

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 752**

51 Int. Cl.:

A01N 25/04 (2006.01)

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 9/24 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2017 PCT/US2017/035594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17210508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017 E 17807536 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3464576**

54 Título: **Composiciones de Bacillus amyloliquefaciens no acuosas y no oleosas**

30 Prioridad:

03.06.2016 US 201662345420 P

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

28.07.2020

73 Titular/es:

**VALENT BIOSCIENCES LLC (100.0%)
870 Technology Way
Libertyville, IL 60048, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, ZHENGYU;
BELKIND, BENJAMIN, A.;
GANGAVARAPU, VENKAT;
ZHENG, ZUOXING;
MAYHEW, TODD, JAMES y
ALCALA, ANA VIDA, C.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 775 752 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

Composiciones de *Bacillus amyloliquefaciens* no acuosas y no oleosas

5 Campo de la invención

La presente invención se dirige a composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que comprenden la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo y un portador líquido.

10 Antecedentes de la invención

15 Los pesticidas microbianos utilizan organismos microbianos vivos como el ingrediente activo. A pesar del número relativamente elevado de patentes de pesticidas microbianos, solo unos pocos están aprobados para uso agrícola. Uno de los problemas en la creación de composiciones pesticidas microbianas útiles es que deben formularse para retardar el crecimiento del microbio mientras mantienen su viabilidad durante largos periodos de almacenamiento y deben diluirse o añadirse fácilmente a varios tipos de aplicaciones.

20 Los pesticidas microbianos líquidos anteriores y actuales son formulaciones en suspensión con base acuosa, tales como Poncho®/VOTIVO® y DoubleNickle LC disponibles comercialmente y los descritos en la patente US 2011/0033436A1, concedida a Bayer Intellectual Property GmbH, que se dirige a las formulaciones acuosas de diversas bacterias y hongos formadores de esporas. Sin embargo, las formulaciones con base acuosa son problemáticas debido a la naturaleza volátil del agua y la necesidad de conservantes agresivos. Además, las formulaciones con base acuosa no son compatibles con otros productos agrícolas no acuosos, lo que presenta dificultades para aplicar el pesticida microbiano. El documento WO 2016/196681 A1 describe las composiciones de un inoculante microbiano agrícola que comprenden una o más especies microbianas, inhibidores de ureasa y/o inhibidores de nitrificación para promover el crecimiento de las plantas, la productividad y la calidad del suelo. La secuencia del genoma de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* se describe en Lefort F. y otros, "Whole-genome shotgun sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* strain UASWS BA1, a bacterium antagonistic to plant pathogenic fungi", Genome Announcements, vol. 2, núm. 1 (2014).

30 Los nematodos, más conocidos como nematelmintos y más específicamente anquilostomas, oxiuros, gusanos del corazón, etc., se encuentran en toda la tierra en casi todos los entornos. De hecho, los nematodos representan alrededor del 80 % de todos los animales individuales en la tierra. Más de la mitad de las especies de nematodos son parásitos y presentan un problema significativo para la salud tanto de las plantas como de los animales. Un grupo particularmente costoso de nematodos son los que forman nudos en las raíces de las plantas tales como los cultivos de soya, maíz, remolacha azucarera, patata y tomate. Las infecciones del nudo en la raíz pueden afectar el rendimiento y el valor estético de estas plantas de cultivo, lo que lleva a pérdidas financieras significativas para los productores. Actualmente, existe una escasez de tratamientos seguros y efectivos para la enfermedad del nudo de la raíz.

40 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que contengan la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo. Preferentemente, estas composiciones pueden diluirse fácilmente y son capaces de mezclarse con una variedad de otros pesticidas. Además, estas composiciones deberían ser capaces de controlar las infecciones por nematodos incluyendo las infecciones de plantas.

Resumen de la invención

45

La presente invención se dirige a composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que comprenden:

i) la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo; y

50 ii) un portador líquido que comprende una mezcla de polietilenglicol y glicerol.

También en la presente descripción se describen los métodos para controlar nematodos que comprenden aplicar una cantidad eficaz de una composición líquida no acuosa y no oleosa que comprende la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* y un portador líquido a un área que necesite del control de nematodos.

