(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 697 127**

(51) Int. CI.:

A01N 65/00	(2009.01)	***C12N 1/14***	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)	***C12N 1/12***	(2006.01)
A01N 57/16	(2006.01)	***C12N 1/10***	(2006.01)
A01P 7/00	(2006.01)		
A01P 13/00	(2006.01)		
A01P 5/00	(2006.01)		
A01P 3/00	(2006.01)		
A01P 1/00	(2006.01)		
C12N 5/04	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/IT2013/000193**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020624**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13756711 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2802213**

(54) Título: **Composición que comprende ácidos nucleicos de sistemas biológicos parasitarios, patógenos o infestantes para inhibir y/o controlar el crecimiento de dichos sistemas**

(30) Prioridad:

02.08.2012 IT NA20120046

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2019

(73) Titular/es:

NO SELF S.R.L. (100.0%)
Via M. Schipa, 77
80122 Napoli, IT

(72) Inventor/es:

MAZZOLENI, STEFANO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

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

Composición que comprende ácidos nucleicos de sistemas biológicos parasitarios, patógenos o infestantes para inhibir y/o controlar el crecimiento de dichos sistemas

La presente invención se refiere a composiciones de ácidos nucleicos de sistemas biológicos parasitarios, patógenos e infestantes para inhibir y/o controlar dichos sistemas y a un procedimiento para su preparación.

Antecedentes de la técnica

Desde hace muchos años, la investigación de nuevos productos que inhiban sistemas biológicos demanda un enorme esfuerzo científico, económico e industrial e incluye la detección de principios activos de fuentes naturales o por medio sintético y sucesivos ensayos biológicos y farmacológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de ensayos de campo y de aplicación clínica (Morgan et al. 2011. Health Policy, 100:4-17).

El uso de fármacos (pesticidas, herbicidas, antibióticos) para la inhibición de sistemas biológicos se refiere a varios campos de aplicación, entre los que están principalmente la agricultura y la medicina y se lleva a término para control, inhibición o eliminación de organismos perjudiciales, patógenos, parasitarios o infestantes, y también tratamiento contra la formación de biopelículas microbianas.

A pesar de la amplitud y la diversificación de dicho rango de aplicación, el uso de fármacos muestra problemas comunes como: (i) la especificidad de acción, (ii) la posible toxicidad para la especie humana y otras especies, (iii) la contaminación ambiental y (iv) el comienzo de resistencias de las poblaciones de los organismos diana.

En general, los fármacos (pesticidas, herbicidas, antibióticos) consisten en moléculas orgánicas de tamaño pequeño y mediano y muestran una gran diversificación tanto en términos de componentes químicos como de mecanismos de acción. Dichos fármacos se han detectado basándose, en general, en métodos de «examen aleatorio», esto es estimando la actividad y la potencialidad del uso de los compuestos químicos obtenidos por síntesis de manera aleatoria partiendo de varias estructuras básicas que resultan de cadenas principales que se encuentran naturalmente. De acuerdo con esto, durante los últimos 50 años, se comercializó un número muy grande de productos, entre ellos más recientemente también polinucleótidos.

Uno de los principales problemas relacionados con los principios activos en la actualidad usados en agricultura y medicina es su insuficiente especificidad de acción para los organismos parasitarios, patógenos y/o infestantes y, por consiguiente, efectos secundarios y toxicidad en el organismo huésped. Por ejemplo, se conocen los casos de paraquat asociados al comienzo de la enfermedad de Parkinson y productos que se ha demostrado que son letales para los embriones humanos. Además de los problemas de toxicidad aguda, la exposición crónica a algunos productos muestra un riesgo reconocido de cancerogenicidad, para lo que las normas establecidas demandan un seguimiento ecotoxicológico y modalidades de uso asociadas a dinámicas ambientales y persistencia de los diversos productos.

Finalmente, no se tiene que ignorar el problema de la contaminación ambiental ocasionada por los fármacos (pesticidas, herbicidas, antibióticos). Las recientes aplicaciones de las regulaciones en el campo ambiental han reducido drásticamente las autorizaciones para el uso de fitofármacos y pesticidas y tendrán que abandonarse muchos productos en un futuro cercano por la entrada en vigor de regulaciones más restrictivas. Por ejemplo, el bromuro de metilo, usado extensamente como fumigante para el control de patógenos en el suelo, entre ellos los nematodos, se ha prohibido debido a su inclusión entre los compuestos considerados responsables de daño a la capa de ozono. Considerando estos problemas, la mayoría de los principios activos más modernos se seleccionaron para su descomposición rápida en el suelo o los cultivos. Sin embargo, esta posible ventaja en términos de contaminación ambiental puede limitar la eficacia en el tiempo de los principios activos usados.

Otro problema fundamental común para los productos usados en la actualidad, tanto en el campo agrícola como en aplicaciones terapéuticas en el campo médico, es la aparición de resistencia farmacológica después de un periodo desde el comienzo del tratamiento.

Por ejemplo, con referencia a la agricultura, en los EE. UU., a principios de los años 60, el 2,4 D ha sido el primer herbicida, usado a gran escala, para el que se indicó el comienzo de resistencia en poblaciones de *Dacus carota* (Switzer, (1957), *Proc. North Eastern Weed Cont. Conf.,* 11:315; Whitehead and Switzer, (1963), *Can. J. Plant Sci.,* 43:255). Sucesivamente, comenzando a principios de los años 70 se indicaron numerosos casos de especies infestantes resistentes a las triazinas (Ryan, (1970), *Weed Sci.,* 18:614; LeBaron and Gressel, Eds., *Herbicide Resistance in Plants,* Wiley, Nueva York, 1982). Los registros han crecido después exponencialmente en las siguientes décadas junto con la difusión de los nuevos productos para la lucha química y biológica y su uso intensivo (Powles and Shaner, 2001. *Herbicide resistance and world grains*, CRC press, Nueva York).

Se conocen varios mecanismos de comienzo de la resistencia del infestante a tratamiento con herbicida. Por ejemplo, varios mecanismos indicados en la bibliografía son: resistencia como resultado de la selección de múltiples copias de genes diana (Gaines et al. 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(3): 1029-1034); mutación de los genes diana (Wakelin et al. 2006. *Weed Res*. (Oxford), 46(5): 432-440); secuestro vacuolar (Ge et al. 2010. *Pest Management Sci.* 66:576); expresión de enzimas que metabolizan los herbicidas (Hidayat et al. 1997. *Pest. Biochem. Physiol.* 57(2): 137-146).

En la actualidad en el campo agrícola, se ha detectado la aparición de resistencia en más de 200 especies infestantes, seleccionadas, sobre todo, como resultado del uso de principios activos caracterizados por el mismo mecanismo de acción. En Italia, en la llanura del Po, se conocen casos de resistencia a las atrazinas en poblaciones de hierbas infestantes, como *Solanum nigrum*, *Chenopodium album* y *Amaranthus cruentus*, o, en otras regiones, aquellas con resistencia a inhibidores enzimáticos en otras diferentes especies infestantes (*Lolium* spp., *Phalaris paradoxa*, *Papaver rhoeas, Sinapis arvensis, Echinocloa crusgalliums, Sorghum halepense, Cyperus difformis*).

También, en el campo médico, el desarrollo de resistencia a fármacos hace inútil su uso, constituyendo uno de los mayores problemas relacionados con las terapias con antibióticos (Clatworthy et al. 2007. *Nat. Chem. Biol*. 3(9): 541-548). Aunque se usaron enormes recursos humanos y económicos para descubrir nuevas moléculas y estudiar los mecanismos de resistencia, se demostró que la aparición de resistencia a fármacos era más rápida que el descubrimiento de nuevos fármacos.

El problema de la resistencia a los fármacos llegó a experimentarse principalmente en el campo de la salud, ya que da como resultado complicaciones clínicas para la terapia con antibióticos (aumento de la duración de las enfermedades, aumento de las complicaciones, posibilidad de epidemias) y demandas de costes adicionales en el tratamiento de las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos (mediante el uso de más fármacos, prologando así la hospitalización). Un caso de resistencia a los antibióticos, cada vez más presente y peligrosa para la salud pública y que representa una de las principales causas de infecciones hospitalarias, es la resistencia a la meticilina de los estafilococos y, sobre todo, de varias cepas de *Staphylococcus aureus*. Estas bacterias, mediante el mecanismo de afinidad reducida por la diana, pueden expresar una proteína modificada que no interactúe con antibióticos beta-lactámicos. La Unión Europea se ha enfrentado a este problema presentando una «estrategia comunitaria contra la resistencia a los antimicrobianos» en donde se recomienda un uso prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina para contener el desarrollo de las resistencias.

La posibilidad de inhibir la expresión de genes específicos dio como resultado un gran interés desde la primera publicación del artículo de Zamecnik and Stephenson, en donde se muestra que el uso de composiciones basadas en oligonucleótidos antisentido (ASO, en inglés) podía inhibir la traducción de proteínas víricas (Zemecnik and Stephenson (1978) *Proc. Natl. Acad. Ski*. 75:285-288). Siguiendo a este descubrimiento, en las experimentaciones más recientes en las técnicas de lucha contra agentes parasitarios, patógenos e infestantes se investigó más acerca del uso de varias moléculas de pequeño tamaño de ARN y/o ADN (en el orden de varias decenas de bases) que se unen selectivamente a dianas que presentan secuencias complementarias como ARNm, microARN o ARN mitocondrial, inhibiéndose así su traducción y llevándose a cabo, por lo tanto, una actividad de control para las especies diana.

Estas metodologías modernas encontraron aplicaciones en la lucha contra especies parásitas (por ejemplo, la patente internacional WO 2005/049841 A1), plantas infestantes (por ejemplo, la patente internacional WO 2011/112570 A1) y terapia antimicrobiana y oncológica.

Las propuestas usadas en la actualidad son múltiples, entre ellas la modificación de ARN para controlar el nivel de ARN mensajero específico, limitando así la expresión del gen que lo codifica. Dicha metodología se caracteriza por la administración mediante construcciones adecuadas de una secuencia de ARN o ADN destinadas a una diana específica, por ejemplo, un gen o partes del mismo. Los problemas asociados al uso de dichas propuestas terapéuticas incluyen la necesidad de caracterización de una secuencia específica como diana de la terapia. Hay también la dificultad de obtener una concentración mínima eficaz de la construcción en el órgano diana. La historia reciente de la tecnología antisentido, además, revela que si bien la identificación de los ARN específicos de la unión de los ASO es ahora relativamente simple, su formulación en composiciones que presentan una potencialidad de aplicación eficaz para la inhibición de la expresión de genes específicos es aún problemática. Varios estudios recientes abordan el problema mencionado, proponiendo estructuras y composiciones más estables y eficaces (por ejemplo, la patente internacional WO 2011/031520 A1). Como se sabe, este tipo de técnicas presenta una selectividad elevada en términos de especificidad del sitio de acción. Hasta ahora, no se han indicado casos del comienzo de resistencia al uso de los ASO en el tratamiento con herbicidas y pesticidas, ya que su aplicación aún no ha logrado la fase de comercialización y consiguiente diseminación de los productos. Sin embargo, considerando la especificidad particular de acción de los ASO, se puede presumir que, como resultado de su uso extensivo y la consiguiente presión selectiva sobre las poblaciones infestantes, parasitarias y/o patógenas, la aplicación de dichos ASO dará como resultado el comienzo de resistencias en las poblaciones tratadas, haciendo así ineficaces los tratamientos, del mismo modo que ocurrió en el pasado para otros tipos de fármacos caracterizados por una elevada especificidad de acción.

En el campo de los cultivos masivos en biorreactores y fotobiorreactores, por lo tanto, en sistemas controlados confinados, uno de los principales problemas aún no resueltos en el cultivo masivo de microorganismos es el comienzo de fenómenos de saturación de la curva de crecimiento para dichos organismos (fase estacionaria), con la consiguiente imposibilidad de exceder ciertas concentraciones por unidad de volumen. Una curva de crecimiento típica de dichos microorganismos (bacterias, bacterias fotosintéticas, levaduras, microalgas y algas verde-azuladas) se caracteriza por una fase de latencia de partida, una fase exponencial sucesiva y una fase de estado estable con saturación de la curva de crecimiento, seguido a veces también por una fase de muerte celular.

La imposibilidad de exceder el umbral de la concentración máxima por unidad de volumen que puede lograr un microorganismo durante el cultivo a gran escala en reactores y sistemas de cultivo masivo, limita destacadamente los potenciales de explotación de tales organismos no permitiendo ulteriores incrementos de la producción más allá de la fase estacionaria.

Se han propuesto varias motivaciones como causa de la disminución de la tasa de crecimiento celular de los microorganismos en la fase de saturación, todas relacionadas principalmente con la limitación de elementos nutritivos en el medio o la autolimitación de la radiación que penetra en el cultivo en el caso de organismos fotosintéticos (fenómeno de autooscurecimiento). Varios estudios experimentales demostraron que los fenómenos de la saturación de la curva de crecimiento ocurren también en ausencia de factores limitantes evidentes y este fenómeno se asocia a la acumulación de sustancias inhibidoras en el medio de cultivo.

A la luz de lo expuesto anteriormente, es evidente, por lo tanto, la necesidad de nuevos métodos para la inhibición de organismos perjudiciales o el incremento de rendimiento en los procedimientos de producción de microorganismos que solucionen las desventajas de los métodos de la técnica anterior.

La invención del título resulta de una observación importante ocurrida durante estudios ecológicos en el ciclo de la sustancia orgánica en el suelo. En estos estudios se observó que se demuestra que el ADN, liberado por la descomposición de material orgánico acumulado en el suelo, se inhibe para las especies vegetales que producen dicho material orgánico, mientras dicho ADN no inhibe a otras especies para las que dicho ADN puede, por el contrario, representar una fuente nutritiva.

En el caso de ecosistemas forestales, este efecto inhibidor del ADN extracelular específico solo en especies de plantas con ADN homólogo, representa un mecanismo regulador de la coexistencia natural entre varias especies y favorece la biodiversidad de las comunidades de plantas. De hecho, cuando una sola especie, por cualquier razón, está en las condiciones adecuadas para aumentar el propio dominio sobre otras especies, en el tiempo, necesariamente acumulará mayores residuos de la propia sustancia orgánica, cuya descomposición y consiguiente liberación de ADN producirá un efecto inhibidor sobre la misma especie, reduciéndose así la capacidad competitiva y, por lo tanto, el dominio. En el mismo fenómeno se basa la denominada «fatiga del suelo» (referida como «enfermedad del suelo») en agricultura, esto es, pérdidas de productividad de los cultivos monoespecíficos repetidos en el tiempo, no resultantes de problemas nutritivos naturales, sino de la acumulación de residuos vegetales de los mismos cultivos. La observación de la inhibición específica de la especie debido a la acumulación de ADN propio, durante el ciclo de la sustancia orgánica, explica los fenómenos mencionados de pérdida de productividad y nunca se indicó dicho hallazgo en la bibliografía científica.

