

Industria

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275266- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:27:30
Tra. 11 PATENTEII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 69

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMBINACIONES SINÉRGICAS DE FUNGICIDAS
POLIÉNICOS Y PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES Y MÉTODOS DE
USO RELACIONADOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A01N 63/16

71. SOLICITANTE: BAYER CROPSCIENCE LP

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América

74. APODERADA SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 13-275268- -00000-0000 Fecha: 2013-11-22 15:27:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 69
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/US2012/039178 Fecha 23 Mayo de 2012			
Publicación Internacional No. WO 2012/162412 A2 Fecha 29 de Noviembre de 2012			
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
<u>COMBINACIONES SINÉRGICAS DE FUNGICIDAS POLIÉNICOS Y PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES Y MÉTODOS DE USO RELACIONADOS</u>			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A01N 43/16		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
BAYER CROSCIENCE LP			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 1540 Drew Avenue Davis, No. TELÉFONO:			
CIUDAD: California 95618, CORREO ELECTRONICO:			
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.GUILHABERT-GOYA,		Magalie	Estadounidense
2.MARGOLIS,		Jonathan, S.	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
1.2009 Renoir Court,		Davis,	California 95618,
2.1737 Evergreen Court,		Davis,	California 95618,
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co.	
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1.Estados Unidos de América		US	61/489.640
2.Estados Unidos de América		US	61/615.075
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2011/05/24
			2012/03/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-112411// 13-	Fecha 05/11/2013 22/11/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios 44		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 63		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. <u>Regla 4.17</u>	
3. ☒ Dibujos y/o figuras Nº folios:9		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

COMBINACIONES SINÉRGICAS DE FUNGICIDAS POLIÉNICOS Y PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES Y MÉTODOS DE USO RELACIONADOS

[0001] La presente invención se refiere a combinaciones sinérgicas de fungicidas poliénicos con antibióticos péptidos no ribosomales, como por ejemplo lipopéptidos cíclicos anfifílicos, para mejorar la actividad fungicida de ambos componentes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los fungicidas tienen muchos usos, que incluyen la protección de cosechas; los usos como conservantes de alimentos, piensos, y cosméticos; y como productos farmacéuticos para uso tanto en humanos como en animales. La reducción del rendimiento de las cosechas, las enfermedades transmitidas por los alimentos e infecciones fúngicas tanto de humanos como de animales son un problema tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en desarrollo. Por lo tanto, son muy deseables las mejoras en la eficacia de los fungicidas existentes, especialmente aquellos que no dañan el medio ambiente y no son susceptibles de desarrollar de resistencia fúngica.

[0003] Los fungicidas poliénicos son antibióticos antifúngicos que se han utilizado en todos los campos mencionados anteriormente. Los mismos se pueden obtener por fermentación de especies de *Streptomyces*, como por ejemplo *Streptomyces natalensis*, que comúnmente se encuentra en el suelo. La actividad de los fungicidas poliénicos se debe, en parte, a su capacidad de dañar las membranas celulares formando complejos con el ergosterol. Numerosos estudios han confirmado que el potencial de desarrollo de hongos resistentes a la natamicina es muy bajo. Además, los fungicidas poliénicos tienen una toxicidad despreciable, ya que no afectan al colesterol presente en las células de los mamíferos.

[0004] Los péptidos no ribosomales, incluyendo a los lipopéptidos cíclicos anfifílicos tales como las surfactinas, iturinas y fengicinas, poseen propiedades antimicrobianas bien reconocidas y se han utilizado en el campo de la protección de cosechas. Debido a su modalidad de acción, los mismos también

presentan potencial para uso en aplicaciones biofarmacéuticas y otras aplicaciones en biotecnología. Los lipopéptidos se pueden obtener por fermentación de diversas bacteria del suelo, incluyendo a *Bacillus subtilis* y *Bacillus amiloliquefaciens*. Los lipopéptidos, de manera similar a los fungicidas poliénicos, matan a los hongos rompiendo sus membranas celulares. Se espera que el potencial de desarrollo de resistencia fúngica a dichos compuestos sea muy bajo porque los mismos actúan directamente sobre los lípidos de la membrana y no sobre un único sitio de una proteína objetivo. Además, los lipopéptidos no dañan el medio ambiente y presentan un bajo riesgo para el personal y para los consumidores; de hecho, las cosechas tratadas con cepas de *Bacillus* que contienen lipopéptidos se pueden cosechar el mismo día del tratamiento. Los inventores descubrieron que las combinaciones de fungicidas poliénicos y lipopéptidos causan un incremento sinérgico, más que simplemente aditivo, de la eficacia contra microorganismos tales como hongos. Sin la intención de quedar limitados por una teoría, los Inventores presentan la hipótesis de que los lipopéptidos y fungicidas poliénicos de la presente invención actúan de una manera fungicida sinérgica porque cada tipo de compuesto rompe las membranas celulares de los hongos mediante una modalidad de acción diferente.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0005] La presente invención provee una composición fungicida de baja toxicidad, con baja inducción de resistencia, con eficacia incrementada que comprende componentes que son menos tóxicos que muchos fungicidas sintéticos tradicionales y que se aplican en menor proporción que cualquiera de los compuestos individuales. Esta composición fungicida comprende una combinación fungicida sinérgica de uno o más fungicidas poliénicos y por lo menos un lipopéptido. En una forma de realización, el fungicida poliénico es uno o más de: natamicina, nistatina, amfotericina B, aureofungina, filipin y lucenosomicina y/o derivados de cada uno de dichos fungicidas poliénicos. En otra forma de realización, la composición incluye más que un fungicida poliénico.

[0006] El componente lipopéptido de esta combinación fungicida sinérgica puede ser parte de un producto de fermentación que produce un

microorganismo productor de lipopéptidos, puede ser un extracto crudo de dicho fungicida producto de una fermentación, o puede haber sido purificado o semi-purificado a partir de dicho producto de fermentación. En otras formas de realización, los lipopéptidos son sintéticos o semi-sintéticos (es decir, se obtiene un lipopéptido de origen de un microorganismo y se derivatiza). En algunas formas de realización, el microorganismo productor de lipopéptidos es una bacteria de la especie *Bacillus*. En otros es un Streptomycete. En aún otros, es una bacteria de la especie *PaeniBacillus*.

[0007] En una instancia, particular, la bacteria productora de lipopéptidos es *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* o cualquier otra especie de *Bacillus* que produzca uno o más lipopéptidos. En aún otra instancia, los lipopéptidos que producen dicha especie de *Bacillus* provienen de una o más de las siguientes familias: compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo iturina y compuestos de tipo fengicina. Algunas especies de *Bacillus* que producen lipopéptidos se describen en la Descripción Detallada de la Invención (por ejemplo, *amyloliquefaciens*, *cereus*, *thuringiensis*, *coagulans*, *pumilus*, *licheniformis*); otras serán conocidas para aquellos con experiencia en el arte. En una instancia, particular, la bacteria productora de lipopéptidos es *Bacillus subtilis* QST713. En una forma de realización, la composición comprende un componente fungicida poliénico y un producto de fermentación que contiene lipopéptidos. En una instancia, el producto de fermentación que contiene lipopéptidos proviene de una bacteria de la especie *Bacillus*, como por ejemplo aquellas que se mencionaron anteriormente.

[0008] En algunas formas de realización, el componente lipopéptido de las composiciones de la presente invención comprende uno o más de los siguientes compuestos: compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fengicina, compuestos de tipo iturina y fusaricidinas. Los compuestos de tipo iturina que son apropiados para la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: bacilomicina D, bacilomicina F, bacilomicina L, bacilomicina LC (que también se conoce como bacilopeptina), micosubtilina, iturina A, iturina A_L, e iturina C (donde los últimos tres compuestos se denominan aquí en

conjunto iturinas). Los compuestos de tipo fengicina que son apropiados para la presente invención son fengicina A, fengicina B, plipastatina A, plipastatina B, las plipastatinas y agrastatinas, según se las describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.291.426 (donde los últimos cuatro de la lista se denominan aquí en conjunto plipastatinas). Los compuestos de tipo surfactina que son apropiados para la presente invención son esperina, liquenisina, pumilacidina y surfactina. En una forma de realización en particular, el componente lipopéptido incluye uno o más compuestos del tipo iturina, como por ejemplo iturina As, micosubtilina y/o bacilomisina, compuestos de tipo fengicina y surfactina. En aún otra forma de realización, el componente lipopéptido incluye por lo menos dos de los siguientes compuestos: iturinas, compuestos de tipo fengicina y surfactinas.

[0009] En algunas formas de realización la combinación fungicida sinérgica comprende un fungicida poliénico y uno o más lipopéptidos. En otra forma de realización la combinación fungicida sinérgica comprende un fungicida poliénico y dos o más lipopéptidos. Los lipopéptidos pueden ser uno o más compuestos de una o más de las siguientes familias de compuestos: compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo iturina y/o compuestos de tipo fengicina. En una instancia, los lipopéptidos comprenden una o más iturinas y/o uno o más compuestos de tipo fengicina y/o surfactina. En una forma de realización, el componente fungicida poliénico de la composición es natamicina o nistatina y el componente lipopéptido comprende iturinas (A, B y/o C), bacilomicina, surfactina, fusaricidina, y/o compuestos de tipo fengicina, ya sea individualmente o en combinación. En una instancia, particular, los lipopéptidos son semi-purificados o purificados a partir de un producto de fermentación de una bacteria productora de lipopéptidos de la especie *Bacillus*. En aún otra instancia de esta forma de realización, el fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma.

