

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 038**

51 Int. Cl.:

A01N 65/06 (2009.01)

A01N 31/06 (2006.01)

A01N 37/02 (2006.01)

A01N 43/08 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015 PCT/GB2015/050766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015 E 15713218 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3119205**

54 Título: **Infecciones patogénicas**

30 Prioridad:

18.03.2014 GB 201404848

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

16.07.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF SURREY (50.0%)

Guildford

Surrey GU2 7XH, GB y

**FORSCHUNGSINSTITUT FUR BIOLOGISCHEN
LANDBAU (FIBL) (50.0%)**

72 Inventor/es:

MULHOLLAND, DULCIE;

LANGAT, MOSES;

TAMM, LUCIUS;

SCHAERER, HANSJACOB;

HOKKANEN, HEIKKI MATTI TAPIO y

MENZLER-HOKKANEN, INGEBORG MARIANNE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 774 038 T3

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

DESCRIPCIÓN

Infecciones patogénicas

5 La invención se refiere a infecciones patogénicas, especialmente infecciones patogénicas de plantas, y particularmente al tratamiento de infecciones patogénicas de oomicetos. La invención se extiende a nuevas composiciones antimicrobianas que comprenden inhibidores de patógenos de oomicetos, y su uso en métodos de tratamiento o prevención de infecciones con tales patógenos, por ejemplo, mildiu de la vid.

10 El mildiu se refiere a cualquiera de varios tipos de microbios oomicetos que son parásitos de las plantas. Por ejemplo, *Plasmopara viticola* es un miembro de la familia de los oomicetos y es una enfermedad altamente destructiva de las vides en todas las áreas de viticultura del mundo donde hay lluvias de primavera y verano a temperaturas superiores a 10°C. Los fungicidas son el principal medio de control en la producción comercial de vid. Las pérdidas de cultivos en años individuales pueden ser del 100% si la enfermedad no se controla en condiciones climáticas favorables para el patógeno. La infección temprana de los racimos de uvas jóvenes puede conducir a una pérdida significativa de cultivos y la infección de las hojas afecta la relación fuente-sumidero y puede provocar defoliación y posibles quemaduras solares o falta de maduración de los frutos. Esta infección se trató por primera vez en 1885 con la mezcla de Burdeos (es decir, sulfato de cobre y cal) y este fue el primer ejemplo de control químico de enfermedades.

20 En el período previo a la infección, las plantas se rocían con fungicidas a base de cobre o agroquímicos sintéticos, tales como ditiocarbamatos. Los tratamientos posteriores a la infección incluyen fosetil-aluminio y fenilamidas (por ejemplo, metalaxil). En el cultivo de uva orgánica, los únicos tratamientos efectivos contra *Plasmopara viticola* actualmente permitidos bajo estándares orgánicos se basan en hidróxido de cobre y sulfato de cobre. Como resultado de las preocupaciones sobre los efectos ambientales de los metales pesados, como el cobre, su uso en la agricultura orgánica es cada vez más restringido. Por ejemplo, en la Unión Europea, los estándares orgánicos permiten un máximo de 6 kg/Ha por año de cobre.

25 De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de proporcionar nuevas composiciones respetuosas con el medio ambiente para su uso en la prevención de infecciones patógenas provocadas por microorganismos, por ejemplo, mildiu.

Los inventores han producido una serie de extractos crudos de una variedad de especies diferentes de *Larix* (es decir, alerce), y descubrieron que varios compuestos activos contenidos en ellos eran sorprendentemente activos contra el oomiceto *Plasmopara viticola*, es decir el patógeno de la vid que provoca el mildiu.

30 De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un extracto de *Larix* spp., para tratar, prevenir o reducir una infección por patógenos de oomicetos.

35 Como se describió en los ejemplos, los extractos de plantas fueron sorprendentemente activos contra el mildiu de la vid (es decir, *Plasmopara viticola*). Ventajosamente, por lo tanto, los extractos y los compuestos activos contenidos en ellos presentan un medio novedoso, natural y ecológico para prevenir las infecciones patogénicas inducidas por microorganismos, por ejemplo, *Plasmopara viticola* en vid, o *Phytophthora infestans* en papa.