Basándose en estos estudios, se logró un segundo resultado importante, que consiste en la observación de que las poblaciones microbianas (por ejemplo, bacterias, microalgas y hongos) producen y segregan, durante el crecimiento, moléculas de ADN propias en forma de fragmentos de diferente tamaño que, por acumulación en el sustrato de crecimiento de la población, ejercen un efecto inhibidor sobre el crecimiento de dicha población.

Se sabe que una población microbiana crece típicamente inicialmente de manera exponencial, después entra en una fase denominada estacionaria, seguido, posiblemente, por una fase de muerte. Se conocen varios factores limitantes del crecimiento de dichas poblaciones microbianas, entre ellos, fundamentalmente, los límites nutritivos y/o la acumulación de sustancias tóxicas de diversa naturaleza. En la bibliografía se indica la producción y secreción de ADN extracelular de varios organismos (Peters and Pretorius, 2011. *Chemical Clinic Acta*. 412:806-811), pero hasta ahora no se ha indicado que una liberación de ADN extracelular durante el crecimiento de una población microbiana produzca un efecto inhibidor sobre el crecimiento de dicha población, de manera absolutamente análoga a la observada para las plantas afectadas por la acumulación del propio ADN en el suelo. Las observaciones en las que se basa esta invención revelan una ley biológica general según la cual se demuestra que la liberación de ADN propio por un organismo está regulando el crecimiento de dicho organismo y de los organismos de poblaciones de la misma especie. Este resultado conduce a un nuevo escenario de aplicación destacable en el campo agrofarmacéutico. En particular, se hace posible el control de toda especie perjudicial por exposición al propio ADN fragmentado aleatorio, total, tal que se reproduzca lo observado en los ciclos naturales de descomposición de la sustancia orgánica o en los fenómenos de secreción extracelular durante el crecimiento de las poblaciones microbianas. Así, se presenta la hipótesis del posible uso para aplicación de composiciones cuyo principio activo consiste en ADN fragmentado total y aleatorio de una especie que se tiene que controlar.

Los ensayos que es ilustran a continuación demuestran la eficacia de dicho método para cualquier especie tratada. Los experimentos indicados son fácilmente replicables y no demandan ningún conocimiento *a priori* del genoma de la especie que se tiene que tratar en términos de secuenciación y/o detección de genes diana específicos. Para la preparación de las composiciones inhibidoras son suficientes solo la extracción del ADN total de material orgánico de la especies diana (por ejemplo, de hojas de plantas, micelio de hongo, biomasa microbiana) y la sucesiva fragmentación aleatoria de dicho ADN extraído. El procedimiento de puesta en marcha de la invención simula el procedimiento de descomposición natural de la sustancia orgánica en el suelo y produce una mezcla de polinucleótidos de diferentes tamaños que comprenden de decenas a cientos de bases. Dichos fragmentos, que representan el ADN total de la especie que se tiene que controlar, producen un efecto altamente selectivo sobre los organismos con ADN homólogo mientras no actúen sobre un gen diana único como ocurre, al contrario, en el caso de los diversos tipos de

oligonucleótidos antisentido. Este aspecto constituye potencialmente una ventaja destacable porque elimina la posibilidad de aparición de resistencias en las poblaciones tratadas, porque no es presumiblemente posible que ningún organismo desarrolle resistencias simultáneamente a la inhibición de todas las funciones propias. Se sabe, de hecho, según la bibliografía científica, que la velocidad de comienzo de los fenómenos de resistencia en poblaciones de agentes parasitarios, patógenos e infestantes está estrechamente relacionada con el número de genes responsables de dicha resistencia. Más precisamente, cuanto menor el número de genes necesarios para el comienzo de la resistencia, mayor la velocidad según la cual esta resistencia se seleccionará positivamente en la población que se tiene que controlar (Prather et al. 2000. *Herbicide resistance: definitions and management strategies*. Universidad de California, División de Agricultura y Recursos Naturales, Oakland - Brent and Hollomon, 2007. *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?* Croplife International, Bruselas).

La invención se refiere, por lo tanto, al uso de composiciones para inhibir especies parasitarias, patógenas y/o infestantes en donde, como principio activo, se usan fragmentos aleatorios de ADN propio total, idénticos o similares al mismo genoma de la especie que se tiene que inhibir. Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende dichos fragmentos aleatorios de ADN total.

Además, los autores de la presente invención desarrollaron un procedimiento y el sistema relacionado para la producción o el crecimiento de microorganismos en biorreactores o fotobiorreactores o plantas en sistemas para cultivo hidropónico, en sustratos fuera del suelo, o en el suelo, mediante la separación de ácidos nucleicos de dichos microrganismos o plantas.

A continuación en la presente solicitud de patente, el término «nivel de saturación» significa que la fase establecida durante el crecimiento de los microorganismos, cuando la concentración de ácidos nucleicos o sus fragmentos en el medio de cultivo es tal que da como resultado una fase de estado estable considerando el transcurso del crecimiento de los microorganismos, con saturación de su curva de crecimiento. De la misma forma, el término «medio de agotamiento» significa un medio de cultivo en donde el nivel de concentración de los ácidos nucleicos y sus fragmentos logró una concentración que daba como resultado un nivel de saturación en el transcurso del crecimiento de los microorganismos.

En cuanto al término «recuperación» significa la operación adecuada para eliminar ácidos nucleicos y sus fragmentos del medio agotado.

«Medio regenerado» significa medio obtenido después de la recuperación del medio agotado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la evidencia experimental de que la exposición de un organismo a extractos de ADN propio total da como resultado un efecto inhibidor sobre las funciones de dicho organismo, limitando así el crecimiento o interfiriendo de manera fundamental con su fisiología a nivel celular.

Concretamente, el ADN total de un organismo parasitario, patógeno y/o infestante extraído y administrado sin selección de fragmentos específicos o el uso de construcciones específicas, puede usarse como producto inhibidor para el mismo organismo u otros organismos con genoma idéntico o similar. La acción inhibidora se ejerce cuando se pone en contacto la especie parasitaria, patógena y/o infestante, en su sustrato de crecimiento o a nivel sistémico, con ADN propio total fragmentado de manera aleatoria. Una vez absorbido, dicho ADN produce un efecto limitante sobre el crecimiento y un efecto inhibidor generalizado sobre las diversas funcionalidades del organismo, que ocurre de otro modo en el caso de aplicaciones de secuencias específicas de ácidos nucleicos dirigidas a efectos de «silenciamiento génico» o de «interferencia por ARN». La adsorción y la actividad inhibidora dependen de la concentración y el nivel de fragmentación de los ácidos nucleicos a que se expone el sistema. Se señala un efecto mayor dependiendo del grado de fragmentación de las moléculas usadas (por ejemplo, después de sonicación o siguiendo a descomposición natural). Los experimentos se llevaron a cabo usando varias longitudes promedio de fragmentos de ADN y se demuestra que el efecto inhibidor es más eficaz para mezclas de fragmentos con frecuencia de mayor longitud de aproximadamente 200 bases.

Específicamente, la producción de fragmentos aleatorios de ADN total extraído de diversas especies según experimentaciones ilustrativas se llevó a cabo con varias propuestas para demostrar que la técnica de fragmentación no influye en la eficacia del efecto inhibidor. Dicha fragmentación puede llevarse a cabo mediante degradación natural (exposición a factores ambientales), degradación artificial (por combustión, de manera enzimática o mecánica) o por síntesis (métodos para multiplicación aleatoria como DOP, esto es por PCR con oligonucleótidos degenerados).

Los autores de la presente invención llevaron a cabo estudios en plantas, hongos, insectos, levaduras, algas y protozoos. Los resultados de dicha experimentación demostraron de manera inequívoca la subsistencia general del efecto inhibidor descrito sobre cualquier especie tratada.

En el caso de las plantas, la presencia en solución acuosa del ADN total de una especie, obtenido por simple extracción y fragmentado de manera aleatoria, también a baja concentración, en contacto con las raíces de las mismas especies, produce rápidamente necrosis radical, clorosis de las hojas, interrupción de las actividades del meristemo y, cuando está en contacto con las semillas, supresión de la capacidad de germinación. Por el contrario, la exposición de las

raíces y/o las semillas de una especie a soluciones de ADN total fragmentado de manera aleatoria de diferentes especies no produce inhibiciones apreciables, tampoco para exposiciones a alta concentración, es decir, mostrando un efecto altamente específico de la especie. Es, por lo tanto, evidente que la presencia de ADN total fragmentado de manera aleatoria en un entorno de crecimiento puede llevar a cabo una función inhibidora selectiva sobre los organismos con genoma idéntico o similar no influyendo en otras especies. Es posible descubrir este efecto inhibidor tanto cuando el ADN total es fragmentado de manera artificial e insertado en el medio de crecimiento del sistema biológico como cuando el ADN es producido y segregado por dicho sistema biológico durante su crecimiento.

Esto, por lo tanto, hace posible una acción diana solo contra la especie parasitaria, patógena y/o infestante, por tratamientos con formulaciones que contienen ADN específico para esta especie, con la enorme ventaja de que dichas moléculas presentarán el efecto inhibidor solo sobre la especie diana, pero no sobre la especie que tiene que protegerse u otras especies, también en el caso de posibles exposiciones repetidas.

El mismo principio observado por los autores de la presente invención puede emplearse de manera favorable para aumentar los rendimientos de los procedimientos para la producción de microorganismos en biorreactores y fotobiorreactores, tanques para cultivo hidropónico y sistemas de cultivo fuera del suelo. De hecho, los autores de la presente invención, observaron, mediante ensayos de laboratorio usando biorreactores para crecimiento de algas, levaduras y bacterias, una acumulación de sobrenadante de fragmentos de ADN de diferente tamaño (aproximadamente de 50 a 800 pares de bases) que pertenecen a los mismos microorganismos producidos, durante las fases de crecimiento a concentraciones crecientes. Se observó que está acumulación ocurre en las fases de crecimiento a concentraciones crecientes y que da como resultado un efecto inhibidor sobre el crecimiento de dicho cultivo cuando se logran en los biorreactores la fase de estado estable y la fase de muerte sucesiva (figura 11A y 11B).

Los ensayos experimentales señalaron que existe un efecto autoinhibidor específico de la especie, ya que los cultivos de una especie determinada presentan inhibición solo por los sobrenadantes de los cultivos de la misma especie. Además, se observó que la eliminación del ADN del medio de cultivo es adecuada para eliminar el efecto inhibidor que permite que se restituya la fase de crecimiento y que se logren mayores densidades celulares en los biorreactores (figura 11C) y fotobiorreactores. De manera análoga, en los tanques para cultivos hidropónicos de plantas, en presencia de una producción decreciente en ausencia de reemplazo completo de la solución nutritiva que circula, se observó una acumulación en el sustrato de ADN de la especie cultivada. También en este caso, la eliminación del ADN acumulado del sustrato de crecimiento permitió que se restituyera la productividad.

Considerando estos resultados experimentales, por lo tanto, es posible desarrollar sistemas tecnológicos para la eliminación de ADN que ocurre en cultivos celulares (biorreactores y fotobiorreactores), tanques de cultivo hidropónico y en sistemas de cultivo fuera del suelo para que se optimicen las producciones.

Es, por lo tanto, un objeto específico de la descripción original de la presente invención el uso de una composición que comprende o que consiste en una mezcla de fragmentos de ADN total en donde dicho ADN total es fragmentado de manera aleatoria para la prevención y el tratamiento contra al menos una especie patógena, parasitaria o infestante de las plantas o del ambiente, en donde dicho ADN total es ADN total de dicha especie patógena, parasitaria o infestante y/o al menos una especie filogenéticamente similar, contra la que se dirigen dicha prevención y tratamiento. En la invención reivindicada, el uso de ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total está restringido a las limitaciones de las reivindicaciones 1 a 10.

Como se dijo anteriormente, la mezcla de fragmentos según la presente invención se obtiene por fragmentación del ADN total extraído de dicha especie patógena, parasitaria o infestante contra la que se dirige dicha prevención y tratamiento, sin llevar a cabo ninguna selección de los fragmentos, esto es usando todos los fragmentos obtenidos a partir del ácido nucleico.

Por lo tanto, según la presente invención se usa ADN completo fragmentado de manera aleatoria, esto es, sin llevar a cabo ninguna selección de secuencias específicas y/o de tamaño específico. Los fragmentos de dicho ADN total se obtienen mediante fermentación aleatoria del ADN total extraído o mediante síntesis de fragmentos aleatorios partiendo del ADN total. La diferencia sustancial de la técnica de la presente invención comparada con las técnicas actuales de «silenciamiento génico» e «interferencia por ARN» es que en el estado actual de la técnica las regiones específicas de los ácidos nucleicos que se tienen que usar deben seleccionarse de manera activa, mientras en el caso de la técnica de la presente invención no se requieren ni conocimiento previo ni selección para las secuencias específicas que se tienen que usar. Dicho ADN total puede extraerse de al menos dicha especie patógena, parasitaria o infestante o sintetizarse de manera artificial. El ácido nucleico puede multiplicarse y/o fragmentarse mediante procedimientos de tipo químico y/o físico y los fragmentos obtenidos posiblemente puedan multiplicarse más. Los métodos de producción de fragmentos aleatorios de ADN total incluyen, por ejemplo, métodos químicos, bioquímicos y moleculares, técnicas de sonicación, tratamientos térmicos y procedimientos de pirólisis. Por ejemplo, siguiendo a la extracción de ADN total de tejido foliar de *Arabidopsis thaliana*, la exposición de las semillas de la misma especie al extracto que contiene ADN en forma no fragmentada no presenta efectos inhibidores significativos. De diferente manera siguiendo a tratamientos de sonicación del extracto, usar un sonicador por inmersión durante tres o cuatro ciclos que duran tres minutos a una potencia del 80 % produce una mezcla de fragmentos aleatorios de diversos tamaños con una actividad inhibidora creciente, en función del grado de fragmentación alcanzado, en la germinación de semillas de *A. thaliana*. Las mismas mezclas de fragmentos aleatorios de ADN total extraído de *A. thaliana* no

presentan efecto inhibidor sobre otras especies tratadas, como *Lycopersicon aesculentum* y *Avena sativa* (usadas como bioensayo de control en este experimento). Se observaron resultados análogos cuando el extracto de ADN total fue fragmentado de manera aleatoria con otros métodos fisicoquímicos ya citados. Finalmente, se obtienen los mismos resultados exponiendo las semillas de *A. thaliana* a mezclas de fragmentos aleatorios del ADN total en donde dichos fragmentos se obtuvieron por multiplicación de ADN total usando DOP. La composición puede usarse como biocida, herbicida, fungicida, insecticida, acaricida, nematicida, antiprotozoario, algicida, bactericida. La composición puede administrarse a, al menos, dicha especie patógena, parasitaria o infestante por contacto superficial, administración citotrópica, administración sistémica mediante, por ejemplo, inyección, ingestión o inhalación o adsorción. La composición puede formularse en una forma, para tratamientos secos o líquidos, seleccionada del grupo que consiste en dispersión, por ejemplo, en forma de aerosol, suspensión, polvos humedecibles o solubles, emulsiones en agua u otros disolventes, gránulos dispersibles, suspensiones de microcápsulas, concentrados emulsionables, pastas fluidas, macroemulsiones, dispersiones de aceite, cebos. Según una realización particular, los fragmentos aleatorios de ácidos nucleicos pueden diseñarse en vectores. Una composición usada en la presente invención puede comprender además pesticidas seleccionados del grupo que consiste en: fungicidas, insecticidas, nematicidas, miticidas, artropocidas, bactericidas, algicidas.