[0010] La proporción peso en peso del componente fungicida poliénico de la composición al componente lipopéptido (por ejemplo, un caldo de fermentación que contiene el lipopéptido, un extracto crudo que contiene lipopéptidos; un extracto de lipopéptido purificado o semi-purificado; o

lipopéptido(s) puro(s) sintetizado(s) o derivatizado(s) químicamente) es de entre aproximadamente 500:1 y 1:500. En una forma de realización, la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un componente lipopéptido que comprende uno o más compuestos de una o más de las siguientes familias de compuestos, compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y/o fusaricidinas es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500. En una forma de realización en particular, la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un componente lipopéptido que incluye una combinación de compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina y/o compuestos de tipo fengicina es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500. En algunas formas de realización, la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un componente lipopéptido que contiene uno o más compuestos de tipo iturina, como por ejemplo iturina As y/o bacilomicina es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500; en otros, la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un componente lipopéptido compuestos que contienen de tipo fengicina es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500; en aún otros la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un componente lipopéptido compuestos que contienen de tipo surfactina, como por ejemplo surfactina, es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500. En una forma de realización, la proporción peso en peso de natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma a un extracto crudo de lipopéptidos que se obtuvo a partir de un caldo de fermentación, incluyendo un caldo de fermentación compuestos que contienen de tipo fengicina, compuestos de tipo iturina y/o compuestos de tipo surfactina, es de entre aproximadamente 1:500 y aproximadamente 500:1. En algunas formas de realización, la proporción peso en peso de cualquiera de las combinaciones descritas anteriormente de fungicida poliénico y un componente lipopéptido es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:100; en

otros es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10; en aún otros es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5; en aún otros es de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2; y en aún otros es de 1:1.

[0011] En una forma de realización, el componente fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma y el componente lipopéptido incluye a uno o más de los siguientes: (i) iturina, (ii) bacilomicina, (iii) micosubtilina, (iv) esperina, (v) liquenisina, (vi) pumilacidina, (vii) surfactina, (viii) fengicina A, (ix) fengicina B, (x) plipastatina A, (xi) plipastatina B, y/o (xii) agrastatina. En otra instancia de la forma de realización que se mencionó anteriormente, se excluye a la surfactina de la composición. En aún otra forma de realización, el componente fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma o nistatina o un derivado de la misma y el componente lipopéptido incluye a uno o más de los siguientes: (i) iturina, (ii) surfactina, (iii) fengicina y/o (v) plipastatina. En otra instancia de esta forma de realización, el derivado de natamicina o nistatina tiene una actividad fungicida igual o mejor que la del compuesto de origen.

[0012] Las composiciones de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones de control de hongos. Las composiciones descritas anteriormente se pueden utilizar para el control fúngico de fitopatógenos, patógenos fúngicos posteriores a la cosecha, patógenos fúngicos de alimentos o piensos y patógenos fúngicos humanos.

[0013] En una forma de realización, cualquiera de las composiciones descritas anteriormente se utiliza para controlar determinados patógenos, tales como especies de *Fusarium*, especies de *Botrytis*, especies de *Verticillium*, especies de *Rhizoctonia*, especies de *Trichoderma* y especies de *Pythium* por aplicación de la composición a las plantas, al área que rodea a las plantas, o hongos (setas) comestibles cultivados, micelios de hongos setas o compost para setas. En una forma de realización, el componente fungicida poliénico de composiciones de la presente invención que se utiliza para controlar dichos patógenos es la natamicina o un derivado de la misma. En otra, el mismo es nistatina o un derivado de la misma.

7

[0014] En otra forma de realización, las composiciones de la presente invención se utilizan para controlar, posteriormente a la cosecha, patógenos tales como especies de *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus niger*, y *Colletotrichum*. En una forma de realización, el componente fungicida poliénico de las composiciones que se utilizan para controlar dichos patógenos es la natamicina o un derivado de la misma. En otra, el mismo es la nistatina o un derivado de la misma.

[0015] En aún otra forma de realización, las composiciones de la presente invención se utilizan para controlar patógenos fúngicos que se encuentran en los alimentos o piensos, como por ejemplo especies de *Penicillium*, especies de *Aspergillus* y especies de *Fusarium*. En una forma de realización, el componente fungicida poliénico de composiciones que se utilizan para controlar a dichos patógenos es la natamicina o un derivado de la misma. En otra, el mismo es la nistatina o un derivado de la misma. En aún otra, el componente lipopéptido es un extracto purificado de uno o más lipopéptidos.

[0016] En aún otra forma de realización, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar o prevenir una infección fúngica en un sujeto administrando al sujeto una composición que comprende un fungicida poliénico y por lo menos un polipéptido. En una forma de realización la infección fúngica es causada por *Candida* y el fungicida poliénico que se utiliza en la composición es nistatina o un derivado de la misma. En otra, la infección fúngica es causada por *Candida* y el fungicida poliénico que se utiliza en la composición es natamicina o un derivado de la misma. En otra, la infección fúngica es causada por *Fusarium* o *Aspergillus* y puede ser una infección de la córnea. En dicha instancia, el componente fungicida poliénico que se utiliza en la composición es natamicina o un derivado de la misma. En otra instancia donde la composición se utiliza para tratar una infección de la córnea, el componente fungicida poliénico es nistatina o un derivado de la misma. En aún otra instancia el componente lipopéptido de la composición es un extracto purificado de uno o más lipopéptidos.

[0017] La presente invención también incluye un método para producir una composición fungicida haciendo una combinación de uno o más fungicidas poliénicos con uno o más lipopéptidos, probar la combinación for sinérgica eficacia

contra hongos objetivo y producir una composición fungicida que comprende la combinación y un vehículo. En una forma de realización, los uno o más lipopéptidos forman parte de un producto de fermentación de una bacteria de la especie *Bacillus* o son un extracto del mismo, como por ejemplo aquellos descritos anteriormente y en la Descripción Detallada de la Invención. En otra instancia de esta forma de realización, antes de hacer la combinación, se selecciona una bacteria productora de lipopéptidos, como por ejemplo una cepa de una especie de *Bacillus* o una cepa de una especie de *PaeniBacillus*, y se produce un producto de fermentación que contiene lipopéptidos usando esta bacteria productora de lipopéptidos, y dicho producto de fermentación o un extracto del mismo se utiliza para hacer la combinación. En una instancia, dicho producto de fermentación puede incluir uno o más de los siguientes lipopéptidos: compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fengicina, compuestos de tipo iturina y/o fusaricidina. En una instancia más particular, dicho producto de fermentación puede incluir uno o más de los siguientes lipopéptidos: surfactina, plipastatina, fengicina, iturina y/o bacilomicina. En otra forma de realización, cada uno del componente fungicida poliénico y el componente lipopéptido se puede seleccionar por su actividad fungicida contra el patógeno objetivo antes de hacer la combinación y para hacer la combinación se pueden utilizar solo el fungicida poliénico y los componentes lipopéptidos que tienen por lo menos cierta actividad fungicida. En otras formas de realización, los hongos objetivo son fitopatógenos, como por ejemplo *Fusarium*, *Botrytis* y *Verticillium*; patógenos posteriores a la cosecha, como por ejemplo *Penicillium* y *Geotrichum*; patógenos fúngicos de alimentos o piensos, como por ejemplo *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; y patógenos fúngicos humanos, como por ejemplo *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium*. En el método anterior también se puede utilizar a *Saccharomyces cerevisiae* como patógeno objetivo, como un modelo para *Candida*. En una instancia, el componente fungicida poliénico de la combinación que se prueba es natamicina o un derivado de la misma o nistatina y un derivado de la misma. En otra instancia, los lipopéptidos que se prueban son uno o más compuestos del tipo surfactina, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina y/o fusaricidinas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0018] La Figura 1 muestra el crecimiento porcentual de *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con un control negativo (sin recibir tratamiento) en presencia de (i) un extracto crudo de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 y natamicina, (ii) lipopéptidos solos, o (iii) natamicina sola.

[0019] La Figura 2 muestra el crecimiento porcentual de *Penicillium expansum* en comparación con un control negativo en presencia de (i) un extracto crudo de lipopéptidos, (ii) natamicina, y (iii) lipopéptidos y natamicina.

[0020] La Figura 3 muestra el crecimiento porcentual de *Penicillium expansum* en comparación con un control negativo en presencia de (i) natamicina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados (iv) combinaciones de natamicina y un extracto de lipopéptidos crudo y (v) combinaciones de natamicina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado o pueden ser todos lipopéptidos semi-purificados o purificados. Tal como se utiliza en la figura, "N" se refiere a natamicina; "lipo crudo" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0021] La Figura 4 muestra el crecimiento porcentual de *Geotrichum candidum* en comparación con un control negativo en presencia de (i) natamicina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de natamicina y un extracto de lipopéptido crudo, y (v) combinaciones de natamicina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "N" se refiere a natamicina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0022] La Figura 5 muestra el crecimiento porcentual de *Geotrichum candidum* en comparación con un control negativo en presencia de (i) nistatina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de nistatina y un extracto de lipopéptido crudo, y

(v) combinaciones de nistatina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "Ny" se refiere a nistatina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0023] La Figura 6 muestra el crecimiento porcentual de *Geotrichum citri-aurantii* en comparación con un control negativo en presencia de (i) natamicina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de natamicina y un extracto de lipopéptido crudo; y (v) combinaciones de natamicina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "N" se refiere a natamicina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0024] La Figura 7 muestra el crecimiento porcentual de *Geotrichum citri-aurantii* en comparación con un control negativo en presencia de (i) nistatina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de nistatina y un extracto de lipopéptido crudo, y (v) combinaciones de nistatina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "Ny" se refiere a nistatina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0025] La Figura 8 muestra el crecimiento porcentual de *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con un control negativo en presencia de (i) natamicina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de natamicina y un extracto de lipopéptido crudo, y (v) combinaciones de natamicina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "N" se refiere a natamicina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y

"S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

[0026] La Figura 9 muestra el crecimiento porcentual de *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con un control negativo en presencia de (i) nistatina, (ii) un extracto de lipopéptido crudo, (iii) diversos lipopéptidos semi-purificados o purificados, (iv) combinaciones de nistatina y un extracto de lipopéptido crudo, y (v) combinaciones de nistatina y cada lipopéptido semi-purificado o purificado. Tal como se utiliza en la figura, "Ny" se refiere a nistatina; "L" se refiere al extracto de lipopéptido crudo; "I" se refiere a los compuestos de tipo iturina semi-purificados; "F" se refiere a los compuestos de tipo fengicina semi-purificados; y "S" se refiere a los compuestos de tipo surfactina purificados.