40 Los extractos de plantas *Larix* spp. se separaron utilizando cromatografía en columna de gravedad, y los compuestos activos, según lo determinado por bioensayos, se identificaron luego utilizando espectroscopía de RMN. Los inventores encontraron cuatro compuestos que exhibían la actividad contra los patógenos de oomicetos, que incluyen: larixol, acetato de larixilo (un derivado de acetato natural de larixol), lariciresinol y acetato de lariciresinol (un derivado de acetato natural de lariciresinol). El lariciresinol y el acetato de lariciresinol son ligninas relacionadas, y el larixol y el acetato de larixilo son diterpenoides estrechamente relacionados.

De acuerdo con lo anterior, preferiblemente el extracto vegetal comprende larixol o lariciresinol, o un derivado activo del mismo, lo más preferiblemente un derivado de acetato del mismo. Los inventores consideran que esta es una característica importante de la invención.

45 Por lo tanto, en un segundo aspecto, se proporciona el uso de larixol o lariciresinol, o un derivado activo del mismo, para tratar, prevenir o mejorar una infección por patógenos de oomicetos.

Preferentemente, la infección por patógenos es un patógeno vegetal provocado por un microorganismo.

Los inventores consideran que son los primeros en haber producido una composición natural derivada de *Larix* para tratar o prevenir infecciones de patógenos de oomicetos.

50 De acuerdo con lo anterior, en un tercer aspecto, se proporciona una composición de tratamiento de patógenos de oomicetos que comprende un extracto de *Larix* spp., o larixol o lariciresinol, o un derivado activo del mismo.

Ventajosamente, la composición no comprende metales pesados, como el cobre, por lo que es ecológica y puede describirse como de origen natural. Por lo tanto, es muy superior a las composiciones que contienen hidróxido de

cobre y sulfato de cobre que se usan actualmente. La composición puede definirse como un agroquímico, que puede aplicarse a la superficie de un objeto en riesgo de infección por un patógeno oomiceto.

5 Por lo tanto, en un cuarto aspecto, se proporciona un método para tratar, prevenir o reducir una infección por patógenos de oomicetos de un objeto, el método comprende poner en contacto el objeto con un extracto de *Larix* spp., o larixol o lariciresinol, o un derivado activo del mismo.

El objeto puede estar ya infectado con un patógeno oomiceto, o estar en riesgo de infectarse. El objeto puede ser cualquier planta (por ejemplo, fruta o verdura, vid, planta ornamental), o un medio o contenedor de almacenamiento de fruta o verdura. Preferiblemente, el método del cuarto aspecto comprende poner en contacto el objeto con la composición del tercer aspecto.

10 El experto apreciará que los compuestos larixol y lariciresinol pueden modificarse o derivarse para producir un derivado activo, que exhibe actividad antimicrobiana contra los oomicetos, por ejemplo, *Plasmopara viticola*. Por ejemplo, en una realización preferida, el derivado activo de larixol o lariciresinol comprende un diterpenoide de labdano. En otra realización preferida, el derivado activo comprende un derivado de lignano. En otra realización preferida más, el derivado activo comprende un derivado sintético de cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente, tales como otros derivados de éster, derivados heterocíclicos y derivados por alquilación u oxidación.

15 Sin embargo, en una realización más preferida, el derivado activo de larixol o lariciresinol comprende larixil acetato o lariciresinol acetato.

Debe apreciarse que los compuestos activos aislados de *Larix* spp. Los extractos de plantas tienen varios sinónimos, que también forman parte de la invención. Por ejemplo, el larixol también se conoce como: -

- 20 1. 8(17), 14-Labdadien-6 α , 13(S) -diol;
2. Labda-8(20), 14-dieno-6 α , 13-diol, (13S);
3. α -Etenildecahidro-4-hidroxi- α ,5,5,8a-tetrametil-2-metilen-1S-[1 α (R*),4 β ,4 α β ,8a α]-1-naftalenopropanol; o
4. α -Eetenildecahidro-4-hidroxi- α ,5,5,8a-tetrametil-2-metileno-(α S,1S,4S,4aS,8aR)-1-naftalenopropanol.