Las realizaciones de un método según la invención para la prevención o el tratamiento contra al menos una especie patógena, parasitaria o infestante de las plantas o el ambiente comprenden o consisten en las siguientes etapas: a) extracción del ADN total de al menos una de dichas especies patógenas, parasitarias o infestantes contra las que se dirige dicha prevención y tratamiento; b) producción de fragmentos aleatorios de dicho ADN total para obtener una mezcla de fragmentos aleatorios de ADN y c) poner en contacto dicha mezcla de fragmentos aleatorios con dicha especie patógena, parasitaria o infestante.

Una composición que comprende o que consiste en una mezcla de fragmentos aleatorios de ADN total para el uso en la prevención y el tratamiento contra al menos una especie patógena, parasitaria o infestante de hombre o animal, en donde dicho ADN total es el ADN de al menos dicha especie patógena, parasitaria o infestante, contra la que se dirige dicha prevención y tratamiento, es un objeto más de la descripción original de la presente invención. En la invención reivindicada, el uso de ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo del ADN total está restringido a las limitaciones de las reivindicaciones 1 a 10. Dichos fragmentos aleatorios de ADN total pueden obtenerse por degradación del ADN total mediante métodos químicos y/o físicos o por síntesis de fragmentos aleatorios de dicho ADN total. La composición según la presente invención puede formularse para tratamientos secos o líquidos, o dispersión en aerosol, en forma de suspensiones, polvos humedecibles o solubles, emulsiones en agua u otros disolventes, gránulos dispersibles, suspensiones de microcápsulas, concentrados emulsionables, pastas fluidas y macroemulsiones, dispersiones de aceite, cremas, cápsulas y comprimidos. Las vías de administración incluyen tratamientos sistémicos y citotrópicos de contacto o superficie, por inyección, absorción, ingestión e inhalación, así como cualquier otra vía de administración útil para el fin de la aplicación. La composición según la presente invención puede incluir mezclas con otros compuestos químicos que actúen como agentes de pegajosidad, agentes humedecibles, agentes de suspensión, excipientes, agente enmendador y disolventes, agentes tensioactivos, así como otras sustancias útiles para el fin de la aplicación. Finalmente, la composición según la invención puede incluir otros compuestos farmacéuticos en formulaciones y mezclas de medios ni antagonistas ni posiblemente sinérgicos con la actividad de los tratamientos. En tales casos, la combinación de los compuestos corresponderá, en general, a relaciones en peso de aproximadamente 0 % a 100 %.

También es un objeto específico de la descripción original de la presente invención un procedimiento para producción de alto rendimiento de microorganismos en biorreactores o fotobiorreactores o para sistemas de cultivo o plantas tanto dentro como fuera del suelo, caracterizado por que los ácidos nucleicos de los mismos organismos producidos por dicho procedimiento se eliminan del medio de cultivo y el medio de cultivo privado de dicho ácido nucleico puede usarse de nuevo en dicho procedimiento. Este procedimiento para producción de alto rendimiento no es parte de la invención reivindicada.

Según el procedimiento, los ácidos nucleicos se eliminan del medio de cultivo o sustrato de crecimiento usando técnicas de separación seleccionadas del grupo que consiste en: unidad de eliminación externa, que consiste preferiblemente en un contenedor externo y un sistema para generación de campos eléctricos o magnéticos o electromagnéticos y al menos un conducto y al menos un medio de desplazamiento para la extracción de ácidos nucleicos concentrados del sistema precedente; unidad de eliminación integrada, que consiste preferiblemente en un sistema de generación de campos eléctricos, o magnéticos, o electromagnéticos y al menos un conducto y al menos un medio de desplazamiento para la extracción de ácidos nucleicos concentrados del sistema precedente, todo integrado en el mismo biorreactor; técnicas aplicables *in situ* y unidades fuera, preferiblemente técnicas de centrifugación; técnicas de filtración; tratamientos con ADNasa y otra enzimas de degradación para ácidos nucleicos; tratamientos térmicos; tratamientos acidificantes.

Preferiblemente, según el procedimiento, dichos ácidos nucleicos se eliminan del medio de cultivo mediante al menos una unidad de eliminación externa o integrada en el biorreactor o fotobiorreactor o sistemas para cultivo hidropónico usando técnicas seleccionadas del grupo que consiste en la aplicación de campos eléctricos estáticos, aplicación de campos magnéticos estáticos, aplicación de campos magnéticos y/o eléctricos dinámicos, centrifugación, filtración, tratamiento con ADNasa, tratamiento térmico, tratamiento acidificante.

Un sistema para producción de microorganismos que comprende al menos un biorreactor o fotobiorreactor o sistema para cultivo hidropónico, al menos una unidad para eliminación externa de ácidos nucleicos para al menos dicho biorreactor o fotobiorreactor o sistema para cultivo hidropónico es un aspecto ulterior de la descripción original de la presente invención, conectándose dicha unidad para eliminación de ácidos nucleicos a al menos dicho biorreactor o fotobiorreactor o sistema para cultivo hidropónico mediante al menos un primer conducto y al menos un primer medio de desplazamiento para la retirada de medio de cultivo que contenga ácido nucleico y al menos un segundo conducto y al menos un segundo medio de desplazamiento para la reintroducción en al menos dicho biorreactor o fotobiorreactor o sistema para cultivo hidropónico del medio de cultivo del que se eliminan los ácidos nucleicos; comprendiendo dicho sistema además al menos un tercer medio de desplazamiento para la retirada de ácidos nucleicos separados. Preferiblemente, dicho conducto puede ser un tubo. Dicho medio de desplazamiento puede ser preferiblemente una bomba. Este sistema para producción de microorganismos no es parte de la invención reivindicada.

La recuperación de medio de cultivo es realizable tanto de manera continua usando tratamientos para eliminación del ADN del medio de cultivo durante la fase de crecimiento como llevando a cabo un tratamiento del medio de agotamiento cuando ocurre la fase de saturación del crecimiento celular.

La recuperación de medio de cultivo puede llevarse a cabo «*in situ*» directamente en los biorreactores o fotobiorreactores usando tratamientos con enzimas u otros compuestos activos para la degradación del ADN que ocurre en el sobrenadante de los cultivos celulares o usando técnicas para la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o electromagnéticos. La recuperación usando estas técnicas demuestra que es viable aprovechando las características de polaridad de las moléculas de ácido nucleico separables, por lo tanto, por campos eléctricos, o usando técnicas para magnetización de moléculas de ADN por su unión a moléculas magnéticas y aplicando campos magnéticos para su separación. Alternativamente, la recuperación puede llevarse a cabo usando un sistema de eliminación colocado fuera del biorreactor (figura 12 A) o cultivo hidropónico (figura 13A) con recirculación de medio regenerado o un sistema integrado de eliminación del biorreactor (figura 12 B) o cultivo hidropónico (figura 13B).

Las técnicas para la eliminación del ADN del medio de cultivo pueden ser: técnicas para aplicación de campos eléctricos estáticos (figura 14); técnicas para la aplicación de campos magnéticos estáticos (figura 15); técnicas para la aplicación de campos magnéticos y/o eléctricos dinámicos; centrifugación; técnicas de filtración; tratamiento con ADNasa; tratamientos térmicos; tratamiento acidificante.

Según un ejemplo, que no es parte de la invención reivindicada (figura 12A), al menos dicho biorreactor (1) puede conectarse a al menos dicha unidad (4) de eliminación externa de tal manera que se transfiera el medio de cultivo agotado en al menos dicha unidad (4) de eliminación mediante al menos un primer conducto (2) y al menos un primer medio (3) de desplazamiento para la retirada de medio de cultivo que contenga ácido nucleico. En dicha unidad (4), la recuperación puede llevarse a cabo usando una de las técnicas mencionadas para eliminación de ADN del medio. En este punto, el ácido nucleico separado será recogido por la unidad (4) de eliminación, preferiblemente mediante al menos un tercer conducto (5) y al menos un tercer medio (6) de desplazamiento para la retirada de ácido nucleico separado, mientras se introduce el medio regenerado en al menos dicho biorreactor (1) mediante al menos un segundo conducto (7) y al menos un segundo medio (8) de desplazamiento.

Además, la integración de los equipos de fertirrigación en campo abierto o en cultivo protegido con sistemas para la eliminación de ácidos nucleicos representa una aplicación más que no es parte de la invención reivindicada en este momento. Se indica un posible diagrama de dicha aplicación en la figura 16, en donde se integra un tanque con una solución que contiene nucleasa en un equipo de fertirrigación.

El uso de fragmentos aleatorios de ADN total para el control y la inhibición de especies parasitarias, infestantes y/o patógenas en agricultura y medicina, comparado con las técnicas y los productos existentes, da como resultado ventajas significativas.

Una primera ventaja resulta de la selectividad absoluta de los tratamientos con fragmentos aleatorios de ADN total de la especie parasitaria, infestante y/o patógena, porque dichos fragmentos aleatorios de ADN total no presentan efectos sobre las especies diferentes de las tratadas.

El uso de fragmentos aleatorios de ADN total de la especie parasitaria, infestante y/o patógena no induce la aparición de resistencia en poblaciones de las mismas especies, porque su mecanismo de acción es diferente del de los productos comercializados en la actualidad o en experimentación (incluyendo los métodos de interferencia por ARN y ASO), ya que se basan en una interferencia múltiple y contemporánea con el genoma entero con el sistema entero de transcripción y de síntesis de proteínas, no permitiendo así que se establezca una resistencia y selección específicas de poblaciones resistentes.

Una ventaja más resulta de la ausencia de toxicidad ocasionada por el uso de ácidos nucleicos, que, siendo metabolitos primarios, ubiquitarios por naturaleza, no dan como resultado contaminación ambiental. De hecho, la administración de fragmentos de ácidos nucleicos no específicos no presenta toxicidad para especies distintas de las tratadas.

La presente invención proporciona además una simplificación destacable de la investigación de nuevos fármacos con un consiguiente gran beneficio económico. De hecho, la detección de especies parasitarias, patógenas e infestantes constituye la única condición necesaria para la preparación del fármaco específico para el tratamiento farmacológico. Por el contrario, la investigación farmacológica actual para productos basada en técnicas como la interferencia por ARN o el uso de oligonucleótidos antisentido, no solo requiere el conocimiento de la secuencia genómica completa del organismo diana, sino también el conocimiento detallado de las funcionalidades de los genes para detectar posibles secuencias específicas que sean diana para actividad inhibidora.

Por otra parte, la investigación farmacológica tradicional se basa en estudios de «examen aleatorio» de compuestos sintéticos o moléculas que se encuentran naturalmente. Dichas sustancias, una vez detectadas y realizados ensayos en cuanto a su actividad, en la mayoría de los casos se caracterizan también por una toxicidad general para otros organismos y seres humanos. En la práctica, la aplicación de dichos productos con frecuencia se asocia a preocupaciones por la contaminación ambiental debido a su toxicidad.

Una ventaja más resulta de la disponibilidad relativamente fácil y la producción masiva de ácido nucleico que satisface los requerimientos de la patente del título. De hecho, los fragmentos aleatorios del ADN total del organismo diana pueden obtenerse por propuestas y metodologías ahora extremadamente difundidas en el campo biomolecular. Las técnicas pueden basarse en extracción del material genético de los organismos diana o mediante síntesis.

Además, la estabilidad de los fragmentos de ADN puede asegurar la persistencia en el tiempo también en condiciones ambientales desfavorables (por ejemplo, en el suelo), dando como resultado, por lo tanto, aplicaciones duraderas que dan como resultado beneficios tanto ambientales como económicos.

Una ventaja más resulta del hecho de que puede obtenerse el ADN para los usos propuestos por extracción de material que se encuentra naturalmente o mediante la síntesis basándose en técnicas de síntesis y extracción y multiplicación también, ahora extensamente difundidas y probadas en biología molecular. Los ejemplos significativos, pero no restrictivos, de posibles técnicas de producción incluyen la disolución de los tejidos celulares, la inactivación de las nucleasas celulares y la recuperación de ácidos nucleicos de la solución que contiene lisados biológicos.

Los ácidos nucleicos son además sintetizables partiendo de moléculas plantilla o *de novo* según diferentes propuestas.

Las moléculas consideradas pueden multiplicarse, produciéndose así múltiples copias idénticas o similares a la plantilla considerada, por ejemplo, por clonación o técnicas basadas en PCR.

Las variantes de PCR son útiles para producir el principio activo que se tiene que usar asegurando la multiplicación aleatoria de los fragmentos de ácidos nucleicos a partir de una muestra de plantilla. Por ejemplo, una propuesta como ADN polimórfico multiplicado de manera aleatoria (RAPD, en inglés) es muy adecuada para nuestro fin, no requiriendo, de otro modo que la PCR clásica, conocimiento de la secuencia de la plantilla de ADN de partida.

La PCR de emulsión representa otro ejemplo de propuesta innovadora adecuada para asegurar de una manera extremadamente rápida la multiplicación de varios fragmentos de ADN partiendo de una muestra de ADN genómico atomizada de manera que se obtengan de 300 a 800 fragmentos largos de nucleótidos o de amplicones obtenidos por otras propuestas.

Además, en cuanto a los procedimientos de producción de microorganismos en biorreactores y fotobiorreactores y tanques para cultivo hidropónico, la eliminación de medio de cultivo agotado y la resuspensión de las células en medio «regenerado», a igual concentración celular por unidad de volumen y en las mismas condiciones del contorno, permiten la restitución de la fase de crecimiento del cultivo.

Además de la ventaja del aumento de la producción que resulta de la eliminación del factor de inhibición, una ventaja destacable adicional resulta de la posibilidad de reutilización del medio agotado, después de su regeneración, para otros cultivos sucesivos, posiblemente no viable en los sistemas de producción actuales.

La presente invención se describirá ahora de modo ilustrativo, por una manera ilustrativa pero no limitante, con referencia particular a ejemplos incorporados y a los dibujos adjuntos, en donde:

La figura 1 muestra una vista conceptual del objeto de la invención.

La figura 2 muestra la inhibición de la germinación de las semillas de *Lepidium* y *Acanthus* por exposición a ADN propio en la concentración óptima de 200 ppm.

La figura 3 muestra la inhibición de plantas de *Quercus ilex, Quercus pubescens, Hedera elix, Ampelodesma mauritanica, Festuca drimeja, Coronilla emerus, Medicago marina, Alnus cordata, Robinia pseudoacacia, Pinus halepensis* por exposición al propio ADN.

La figura 4 muestra la inhibición de plantas de *Arabidopsis thaliana* por exposición a ADN propio y de *Lycopersicon esculentum*.

La figura 5 muestra el efecto inhibidor en la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa de *Aspergillus niger* cuando se expone dicho hongo a los ADN propios o de otras especies de hongo (*Trichoderma hartianum*).

La figura 6 muestra la inhibición de insecto *Sarcophaga carnaria* por exposición al propio ADN.