Descripción Detallada de la Invención

[0027] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente, incluyen a todas las figuras y apéndices que figuran en las mismas, se incorporan como referencia en la misma extensión que si se indicase que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora específica e individualmente como referencia.

[0028] La siguiente descripción incluyen información que puede ser útil para comprender la presente invención. La misma no es una admisión de que nada de la información que se provee aquí es arte anterior ni que sea relevante para la invención que se reivindica en la presente, ni tampoco que ninguna de las publicaciones a las que se hace referencia específica o implícitamente sea arte anterior.

[0029] La presente invención abarca combinaciones sinérgicas de fungicidas poliénicos con antibióticos péptidos no ribosomales, diferentes de enzimas, para el control de patógenos microbianos, como por ejemplo hongos, oomicetes y/o bacterias.

[0030] Los fungicidas poliénicos de la presente invención son antibióticos antifúngicos con un anillo lactona macrocíclico que tiene (i) una parte polieno lipofílica rígida y una parte hidrofílica hidroxilada flexible y (ii) la capacidad de unirse a un esteroide en la membrana celular de la mayoría de los hongos, principalmente ergosterol. El anillo lactona macrocíclico puede tener 12-40

carbonos, 6-14 grupos hidroxilo y puede estar conectado o no a un carbohidrato. El anillo puede ser conectado a uno o más azúcares tales como un azúcar simple con cinco o más unidades de carbono, un desoxi azúcar, amino azúcares y otros similares, que contienen grupos sustituyentes unidos al anillo que incluyen conexiones oxigenadas. Los fungicidas poliénicos de la presente invención se pueden obtener de una especie de bacterias *Streptomyces*. Dichos fungicidas incluyen natamicina, nistatina, amfotericina B, aureofungina, filipin y lucensomicina así como derivados de las mismas. Los ejemplos de derivados incluyen a los derivados de amfotericina B descritos en la Patente de los EE.UU. No. 5.606.038, por ejemplo, o los derivados/análogos de nistatina tales como S44HP, NYST1068, y la octaeno nistatina descrita en Bruheim et al., *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Nov. 2004, pp. 4120-4129. Los derivados son análogos de origen natural de moléculas de origen o compuestos sintéticos o semi-sintéticos derivatizados a partir de una molécula de origen que retiene por lo menos cierta actividad fungicida en comparación con las moléculas de origen. En algunas formas de realización, los derivados tienen por lo menos la misma actividad fungicida o una mayor actividad en comparación con las moléculas de origen. Los derivados incluyen sales y solvatos y otras formas modificadas con una mayor solubilidad en comparación con las moléculas de origen.

[0031] Los antibióticos péptidos no ribosomales (NRPs) de la presente invención son péptidos no ribosomales que afectan la membrana celular o pared celular, excluyendo a las enzimas. Dichos antibióticos NRP son sintetizados por grandes complejos enzimáticos denominados sintetasas de péptidos no ribosomales, en vez de serlo por los ribosomas. El término "antibiótico", según se usa aquí, se refiere a la capacidad de matar o hacer más lento el crecimiento de los patógenos microbianos, como por ejemplo hongos, oomicetes y/o bacteria. En Internet hay una base de datos de péptidos no-ribosomales denominada Norine y se la describe en Caboche, S., et al., "NORINE: A Database of Nonribosomal Peptides", *Nucleic Acids Research*, 36:D326-D331, (2008). Los antibióticos NRP de la presente invención afectan las membranas celulares, incluyendo a las membranas de las organelas, o las paredes celulares. Las membranas o paredes

se pueden perturbar por diversos medios, que incluyen la inhibición de la síntesis de componentes de las membranas o paredes celulares; perturbación física de los componentes de la membrana celular, como por ejemplo por permeabilización de las membranas de fosfolípidos, ya sea por solubilización de la membrana o por perturbación osmótica; o uniéndose a moléculas pequeñas en la membrana celular.

[0032] Los NRP antifúngicos que afectan la pared celular de la presente invención incluyen a las equinocandinas, que son lipopéptidos anfifílicos semi-sintéticos compuestos de un núcleo hexapéptido cíclico conectado a una cadena lateral del lípido configurada variablemente. Las equinocandinas inhiben la síntesis de 1,3- β -glucano, un componente polisacárido predominante de la pared celular de los ascomicetes que conserva la integridad osmótica de la célula y está relacionado con división y el crecimiento de la célula. Las equinocandinas incluyen: caspofungina, micafungina y anidulafungina.

[0033] Los NRP antifúngicos que perturban la membrana celular de la presente invención también incluyen lipopéptidos, como por ejemplo péptidos cíclicos anfifílicos que se pueden obtener de diversas bacterias, incluyen *Bacillus* sp., *PaeniBacillus* sp., y *Streptomyces* sp. Según se usa aquí, el término "lipopéptidos" se refiere a péptidos cíclicos anfifílicos.

[0034] En algunas formas de realización, dichos péptidos cíclicos anfifílicos están compuestos por entre seis y diez α -aminoácidos conectados a un ácido graso β -aminado o β -hidroxilado, como por ejemplo los compuestos de tipo fengicina, los compuestos de tipo iturina, los compuestos de tipo surfactina y las fusaricidinas. Los compuestos de tipo iturina están compuestos por siete aminoácidos y están conectados a un ácido graso β -aminado. La longitud de la cadena de ácido graso puede variar entre C14 y C17. Dichos compuestos se pueden obtener de diversas especies de *Bacillus*, incluyendo a *subtilis* y *amiloliquefaciens*. Las iturinas y sus variantes se describen en Ongena, M., et al., "Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plants Disease Biocontrol," Trends in Microbiology, 16(3):115-125, (2007). Los compuestos de tipo iturina de la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: bacilomicina D,

bacilomicina F, bacilomicina L, bacilomicina LC (que también se conoce como bacilopeptina), micosubtilina, iturina A, iturina A_L, e iturina C (donde los últimos tres compuestos se denominan aquí en conjunto iturinas).

[0035] Los compuestos de tipo fengicina están compuestos por diez aminoácidos conectados a un ácido graso β -hidroxilado con una cadena, cuya longitud varía entre C14 y C18. Dichos compuestos se pueden obtener de diversas especies de *Bacillus*, incluyen *subtilis*, *amiloliquefaciens*, *cereus* y *thuringiensis* y de *Streptomyces* sp. Los compuestos de tipo fengicina se describen en Ongena, *citado anteriormente*. Los compuestos de tipo fengicina que son apropiados para las composiciones descritas aquí incluyen fengicina A, fengicina B, plipastatina A, plipastatina B, las plipastatinas de una *Streptomyces* sp. descrita en Kimura, et al., "SNA 60-367 - New Peptide Enzyme Inhibitors against Aromatase," Journal of Antibiotics, 50(6): 529-531, (1997), y agrastatinas, según se describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.291.426 (donde las últimas cuatro de la lista se denominan aquí en conjunto plipastatinas).

[0036] Los compuestos de tipo surfactina están compuestos por siete aminoácidos conectados a un ácido graso β -hidroxilado con una cadena cuya longitud varía entre C13 y C16. Dichos compuestos se pueden obtener de diversas especies de *Bacillus*, incluyen *subtilis*, *amiloliquefaciens*, *coagulans*, *pumilus* y *licheniformis*. La familia de compuestos surfactina ha sido descrita en Ongena, *citado anteriormente*. Los compuestos de tipo surfactina de la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: esperina, liquenisina, pumilacidina y surfactina.

[0037] Las fusaricidinas están compuestas por seis aminoácidos conectados a un ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico. Las fusaricidinas se pueden obtener de *PaeniBacillus* sp., incluyendo *polimyxa*. La familia de compuestos de la fusaricidina ha sido descrita en Choi, S-K, et al., "Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of *Paenibacillus polymyxa* E681," Biochemical and Biophysical Research Communications, 365:89-95, (2008). Las fusaricidinas de la presente invención incluyen a uno o más de los siguientes compuestos: fusaricidinas A-D y fusaricidinas LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-

F06, LI-F07 y LI-F08.

[0038] Se sabe que ciertas bacterias producen uno o más lipopéptidos, y combinaciones de diversos lipopéptidos poseen actividad fungicida sinérgica. En una forma de realización, el componente lipopéptido de la composición contiene una combinación de lipopéptidos de por lo menos dos de las siguientes clases de lipopéptidos: compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo iturina, y compuestos de tipo fengicina. En otra forma de realización, la combinación contiene dos o más de los siguientes compuestos: iturina As, plipastatinas A y B, fengicinas A y B y surfactina. En aún otra forma de realización, la combinación contiene uno o más de los siguientes compuestos: iturina As, plipastatinas A y B, fengicinas A y B, surfactina y agrastatina.

[0039] Los lipopéptidos de la presente invención son producidos por una o más bacterias, como por ejemplo aquellas descritas anteriormente, o se sintetizan químicamente. El término "caldo de fermentación", según se usa aquí, se refiere al medio de cultivo que se obtiene como resultado luego de la fermentación de un microorganismo y abarca al microorganismo y a las partes que lo componen, sustratos en bruto sin utilizar, y metabolitos que produce el microorganismo durante la fermentación, entre otras cosas. El término "sólido de fermentación", según se usa aquí, se refiere a un caldo de fermentación concentrado y/o secado. El término "producto de fermentación", según se usa aquí, se refiere a un caldo de fermentación y/o sólidos de fermentación. El término "lipopéptidos", según se usa aquí, se refiere a lipopéptidos que forman parte de un producto de fermentación y a lipopéptidos que están purificados por lo menos en cierta extensión, ya sea sintetizados químicamente o producidos biológicamente.

[0040] Los métodos para cultivar bacterias son bien conocidos en el arte. Los procesos de cultivos microbianos a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido, o cultivo en la superficie de líquidos. Para los *Bacillus*, hacia el final de la fermentación, a medida que se agotan los nutrientes, las células comienzan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de manera tal que el producto final de la fermentación consiste principalmente en esporas, metabolitos y medio de fermentación residual.