El acetato de larixilo también se conoce como: -

- 25 1. 4-(Acetiloxi)- α -etenildecahidro- α ,5,5,8a-tetrametil-2-metileno-(α S,1S, 4S,4aS,8aR)-1-naftalenopropanol;
2. 4-(Acetiloxi)- α -etenildecahidro- α ,5,5,8a-tetrametil-2-metileno-[1S-[1 α (R*), 4 β ,4 α β ,8a α]-1-naftalenopropanol; o
3. Labda-8(20),14-dieno-6 α , 13(S)-diol, 6-acetato.

El lariciresinol o (+)- lariciresinol (NSC 329247) también se conoce como: -

1. Tetrahidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-, (2S,3R,4R)-3-furanmetanol;
- 30 2. Tetrahidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-, [2S-(2 α ,3 β ,4 β)]- 3-furanmetanol;
3. Tetrahidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-vanilil-3-furanmetanol; o
4. (+)- 4,4',9'-Trihidroxi-3,3'-dimetoxi-7',9-epoxilignano.

El acetato de lariciresinol o (+)-acetato de lariciresinol también se conoce como: -

1. Tetrahidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-3-acetato, (2S,3R,4R)-3- furanmetanol; o
- 35 2. Tetrahidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]- α -acetato (2S,3R,4R)-3-furanmetanol.

Los inventores han encontrado que estos compuestos activos están presentes en cantidades variables dependiendo de la especie *Larix* de la que se derivan. El género *Larix* incluye coníferas pertenecientes a la familia Pinaceae. Existe cierto desacuerdo sobre el número de especies, ya que se produce la hibridación, pero la Lista de plantas producida por Missouri Botanical Gardens y Royal Botanical Gardens, Kew enumera 14 como nombres de especies aceptadas y 63 como sinónimos (<http://www.theplantlist.org/navegar/G/Pinaceae/Larix/>). Preferiblemente, por lo tanto, el extracto de la planta o el compuesto activo obtenido de *Larix* spp. se selecciona del grupo que consiste en: *L. czekanowskii*; *L. decidua*; *L. gmelinii*; *L. griffithii*; *L. kaempferi*; *L. laricina*; *Larix x lubarskii*; *L. lyallii*; *Larix x maritimo*; *L. mastersiana*; *L. occidentalis*; *Larix x polonica*; *L. potaninii*; y *L. sibirica*.

40

Más preferiblemente, el extracto de la planta o el compuesto activo se obtiene de un *Larix* spp. seleccionado del grupo formado por *L. decidua* (alerce europeo), *L. gmelinii* (alerce Dahurian), *Larix kaempferi* (alerce japonés), *L. sukaczewii* (alerce ruso) o *L. sibirica* (siberiano). Existe cierta controversia acerca de si *L. sukaczewii* es la misma especie o una especie diferente a *L. sibirica* y no figura por separado en la Lista de plantas. Sin embargo, los

45

inventores ahora han demostrado que sus componentes son de hecho diferentes, por lo que pueden ser especies diferentes. Preferiblemente, el extracto vegetal o el compuesto activo se obtiene de *L. kaempferi* o *L. decidua*, siendo *L. decidua* el más preferido. Ventajosamente, *L. decidua* está fácilmente disponible y comprende altas concentraciones de los compuestos activos, por lo que puede usarse como una fuente óptima para el extracto o los compuestos activos contenidos en ellos.

Cualquier parte de *Larix* spp. El material vegetal precursor puede usarse para formar el extracto de la planta, como el tallo, las hojas o la corteza. Preferiblemente, sin embargo, la corteza del material precursor se usa para formar el extracto de la planta. Preferiblemente, el material precursor es molido. El extracto puede formarse poniendo en contacto el material vegetal con un disolvente, ya sea a temperatura ambiente con agitación, o a una temperatura elevada utilizando extracción con microondas o Soxhlet. Un disolvente adecuado puede ser diclorometano (DCM) o metanol. Preferiblemente, el extracto bruto resultante se separa utilizando cromatografía, más preferiblemente cromatografía en columna de gravedad. Se puede usar una mezcla de DCM y metanol para eluir los compuestos activos de la columna de cromatografía. Por ejemplo, preferiblemente el acetato de larixilo se puede eluir con una mezcla de DCM y hexano, preferiblemente 30% de DCM/70% de hexano. Larixol puede eluirse con una imagen de DCM y hexano, preferiblemente 80% DCM/20% hexano. El acetato de lariciresinol puede eluirse con DCM al 100%. El lariciresinol puede eluirse con una mezcla de metanol y DCM, preferiblemente MeOH al 5% en DCM.