La figura 7 muestra la metamorfosis completada en porcentaje, comparado con un control no expuesto, en larvas de díptero *Sarcophaga carnaria* expuesto durante 4 semanas a ADN homólogo en tres concentraciones diferentes o ADN heterólogo extraído de hongo (*Penicillium chrysogenum*) o bacterias (*Bacillus subtilis*).

La figura 8 muestra los recuentos viables en bacteria *Bacillus subtilis* en cultivos expuestos durante 24 horas a ADN homólogo en tres concentraciones diferentes y en control no expuesto.

La figura 9 muestra la germinación de las esporas en el hongo *Trichoderma harzianum*, en porcentaje, comparado con control no expuesto, en cultivos expuestos a ADN homólogo en tres concentraciones diferentes o un ADN heterólogo extraído de otro hongo (*Aspergillus niger*), insecto (*Sarcophaga carnaria*) o bacteria (*Bacillus subtilis*).

La figura 10 muestra dinámicas de crecimiento de microalgas *Scenedesmus obliquus* en dos cultivos expuestos a ADN homólogo en diferente concentración y control no expuesto.

La figura 11 muestra la acumulación de ADN extracelular en el sustrato líquido de dos biorreactores diferentes.

La figura 12 muestra: (a) el diagrama del sistema para la producción de microorganismos en biorreactor (no según la invención reivindicada) caracterizado desde una unidad externa para eliminación de ADN; (b) el diagrama del sistema para producción de microorganismos en biorreactor en donde la eliminación de ADN del medio de cultivo ocurre mediante una unidad de eliminación integrada del biorreactor.

La figura 13 muestra: (a) un tanque para cultivo hidropónico (no según la invención reivindicada) caracterizado a partir de la presencia de una unidad de ADN de eliminación externa y recirculación de medio de cultivo en el sistema hidropónico; (b) un tanque para cultivo hidropónico en donde la eliminación del ADN del medio de cultivo ocurre mediante la unidad de eliminación integrada en el mismo tanque.

La figura 14 muestra un diagrama específico de la unidad de eliminación externa para el sistema representado en la figura 12 (no según la invención reivindicada), en donde la separación de ácido nucleico ocurre por aplicación de un campo eléctrico.

La figura 15 muestra un diagrama más de la unidad de eliminación para el sistema mostrado en la figura 12 (no según la invención reivindicada), en donde la separación de ácido nucleico ocurre por aplicación de un campo magnético.

La figura 16 muestra un diagrama de cultivo de plantas en donde se trata el sustrato con nucleasa por integración con sistema de fertirrigación (no según la invención reivindicada).

En todos los ejemplos de los experimentos indicados, la composición de ácidos nucleicos usada en los diferentes tratamientos se preparó según el procedimiento explicado de líneas generales en la figura 1. En particular, el ADN total extraído con procedimientos estándar de material orgánico (hojas, micelio de hongo, biomasa microbiana) fue tratado por sonicación durante al menos tres ciclos que duraron tres minutos a potencia máxima con sonicación por inmersión hasta obtener la producción de composición de fragmentos aleatorios que caen en un rango de 50 a 1000 pares de bases de tamaño. La verificación del nivel de fragmentación se lleva a cabo por procedimientos estándar usando electroforesis de gel de agarosa o poliacrilamida y técnicas de tinción, tipo Sybr safe y visualización por luz ultravioleta.

Ejemplo 1: Inhibición de plantas *Acanthus mollis* y *Lepidium sativum* por exposición a ADN propios

Se llevó a cabo un primer experimento en plantas *Acanthus mollis* y *Lepidium sativum*, se seleccionó la última especie porque es particularmente sensible a las toxinas. Los ADN de acanto, *Acanthus mollis,* y berro, *Lepidium sativum,* se obtuvieron por extracción directa de hojas de las dos especies y se almacenaron en H_2O destilada. Sucesivamente, se colocaron 10 semillas previamente esterilizadas de *A. mollis* o *L. sativum*, en placas de Petri (de 9 cm de diámetro) en una lámina de papel de filtro estéril. Se trataron las semillas de cada especie por separado con el ADN de las dos especies en concentraciones de 2, 20 y 200 partes por millón, al tiempo que se añadió H_2O estéril al control. La germinación de las dos especies y la longitud total de las raíces se cuantificaron al cabo de 7 días de incubación a 24 °C por observación y medición de las raíces. Cada tratamiento se repitió tres veces.

El tratamiento de las semillas de las dos especies con el ADN extraído de las plantas de las dos especies, aplicado por separado, permitió estimar el efecto del ADN sobre el crecimiento de las raíces y la concentración para actividad óptima. Los resultados de la experimentación, indicados en la figura 2, demuestran que tanto las semillas de lepidio como las semillas de acanto se inhiben en la germinación por exposición al propio ADN en una concentración óptima de 200 ppm. Por el contrario, la exposición de las semillas al ADN de otras especies no demuestra efectos perceptibles sobre la germinación de las semillas.

Ejemplo 2: Inhibición de las plantas *Quercus ilex, Quercus pubescens, Hedera elix, Ampelodesma mauritanica,*

Festuca drimeja, Coronilla emerus, Medicago marina, Alnus cordata, Robinia pseudoacacia, Pinus halepensis por exposición al propio ADN

Un segundo experimento se refirió al análisis de la germinación y el crecimiento de la raíz de 10 especies de plantas de ambiente natural. Se trataron por separado semillas esterilizadas superficialmente de las plantas *Quercus ilex, Quercus pubescens, Hedera elix, Ampelodesma mauritanica, Festuca drimeja, Coronilla emerus, Medicago marina, Alnus cordata, Robinia pseudoacacia, Pinus halepensis*, con los ADN de todas las especies aplicados en la concentración de 500 ppm. Al cabo de poco tiempo, se pusieron en placas de Petri (de 9 cm de diámetro) 10 semillas de cada especie en una lámina de papel de filtro estéril. Se añadieron los diferentes ADN en una concentración de 500 ppm a las placas mientras solo se añadió H_2O estéril al control. La germinación de las semillas de las especies y la longitud total de las raíces se cuantificaron después de 7 días de incubación a 24 °C por observación y medición de las raíces. Cada tratamiento se repitió tres veces. Los resultados, indicados en la figura 3 (promedio de los ensayos llevados a cabo en las diferentes especies indicadas anteriormente), demuestran la inhibición de la germinación resultante de la exposición a ADN propio y la ausencia de inhibición en presencia de ADN heterólogo.

Ejemplo 3: Inhibición de las plantas *Arabidopsis thaliana, Lycopersicon esculentum, Lepidium sativum* y *Lens esculentum* por exposición al propio ADN. Un tercer experimento se refirió a la evaluación de la toxicidad, de nuevo por ensayos de germinación y crecimiento de las raíces, en varias especies vegetales por ácido nucleico extraído de las mismas especies. Se obtuvieron los ADN de las plantas *Arabidopsis thaliana, Lycopersicon esculentum, Lepidium sativum* y *Lens esculentum* por extracción directa de las respectivas plantas y se almacenaron en H_2O destilada. Se pusieron sucesivamente 10 semillas esterilizadas previamente de cada especie en placas de Petri (de 9 cm de diámetro) en una lámina de papel de filtro estéril. Se trataron por separado las semillas de cada planta con los ADN de las cuatro especies en concentraciones de 2, 20 y 200 partes por millón, mientras se añadió H_2O estéril al control. Se llevaron a cabo los experimentos en semilleros en condiciones controladas y esterilidad completa. La germinación de las cuatro especies y la longitud total de las raíces se cuantificaron después de 7 días de incubación a 24 °C por observación y medición de las raíces. Cada tratamiento se repitió tres veces. Las cuatro especies demostraron un comportamiento análogo, con un efecto inhibidor destacable en presencia de ADN propio y la ausencia de efectos en presencia de los ADN de las otras especies. El efecto inhibidor probó que estaba relacionado positivamente con la concentración de ADN. Con el fin de presentar ejemplos, se indican *Arabidopsis thaliana* en presencia de ADN propio y ADN de *Lycopersicon esculentum*, respectivamente. Se observan resultados de inhibición similares en *Arabidopsis thaliana,* cuando se exponen semillas de esta especie a ADN de la misma especie obtenido por multiplicación de fragmentos del mismo ADN usando técnicas PCR.

Ejemplo 4: Inhibición de hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* por exposición a ADN propio

Se llevó a cabo un cuarto experimento sobre el hongo *Aspergillus niger* para estimar el efecto del ADN propio y ADN aislado de otro hongo, es decir, *Trichoderma harzianum,* en el crecimiento celular. Se obtuvieron esporas de *Aspergillus niger* por cultivos puros en laboratorio en sustrato tratado con agar (PDA, patata-dextrosa-agar). Se retiraron las esporas en condiciones de esterilidad y se diluyeron a una concentración de 1 x 10^6 esporas/ml. Se llevó a cabo el experimento de germinación en sustrato líquido (10 % de PDB) en placas ELISA de 96 pozos. Se llevó a cabo el tratamiento comparativo con ADN de *Trichoderma harzianum***,** usado como heterólogo, mientras que no se trató el control. Se aplicaron los ADN extraídos de ambas especies en concentraciones de 100 ppm y 1000 ppm. Al cabo de poco tiempo, en cada pozo, con un volumen total de 100 µl, se añadieron esos dos ADN por separado en diferentes concentraciones, junto con 10 µl de sustrato nutritivo líquido (PDB, caldo de patata y dextrosa, por sus siglas en inglés), agua estéril y esporas de *A. niger*. Se cuantificaron la germinación de las esporas y la longitud del tubo germinativo por lecturas espectrofotométricas y microscopio óptico después de 20 horas de incubación a 24 °C. Los resultados, indicados en la figura 5, demuestran un efecto inhibidor destacable sobre la germinación de las esporas y el crecimiento de la hifa de *A. niger* solo cuando se expuso dicho hongo a ADN propio.

Ejemplo 5: Inhibición del insecto *Sarcophaga carnaria* por exposición a ADN propio.

Se llevó a cabo un quinto experimento sobre el insecto *Sarcophaga carnaria* para estimar el efecto del ADN propio sobre el ciclo vital. Se criaron larvas del díptero *Sarcophaga carnaria* en cultivo puro de laboratorio a la temperatura de 10 °C y se alimentaron con carne picada. Se llevó a cabo el experimento de toxicidad del ADN en placas de plástico cuadradas (12 x 12 cm de tamaño, 2 cm de altura). Se llevaron a cabo tratamientos comparativos con los ADN de *Bacillus subtilis* y *Lepidium sativum,* usados como ADN heterólogo. Como control se usó solo carne picada sin la adición de otros tratamientos. Se añadieron los ADN extraídos del díptero y de otras dos especies a la carne picada en concentraciones de 2, 20 y 200 partes por millón, con mezclador de agitación. Al cabo de poco tiempo, se añadió en cada placa ADN en las diversas concentraciones, agitado con 1 g de carne picada. Se incubaron las placas a 10 °C en la oscuridad durante 21 días. El desarrollo, la supervivencia y el tiempo requeridos para la formación de la pupa se vigilan cada 3 días durante los 21 días de incubación. Las larvas en las condiciones de control, así como las tratadas con ADN heterólogo, presentaron un ciclo vital regular. Por el contrario, la exposición al propio ADN inhibió el ciclo vital ocasionando la muerte de la larva de manera proporcional a la concentración del tratamiento. Las figuras 6 y 7 indican los resultados ya descritos.

Ejemplo 6: Inhibición del microorganismo *Bacillus subtilis* por exposición a ADN propio

Para demostrar el posible uso de ácido nucleico como antibiótico se llevó a cabo una evaluación de la toxicidad en *Bacillus subtilis* tratado con ADN propio en varias concentraciones. El experimento se realizó usando un sustrato de crecimiento de 4 ml de LB (caldo Luria, por sus siglas en inglés) inoculado con 10 µl de precultivo de *Bacillus subtilis*. El tratamiento consistió en la preparación de los cultivos en presencia de ADN de *Bacillus subtilis* en las concentraciones finales de 4, 40 y 400 partes por millón. Se inocularon los cultivos con agitación a 35 °C durante 24 h con tres repeticiones del tratamiento. Después de 24 horas de incubación, se retiraron de cada tubo de ensayo 0,5 ml y se diluyeron en serie en medio LB, del que se pusieron 100 microlitros de medio LB tratado con agar en placas de Petri. Se incubaron las placas a 28 °C hasta la aparición de colonias (UFC - unidades formadoras de colonias). Los resultados indicados en la figura 8 demuestran una disminución dependiente de la concentración destacable de las UFC, como respuesta al tratamiento.

Ejemplo 7: Inhibición del hongo *Trichoderma harzianum* por exposición a ADN propio

Para demostrar el posible uso de ácidos nucleicos como fungicida y su especificidad de acción se llevó a cabo un experimento sobre la germinación de las esporas en el hongo *Trichoderma harzianum*. Se obtuvieron esporas de *Trichoderma harzianum* por cultivos de laboratorio puros sobre sustrato tratado con agar (PDA, patata-dextrosa-agar). Se retiraron las esporas en condiciones de esterilidad y se diluyeron a una concentración de 1 x 10^6 esporas/ml. Se llevó a cabo el experimento de germinación en sustrato líquido (10 % de PDB) en placas ELISA de 96 pozos. Se llevó a cabo el tratamiento con ADN homólogo o heterólogo, que se extrajo de la misma especie de *Trichoderma*, o de una especie diferente de hongo (*Aspergillus niger*), de un insecto (*Sarcophaga carnaria*) o de una bacteria (*Bacillus subtilis*). Se aplicó el ADN extraído de las diferentes especies en concentraciones de 8, 80 y 800 partes por millón. Al cabo de poco tiempo, se añadió en cada pozo, con un volumen total de 100 µl, ADN por separado en diferentes concentraciones, junto con 10 µl de sustrato nutritivo líquido (PDB, caldo de patata y dextrosa), agua estéril y esporas de *Trichoderma*. La germinación de las esporas y la longitud del tubo germinativo se cuantificaron por lecturas espectrofotométricas y microscopio óptico después de 20 horas de incubación a 24 ºC.

La figura 9 indica los resultados del experimento, que demuestran un efecto inhibidor destacable dependiente de la concentración, sobre la germinación de las esporas *Trichoderma* solo por ADN de la misma especie de hongo. Por el contrario, el tratamiento con ADN de varias especies presenta efectos estimulantes sobre la germinación (valores en porcentaje comparado con control no expuesto mayor que 100 %).

Ejemplo 8: Inhibición de las microalgas *Scenedesmus obliquus* por exposición a ADN propio

Para demostrar el posible uso de ADN como producto algicida se llevó a cabo un ensayo de crecimiento de alga verde *Scenedesmus obliquus* en condiciones de control óptimas y en presencia de ADN propio en el sustrato de cultivo (CHU#10). Los tratamientos se llevaron a cabo a dos concentraciones diferentes (50 ppm y 500 ppm) con dos repeticiones. La figura 10 muestra las dinámicas de crecimiento de las algas y demuestra un efecto inhibidor destacable dependiente de la concentración del ADN homólogo comparado con control no expuesto.