La esporulación es parte del ciclo de vida natural de muchos *Bacilos* y generalmente es iniciada por la célula en respuesta a una limitación de los nutrientes. Para la presente invención, la fermentación se configura para obtener altos niveles de lipopéptidos y para promover la esporulación.

[0041] Las células, esporas y metabolitos bacterianos en los medios de cultivo que se obtienen como resultado de la fermentación (es decir, el caldo de fermentación) se pueden utilizar directamente o se pueden concentrar (para hacer un sólido de fermentación) por métodos industriales convencionales, como por ejemplo centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración de profundidad, y evaporación. En algunas formas de realización, el sólido de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un proceso de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación y los metabolitos residuales.

[0042] El caldo de fermentación o los sólidos de fermentación se pueden secar con agregado de vehículos o sin realizar dicho agregado usando procesos o métodos de secado convencionales tales como secado por aspersión, liofilización, secado en bandejas, secado en lecho fluidizado, secado en tambor, o evaporación. Los sólidos de fermentación secos que se obtienen como resultado se pueden continuar procesando, como por ejemplo por molienda o granulación, para obtener un tamaño de partícula o formato físico específico. Los vehículos, que se describen más adelante, también se pueden agregar luego del secado, según sea apropiado para el método de uso que se desea.

[0043] Los lipopéptidos producidos bacteriamente se pueden separar de las células bacterianas o se pueden continuar purificando para separarlos de otros componentes bacterianos y, en algunas formas de realización, separándolos entre sí. El término "preparado libre de células" se refiere a un caldo de fermentación del cual se han eliminado las células o se han eliminado sustancialmente a través de medios bien conocidos por aquellos con experiencia en el arte. A continuación se describen algunos métodos para crear preparados libres de células. Los preparados del caldo de fermentación libres de células se puede obtener por cualquiera de los medios conocidos en el arte, como por ejemplo extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Aquellos con experiencia en

el arte apreciarán que los denominados preparados libres de células pueden no estar exentos de células sino que pueden estar principalmente libres de células o sustancialmente libres de células, dependiendo de la técnica que se utilice (por ejemplo, de la velocidad de centrifugación) para eliminar las células. El preparado libre de células que se obtiene como resultado se puede secar y/o formular con componentes que contribuyen a su aplicación particular. Los métodos de concentración y las técnicas de secado descritos anteriormente para el caldo de fermentación también se pueden aplicar a los preparados libres de células.

[0044] En algunas formas de realización, luego de hacer un preparado libre de células por centrifugación del caldo de fermentación, los metabolitos se pueden purificar mediante una filtración de exclusión por tamaños tal como con las resinas Sephadex, incluyendo LH-20, G10, y G15 y G25 que agrupan a los metabolitos en diferentes fracciones en base a cortes según su peso molecular, como por ejemplo pesos moleculares menores de aproximadamente 2000 Dalton, menores de aproximadamente 1500 Dalton, menores de aproximadamente 1000 Dalton etc., ya que los lipopéptidos se encuentran entre los 800 Dalton y los 1600 Dalton.

[0045] El término "extracto crudo", según se usa aquí, se refiere a extractos del caldo de fermentación en solventes orgánicos, como por ejemplo extractos en acetato de etilo, en el cual el extracto está enriquecido en lipopéptidos. En el Ejemplo 1 se ha descrito un método para obtener un extracto crudo de lipopéptidos de un cultivo bacteriano.

[0046] El término "semi-purificado", según se usa aquí, se refiere a lipopéptidos aislados de caldos de fermentación que son entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90% puros. El término "purificado", según se usa aquí, se refiere a lipopéptidos que se han aislado de caldos de fermentación que son entre aproximadamente 91% y aproximadamente 100% puros. Los lipopéptidos de la presente invención puede ser ya sea purificados o semi-purificados.

[0047] En una forma de realización, los lipopéptidos de la presente invención se obtienen de *Bacillus subtilis* QST713 o se utiliza un producto de fermentación de *Bacillus subtilis* QST713 como el lipopéptido que contiene al

componente de la composición. *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos lipopéptidos, y métodos para su uso en el control de patógenos de plantas e insectos se han descrito completamente en las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.060.051; 6.103.228; 6.291.426; 6.417.163 y 6.638.910. En dichas patentes, la cepa se denomina AQ713. *Bacillus subtilis* QST713 se ha depositado en la NRRL el 7 de mayo de 1997, conforme al Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure con el Número de Acceso B21661. Todas las referencias a QST713 en la presente memoria descriptiva se refieren a *Bacillus subtilis* QST713. En la Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 13/330.576 se describen variantes particulares de *Bacillus subtilis* QST713 (por ejemplo, *Bacillus subtilis* AQ30002 y AQ30004, depositados con los Números de Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455) que también pueden ser apropiadas para la presente invención.

[0048] En otras formas de realización, como fuentes de lipopéptidos para la presente invención se utilizan otras cepas de *Bacillus* capaces de producir lipopéptidos. Como se describió anteriormente, el caldo de fermentación o los extractos del caldo de fermentación se pueden utilizar como el componente que contiene al lipopéptido de la combinación fungicida sinérgica de la presente invención. En los ejemplos se describen métodos para obtener lipopéptidos de un caldo de fermentación de QST713. La obtención de lipopéptidos del caldo de fermentación de bacterias *Bacillus*, en general, y el análisis de la presencia de lipopéptidos en los caldos de fermentación son bien conocidos por aquellos con experiencia en el arte, de manera tal que un técnico con experiencia puede identificar fácilmente otras cepas bacterianas apropiadas para la presente invención. Las cepas de *Bacillus* que producen diversos lipopéptidos se describen en el artículo de revisión de Ongena (Trends in Microbiology (2007) Vol. 16, No. 3) citado anteriormente. Hay muchos otros artículos donde se describen cepas de *Bacillus* productoras de lipopéptidos y métodos para extraer lipopéptidos de los caldos de fermentación de such cepas: véanse; por ejemplo, Alvarez, F., et al. "The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP₂18 and ARP₂3

capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease" Journal of Applied Microbiology (2011) 112: 159-174; Ongena, M. et al., "Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*," Applied Microbiology Biotechnology (2005) 69: 29-38; Wang, Y., et al., "Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin" Eur. Food Res. Technol. (2010) 231: 189-196.

[0049] Las composiciones de la presente invención pueden incluir vehículos, que son ingredientes inertes de la formulación que se agregan a las composiciones que comprenden un producto de fermentación que contiene lipopéptidos, preparados libres de células de lipopéptidos o extractos de lipopéptidos purificados, semi-purificados o crudos para mejorar la recuperación, eficacia, o las propiedades físicas y/o para contribuir a su envasado y administración. Dichos vehículos se pueden agregar individualmente o en combinación.

[0050] Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para diversos propósitos, que incluyen la protección de cosechas y de frutos luego de la cosecha, hortalizas y plantas; como conservantes para cosméticos, alimentos procesados, piensos para animales, o maderas; y para aplicaciones farmacéuticas y veterinarias. Dependiendo de la aplicación particular, las composiciones se formularán con vehículos apropiados para contribuir a su aplicación o administración. En algunas formas de realización, los vehículos are agentes antiapelmazantes, agentes antioxidantes, agentes para aumentar el volumen, y/o protectores. Los ejemplos de vehículos útiles incluyen polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, como por ejemplo proteína de suero, péptidos, gomas), azúcares (lactosa, trehalosa, sacarosa), lípidos (lecitina, aceites vegetales, aceites minerales), sales (cloruro de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio), silicatos (arcillas, sílice amorfa, sílices ahumadas/precipitadas, sales silicato), ceras, aceites, alcoholes y tensioactivos.

[0051] Los vehículos apropiados como aditivos para piensos para animales se establecen en la American Feed Control Officials, Inc.'s Official

Publication, que se publica anualmente. Véase, por ejemplo, la Publicación Oficial de American Feed Control Officials, Sharon Krebs, editor, edición de 2006, ISBN 1-878341-18-9.

[0052] Las composiciones que se utilizan para aplicaciones farmacéuticas o veterinarias se combinan con vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden variar, dependiendo de la modalidad de administración.

[0053] Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar a un sitio que necesita tratamiento, en una cantidad efectiva para controlar un patógeno. El término "controlar", según se usa aquí, significa matar o inhibir el crecimiento del patógeno. En una forma de realización, el patógeno es un hongo. En otra, el patógeno es un oomicete.

[0054] En una forma de realización, el fungicida poliénico y el componente que contiene al lipopéptido (por ejemplo lipopéptidos purificados o semi-purificados, extractos crudos, productos de fermentación o productos sintetizados o derivatizados químicamente) se aplican en una proporción 1:1 (peso en peso). En otra, la proporción de fungicida poliénico a componente que contiene al lipopéptido es de aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 20:1, o aproximadamente 50:1. En otra, la proporción de fungicida poliénico a proteína no ribosomal es de aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, o aproximadamente 1:50.

[0055] En una forma de realización específica, se pueden proveer el fungicida poliénico y un componente que contiene lipopéptido que incluye uno o más lipopéptidos en diversas proporciones peso en peso (p/p) en la composición. En una forma de realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500. En otra forma de realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:100. En otra forma de

realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10. En otra forma de realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5. En otra forma de realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2. En otra forma de realización, la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el componente que contiene lipopéptido es de aproximadamente 1:1.

[0056] En una forma de realización, la composición se aplica a una planta o a un hongo comestible (seta) cultivado. En las aplicaciones en plantas, las composiciones se pueden aplicar a cualquier parte de una planta, incluyendo sus raíces, follaje, o frutos, o al área que rodea a la planta, incluyendo al suelo que rodea la planta. En aplicaciones en hongos (setas), las composiciones se pueden aplicar a hongos (setas) o a micelios de hongos (setas) o al compost para hongos (setas). La aplicación se puede realizar antes, cuando se está plantando y/o después. Algunos patógenos indicativos son *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Verticillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp. (moho verde), *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. La determinación de las tasas de aplicación para las composiciones de la presente es bien conocida por aquellos con experiencia en el arte. Una composición de la presente invención generalmente constituirá en entre 0,005 g/L y 100 g/L de cada uno del fungicida poliénico y la(s) proteína(s) no ribosomal(es), como por ejemplo un lipopéptido. En una forma de realización en la cual la composición sinérgica se aplica a una planta, a una parte de una planta o al área que rodea la planta o a un hongo comestible (seta) cultivado, micelios de hongos (setas) o compost para hongos (setas), el componente fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma.