La cromatografía flash de media presión o la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) también se pueden usar para separar los compuestos. La cromatografía de partición utilizando disolventes (por ejemplo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano, diclorometano y/o metanol) seguido de cristalización de fracciones enriquecidas también se puede usar para purificar los compuestos.

Los inventores han demostrado que los extractos de plantas y los compuestos activos son sorprendentemente útiles para tratar o prevenir una infección patogénica de oomicetos. Oomycota u oomycetes forman un linaje filogenético distinto de microorganismos eucariotas similares a hongos, pero no son hongos per se. Son organismos filamentosos, microscópicos y absorbentes que se reproducen tanto sexual como asexualmente. Los oomicetos ocupan estilos de vida saprófitos y patógenos. También se les conoce a menudo como moldes de agua. Preferiblemente, las infecciones por *Plasmopara* spp. o *Phytophthora* spp., pueden tratarse o prevenirse utilizando los compuestos, composiciones y extractos de la invención. Preferiblemente, infecciones por *Plasmopara* spp., más preferiblemente se pueden tratar o prevenir infecciones por *Plasmopara viticola*. Preferiblemente, se tratan o previenen *Phytophthora* investans.

Los oomicetos son algunos de los patógenos más notorios de las plantas, provocando enfermedades devastadoras, que incluyen el mildiu, el tizón tardío de la papa y la muerte súbita del roble. Ejemplos de infecciones por *Phytophthora* incluyen tizón tardío en papas. Los ejemplos de infecciones por Albuginales incluyen infecciones por roya blanca de las plantas con flores. Como tal, las infecciones preferidas por patógenos de oomicetos, que pueden tratarse con el extracto de plantas o el compuesto activo descrito en el presente documento incluyen el mildiu, el tizón tardío de la patata, las enfermedades de la tinta del castaño europeo y las infecciones por roya blanca. Preferiblemente, se trata el mildiu suave.

El ingrediente activo, utilizado en la presente invención es un compuesto eficaz para una variedad de enfermedades tales como el mildiu (*Uncinula necator*), el mildiu (*Plasmopara viticola*), el mildiu (*Podosphaera leucotricha*), la costra de manzana (*Venturia inaequalis*), mancha de alternaria de manzana (*Alternaria mali*), roya de manzana (*Gymnosporangium yamadadae*), tizón de la flor de manzana (*Aclerotinia mali*), mancha negra de pera (*Alternaria kikuchiana*), costra de pera (*Venturia nashicola*), roya de pera (*Gymnosporangium haraeaeum*), podredumbre parda del melocotón (*Sclerotinia cinerea*), costra de durazno (*Cladosporium carpophilum*), cucurbitáceas moho polvoriento (*Sphaerotheca fuliginea*), moho de hoja de tomate (*Cladosporium fulvam*), moho polvoriento de berenjena (*Erysiphe cichoracoarum*), moho gris (*Botrytis cinerea*) y podredumbre (*Sclerotinia sclerotiorum*) en vegetales como pepinos, tomates, fresas y uvas.

Además, la composición de la presente invención exhibe un efecto de control contra una enfermedad, tal como explosión de arroz; tizón de vaina de arroz; pepino antracnosis; moho suave de pepinos, melones, coles, coles chinas, cebollas, calabazas, uvas; moho polvoriento de trigo, cebada, pepinos; tizón de papas, pimientos rojos, pimientos dulces, sandías, calabazas, tabacos, tomates; enfermedad de la septoria del trigo; mancha de anillo de tomate; melanosa cítrica; moho verde común de los cítricos; costra de pera; mancha *Alternaria* de manzana; punta de cebolla blanca; podredumbre marrón sandía; varios mohos grises; podredumbre de varias coronas; varios óxido. Además, la composición de la presente invención exhibe un excelente efecto de control contra enfermedades provocadas por *Plasmodiophora*. Más específicamente, la composición exhibe un efecto de control especialmente excelente contra enfermedades tales como el tizón de papas, pimientos rojos, pimientos dulces, sandías, calabazas, tabacos, tomates; moho suave de pepinos, melones, coles, coles chinas, cebollas, calabazas, uvas; y enfermedad de *Pythium*, tizón bacteriano y tizón de la hoja (parche marrón y parche grande) de césped.