55

Descripción detallada de la invención

60 Los solicitantes descubrieron inesperadamente que las composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que contienen un portador líquido proporcionan una estabilidad y viabilidad superiores a la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo. Este hallazgo fue inesperado porque anteriormente se desconocía si las composiciones líquidas no acuosas y no oleosas podían usarse para el almacenamiento y la dispersión de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En una modalidad, la presente invención se dirige a una composición líquida no acuosa y no oleosa que comprende:

65 i) la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo; y

ii) un portador líquido que comprende una mezcla de polietilenglicol y glicerol.

En otra modalidad la presente invención se dirige a composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que comprenden:

- 5 i) la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo a una concentración del 20 % ± 10 % al 30 % ± 10 % p/p;
ii) UN polietilenglicol a una concentración del 70 % ± 10 % al 80 % ± 10 % p/p; y

10 iii) glicerol a una concentración del 5 % ± 10 % al 10 % ± 10 % p/p; y en donde "más o menos 10 %" significa que son valores comprendidos dentro de más o menos 10 % de los valores reivindicados.

En otra modalidad la presente invención se dirige a composiciones líquidas no acuosas Y no oleosas que comprenden:

- 15 i) La cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo a una concentración del 20 % ± 10 % al 30 % ± 10 % p/p;
ii) un polietilenglicol a una concentración del 70 % ± 10 % al 80 % ± 10 % p/p;
20 iii) glicerol a una concentración del 5 % ± 10 % al 10 % ± 10 % p/p;
iv) un polímero de vinilpirrolidona a una concentración del 0,1 % ± 10 % al 5 % ± 10 % p/p; y
v) un copolímero de bloques no iónico a una concentración del 0,1 % ± 10 % al 5 % ± 10 % p/p; y en donde "más o menos 10 %" significa que son valores comprendidos dentro de más o menos 10 % de los valores reivindicados.

25 En una modalidad preferida la presente invención se dirige a composiciones líquidas no acuosas y no oleosas que comprenden:

- i) 22,5 % ± 10 % p/p de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo;
30 ii) 68 % ± 10 % p/p de un polietilenglicol;
iii) 7 % ± 10 % p/p de glicerol;
iv) 0,5 % ± 10 % p/p de heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno
35 v) 1,5 % ± 10 % p/p de un polímero de vinilpirrolidona; y
vi) 1 % ± 10 % p/p de un copolímero de bloques no iónico; en donde "más o menos 10 %" significa que son valores comprendidos dentro de más o menos 10 % de los valores reivindicados.

40 Se describe además en la presente descripción un método para controlar nematodos que comprende aplicar una cantidad eficaz de una composición de la invención a un área que necesita el control de nematodos.

45 Las composiciones de la presente invención pueden aplicarse a una velocidad de alrededor de 5 a alrededor de 400 gramos de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo por hectárea, preferentemente de alrededor de 10 a alrededor de 300 gramos por hectárea y con mayor preferencia de alrededor de 25 a alrededor de 300 gramos por hectárea.

50 Las composiciones de la presente invención pueden aplicarse a una velocidad de alrededor de 0,01 a alrededor de 100 miligramos de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo por 100 000 semillas o 100 libras de semilla, preferentemente de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 miligramos de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo por 100 000 semillas o 100 libras de semilla y con mayor preferencia de alrededor de 0,3 a alrededor de 3 miligramos de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo por 100 000 semillas o 100 libras de semilla.

El área que necesita el control de nematodos puede ser material de propagación de la planta.

55 El material de propagación de la planta puede ser semillas.

Las composiciones de la presente invención pueden aplicarse a cualquier planta que necesite el control de nematodos, que incluye, pero no limita a, cultivos de plantas de paisaje, árboles frutales, árboles de núculas, vides frutales, cultivos de hortalizas y cereales.

60 El área que necesita el control de nematodos puede ser un área donde se cultivan cultivos.

Los cultivos pueden seleccionarse del grupo que consiste en cultivos de soya, maíz, patata y cereal.

65 La composición de la presente invención puede aplicarse con un herbicida tal como glifosato, mesotriona, halosulfurón, saflufenacilo o dicamba.

La composición de la presente invención puede aplicarse con un fungicida tal como tetraconazol, metconazol, una estrobilurina o un producto combinado de estrobilurina-azol.