Ejemplo 9: Inhibición del protozoo *Physarium polycephalum* por exposición a ADN propio

Para demostrar el posible uso de ADN como producto antiprotozoario se llevó a cabo un experimento sobre protozoo *Physarium polycephalum*. Se usó como material experimental el estuche de cultivo producido en «Carolina Biological Supply». Los cultivos se iniciaron en placas de Petri con agua y agar para favorecer el movimiento del organismo. Como nutriente se usaron copos de avena. Se llevó a cabo un primer cultivo masivo en 20 placas y se recogió la biomasa protozoaria producida al cabo de quince días y se usó para extracción del ADN usando el estuche Quiagen. El experimento sucesivo consistió en la preparación de tres placas de Petri llenadas de agua y agar, a lo que se añadieron dos porciones pequeñas de copos de avena, una para control humedecida con 5 ml de agua destilada y la otra con adición de 5 ml de agua con ADN del protozoo en una concentración de 200 ppm. Se repitió el experimento otras dos veces, con la variación de que el ADN añadido fue de bacteria (*Bacillus subtilis*) e insecto (*Sarcophaga carnaria*). Los resultados de los experimentos demostraron la ausencia de crecimiento de *Physarium polycephalum* en el sustrato tratado con ADN del mismo protozoo, mientras el organismo no demostró diferencias de crecimiento en las condiciones de control o en presencia de ADN heterólogo.

Ejemplo 10: Estudio del procedimiento de producción de levaduras, bacterias y algas en biorreactores y fotobiorreactores

Considerando las demostraciones ya indicadas acerca del efecto inhibidor en diferentes especies cuando se exponen a ADN propio, se llevaron a cabo análisis de comprobación sobre la presencia de ADN extracelular en el sustrato de crecimiento en biorreactores y fotobiorreactores con cultivos celulares a alta densidad en condiciones de desaceleración del crecimiento, incluso si ocurría en presencia de sustrato nutritivo óptimo. El estudio implicó el muestreo de sobrenadante líquido de diferentes cultivos en biorreactores en las fases de crecimiento exponencial, desaceleración y estado estable. El análisis se refirió a cultivos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria *Bacillus subtilis* y microalga *Phaeodactylum tricornutum* y *Scenedesmus obliquus*. Se analizaron las muestras de los sobrenadantes de cultivo celular obtenidos por dos ciclos de centrifugación a 314 rad/s (3000 rpm) durante quince minutos para separar posibles residuos celulares y someterlos después a electroforesis de gel después de tratamiento con Syber-Safe y evaluación de la fluorescencia. La figura 11 demuestra los resultados de algunos de estos análisis

a partir de los cuales es evidente la acumulación de ADN extracelular en el sustrato líquido de los biorreactores. Esta acumulación está claramente asociada a la desaceleración del crecimiento de los diferentes cultivos celulares y a la consecución de la fase de estado estable (figuras 11A y 11B). La figura 11C demuestra claramente cómo la eliminación del ADN extracelular del medio de cultivo por procedimientos fisicoquímicos y la siguiente introducción de sustrato regenerado en el reactor da como resultado la eliminación del efecto inhibidor y una consiguiente restitución del crecimiento del cultivo celular.

REIVINDICACIONES

1. Método no terapéutico para inhibir una especie, la especie diana, que comprende exponer dicha especie diana a una composición que comprende ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total, siendo dicho ADN total de dicha especie diana o de una especie filogenéticamente similar, en donde la especie filogenéticamente similar es una especie cuyo ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total se inhibe para la especie diana.

2. Método no terapéutico según la reivindicación 1, en donde la especie que tiene que inhibirse se selecciona de una especie patógena, parasitaria o infestante.

3. Método no terapéutico según la reivindicación 1, en donde la composición se selecciona de una composición de biocida, herbicida, fungicida, insecticida, acaricida, nematicida, antiprotozoario, algicida o bactericida.

4. Método no terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición comprende además compuestos pesticidas seleccionados del grupo que consiste en: fungicidas, insecticidas, nematicidas, miticidas, artropocidas, bactericidas o algicidas.

5. Composición que comprende ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total, para uso en el tratamiento terapéutico contra una especie parasitaria, patógena o infestante, siendo dicho ADN total de dicha especie parasitaria, patógena o infestante o de una especie filogenéticamente similar, en donde la especie filogenéticamente similar es una especie cuyo ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total se inhibe para la especie contra la que se destina el tratamiento.

6. Composición para uso según la reivindicación 5, en donde la composición comprende además compuestos pesticidas seleccionados del grupo que consiste en: fungicidas, insecticidas, nematicidas, miticidas, artropocidas, bactericidas.

7. Uso no médico de ADN de una especie obtenida por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total de dicha especie, para inhibir dicha especie o una especie filogenéticamente similar, en donde la especie filogenéticamente similar es una especie inhibida por dicho ADN obtenido por fragmentación aleatoria de ADN total extraído o por síntesis de fragmentos aleatorios partiendo de ADN total.

8. Uso no médico según la reivindicación 7, en donde el ADN se usa como agente antipatógeno, antiparasitario o antiinfestante.

9. Uso no médico según la reivindicación 7, en donde el ADN se usa como un biocida, herbicida, fungicida, insecticida, acaricida, nematicida, antiprotozoario, algicida o bactericida.

10. Uso no médico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el ADN está en una composición que comprende además compuestos pesticidas seleccionados del grupo que consiste en: fungicidas, insecticidas, nematicidas, miticidas, artropocidas, bactericidas o algicidas.

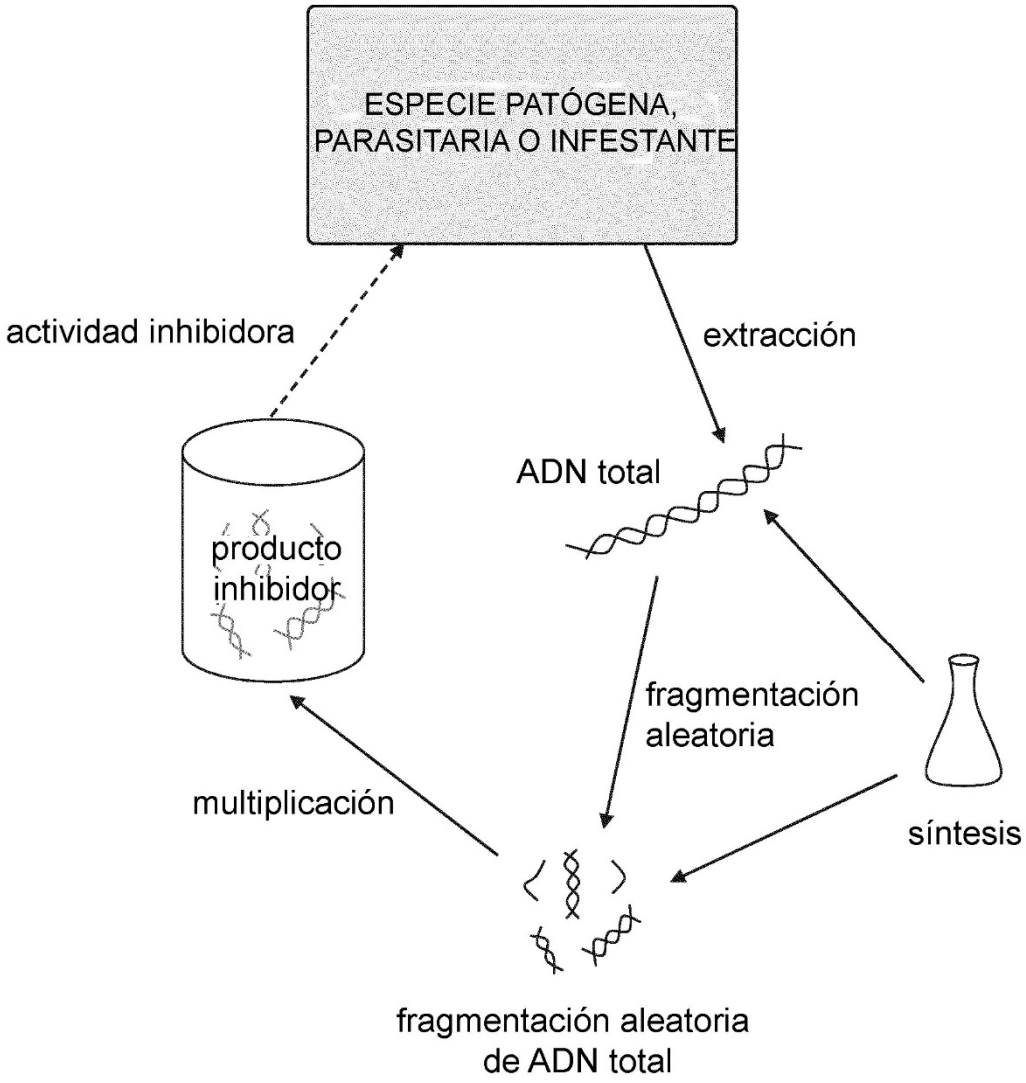

ESPECIE PATÓGENA,
PARASITARIA O INFESTANTE
actividad inhibidora
extracción
producto
inhibidor
ADN total
fragmentación
aleatoria
multiplicación
síntesis
fragmentación aleatoria
de ADN total

Fig. 1

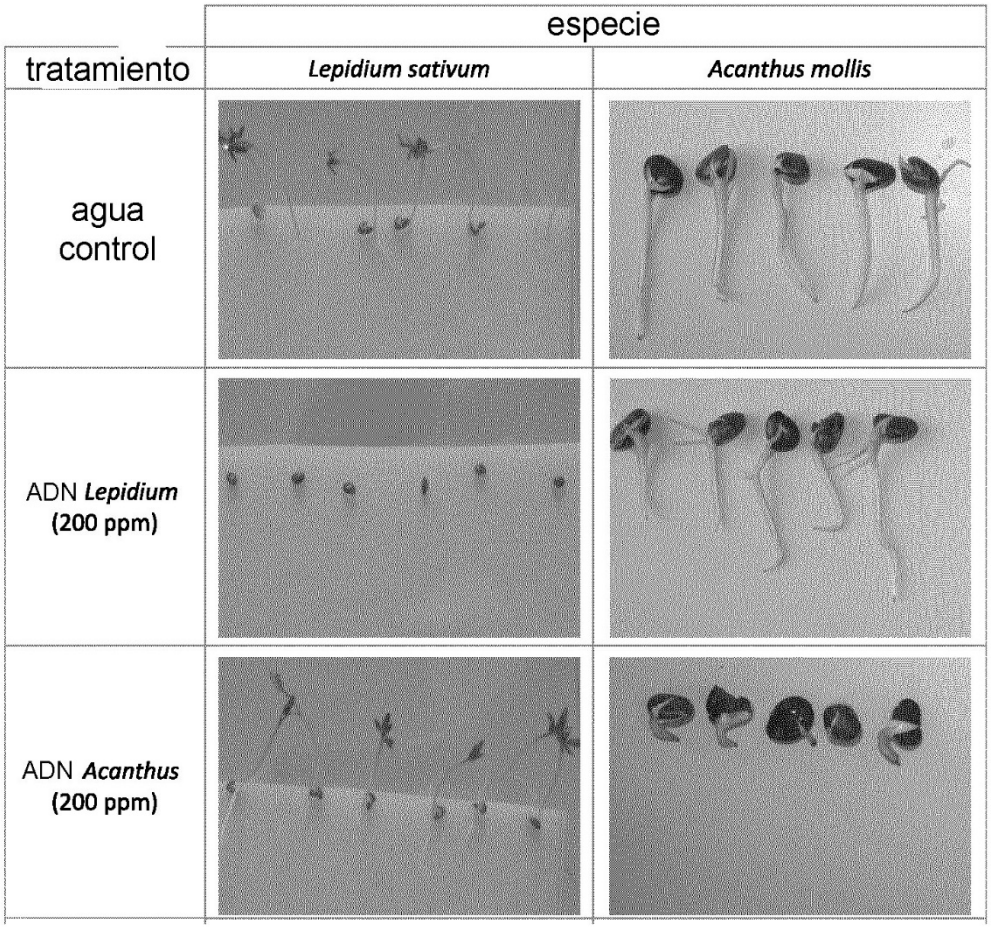

especie
tratamiento
Lepidium sativum
Acanthus mollis
agua control
ADN Lepidium (200 ppm)
ADN Acanthus (200 ppm)