[0057] En otra forma de realización la aplicación se realiza en alimentos posteriores a la cosecha y materiales vegetales no comestibles posteriores a la cosecha, como por ejemplo materias primas para biocombustible. Los alimentos posteriores a la cosecha, según se usa aquí, se refieren a frutos, hortalizas,

granos, semillas oleaginosas, y cualquier otro vegetal comestible y frutos secos luego la cosecha en el campo pero antes del envasado. Los patógenos posteriores a la cosecha indicativos incluyen, pero de manera no taxativa: *Botrytis cinerea* (moho gris), especies patógenas de *Colletotrichum* tales como *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum musa*, y *Colletotrichum capsici*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum citri-aurantii* (podredumbre ácida), *Helminthosporium solani* (sarna plateada de la papa), *Monilinia fructicola* (podredumbre marrón), *Penicillium* sp., incluyendo a las variedades *digitatum* (moho verde de los cítricos) y *expansum* (moho azul de los frutos de pepitas), *Rhizopus* sp. (podredumbre acuosa por *Rhizopus*), *Aspergillus niger* (moho negro), *Thielaviopsis basicola* (podredumbre negra de la zanahoria), podredumbre de frutos por mucor (por ejemplo, *Mucor piriformis* en peras), y *Alternaria* en raíces (que afecta principalmente a las zanahorias, al brócoli, a las papas, pimientos, manzanas, kiwis, peras, membrillos y tomates). La determinación de las tasas de aplicación para las composiciones de la presente para alimentos posteriores a la cosecha y materiales vegetales no comestibles posteriores a la cosecha es bien conocida por aquellos con experiencia en el arte. En una forma de realización donde la composición se aplica a los alimentos posteriores a la cosecha y a materiales vegetales no comestibles posteriores a la cosecha, como por ejemplo a materias primas para biocombustible, el componente fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma.

[0058] En aún otra forma de realización la aplicación se realiza a los alimentos o piensos. El término alimentos, según se usa aquí, incluye alimentos procesados, como por ejemplo productos lácteos, panes, tortillas, fiambres, y productos de panadería; alimentos semiprocesados o mínimamente procesados, como por ejemplo carnes, frutos y hortalizas cortados; y alimentos envasados, como por ejemplo lechuga, espinaca y otras hortalizas envasadas. El término "piensos" incluye piensos para animales procesados y ensilados. En dichas aplicaciones, los patógenos objetivo son patógenos que inducen el deterioro y productores de micotoxinas. Los patógenos indicativos son *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. La determinación de las tasas de aplicación para las

composiciones de la presente es bien conocida por aquellos con experiencia en el arte. Los niveles de dosis y los métodos de aplicación recomendados se describen en detalle en numerosas referencias, incluyendo: Davidson, P. Michael, et al., eds., *Antimicrobials in Food*, 3ª ed. CRC Press 2005, Cap. 8, pp. 275-289. En una forma de realización en la cual la composición sinérgica de la presente invención se aplica a alimentos o piensos, el componente fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma.

[0059] En otra forma de realización la aplicación se realiza en un humano o un animal. En aplicaciones en humano y veterinarias, las composiciones se aplican tópicamente a la piel y a las membranas mucosas para controlar *Candida albicans* y/o *Fusarium* sp. En una forma de realización, las composiciones se utilizan para prevenir o tratar infecciones vaginales, especialmente aquellas causadas por *Candida albicans* pero también aquellas causadas por *C. glabrata*, *C. Parapsilosis*, *C. guilliermondii*, y *C. tropicalis*. En una forma de realización en la cual la composición sinérgica se aplica para tratar *Candida*, el componente fungicida poliénico es nistatina. En humanos, las composiciones de la presente invención también se pueden aplicar a las uñas, al cuero cabelludo y a la piel para controlar dermatofitos, como por ejemplo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, que son responsables de una variedad de manifestaciones de enfermedades que se localizan en las estructuras queratinizadas del cuerpo (piel, uñas y cabello). En los humanos, las composiciones se pueden administrar como pastillas, para tratar la candidiasis oral o en forma oral para tratar o prevenir la candidiasis intestinal. Las composiciones de la presente invención también se pueden utilizar para tratar infecciones de la córnea por *Aspergillus* y *Fusarium*. En una forma de realización donde las composiciones se utilizan para tratar infecciones de la córnea, el componente fungicida poliénico de la composición es natamicina o un derivado de la misma. La determinación de las tasas de administración apropiadas para las composiciones de la presente se encuentra dentro del conocimiento de alguien con experiencia en el arte.

[0060] En algunas formas de realización, se identifica un sitio que necesita tratamiento antes de aplicar o administrar las composiciones.

[0061] En una forma de realización, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden variar, dependiendo de lo apropiadas que sean para las diversas formas de dosificación. En una forma de realización, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables como una composición tópica. La composición tópica puede tener la forma de una crema, gel, aceite, spray, polvo, pasta, arcilla o cualquier otra forma, manera o método conocidos en el arte para administrar la composición a la piel o a un sujeto ya sea humano o animal. El vehículo aceptable contenido en la composición tópica puede variar, dependiendo del tipo de la formulación. Por ejemplo, las formulaciones de los ungüentos, pastas, cremas o geles pueden comprender grasas animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, silicatos, bentonitas, sílice, talco, óxido de cinc o mezclas de dichas sustancias.

[0062] En una forma de realización, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables como una composición oral. Las formas de dosificación oral pueden tener la forma de un polvo sólido, comprimidos, tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel blandas o un líquido, y que se pueden administrar solas o en una combinación apropiada con otros componentes. Por ejemplo, la composición de la presente invención se puede administrar en uno o más comprimidos o pastillas, según sea práctico para la facilidad de administración. Al preparar la composición en forma de dosificación oral, se pueden utilizar cualquiera de los medios usuales. Para los preparados líquidos (por ejemplo, suspensiones, elixires, y soluciones), se pueden utilizar medios que contienen, por ejemplo agua, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y otros similares. Se pueden utilizar vehículos farmacéuticos aceptables tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y otros similares, para preparar sólidos orales (por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, tabletas, cápsulas, y pastillas). También se pueden utilizar formas de liberación controlada. Debido a su facilidad de administración, los

comprimidos, tabletas, píldoras, y cápsulas representa la forma de dosificación oral unitaria más ventajosa, en cuyo caso se emplean vehículos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir con azúcar o con un recubrimiento entérico por técnicas estándar. Todos dichos vehículos farmacéuticos y formulaciones son bien conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte. Véase, por ejemplo, Wade & Waller, Handbook of Pharmaceutical Excipients (2ª ed. 1994).

[0063] Una forma de realización específica de la presente invención puede comprender composiciones en una forma de dosificación de cápsulas de gel blandas. Las cápsulas de gel blandas consisten en un revestimiento de una pieza, sellado, de gelatina blanda que contiene una solución, una suspensión, o una pasta semisólida. Las cápsulas de gel blandas se utilizan predominantemente para contener líquidos donde los ingredientes activos están presentes en estado disuelto o suspendido. Las cápsulas de gel blandas son ampliamente conocidas y se han utilizado durante muchos años y para una variedad de propósitos. Como las cápsulas de gel blandas tienen propiedades que son bastante diferentes de las cápsulas rígidas de dos piezas, las cápsulas de gel blandas son capaces de retener un material de relleno líquido. Las cápsulas de gel blandas frecuentemente se utilizan para encapsular materiales para consumo, incluyendo vitaminas, suplementos dietarios, productos farmacéuticos, y otros similares, en un vehículo líquido. Las cápsulas de gel blandas son una única forma de dosificación que puede proveer diferentes ventajas respecto de las formas de dosificación más tradicionales tales como tabletas, cápsulas de gelatina rígidas, y líquidos. Dichas ventajas incluyen el cumplimiento del paciente y la preferencia del consumidor, mejor biodisponibilidad, velocidad de desarrollo del producto en muchos casos, acortamiento del tiempo de elaboración, estabilidad mejorada de la droga debido a la menor exposición del ingrediente activo al oxígeno, excelente uniformidad de la dosis, y diferenciación del producto.

[0064] En una forma de realización, las composiciones y métodos de la presente invención puede tener un sabor agradable o tolerable. Los sabores tolerables se pueden obtener incluyendo agentes endulzantes y/o saborizantes. Los agentes endulzantes que se pueden incluir en las composiciones de la

presente invención incluyen, como ejemplo y no como limitación: sacarosa, fructosa, jarabe de maíz de alta fructosa, dextrosa, sacarina sódica, maltodextrina, aspartamo, acesulfame potásico, neohesperidina dihidrochalcona, sucralosa, glicirrizinato monoamónico, y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte.

[0065] En las composiciones de la presente invención también se pueden incluir desintegrantes para facilitar la disolución. Los desintegrantes, incluyen agentes permeabilizantes y de capilaridad, son capaces de atraer al agua o la saliva hacia las composiciones, lo que promueve la disolución desde el interior además de suceder desde el exterior de las composiciones. Dichos agentes desintegrantes, permeabilizante y/o de capilaridad que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, como ejemplo y no como limitación, almidones, como por ejemplo almidón de maíz, almidón de papa, almidones pregelatinizados y modificados, agentes celulósicos, como por ejemplo Ac-di-sol, arcillas del tipo montmorillonita, PVP reticulado, endulzantes, bentonita, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, alginatos, almidón glicolato de sodio, gomas, como por ejemplo ágar, goma guar, de algarroba, de caraya, pectina, goma arábica, xántica y tragacanto, sílice con alta afinidad por los solventes acuosos, como por ejemplo sílice coloidal, sílice precipitada, maltodextrinas, beta-ciclodextrinas, polímeros, como por ejemplo Carbopol, y agentes celulósicos, como por ejemplo hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.