El patógeno oomiceto puede infectar frutas, por ejemplo, uvas, manzanas, fresas o frambuesas. Alternativamente, el patógeno oomiceto puede infectar un vegetal.

Para tratar una infección por patógenos de oomicetos, el extracto de la planta o el compuesto activo allí se disuelve preferiblemente en un disolvente líquido. Los disolventes adecuados incluyen alcohol, acetona o agua. En otra realización, el extracto o compuesto se puede proporcionar en forma de emulsión. Preferiblemente, la concentración del compuesto activo en el disolvente es de aproximadamente 0.1% a 2% (p/p). La solución o emulsión resultante se puede aplicar (por ejemplo, mediante pulverización o inmersión) a un objeto que ya está infectado con un patógeno oomiceto, o que está en riesgo de infectarse.

Todas las características descritas en el presente documento (incluidas las reivindicaciones, el resumen y los dibujos adjuntos), y/o todos los pasos de cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de esas características y/o pasos son mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo se pueden llevar a cabo realizaciones de la misma, se hará referencia, a modo de ejemplo, a las Figuras adjuntas, en las que: -

La Figura 1 muestra las fórmulas químicas para realizaciones de compuestos de acuerdo con la invención, es decir (1) larixol ($C_{20}H_{34}O_2$); (2) larixilo de etilo ($C_{22}H_{36}O_3$); (3) (+)-lariciresinol ($C_{20}H_{24}O_6$); y (4) (+)-acetato de lariciresinol ($C_{22}H_{26}O_7$).

Ejemplos

Materiales y métodos

Extracción de material vegetal

muestras de plantas molidas (0.5 kg cada una) de la corteza de *L. decidua*, *L. gmelinii*, *L. sibirica* y *L. sukaczewii*. Se extrajeron con 1 L de disolvente de diclorometano y metanol utilizando un sistema de reacción de microondas MARSXpress™. (voltaje: 1600 W, potencia: 100%, tiempo: 10 minutos de retención: 20 minutos, temperatura 50 (DCM)/70 (MeOH)°C). Se envasaron 10-15 g de corteza de tallo en polvo en cada uno de los 40 recipientes. Después de la extracción, el disolvente se decantó, se filtró y se evaporó para producir el extracto crudo. Los rendimientos de los extractos crudos obtenidos de estas muestras de plantas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 - Rendimientos de extractos crudos (% masa/masa)

Especies Vegetales	Extracto de Diclorometano	Extracto de Metanol
<i>L. gmelinii</i>	1.0%	9.7%
<i>L. sibirica</i>	1.5%	6.9%
<i>L. sukaczewii</i>	3.6%	7.3%
<i>L. decidua</i>	1.0%	9.6%

L. kaempferii fue adquirido de Alice Holt, Comisión Forestal, Reino Unido, y los compuestos se extrajeron por remojo en diclorometano a temperatura ambiente durante 24 h y dio 0.7% de extracto crudo (de una muestra de 20 kg con 40 L de disolvente utilizado).

Para la extracción a mayor escala, se utilizó extracción en caliente utilizando un aparato Soxhlet. Se empacaron 0.8-1 kg de material de corteza de tallo en polvo en un aparato Soxhlet de 5 L colocado sobre un matraz de 5 L en una cámara de humo y se dejó refluir sucesivamente con diclorometano y metanol durante 24 h en cada caso. Los solventes se eliminaron y se evaporaron por separado para producir dos extractos crudos para la separación cromatográfica posterior.

Separación de extractos crudos

Los extractos crudos obtenidos anteriormente se separaron luego de la siguiente manera en la que *L. decidua* se usa el extracto de diclorometano (DCM) como un ejemplo. Los extractos crudos (aproximadamente 40-70 g de material crudo para cada separación) se separaron utilizando cromatografía en columna de gravedad (columna de 4 cm de diámetro) sobre gel de sílice (Merck 9385) utilizando un gradiente escalonado que comienza con 100% de hexano, agregando DCM en pasos de 5% hasta alcanzar el 100% de DCM. Luego se añadió metanol en incrementos del 5% hasta que se alcanzó un sistema disolvente de MeOH al 40% en DCM. En cada caso, se recogieron fracciones de 75 ml (se usaron 1 L de hexano, 3 L de diclorometano y 500 ml de metanol). En esta etapa, todos los compuestos de interés habían sido eluidos de la columna.