Fig. 2

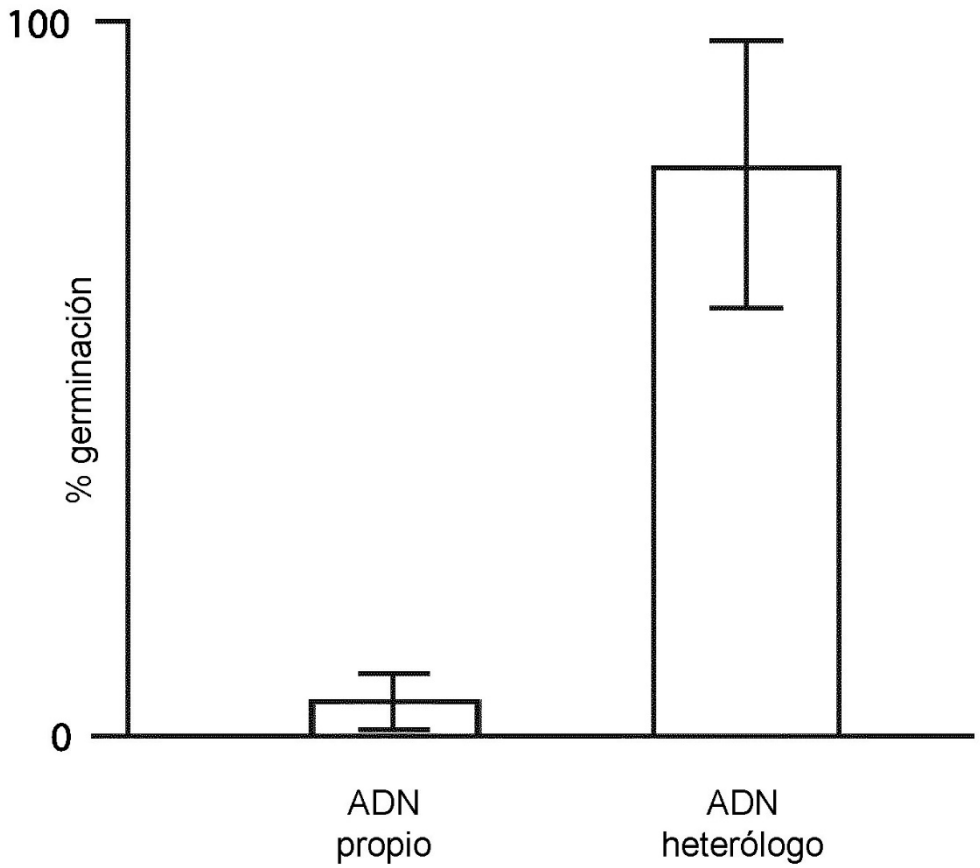


Fig. 3

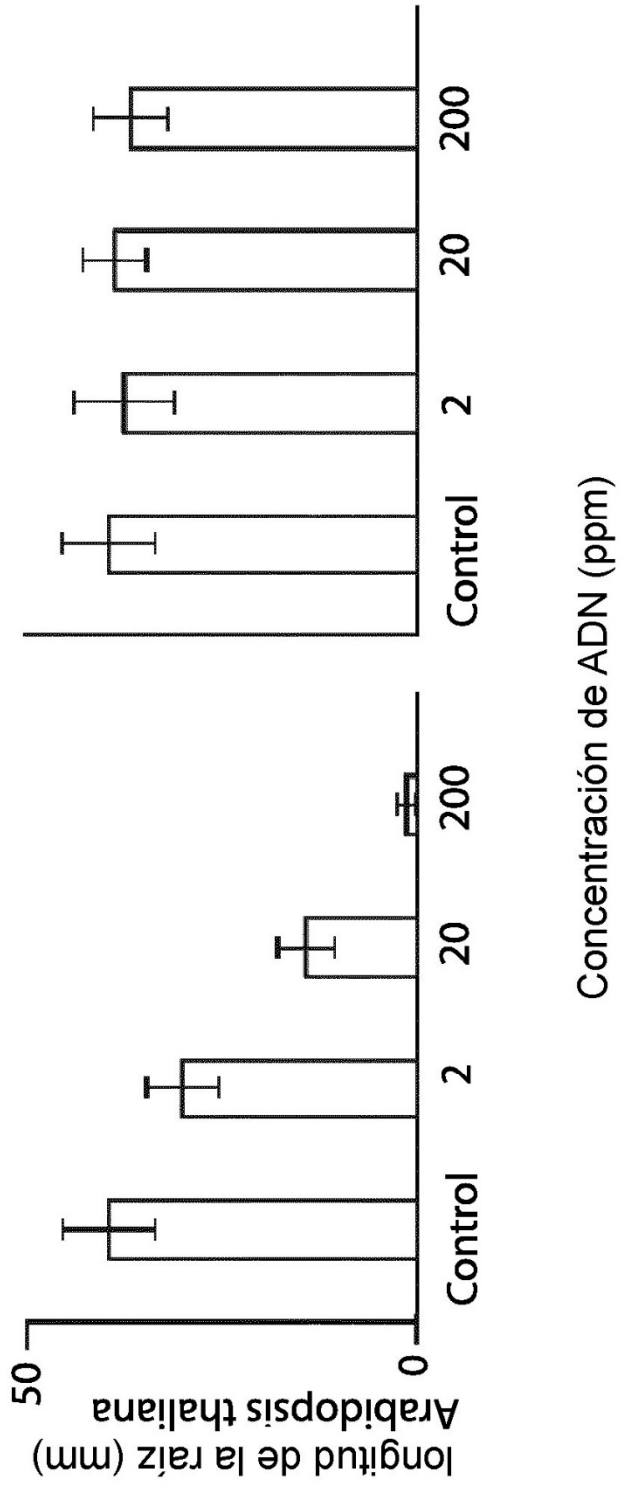
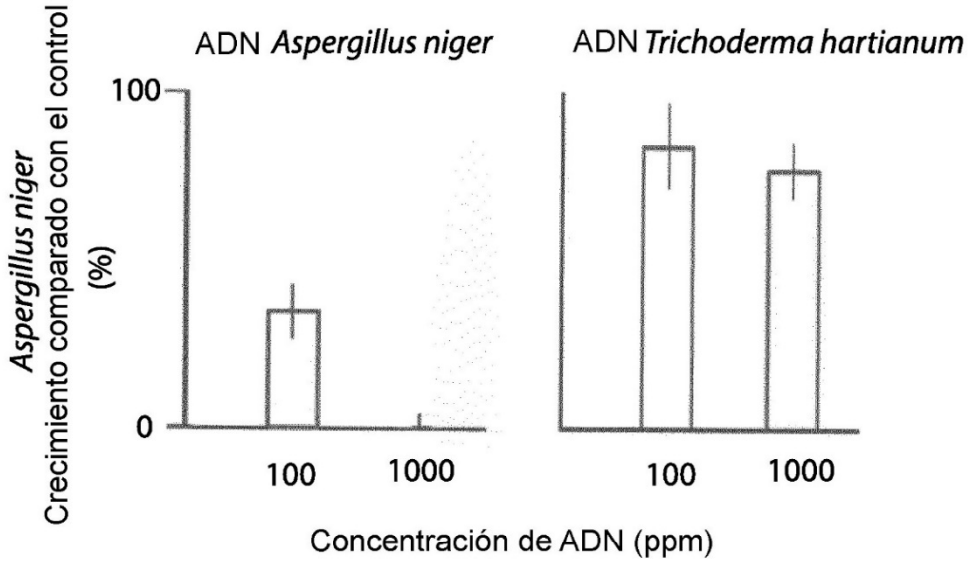

ADN Arabidopsis thaliana
ADN Lycopersicon esculentum
Longitud de la raíz (mm)
Arabidopsis thaliana
50
0
Control
2
20
200
Control
2
20
200
Concentración de ADN (ppm)

Fig. 4


ADN Aspergillus niger
ADN Trichoderma hartianum
100
0
Aspergillus niger
Crecimiento comparado con el control
(%)
100
1000
100
1000
Concentración de ADN (ppm)

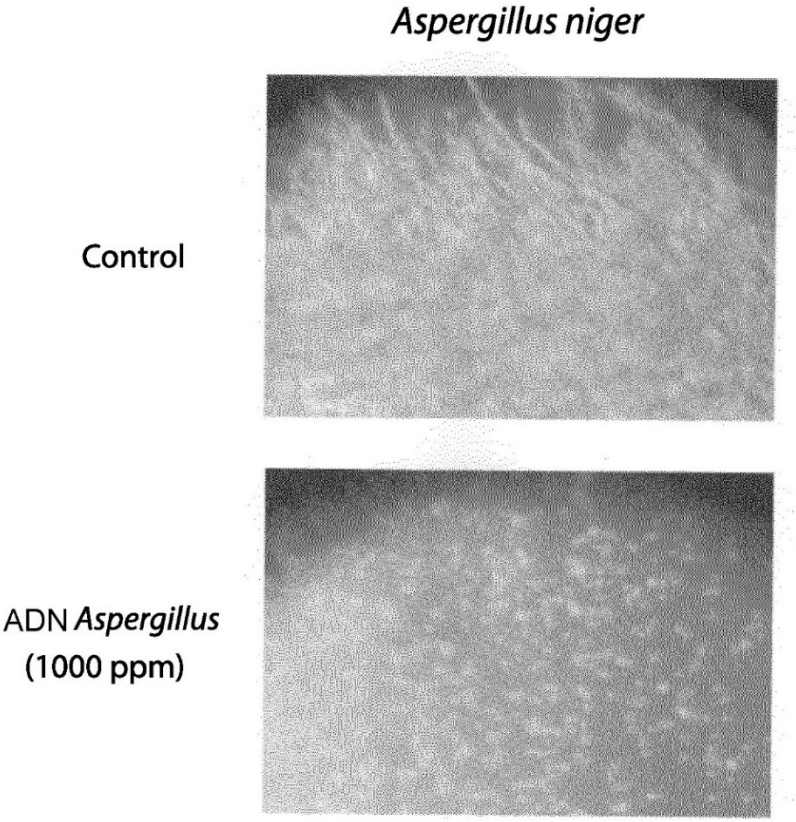

Aspergillus niger
Control
ADN Aspergillus
(1000 ppm)

Fig. 5

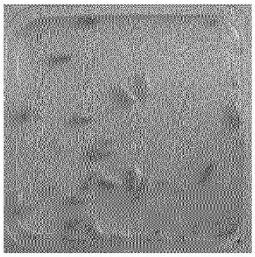
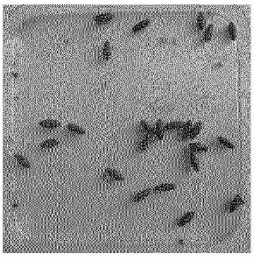
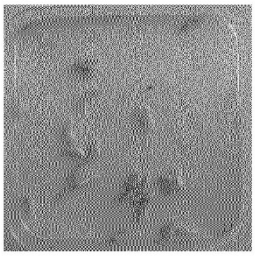
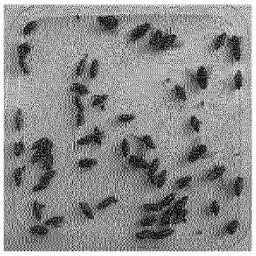
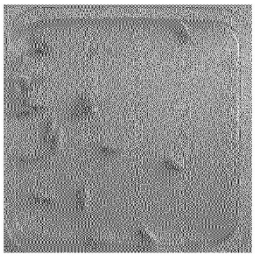
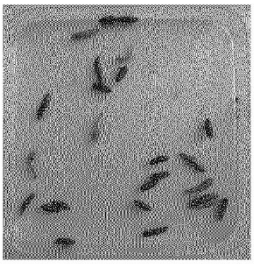
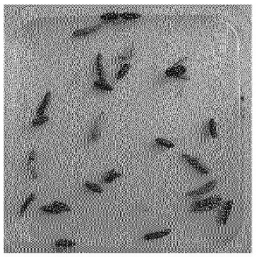
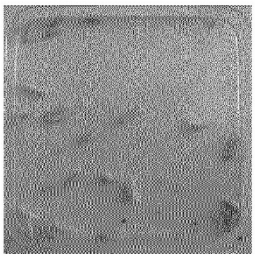
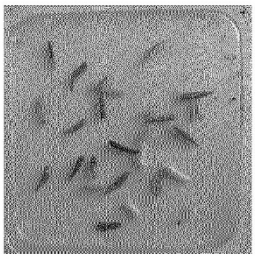
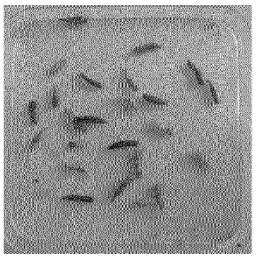
Sarcophaga carnaria	*t = 0*	*t = 10* días	*t = 20* días	núm., de moscas vivas
Control				**25**
ADN heterólogo **(200 ppm)**				**24**
ADN propio **(20 ppm)**				**2**
ADN propio **(200 ppm)**				**0**

Fig. 6

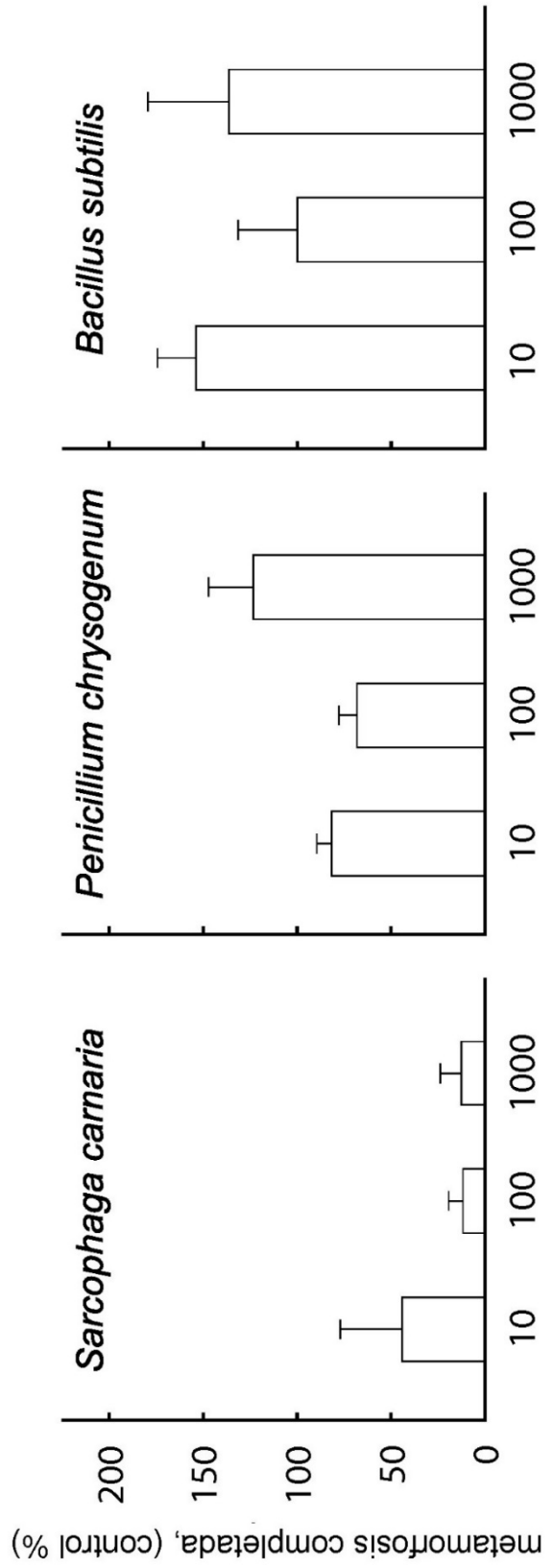

Sarcophaga carnaria
Penicillium chrysogenum
Bacillus subtilis
metamorfosis completada, (control %)
200
150
100
50
0
10
100
1000
Concentración de ADN (ppm)

Fig. 7

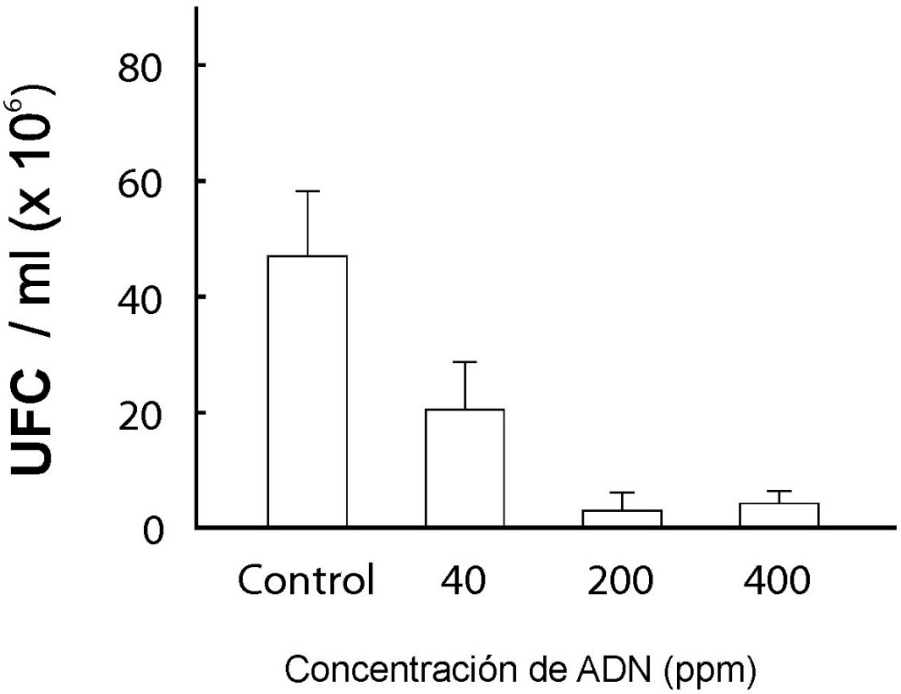

UFC / ml (x 10^6)
80
60
40
20
0
Control
40
200
400
Concentración de ADN (ppm)