[0066] Además de aquellos descritos anteriormente, al preparar las composiciones de la presente invención se puede utilizar cualquier carga y excipiente apropiado, con la condición de que los mismos sean consistentes con los objetivos descritos aquí. Por ejemplo, los aglutinantes son sustancias que se utilizan para hacer que las partículas de polvo se adhieran en las granulaciones. Dichos compuestos apropiados para utilizar en la presente invención incluyen, como ejemplo y no como limitación, acacia, azúcar para comprimir, gelatina, sacarosa y sus derivados, maltodextrina, polímeros celulósicos, como por ejemplo etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica y metilcelulosa, polímeros acrílicos, como por ejemplo copolímero insoluble

de acrilato y metacrilato de amonio, copolímero de poliacrilato o polimetacrílico, povidonas, copovidonas, alcoholes polivinílicos, ácido algínico, alginato de sodio, almidón, almidón pregelatinizado, goma guar, polietilenglicol y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte.

[0067] Los diluyentes también se pueden incluir en las composiciones de la presente invención para mejorar la granulación de las composiciones. Los diluyentes pueden incluir, como ejemplo y no como limitación, celulosa microcristalina, sacarosa, fosfato dicálcico, almidones, lactosa y polioles menores de 13 átomos de carbono, como por ejemplo manitol, xilitol, sorbitol, maltitol y aminoácidos farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo glicina, y sus mezclas.

[0068] Los lubricantes son sustancias que se utilizan para formular composiciones que reducen la fricción durante la compresión de la composición. Los lubricantes que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, como ejemplo y no como limitación, ácido esteárico, estearato de calcio, estearato de magnesio, estearato de cinc, talco, aceites minerales y vegetales, ácido benzoico, poli(etilenglicol), behenato de glicerilo, estearil fumarato, y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte.

[0069] Los agentes deslizantes mejoran el flujo de las mezclas en polvo durante la elaboración y minimizan la variación de peso de la composición. Los agentes deslizantes que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, como ejemplo y no como limitación, dióxido de silicio, sílice coloidal o ahumada, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, almidón de maíz, talco y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte.

[0070] En las composiciones de la presente invención también se pueden incluir colorantes. Según se usa aquí, el término "colorante" incluye a los compuestos que se utilizan para conferir color a los preparados farmacéuticos. Dichos compuestos incluyen, como ejemplo y no como limitación, Rojo FD&C No. 3, Rojo FD&C No. 20, Amarillo FD&C No. 6, Azul FD&C No. 2, Verde D&C No. 5, Anaranjado FD&C No. 5, Rojo D&C No. 8, caramelo, y óxido férrico, rojo y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte. Los agentes

colorantes también pueden incluir pigmentos, tinturas, tintes, dióxido de titanio, agentes colorantes naturales, como por ejemplo extracto de piel de uvas, polvo rojo de remolachas, beta-caroteno, annato, carmín, cúrcuma, páprika y otros conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte.

[0071] Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, como por ejemplo carboximetil celulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar según sea apropiado, como suspensiones para inyección al aceite. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintéticos, como por ejemplo oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Para la administración también se pueden utilizar amino polímeros policatiónicos no lípidos.

[0072] Las composiciones pueden incluir un solubilizante para asegurar una buena solubilización y/o disolución de los ingredientes activos tales como el fungicida y/o lipopéptido. Un solubilizante también se puede agregar para incrementar la solubilidad del fungicida y/o lipopéptido y/u otros componentes, como por ejemplo tensioactivos, o para mantener la composición como una solución o dispersión estable u homogénea.

[0073] Los ejemplos de solubilizantes apropiados incluyen, pero de manera no taxativa, a los siguientes: alcoholes y polioles, como por ejemplo etanol, isopropanol, butanol, alcohol bencílico, etilenglicol, propilenglicol, butanodiolos e isómeros de los mismos, glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcitol, dimetil isosorbide, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, hidroxipropil metilcelulosa y otros derivados de celulosa, ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina; éteres de polietilenglicoles con un peso molecular promedio de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 6000, como por ejemplo alcohol tetrahidrofurfurílico PEG éter (glicofurol) o metoxi PEG; amidas y otros compuestos que contienen nitrógeno tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona, ϵ -caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroxialquilpirrolidona, N-alquimpiperidona, N-alquilcaprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona; ésteres tales como

propionato de etilo, citrato de tributilo, acetil citrato de trietilo, acetil citrato de tributilo, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, butirato de etilo, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol, ϵ -caprolactona e isómeros de la misma, δ -valerolactona e isómeros de la misma, β -butirolactona e isómeros de la misma; y otros solubilizantes conocidos en el arte, como por ejemplo dimetil acetamida, dimetil isosorbide, N-metilpirrolidonas, monooctanoína, dietilenglicol monoetil éter, y agua.

[0074] También se pueden utilizar mezclas de solubilizantes. Los ejemplos incluyen, pero de manera no taxativa, triacetina, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, polietilenglicol 200-100, glicofurol, transcuto, propilenglicol, y dimetil isosorbide. En algunas formas de realización, los solubilizantes incluyen sorbitol, glicerol, triacetina, alcohol etílico, PEG-400, glicofurol y propilenglicol.

[0075] La cantidad de solubilizante que se puede incluir no está limitada a ningún valor particular. La cantidad de un determinado solubilizante se puede limitar a una cantidad bioaceptable, lo que puede determinar fácilmente alguien con experiencia en el arte. En ciertas circunstancias, puede ser ventajoso incluir cantidades de solubilizantes en un gran exceso respecto de las cantidades bioaceptables, por ejemplo, para maximizar la concentración de la droga, eliminando el exceso de solubilizante antes de suministrar la composición a un sujeto usando técnicas convencionales, como por ejemplo destilación o evaporación. Por lo tanto, de estar presente, el solubilizante puede encontrarse en una proporción en peso de aproximadamente 10%, 25%, 50%, 100%, o de hasta aproximadamente 200% en peso, en base a los pesos combinados de la droga y los otros excipientes. Si se desea, también se pueden utilizar cantidades muy pequeñas de solubilizante, como por ejemplo aproximadamente 5%, 2%, 1% o aún menos. Típicamente, el solubilizante puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 100%, más típicamente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 25% en peso.

[0076] Los siguientes ejemplos se dan con propósitos puramente

ilustrativos y no limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Efecto sinérgico de los Lipopéptidos y la natamicina contra *Saccharomyces cerevisiae*

[0077] Se probó la eficacia de una combinación de lipopéptidos y natamicina contra *Saccharomyces cerevisiae*, que generalmente se reconoce como un organismo modelo para probar la actividad contra hongos y que está estrechamente relacionado con *Candida*. Véase Smits, GJ, et al., "Stress Tolerance in Fungi – To Kill a Spoilage Yeast," Current Opin Biotechnol., 16(2): 225-30, (2005) y Castrillo, JI, et al., "Yeast as a Touchstone in Post-Genomic Research: Strategies for Integrative Analysis in Functional Genomics," J Biochem Mol Biol., 37(1): 93-106, (2004).

[0078] Los lipopéptidos que se utilizaron fueron una mezcla compleja de compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo plipastatina, y surfactinas parcialmente purificadas a partir del caldo de fermentación de *Bacillus subtilis* QST713. Se inocularon botellas para cultivo que contenían caldo Luria (LB) con la cepa QST713, y dichas botellas se cultivaron durante toda la noche a 30 °C. El día siguiente, se inocularon alícuotas de la botella para cultivo en un medio a base de soja y se cultivaron hasta la esporulación. El caldo de fermentación de *B. Subtilis* QST713 se acidificó hasta pH 2 y se centrifugó para separar el material sólido del sobrenadante. Los lipopéptidos se concentraron en el pellet. El sobrenadante se decantó y el pellet se extrajo con una mezcla acuosa de solvente orgánico (preferiblemente 80/20 acetonitrilo/agua). Los lipopéptidos se concentraron en la fracción orgánica acuosa. La mezcla se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se volvió a extraer dos veces más con una mezcla acuosa de solvente orgánico (preferiblemente 80/20 acetonitrilo/agua). Los sobrenadantes de cada extracción se combinaron y se eliminó el solvente al vacío. El extracto seco contenía una forma enriquecida de las tres clases de lipopéptidos descubiertos en *B. Subtilis* QST713: compuestos de tipo iturina, que incluyen iturina A2, iturina A3, A4, o A5, iturina A6, iturina A7; compuestos de tipo fengicina, que incluyen pilpastatina A1, plipastatina A2, plipastatina B1, plipastatina B2, agrastatina A,

agrastatina B, fengicina A, fengicina B; surfactina A1, A2, o A3, surfactina B1 o B2 y surfactina C1 o C2. El extracto seco se puede resuspender en una mezcla acuosa de solvente orgánico (preferiblemente 80/20 acetonitrilo/agua).

[0079] La cepa *Saccharomyces cerevisiae* de tipo salvaje BY4742 se cultivó en YPD líquido en presencia de: (1) natamicina (Haorui Pharma-Chem Inc), (2) el extracto de lipopéptidos descrito anteriormente, (3) natamicina + extracto de lipopéptidos, y 4) sin lipopéptidos ni natamicina (control). La concentración inicial de natamicina antes de agregarla al cultivo líquido fue de 1 ppm y la concentración inicial de extracto de lipopéptidos fue de 15 ppm. La concentración final de natamicina en el cultivo líquido fue de 0,08 ppm y la concentración final de extracto de lipopéptidos fue de 1,12 ppm, de manera tal que la proporción peso en peso de natamicina a lipopéptido en la muestra que contenía a ambos fue 1:14.

[0080] Se compararon las densidades ópticas (OD) de los cultivos líquidos que contenían natamicina y/o lipopéptidos las de los cultivos de control luego de 16 horas de cultivo a 30 °C. Para la comparación, la OD de los cultivos de control sin tratar se estableció como el 100% y los cultivos tratados se normalizaron para este valor.