5 La composición de la presente invención puede aplicarse con un insecticida tal como metilparatión, bifentrina, esfenvalerato, lorsban, carbarilo o lanato.

10 Las composiciones de la invención pueden aplicarse con fertilizantes foliares tal como CoRoN (disponible de Helena Chemical), un nitrógeno de liberación controlada o BioForge (disponible de Stoller USA), que es en gran parte N,N'-diformilurea u otros pulverizadores que contienen micronutrientes.

15 La composición de la presente invención puede aplicarse por cualquier medio conveniente. Los expertos en la técnica están familiarizados con los modos de aplicación que incluyen aplicaciones foliares tales como pulverización y aplicaciones al suelo, que incluye pulverización, tratamientos en surcos o vendajes.

Como se usa en la presente descripción, el término "vivo" se refiere a un organismo que puede crecer y replicarse.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "latente" se refiere a una etapa en el ciclo de vida de un organismo vivo en la que el crecimiento y la replicación del organismo se suspende o retarda.

Como se usa en la presente descripción, el término "material de propagación de plantas" se refiere a semillas de todo tipo (frutas, tubérculos, granos), esquejes, brotes cortados y similares.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un organismo microbiano vivo capaz de proporcionar el control de un nematodo.

Como se usa en la presente descripción, "control" o "controlar" se refiere a matar o inhibir, ralentizar o prevenir el crecimiento y/o propagación de un organismo.

30 Como se usa en la presente descripción, "concentrado en suspensión" se refiere a una formulación en donde las partículas insolubles se suspenden en diluyentes líquidos. Un concentrado en suspensión no es una solución.

35 Como se usa en la presente descripción, todos los valores numéricos relacionados con cantidades, porcentajes en peso y similares se definen como "alrededor de" o "aproximadamente" cada valor particular, más o menos 10 %. Por ejemplo, la frase "al menos 5,0 % en peso" debe entenderse como "al menos 4,5 % al 5,5 % en peso." Además, las cantidades dentro de 10 % de los valores reivindicados están comprendidas por el alcance de las reivindicaciones.

40 Como se usa en la presente descripción % p/p indica el peso en peso total de la composición. Todas las concentraciones enumeradas en la presente descripción están en % p/p a menos que se describa lo contrario.

Los portadores líquidos de la presente invención incluyen una mezcla de polietilenglicol (tal como PEG 300, PEG 400) y glicerol. En una modalidad preferida el portador líquido se incluye en la composición a una concentración de alrededor de 15 % a alrededor de 99 % p/p.

45 Los polietilenglicoles son compuestos que contienen una subunidad repetitiva de la siguiente estructura molecular $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$. Los polietilenglicoles se identifican en función de su peso molecular promedio. Por ejemplo, un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 400 dalton se denomina polietilenglicol 400. En una modalidad preferida, el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de alrededor de 100 a alrededor de 800 dalton.

50 Las composiciones utilizadas en los métodos de la presente invención pueden formularse para que contengan adyuvantes adicionales, tales como:

55 agentes antiaglomerantes, que incluyen, pero no se limitan, fosfato de sodio, fosfato de amonio, acetato de sodio, metasilicato de sodio, magnesio, sulfato de zinc y calcio, hidróxido de magnesio, cloruro de calcio anhidro, alquilsulfosuccinatos de sodio, óxidos de calcio y bario;

estabilizadores, que incluyen, pero no se limitan a, aceites animales o vegetales epoxidados, tal como aceite de soya epoxidado;

60 antiespumantes, que incluyen, pero no se limitan a, agentes antiespumantes de silicona y polímeros de bloques de polioxietileno y polioxipropileno inferiores (en donde el número de unidades de óxido de octil, nonil y fenilpolioxietileno/etileno es >5) y alcoholes de cadena larga;

agentes deslizantes, que incluyen, pero no se limitan a, aminas grasas, oleamidas y erucamidas;