El acetato de larixilo se eluyó primero con 30% de DCM/70% de hexano, el larixol se eluyó con 80% de DCM/20% de hexano, acetato de lariciresinol al 100% de DCM y lariciresinol al 5% de MeOH en DCM.

El extracto de metanol también se sometió a cromatografía en columna y produjo principalmente lariciresinol, pero también mostró trazas de larixol y acetato de lariciresinol.

5 Identificación de compuestos

Las estructuras de los compuestos extraídos se determinaron utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear (CDCl_3 , instrumento Bruker 500 MHz, espectrometría de masas y mediciones de rotación óptica).

Las rotaciones ópticas se midieron a temperatura ambiente en cloroformo (1, 2, 3)/metanol (4) utilizando un polarímetro JASCO P-1020 utilizando una celda con una longitud de trayectoria de 0.1 dm.

- 10 Se realizaron experimentos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear en un espectrómetro Bruker AVANCE RMN de 500 MHz. Los espectros se registraron en deuterioclороformo (CDCl_3) y metanol- d_4 (CD_3OD) y los cambios químicos se registraron en ppm (partes por millón) en relación con los solventes. El deuterioclороformo fue referenciado de acuerdo con la línea central en δ 7.260 en el espectro ^1H RMN y en δ 77.23 en el espectro de ^{13}C RMN, mientras que el metanol d_4 fue referenciado de acuerdo con la línea central en δ 4.87 en el espectro de ^1H RMN y a δ 49.15 en el espectro ^{13}C RMN.

Los espectros de masa de impacto electrónico de baja resolución (GC-MS) se adquirieron utilizando un sistema Hewlett Packard G1800A GCD y el análisis LCMS se registró en un instrumento QTOF Premier - Water Corp. a través de infusión directa a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Resultados y discusión

- 20 Con referencia a la Figura 1, se muestran las fórmulas estructurales de cuatro compuestos clave encontrados en cada uno de los extractos de plantas.

El compuesto 1 es larixol; El compuesto 2 es acetato de larixilo, que es el derivado de acetato natural del compuesto 1; El compuesto 3 es (+)-lariciresinol (NSC 329247); y el Compuesto 4 es (+)-acetato de lariciresinol, que es el derivado de acetato natural del compuesto 3.

- 25 Los rendimientos de cada uno de estos compuestos de las diversas muestras de plantas se resumen en la Tabla 2 en la que "% m/m" es la masa de muestra por 100 g de material vegetal seco. Para *L. kaempferii*, los resultados se informan como % m/m de compuesto en extracto crudo.

Tabla 2 - Investigaciones preliminares de rendimientos de compuestos

Especie vegetal	Compuesto	% de masa/masa
<i>L. gmelinii</i>	larixol	0.5%
	acetato de larixilo	1.5%
	lariciresinol	Traza
	acetato de lariciresinol	Traza
<i>L. sibirica</i>	larixol	Traza
	acetato de larixilo	Traza
	lariciresinol	1.9%
	acetato de lariciresinol	0.7%
<i>L. decidua</i>	larixol	0.8%
	acetato de larixilo	0.2%
	lariciresinol	0.1%

	acetato de lariciresinol	Traza
L. kaempferii	larixol	0.99% de extracto crudo
	acetato de larixilo	1.60% de extracto crudo
	lariciresinol	Traza
	acetato de lariciresinol	Traza
L. sukaczewii	larixol	Traza
	acetato de larixilo	Traza
	lariciresinol	Traza
	acetato de larisiresinal	Traza

Los resultados y actividades preliminares de detección de los compuestos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de detección preliminares

Muestra (% de masa/volumen)	Actividad
Extractos crudos de Larix decidua	
Extracto de Diclorometano 0.1%	90.2%
Extracto de Diclorometano 0.01%	Sin actividad
Extracto de Metanol 0.2%	13.3%
Extracto de Metanol 0.02%	Sin actividad
Extractos crudos de Larix sukaczewii	
Extracto de Diclorometano 0.1%	98.3%
Extracto de Diclorometano 0.01%	Sin actividad
1. larixol	
0.147%	99.5%
0.074%	100%
0.0147%	36.3%
2. acetato de larixilo	
0.12%	100%
0.012%	69.2%
3. (+)-lariciresinol	
0.1%	94.1%

