el fin de utilizarlas en la protección cruzada frente a infecciones virales. Cabe destacar, que para los estudios de efectividad de la inoculación del virus en las plantas de tomate, se utilizaron homogenados de hojas infectadas. Sin embargo, no se tuvo en cuenta el tamaño de las partículas vegetales de estos homogenados, sino que la investigación se centró en la mejora de la estabilidad de la proteína de la cápsida.

En D02 se presenta un estudio sobre los factores que afectan a la transmisión por contacto de virus en plantas, mediante un análisis de la eficacia de inoculación del *virus del mosaico del tabaco*. No se consideró que el tamaño de las partículas vegetales infectadas utilizadas en la inoculación, fuera un factor determinante.

D03 divulga la necesidad de generar composiciones estables del PepMV con el fin de conseguir una composición mejorada útil en la protección frente a la infección por dicho virus. La investigación se basó en el estudio de la estabilidad de la proteína de la cápsida y no menciona como variables a analizar, ni el modo de inoculación ni el tamaño de las partículas vegetales portadoras del virus.

En D04 se describe un estudio de alergenicidad de tomates provenientes de plantas infectadas con el PepMV. La inoculación se realizó a partir de hojas infectadas, pero no se consideró importante el tamaño de las partículas vegetales molidas.

Ninguno de los documentos citados de D01 a D04, pese a divulgar trabajos en los que se inoculan virus ARN en plantas mediante el contacto de las mismas con material vegetal procedente de plantas infectadas; plantear la necesidad de obtener composiciones más estables u optimizar el modo de transmisión del virus, considera como posible modo de optimizar la inoculación, la selección del tamaño de las partículas vegetales infectadas.

Es decir, ante la necesidad de resolver el problema técnico planteado en la solicitud, que consiste una mejora de la eficiencia en inoculación de los virus en las plantas, no parece existir ninguna indicación en dichos documentos, ni considerados de forma individual ni en combinación, que hubiera llevado al experto en la materia seleccionar partículas vegetales portadoras del virus de 1-10  $\mu\text{m}$  y de 50 - 500  $\mu\text{m}$  (reivindicación 1).

En conclusión, se considera que la reivindicación independiente 1 es nueva y tiene actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

Las reivindicaciones 2 - 10 dependen de la reivindicación 1, que cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva y por lo tanto, cumplen a su vez dichos requisitos (art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986).

Al ser nueva e inventiva la composición objeto de la reivindicación 1, también lo son sus usos, y en consecuencia las reivindicaciones 11 y 12 presentan novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986).