65

dispersantes, que incluyen, pero no se limitan a, Agrimer® 30 (polímero de vinilpirrolidona; Agrimer es una marca registrada de ISP Investment, Inc. y disponible de Ashland), copolímeros de bloques de polietilenglicol/polipropilenglicol, Atlox® 4912 (copolímero de bloques no iónico; Atlox es una marca registrada y disponible de Croda Americas LLC), alquiléteres de polietilenglicol, alquiléteres de polipropilenglicol, copolímeros de bloques de éter de polietilenglicol/polipropilenglicol, fosfatos de alquilarilo, por ejemplo tristirilfosfatos, ácidos lignosulfónicos, condensados de naftalenos sulfonados con formaldehído o con formaldehído y fenol y, si corresponde, urea, y también condensados de ácido fenolsulfónico, formaldehído y urea, licores residuales de lignosulfito y lignosulfonatos, policarboxilatos, tales como, por ejemplo, poliacrilatos, copolímeros de anhídrido maleico/olefina que incluyen el metal alcalino, metal alcalinotérreo, sales de amonio y amina de los mismos, preferentemente el dispersante es un polímero de vinilpirrolidona, un copolímero de bloques no iónico o una combinación de los mismos, con mayor preferencia el dispersante es una combinación de alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 % p/p de un polímero de vinilpirrolidona y de alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 % p/p de un copolímero de bloques no iónico;

modificadores de la reología, que incluyen, pero no se limitan a, Attagel 50 (filosilicato de aluminio y magnesio), arcillas y organoarcillas, sílices hidrófilas e hidrófobas, aceites de ricino hidrogenados y sus derivados, poliamidas, celulosa microcristalina, ceras oxidadas y dispersantes estéricos (por ejemplo, polímeros peine tales como polivinilpirrolidinonas o poliacrilatos), preferentemente el modificador de la reología es filosilicato de magnesio y aluminio, con mayor preferencia a una concentración de alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 % p/p;

agentes humectantes, que incluyen, pero no se limitan a, ácidos naftalenosulfónicos, que incluyen sus sales de metales alcalinos, alcalinotérreos, sales de amonio y amina, etoxilato de alcohol graso, alquilpoliglucósidos, ésteres de glicerol de ácidos grasos, alcoxilatos de aceite de ricino, alcoxilatos de ácidos grasos, alcoxilatos de amida grasa, polidietanolamidas grasas, etoxilados de lanolina y ésteres de poliglicol de ácidos graso;

agentes espesantes, que incluyen, pero no se limitan a sílice humeada hidratada o arcillas de atapulgita o arcillas de atapulgita tratadas con amina;

emulsionantes, que incluyen, pero no se limitan a, alquilaril éster sulfato de polioxietileno y estirilalil éter sulfato polioxietileno, alcoholes alcoxilados, alcoholes etoxilados, alcoholes etopropoxilados, alquilfenoletoxilatos, tristirilfenoles alcoxilados, tributilfenoles alcoxilados, alquilaminaetoxilados, aceites vegetales etoxilados que incluyen sus hidrogenados, poliaductos de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y sus derivados), ácidos grasos etoxilados, tensioactivos poliméricos no iónicos (por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polimetacrilatos y sus derivados), ésteres de sorbitán y sus etoxilatos, ésteres de sorbitol, ésteres de propilenglicol y poliésteres de ácidos grasos de ácidos grasos y ésteres de poliglicerol;

conservantes, que incluyen, pero no se limitan a, conservantes a base de 1, 2-benzisotiazolin-3-ona, conservantes 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y conservantes 2-metil-2H-isotiazol-3-ona, que aumentan la actividad duradera de los activos; y

Silwet® ECO (heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileño; Silwet es una marca registrada y disponible de Momentive Performance Materials Inc.) Pueden incluirse opcionalmente otros componentes que mejoran la actividad biológica o la aplicación de estos ingredientes.

Estas modalidades representativas no son de ninguna manera limitantes y se describen únicamente para ilustrar algunos aspectos de la invención.

Además, los siguientes ejemplos se ofrecen solo a manera de ilustración y no a manera de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Formulaciones en suspensión de *Bacillus amyloliquefaciens* al 22,5 % concentrada

Tabla 1

| Formulación #1 | % p/p |
|--|-------------|
| Polietilenglicol | Hasta 100 % |
| Glicerol | 7 |
| Silwet® ECO (heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileo) | 0.5 |
| Agrimer® 30 (polímero de vinilpirrolidona) | 1.5 |
| Atlox® 4912 (copolímero de bloques no iónico) | 1 |
| Polvo Tech de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Cepa BA-1) | 22.5 |