ES 2 774 038 T3

0.01%	14.4%
4. (+)-acetato de lariciresinol	
0.08%	92.4%
0.036%	78.8%
0.008%	13.1%
Control (referencia de cobre Kocide Opti)	
0.1%	97.3%
0.01%	80.2%

Resultados de detección adicionales

Los inventores probaron las actividades de varias composiciones que comprenden diversas concentraciones de los compuestos activos, como se expone en la Tabla 4, contra diferentes oomicetos, *P. viticola* y *P. infestans*.

5

Tabla 4 - Composiciones que comprenden los aislados activos

Sustancia	Código	Eficacia (%)	Concentración (% de masa/volumen)	Solvente
Acetato de Larixilo	LD-SURR-001	99.5	0.147%	Isopropanol
		100.0	0.12%	Etanol
		99.9	0.1%	Etanol
		99.4	0.1%	Etanol
		98.4	0.05%	Etanol
		83.3	0.025%	Etanol
		69.2	0.012%	Etanol
Larixol	LD-SURR-002	24.5	0.01%	Isopropanol
		99.5	0.147%	Isopropanol
		98.8	0.1%	Etanol
		100.0	0.074%	Isopropanol
		91.2	0.025%	Etanol
Acetato de Lariciresinol	LD-SURR-003	36.3	0.0147%	Isopropanol
		88.8	0.1%	Etanol
		92.4	0.08%	Etanol
		78.8	0.04%	Metanol
		78.4	0.025%	Etanol
Lariciresinol	LD-SURR-004	13.1	0.008%	Etanol
		93.3	0.1%	Etanol
		94.1	0.1%	Etanol
		86.5	0.1%	Etanol

	56.9	0.052%	Metanol
	64.6	0.025%	Etanol
	14.4	0.01%	Etanol
	-4.9	0.01%	Etanol
Kocide (referencia de cobre)	92-99%	0.10%	
	63-96%	0.01%	

Tabla 5 - Resultados preliminares y actividades de los compuestos contra *P. viticola* (germinación y actividad de zoosporas) y *P. infestans* (germinación) in vitro

Código de muestra	Composición de muestra	Concentración de inhibición mínima (MIC(100%))	
		Plasmopara viticola	Phytophthora infestans
Extracto T de DCM-Extract T	Extracto de Diclorometano de corteza	250 ppm	Sin actividad
Extracto de MeOH (1)	Extracto de DCM y extracto de metanol secuencial	125 ppm	63 ppm
Extracto de MeOH (2)	Extracto de Metanol de corteza	250 ppm	125 ppm
LD-SURR-001	Acetato de Larixilo	4 ppm	125 ppm
LD-SURR-002	Larixol	16 ppm	500 ppm
LD-SURR-003	Acetato de Larisciresinol	125 ppm	Sin actividad
LD-SURR-004	Larisciresinol	250 ppm	Sin actividad

5 Conclusiones

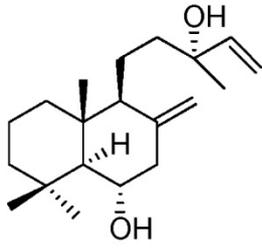
Los extractos crudos de cada una de las especies *Larix* de y también los cuatro compuestos de *Larix* Se descubrió que los(dos diterpenoides estrechamente relacionados y dos lignanos relacionados), eran activos en el laboratorio contra el oomiceto *Plasmopara viticola*, es decir el mildiu patógeno, y también *Phytophthora investans*, es decir provoca el tizón de la papa. Los inventores han encontrado que estos compuestos están presentes en cantidades variables dependiendo de la especie y el sitio de recolección de una variedad de especies de alerces: *Larix sibirica* (Siberia), *Larix decidua* (Alerce europeo), *Larix gmelinii* (Alerce Dahuriano), *Larix sukaczewii* (Alerce ruso) y *Larix kaempferi* (Alerce japonés). Por lo tanto, han demostrado que los extractos y compuestos son sorprendentemente útiles para tratar o prevenir cualquier infección patogénica de oomicetos.