Fig. 8

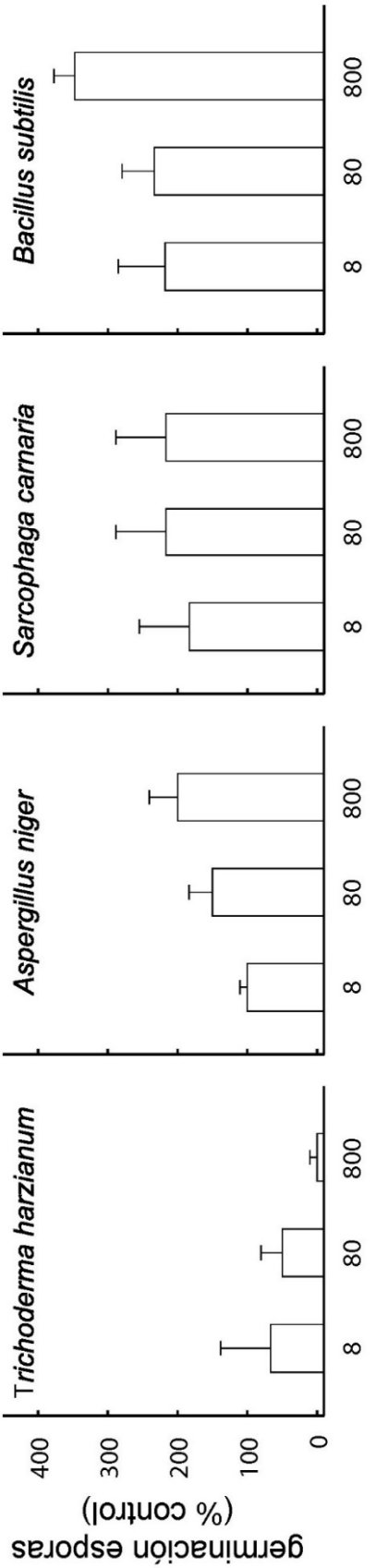

Trichoderma harzianum
Aspergillus niger
Sarcophaga carnaria
Bacillus subtilis
germinación esporas
(% control)
0
100
200
300
400
8
80
800
Concentración de ADN (ppm)

Fig. 9

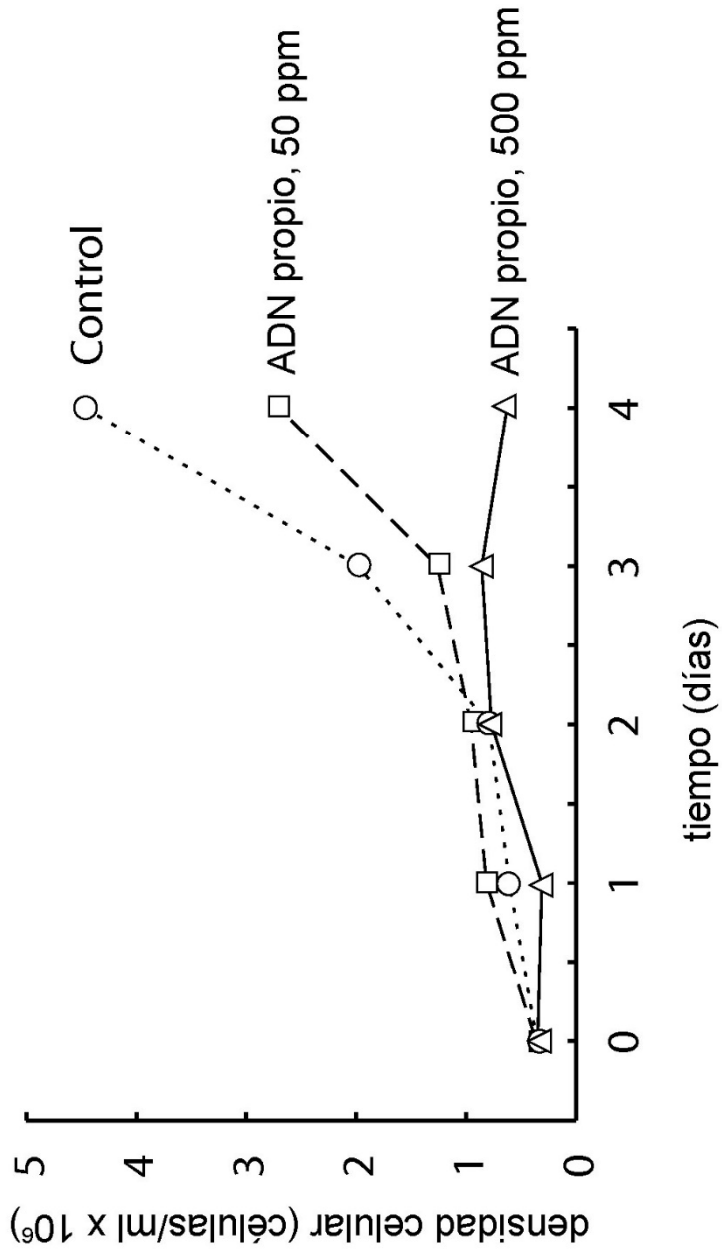
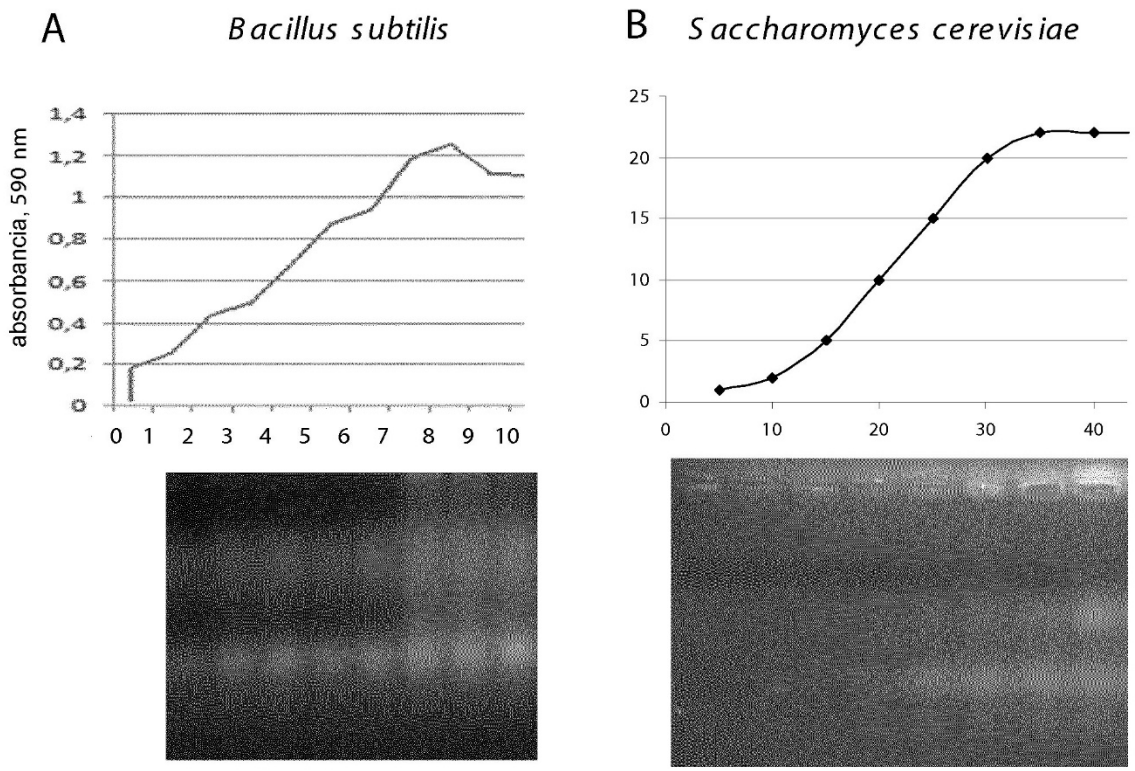

densidad celular (células/ml x 10⁶)
0
1
2
3
4
5
tiempo (días)
0
1
2
3
4
Control
ADN propio, 50 ppm
ADN propio, 500 ppm

Fig. 10

Evidencias experimentales de acumulación de ADN en sobrenadante del biorreactor y efecto inhibidor relacionado sobre el crecimiento



fluorescencia del sobrenadante de cultivos microbianos en gel de agarosa al 1 % + SYBR safe

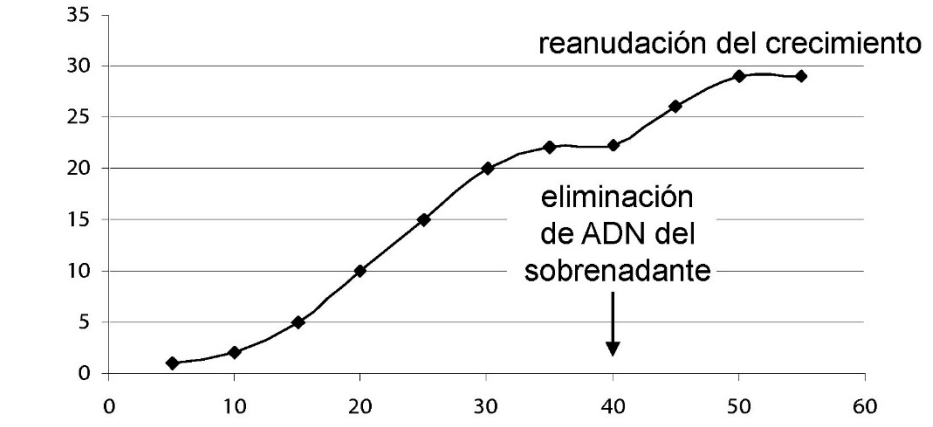


Fig. 11

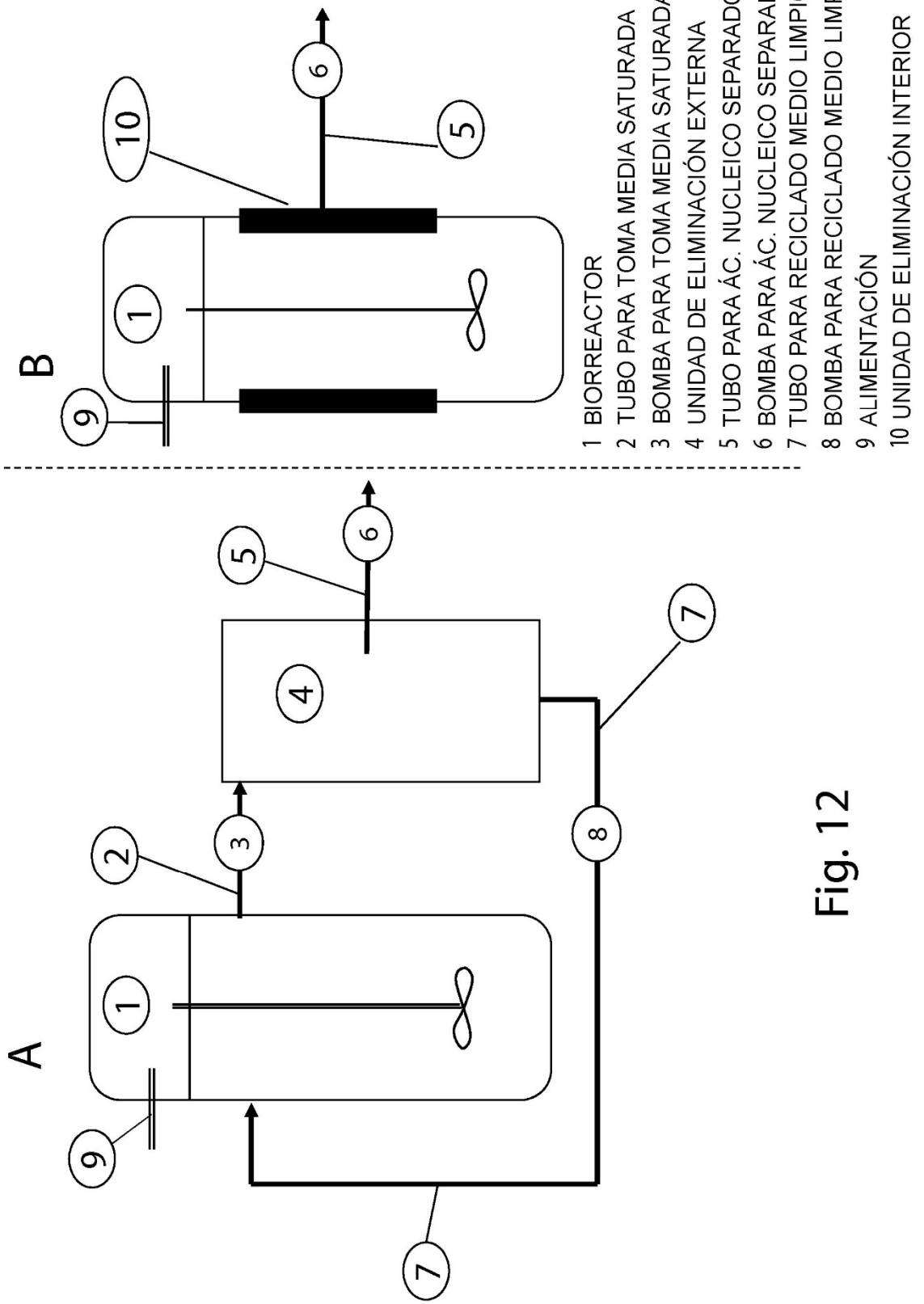

A
B
1 BIORREACTOR
2 TUBO PARA TOMA MEDIA SATURADA
3 BOMBA PARA TOMA MEDIA SATURADA
4 UNIDAD DE ELIMINACIÓN EXTERNA
5 TUBO PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
6 BOMBA PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
7 TUBO PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
8 BOMBA PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
9 ALIMENTACIÓN
10 UNIDAD DE ELIMINACIÓN INTERIOR