[0081] Se aplicó la Ecuación de Gowing, que se da a continuación, para determinar la sinergia de los lipopéptidos con la natamicina.

$$\text{Ecuación de Gowing: } E_{xp} = X + [Y * (100 - X)]/100$$

Si $E_{ob} \gg E_{xp}$, entonces existe sinergia

NOTA: en la anterior ecuación, E_{ob} , E_{xp} , X e Y representan la inhibición del crecimiento. Por lo tanto, X e Y se calculan restando de 100 la magnitud del crecimiento en una placa tratada, como se muestra a continuación.

$$X = 100 - 77,89 = 22,11, Y = 100 - 93,87 = 6,13$$

$$E_{ob} = 100 - 8,51 = 91,49$$

$$E_{xp} = 22,11 + [6,13 * (100 - 22,11)]/100 = 26,88$$

$$E_{ob} \gg E_{xp}$$

Los resultados también se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2: Efecto sinérgico de la natamicina y los lipopéptidos contra *S. cerevisiae* usando lipopéptidos que se obtuvieron de un producto que se

puede obtener comercialmente

[0082] Este estudio, que es similares al descrito en el Ejemplo 1, se realiza usando un extracto crudo de lipopéptidos que se obtuvieron del fungicida SERENADE® MAX o el fungicida SERENADE® ASO como punto de partida (en vez de hacerlo a partir de un caldo de fermentación no formulado de *Bacillus subtilis* QST713). Los productos SERENADE® se pueden obtener comercialmente, y su ingrediente activo es el *Bacillus subtilis* QST713. Se obtiene un extracto crudo de lipopéptidos acidificando el SERENADE® ASO (o SERENADE® MAX, disuelto en agua) a pH 2, centrifugando y extrayendo el pellet que se obtiene como resultado con una mezcla de solvente orgánico. Los lipopéptidos que se obtienen como resultado se combinan con natamicina como se describió anteriormente y se prueba la actividad contra *S. cerevisiae* de esta mezcla. Se espera obtener los mismos resultados que se obtuvieron antes.

Ejemplo 3: Efecto sinérgico de la natamicina y un extracto crudo de lipopéptidos contra *Penicillium expansum*

[0083] Se investigó el efecto de (i) natamicina (Haorui Pharma-Chem Inc.), (ii) un extracto crudo de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (preparado según se describe en el Ejemplo 1), y (iii) una combinación de natamicina y un extracto crudo de lipopéptidos sobre el *Penicillium expansum*. Se llevó a cabo un ensayo con un cultivo fúngico en medio líquido en placas de 96 pocillos para determinar si las combinaciones de lipopéptidos y natamicina sinérgica en la inhibición del crecimiento fúngico. Todos los procedimientos se realizaron de manera aséptica.

[0084] Para cada placa de 96 pocillos, se realizaron tres agregados por separado a cada pocillo. Primero, se agregaron 100 µl de caldo de dextrosa de papa con 100ppm de cloranfenicol. Luego se suplementaron 25 µl de cada muestra (lipopéptidos, natamicina, o combinado proveniente de la placa de dilución). Por último, se agregaron 50 µl de H₂O desionizada a la placa de blanco (la placa que se deseaba dejar como blanco para usar como referencia de la OD) o se agregaron a cada pocillo 50 µl de inóculo fúngico 10⁵ en su(s) respectiva(s) placa(s). Por lo tanto, la concentración final de lipopéptido en cada pocillo fue de

1,1 ppm y la concentración final de natamicina en cada pocillo fue de 1,1 ppm. Luego, las placas se cubrieron con tapas y se dejaron a 20 °C durante 3 días de incubación.

Calificación de las placas e interpretación de los datos

[0085] Luego del período de incubación, se calificó el crecimiento de cada pocillo en cada placa por su densidad óptica a 600 nm usando una lectora de placas PerkinElmer Victor usando la regulación "MIC Settings @ 600 (0,1s)" del software Wallac® Victor®. Los resultados también se evaluaron aproximadamente a simple vista en base a los pocillos turbios (crecimiento parcial) que aparecieron en las series de dilución, donde cayó la actividad de la muestra.

[0086] Luego de obtener una OD para cada pocillo, se determinó el crecimiento relativo mediante el siguiente cálculo: $[(\text{Tratamiento c/Bacteria}) - (\text{Tratamiento sin Bacteria}) / (\text{Control Diluyente c/Bacteria}) - (\text{Control Diluyente sin Bacteria})] \times 100$. Los pocillos de control positivo del crecimiento bacteriano se consideraron aceptables si el promedio y desviación estándar de las lecturas de OD a 600 nm estaban bastante por encima del rango de los pocillos de referencia de OD no inoculados. (Debe haber una gran diferencia entre las lecturas de los pocillos de Control de Diluyente sin inocular y los del Control Diluyente inoculado para asegurar que se obtuvo un buen crecimiento).

[0087] Luego se graficó este crecimiento porcentual contra la muestra para las diluciones probadas y se tomó como la mínima inhibidora concentración (MIC) a la última dilución que dio una inhibición del crecimiento de por lo menos 80%.

[0088] Luego se determinó la sinergia por la Ecuación de Gowing, que se dio anteriormente.

[0089] En este ejemplo, el crecimiento porcentual de 1,1 ppm de lipopéptidos fue del 113%. El crecimiento porcentual de 1,1 ppm de natamicina fue del 102%. El crecimiento porcentual de 1,1 ppm de lipopéptido + 1,1 ppm de natamicina fue del 20,4%.

$$[0090] \quad X = 100-102,1$$

$$Y = 100-112,9$$

$$\text{Exp} = -2,1 + (-12,9(102,1))/100$$

$$\text{Exp} = -15,3$$

Como alternativa, cuando el Crecimiento Porcentual es mayor de 100, se redondeó en 100. En dicho ejemplo, esto daría $\text{Exp} = 0$

$$\text{Eob} = 100 - 20,4$$

$$\text{Eob} = 79,6$$

$$79,6 \gg -15,3$$

$\text{Eob} \gg \text{Exp}$; por lo tanto, se observa sinergia, como se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 4: Efecto sinérgico de las plipastatinas, iturinas y surfactinas y natamicina semi-purificadas y purificadas contra *Penicillium expansum*

[0091] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Penicillium expansum* como el patógeno objetivo, con combinaciones de (i) natamicina y extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente) e (ii) natamicina y lipopéptidos semi-purificados y purificados que se obtuvieron de *Bacillus subtilis* QST713, de la siguiente manera. Los compuestos de tipo iturina, incluyendo a la iturina As, y los compuestos de tipo fengicina, que incluían plipastatinas (A, B y agrastatinas) y fengicinas, se precipitaron y extrajeron del caldo de fermentación de *B. Subtilis* QST713 usando acidificación seguida de extracción con un solvente orgánico. Dichos lipopéptidos se continuaron purificando y se separaron por cromatografía en fase inversa para obtener compuestos del tipo fengicina que eran aproximadamente 83% puros e iturinas que eran aproximadamente 88% puras. Las surfactinas se extrajeron usando un solvente orgánico y luego se continuaron purificando por cromatografía en columna de exclusión por tamaños hasta una pureza del 95%. La pureza de cada clase de lipopéptido se determinó usando el trazado de una cromatografía líquida de alto rendimiento.

[0092] La concentración final de la natamicina en cada pocillo de prueba fue de 2,23 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 2,23 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos

semi-purificado o purificado de los compuestos de tipo iturina, surfactina o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 2,23 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue 1:1.

[0093] En la Figura 3 y en la tabla 1 se muestran los resultados, que muestran sinergia entre las diversas combinaciones. En la tabla 1 se muestra el cálculo de sinergia usando la Ecuación de Gowing, como se describió anteriormente.

Tabla 1

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	natamicina	natamicina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
125,94	35,38	0,96	55,44	99,04	Si
Iturina	natamicina	natamicina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
110,39	35,38	9,38	60,94	90,62	Si
Fengicina	natamicina	natamicina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
165,04	35,38	2,15	41,6	97,85	Si
Surfactina	natamicina	natamicina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
79,87	35,38	1,64	71,74	98,36	Si

Ejemplo 5: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y natamicina semi-purificadas y purificadas contra *Geotrichum candidum*

[0094] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Geotrichum candidum* como el patógeno objetivo, con (i) natamicina, (ii) extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que

se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de natamicina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de natamicina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y compuestos de tipo surfactina) de *Bacillus subtilis* QST713.

[0095] Los compuestos de tipo iturina y surfactinas se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó anteriormente. Los compuestos de tipo fengicina se extrajeron en la misma manera que para los compuestos de tipo iturina pero se continuaron purificando por cromatografía de fase inversa bajo presión hasta una pureza de por lo menos 90%.

[0096] La concentración final de natamicina en cada pocillo de prueba fue de 2,23 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 2,23 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactinas o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 2,23 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[0097] En la Figura 4 y la tabla 2 se describen los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 2

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	natamicina	natamicina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
111,3	110,4	32,7	- 22,9	67,3	Si
Iturina	natamicina	natamicina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
117,3	110,4	74,2	- 29,5	25,8	Si

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
Fengicina	natamicina	natamicina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
116,4	110,4	84,3	- 28,4	15,7	Si
Surfactina	natamicina	natamicina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
116,4	110,4	3,8	- 28,4	96,2	Si

Ejemplo 6: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y nistatina semi-purificadas y purificadas contra *Geotrichum candidum*

[0098] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Geotrichum candidum* como el patógeno objetivo, con (i) nistatina (otro ejemplo de un fungicida poliénico), (ii) extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de nistatina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de nistatina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, iturinas, fengicinas, y surfactinas) de *Bacillus subtilis* QST713.

[0099] Los compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina, y compuestos de tipo fengicina se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó anteriormente. La concentración final de nistatina en cada pocillo de prueba fue de 1,12 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 1,12 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactinas o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 1,12 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[00100] En la Figura 5 y la tabla 3 se describen los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 3

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 1,12 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	nistatina	nistatina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
110,8	96,2	76,9	-6,6	23,1	Si
Iturina	nistatina	nistatina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
110,4	96,2	57,5	-6,2	42,5	Si
Fengicina	nistatina	nistatina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
109,3	96,2	71,4	-5,1	28,6	Si
Surfactina	nistatina	nistatina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
112,5	96,2	99,2			No

Ejemplo 7: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y natamicina semi-purificadas y purificadas contra *Geotrichum citri-aurantii*

[00101] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Geotrichum citri-aurantii* como el patógeno objetivo, con (i) natamicina, (ii) extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de natamicina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de natamicina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y compuestos de tipo surfactina) de *Bacillus subtilis* QST713.