Tabla 2

| Formulación #2 | % p/p |
|--|-------------|
| Polietilenglicol | Hasta 100 % |
| Glicerol | 7 |
| Silwet® ECO (heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileo) | 0.5 |
| Attagel™ 50 (filosilicato de magnesio y aluminio) | 3.1 |
| Agrimer® 30 (polímero de vinilpirrolidona) | 0.1 |
| Polvo Tech de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Cepa BA-1) | 22.5 |

Ejemplo 2

Estudios de viabilidad

Los solicitantes probaron la viabilidad de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* en las formulaciones del Ejemplo 1. Este estudio se realizó mediante el uso de procedimientos estándar conocidos y aceptados por los expertos en la técnica. Los resultados de este estudio pueden observarse a continuación en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3

| Formulación #1 | # unidades formadoras de colonias | |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | 0 meses | 9 meses |
| Temperatura | | |
| 5 °C | 8,2 X 10 ¹⁰ | 8,13 X 10 ¹⁰ |
| 25 °C | 8,2 X 10 ¹⁰ | 7,63 X 10 ¹⁰ |
| 30 °C | 8,2 X 10 ¹⁰ | 8,36 X 10 ¹⁰ |

Tabla 4

| Formulación #2 | # unidades formadoras de colonias | |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | 0 meses | 3 meses |
| Temperatura | | |
| 5 °C | 7,4 X 10 ¹⁰ | 7,45 X 10 ¹⁰ |
| 25 °C | 7,4 X 10 ¹⁰ | 9,10 X 10 ¹⁰ |
| 30 °C | 7,4 X 10 ¹⁰ | 7,58 X 10 ¹⁰ |
| 25-40 °C Tropical | 7,4 X 10 ¹⁰ | 8,50 X 10 ¹⁰ |

Como puede observarse en las Tablas 3 y 4, las composiciones del Ejemplo 1 proporcionan estabilidad y viabilidad a *Bacillus amyloliquefaciens*. Específicamente, ninguna de las formulaciones permitió una reducción significativa en el número de unidades formadoras de colonias cuando se almacenaron a varias temperaturas durante un período de tiempo prolongado. El número de unidades formadoras de colonias es una medida de la viabilidad ya que cada unidad formadora de colonias representa a un organismo individual de *Bacillus amyloliquefaciens* que pudo crecer y propagarse. Por lo tanto, las composiciones del Ejemplo 1 son capaces de proporcionar almacenamiento estable a largo plazo de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo mientras se mantiene la viabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida no acuosa y no oleosa que comprende:
5 i) la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo; y
ii) un portador líquido que comprende una mezcla de polietilenglicol y glicerol.
2. La composición de conformidad con la reivindicación 1 en donde:
10 i) la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo está a una concentración del 20 % ± 10 % al 30 % ± 10 % p/p;
ii) el polietilenglicol está a una concentración del 70 % ± 10 % al 80 % ± 10 % p/p; y
10 iii) el glicerol está a una concentración del 5 % ± 10 % al 10 % ± 10 % p/p,
en donde p/p indica el peso en el peso total de la composición; y en donde "más o menos 10 %" significa que son valores abarcados dentro de más o menos 10 % de los valores reivindicados.
3. La composición de conformidad con la reivindicación 2 que comprende, además:
15 i) un polímero de vinilpirrolidona a una concentración del 0,1 % ± 10 % al 5 % ± 10 % p/p; y
ii) un copolímero de bloque no iónico a una concentración del 0,1 % ± 10 % al 5 % ± 10 %
p/p; y en donde "más o menos 10 %" significa que son valores abarcados dentro de más o menos 10 % de los
valores reivindicados.
- 20 4. Una composición líquida no acuosa y no oleosa que comprende:
i) 22,5 % ± 10 % p/p de la cepa BA-1 de *Bacillus amyloliquefaciens* vivo;
ii) 68 % ± 10 % p/p de un polietilenglicol;
iii) 7 % ± 10 % p/p de glicerol;
iv) 0,5 % ± 10 % p/p de heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno
25 v) 1,5 % ± 10 % p/p de un polímero de vinilpirrolidona; y
vi) 1 % ± 10 % p/p de un copolímero de bloques no iónico,
en donde p/p indica el peso en el peso total de la composición; y en donde "más o menos 10 %" significa que son
valores abarcados dentro de más o menos 10 % de los valores reivindicados.