Fig. 12

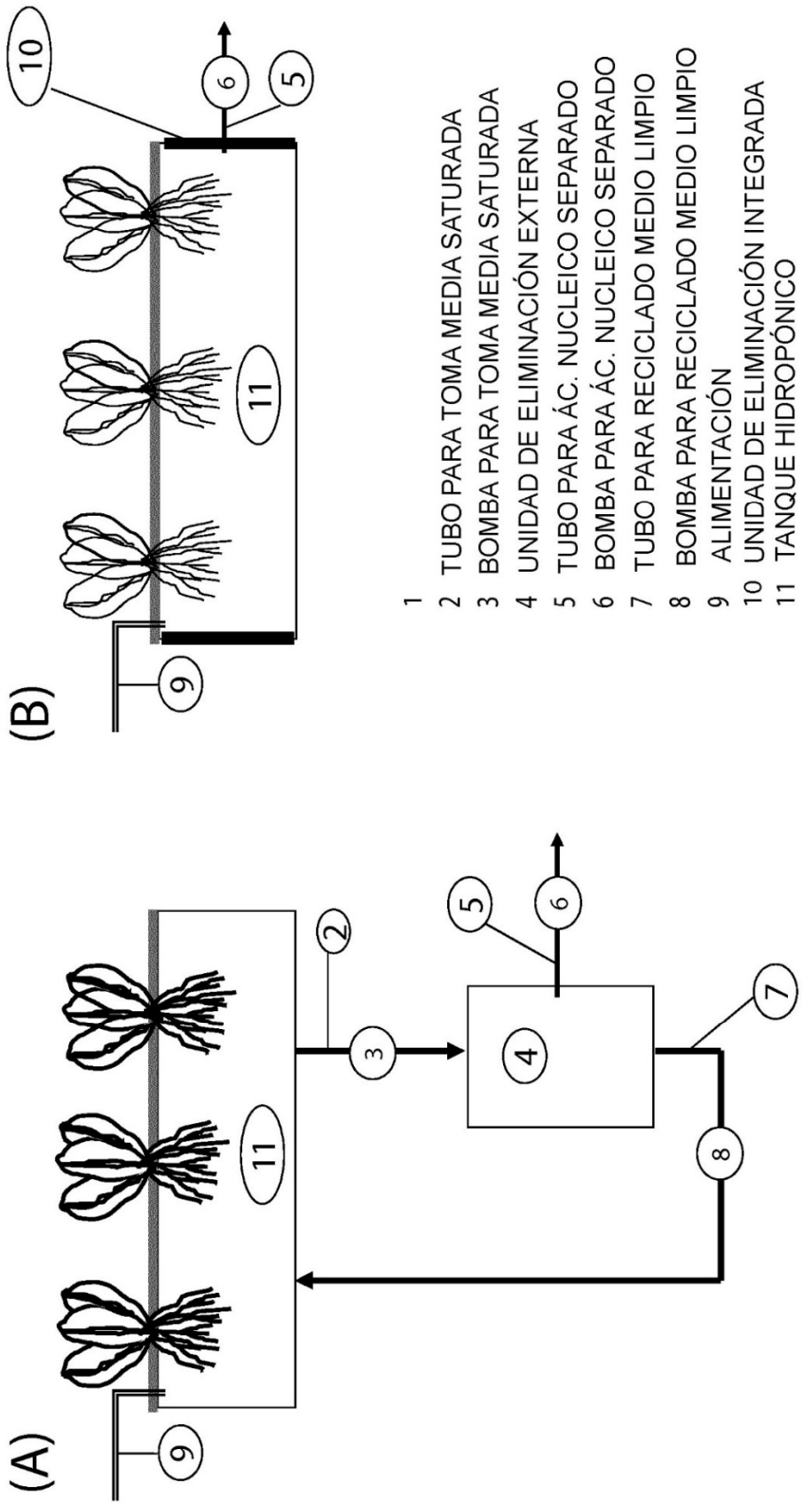
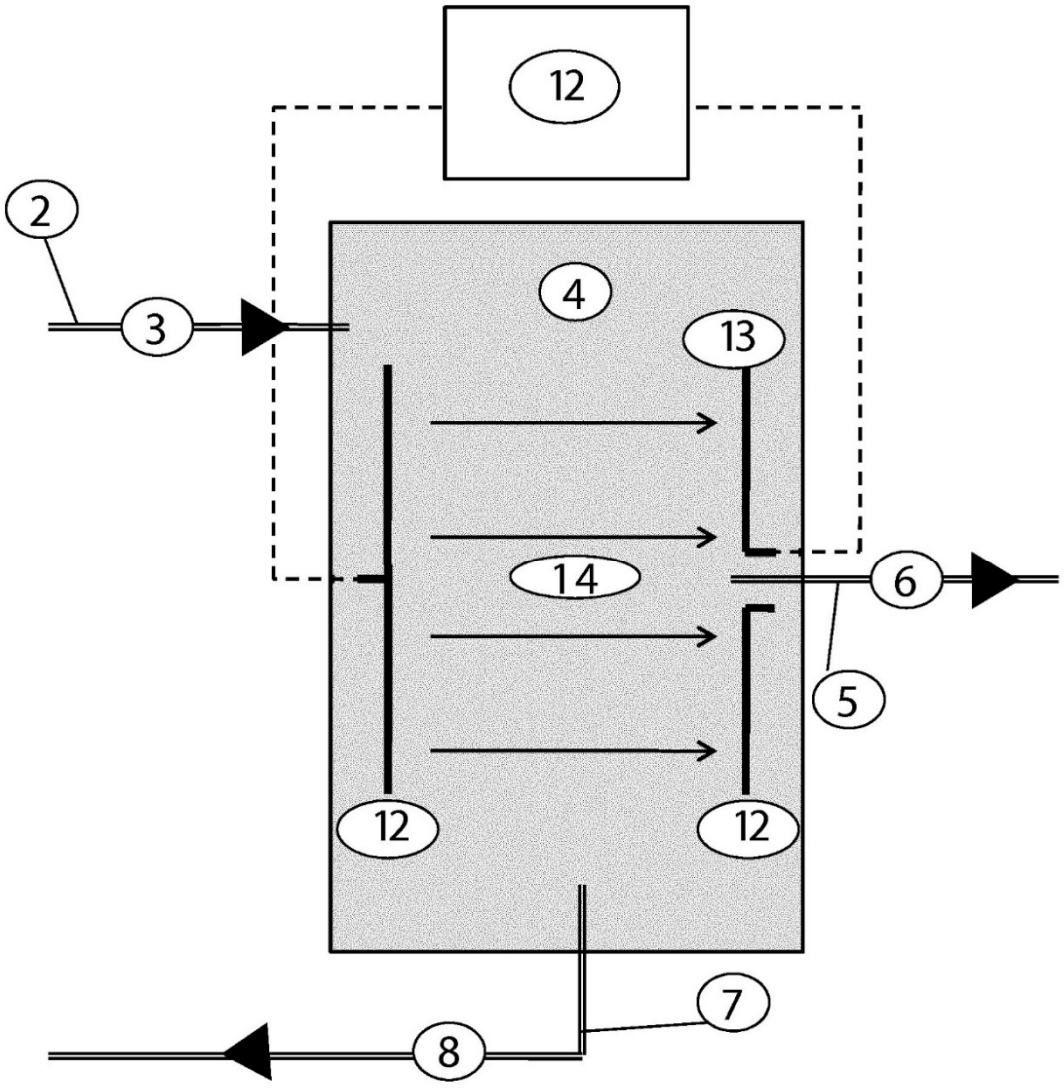
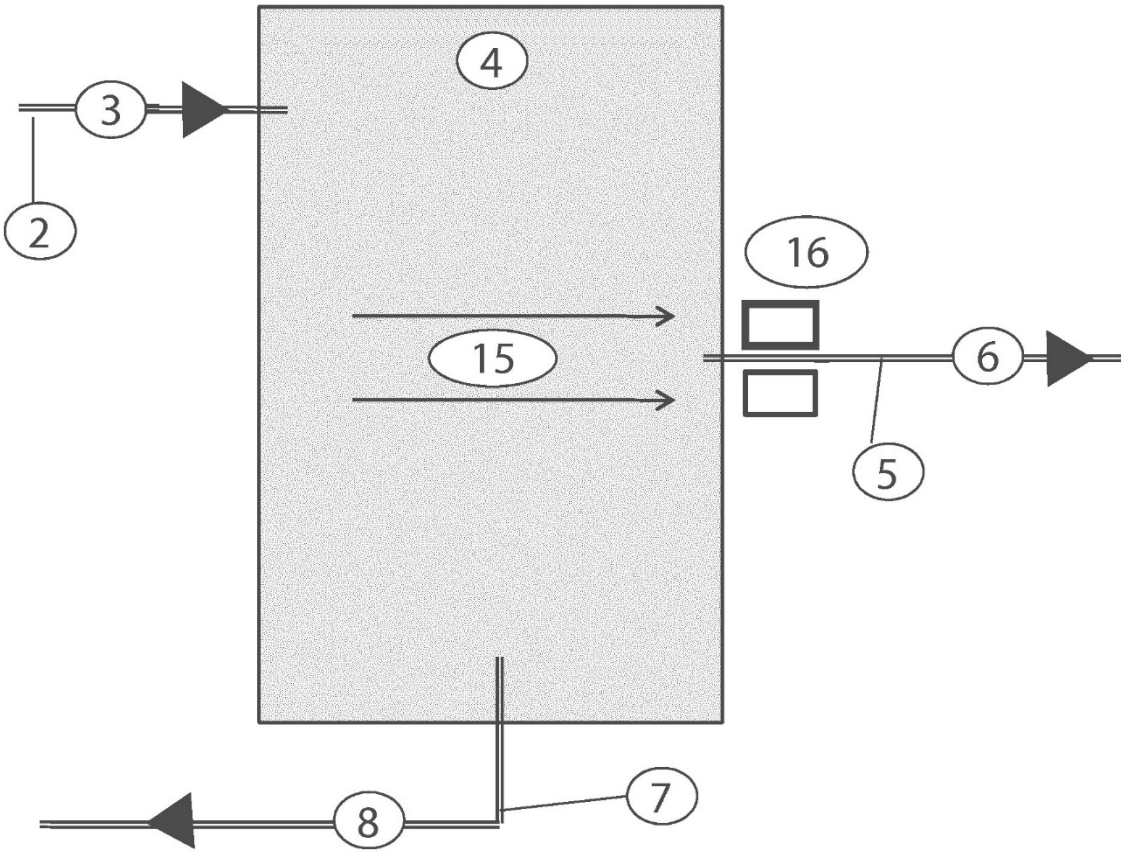

(A)
(B)
9
10
11
2
3
4
5
6
7
8
1 TUBO PARA TOMA MEDIA SATURADA
2 BOMBA PARA TOMA MEDIA SATURADA
3 UNIDAD DE ELIMINACIÓN EXTERNA
4 TUBO PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
5 BOMBA PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
6 TUBO PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
7 BOMBA PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
8 ALIMENTACIÓN
9 UNIDAD DE ELIMINACIÓN INTEGRADA
10 TANQUE HIDROPÓNICO

Fig. 13



1 -
2 TUBO PARA TOMA MEDIA SATURADA
3 BOMBA PARA TOMA MEDIA SATURADA
4 UNIDAD DE ELIMINACIÓN EXTERNA
5 TUBO PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
6 BOMBA PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
7 TUBO PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
8 BOMBA PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
9 -
10 -
11 -
12 COMPROBACIÓN ELECTRÓNICA DEL CAMPO
13 PLACAS DE METAL
14 CAMPO ELÉCTRICO

Fig. 14



1	-
2	TUBO PARA TOMA MEDIA SATURADA
3	BOMBA PARA TOMA MEDIA SATURADA
4	UNIDAD DE ELIMINACIÓN EXTERNA
5	TUBO PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
6	BOMBA PARA ÁC. NUCLEICO SEPARADO
7	TUBO PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
8	BOMBA PARA RECICLADO MEDIO LIMPIO
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	CAMPO MAGNÉTICO
16	IMÁN/ELECTROIMÁN PERMANENTE

Fig. 15

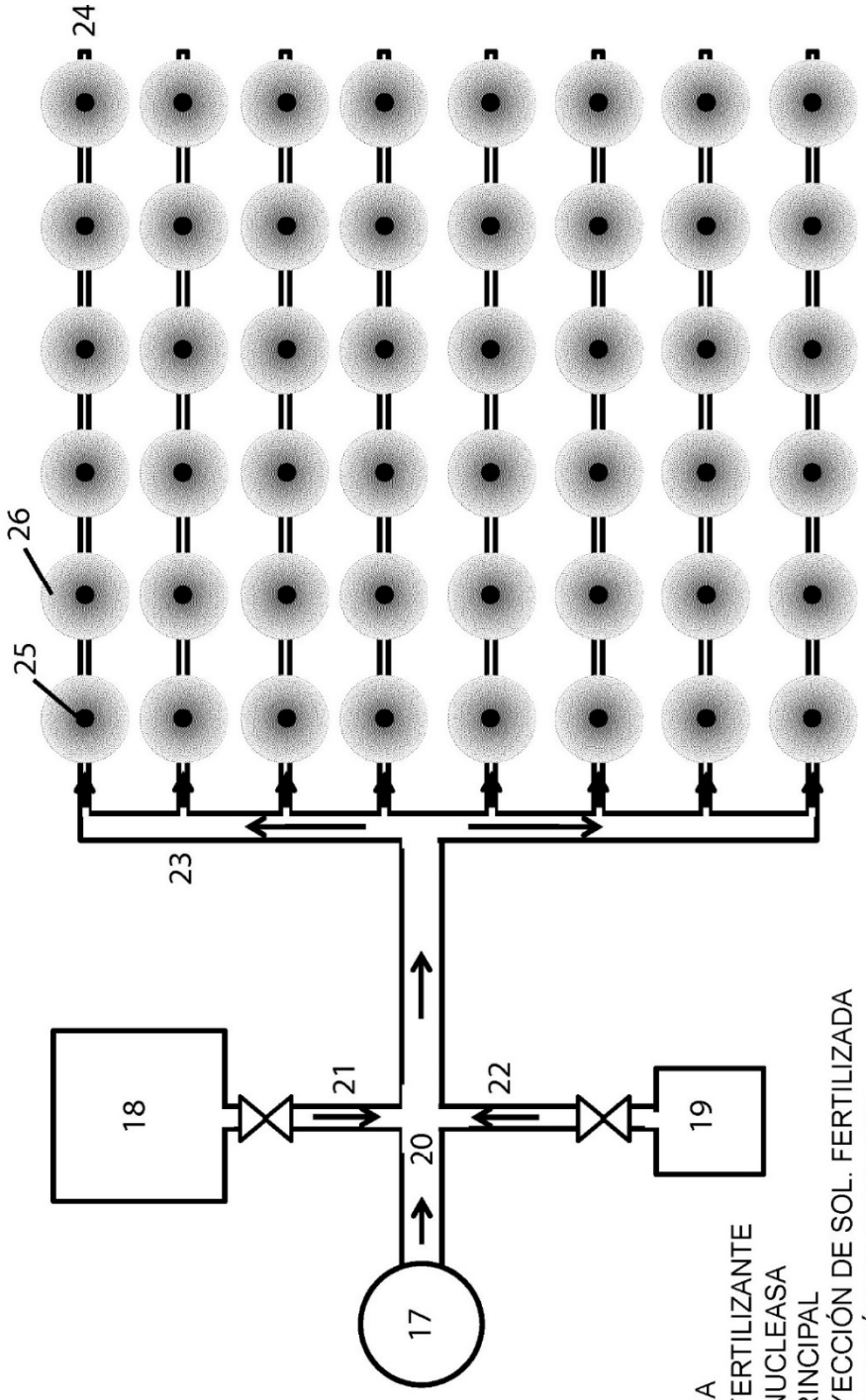

17 BOMBA DE AGUA
18 TANQUE SOL., FERTILIZANTE
19 TANQUE SOL., NUCLEASA
20 TUBO FLUJO PRINCIPAL
21 TUBERÍA DE INYECCIÓN DE SOL. FERTILIZADA
22 TUBERÍA DE INYECCIÓN DE NUCLEASA
23 TUBO PRINCIPAL
24 ALAS O TUBERÍAS DE GOTEO
25 GOTEROS O ASPERSORES
26 ÁREA IRRIGADA

Fig. 16