El trabajo que condujo a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7-KBBE-2008-2B) en virtud del acuerdo de subvención No. 227239.

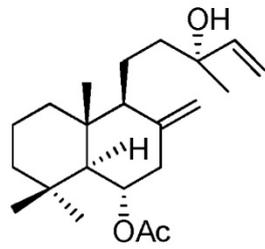
REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de un extracto de *Larix* spp. que comprende larixol, lariciresinol, acetato de larixilo o acetato de lariciresinol, para tratar, prevenir o reducir una infección por patógenos de oomicetos.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el extracto de la planta se obtiene de un *Larix* spp. seleccionado del grupo que consiste en: *L. czekanowskii*; *L. decidua*; *L. gmelinii*; *L. griffithii*; *L. kaempferi*; *L. laricina*; *Larix x lubarskii*; *L. lyallii*; *Larix x marítimo*; *L. mastersiana*; *L. occidentalis*; *Larix x polonica*; *L. potaninii*; y *L. sibirica*, preferiblemente en el que el extracto de planta se obtiene de *Larix* spp. seleccionado del grupo formado por *L. decidua* (alerce europeo), *L. gmelinii* (alerce Dahurian), *Larix kaempferi* (alerce japonés), *L. sukaczewii* (alerce ruso) y *L. sibirica* (siberiano), más preferiblemente en donde el extracto de la planta se obtiene de *L. kaempferi* o *L. decidua*.
- 10 3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto de la planta se deriva del tallo, las hojas o la corteza del material vegetal precursor *Larix* spp., preferiblemente en donde la corteza del material precursor se usa para formar el extracto vegetal.
- 15 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto se forma poniendo en contacto el material vegetal con un disolvente, ya sea a temperatura ambiente con agitación, o a una temperatura elevada utilizando extracción con microondas o Soxhlet, preferiblemente en el que el disolvente es diclorometano (DCM) o metanol.
- 20 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto se separa utilizando cromatografía, preferiblemente cromatografía en columna de gravedad.
- 25 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una infección de *Plasmopara* spp. O *Phytophthora* spp. se trata o previene utilizando el extracto, preferiblemente en el que la infección por *Plasmopara* spp. se trata o previene, más preferiblemente en donde se trata o previene una infección por *Plasmopara viticola* o *Phytophthora investans*.
- 30 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la infección por patógenos de oomiceto, que se trata con el extracto de la planta, es mildiu, tizón tardío de la patata, muerte súbita del roble, pudrición de la raíz del rododro, enfermedades del chancro del castaño europeo, marchitamiento del *pythium* o infección por roya blanca, y preferiblemente es moho suave.
- 35 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el patógeno oomiceto infecta frutas, por ejemplo, uvas, manzanas, fresas o frambuesas, o un vegetal.
- 40 9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto de la planta se disuelve en un disolvente líquido seleccionado de alcohol, acetona o agua, y/o en el que el extracto se proporciona en forma de emulsión.
10. Uso no terapéutico de larixol o lariciresinol, larixil acetato o lariciresinol acetato, para tratar, prevenir o reducir una infección por patógenos de oomicetos.
11. Un método no terapéutico para tratar, prevenir o reducir una infección por patógenos de oomicetos de un objeto, el método comprende poner en contacto el objeto con un extracto de *Larix* spp., o larixol, lariciresinol, acetato de larixil o acetato de lariciresinol.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el extracto de planta es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 9.
13. El uso según la reivindicación 10, o el método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el patógeno oomiceto es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

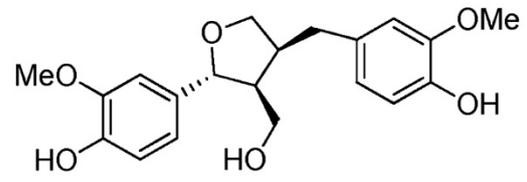
Figura 1



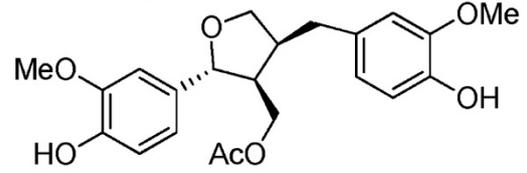
1. Larixol



2. Acetato de larixilo



3. (+)-lariciresinol



4. (+)- acetato de lariciresinol