[00102] Los compuestos de tipo iturina, surfactinas, y los compuestos de tipo fengicina se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó anteriormente. La concentración final de natamicina en cada pocillo de prueba fue

de 2,23 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 2,23 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactina o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 2,23 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[00103] En la Figura 6 y la tabla 4 se describen los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 4

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	natamicina	natamicina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
116,3	57,4	17	33,2	82	Si
Iturina	natamicina	natamicina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
112,6	57,4	2,2	35,4	97,8	Si
Fengicina	natamicina	natamicina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
98,1	57,4	3,7	43,7	96,3	Si
Surfactina	natamicina	natamicina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
119,6	57,4	2,6	31,3	97,4	Si

Ejemplo 8: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y nistatina semi-purificadas y purificadas contra *Geotrichum citri-aurantii*

[00104] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Geotrichum citri-aurantii* como el patógeno objetivo, con (i)

nistatina (otro ejemplo de un fungicida poliénico), (ii) extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de nistatina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de nistatina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y compuestos de tipo surfactina) de *Bacillus subtilis* QST713.

[00105] Los compuestos de tipo iturina, surfactinas, y los compuestos de tipo fengicina se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó anteriormente. La concentración final de nistatina en cada pocillo de prueba fue de 2,23 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 2,23 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactina o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 2,23 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[00106] En la Figura 7 y la tabla 5 se muestran los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 5

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	nistatina	nistatina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
118,9	30,5	8,8	63,7	91,2	Si
Iturina	nistatina	nistatina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
121,3	30,5	25,1	63	74,9	Si
Fengicina	nistatina	nistatina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
119,8	30,5	13,9	63,4	86,1	Si
Surfactina	nistatina	nistatina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 2,23 ppm			Ecuación de Gowing		
114,3	30,5	26	65,1	74	Si

Ejemplo 9: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y natamicina semi-purificadas y purificadas contra *Saccharomyces cerevisiae*

[00107] Se realizaron experimentos similares a aquellos descritos anteriormente, usando *Saccharomyces cerevisiae* como el patógeno objetivo, con (i) natamicina, (ii) extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de natamicina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de natamicina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y compuestos de tipo surfactina) de *Bacillus subtilis* QST713.

[00108] Igual que antes, los ensayos con un cultivo fúngico en medio líquido se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos para determinar ya sea las combinaciones de lipopéptidos y natamicina que son sinérgicas en la inhibición del crecimiento fúngico . En cada pocillo de la placa se realizaron tres agregados por separado. Primero, se utilizaron medios de levadura-peptona-dextrosa (YPD). Luego, se agregaron 25 µL de cada muestra (ya sea lipopéptido, natamicina, o una combinación de los dos proveniente de la placa de dilución). Por último, se agregaron 50 µL de inóculo de levadura o 50 µL de H₂O desionizada (la última opción se utiliza al construir el blanco). El inóculo de levadura se preparó inoculando una única colonia en 5 ml de YPD e incubando a 30 °C durante toda la noche con agitación. A la mañana, se subcultivaron 200 µL de el inóculo de toda la noche en 5 ml de YPD y se incubó a 30 °C con agitación durante entre 4 y 5 horas. Esto se diluyó hasta una densidad óptica de 0,015. Luego de los tres agregados, las placas se cubrieron con tapas y se incubaron a 30 °C durante toda la noche para analizarlas el día siguiente.

[00109] Los compuestos de tipo iturina, surfactinas, y los compuestos de tipo fengicina se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó

anteriormente. La concentración final de natamicina en cada pocillo de prueba fue de 1,12 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 1,12 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactina o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 1,12 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[00110] En la Figura 8 y la tabla 6 se describen los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 6

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 1,12 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	natamicina	natamicina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
103,9	97,4	11,2	-1,3	88,8	Si
Iturina	natamicina	natamicina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
107,1	97,4	90,8	-4,4	9,2	Si
Fengicina	natamicina	natamicina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
102	97,4	39,7	0,6	60,3	Si
Surfactina	natamicina	natamicina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
107,7	97,4	108,2			No

Ejemplo 10: Efecto sinérgico de las iturinas, fengicinas, y surfactinas y nistatina semi-purificadas y purificadas contra *Saccharomyces cerevisiae*

[00111] Se realizaron experimentos similares los descritos anteriormente, usando *Saccharomyces cerevisiae* como el patógeno objetivo, con (i) nistatina, (ii)

extractos crudos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* QST713 (que se obtuvieron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), (iii) combinaciones de nistatina y los extractos crudos, y (iv) combinaciones de nistatina y lipopéptidos semi-purificados y purificados (es decir, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, y compuestos de tipo surfactina) de *Bacillus subtilis* QST713.

[00112] Los compuestos de tipo iturina, surfactinas, y los compuestos de tipo fengicina se extrajeron y purificaron de *B. Subtilis* QST713 como se explicó anteriormente. La concentración final de natamicina en cada pocillo de prueba fue de 0,56 ppm; la concentración final del extracto de lipopéptidos crudo en cada pocillo fue de 0,56 ppm; la concentración final de cada extracto de lipopéptidos semi-purificado o purificado de compuestos de tipo iturina, surfactinas o compuestos de tipo fengicina en cada pocillo fue de 0,56 ppm. Por lo tanto, la proporción peso en peso de cada componente en los pocillos que contenían las combinaciones fue de 1:1.

[00113] En la Figura 9 y la tabla 7 se describen los resultados que muestran sinergia entre diversas combinaciones.

Tabla 7

% de Crecimiento con el(los) compuesto(s) determinado(s) a 0,56 ppm			Ecuación de Gowing		
Lipopéptidos Crudos	nistatina	nistatina + Lipopéptido	Exp	Eob	Sinergia?
104	96,5	71,4	- 0,35	28,6	Si
Iturina	nistatina	nistatina + Iturina	Exp	Eob	Sinergia?
102,1	96,5	49	1,5	51	Si
Fengicina	nistatina	nistatina + Fengicina	Exp	Eob	Sinergia?
106,7	96,5	62,8	-2,9	37,2	Si
Surfactina	nistatina	nistatina + Surfactina	Exp	Eob	Sinergia?
102,9	96,5	83,9	0,7	16,1	Si

Ejemplo 11: Efecto sinérgico de la natamicina y el extracto crudo de

lipopéptidos contra *Penicillium expansum* para diferentes proporciones peso en peso

[00114] Se realizaron estudios para determinar si se observaba sinergia con diversas proporciones peso en peso de natamicina a extracto crudo de lipopéptidos. Los lipopéptidos se extrajeron de *Bacillus subtilis* QST713 según se describe en el Ejemplo 1, según se mostró anteriormente. Se probaron las eficacias de diversas combinaciones contra *Penicillium expansum* usando el ensayo en placas de múltiples pocillos descrito en el Ejemplo 3. Las proporciones peso en peso de natamicina al extracto de lipopéptidos crudo se hicieron variar entre 1:500 y 500:1 y en todos los casos se observó sinergia, según se resume en la tabla 8. Las concentraciones de la tabla 8 representan la concentración final de cada componente por pocillo.

Tabla 8

Concentración de natamicina (ppm)	Concentración de Lipopéptidos (ppm)	Proporción peso en peso	Sinergia
1,12	1,12	1:1	Si
1,12	0,224	5:1	Si
1,12	0,00224	500:1	Si
0,08	0,08	1:1	Si
0,016	0,08	1:5	Si
0,0008	0,08	1:100	Si
0,032	0,16	1:5	Si
0,16	0,16	1:1	Si
0,016	0,16	1:10	Si
0,0016	0,16	1:100	Si
0,00032	0,16	1:500	Si
0,224	1,12	1:5	Si
0,0112	1,12	1:100	Si

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sherry D. Heins
 Denise C. Manker
 Desmond R. Jimenez
 Randy J. McCoy
 Pamela G. Marrone
 Jimmy E. Orjala

<120> NUEVA CEPA DE BACILLUS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS
 Y DEL GUSANO DE LA RAÍZ DE MAÍZ

<130> 311412000920

<140> 09/074870
 <141> 08-05-1998

<150> 08/853753
 <151> 09-05-1997

<160> 3

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Gln or Glu

<221> VARIANTE
 <222> (2)...(2)
 <223> Orn

<221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Gln o Glu

<221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Ala o Val

<221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Gln o Glu

<400> 1
 Xaa Xaa Tyr Thr Xaa Xaa Pro Xaa Tyr Val
 1 5 10

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)...(2)
 <223> Orn

<400> 2
Glu Xaa Tyr Thr Glu Ala Pro Gln Tyr Val
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)...(2)
<223> Orn

<400> 3
Glu Xaa Tyr Thr Glu Val Pro Gln Tyr Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición CARACTERIZADA PORQUE comprende una combinación sinérgica de un fungicida poliénico y por lo menos un lipopéptido.
2. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido se selecciona entre el grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fengicina y fusaricidinas.
3. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido consiste en uno o más compuestos de tipo iturina.
4. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido consiste en uno o más compuestos de tipo fengicina.
5. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido son una o más surfactinas.
6. La composición de la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto de tipo iturina es una iturina A.
7. La composición de la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto de tipo iturina es una bacilomicina.
8. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido es una fusaricidina.
9. La composición de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE comprende por lo menos dos lipopéptidos.
10. La composición de la reivindicación 9, CARACTERIZADA PORQUE los por lo menos dos lipopéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina, y compuestos de tipo fengicina.
11. La composición de la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE los por lo menos dos lipopéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en iturinas, surfactinas y compuestos de tipo fengicina.
12. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el por lo menos un lipopéptido es un extracto de un producto de fermentación que contiene lipopéptidos o parte del mismo.

13. La composición de la reivindicación 12, CARACTERIZADA PORQUE el producto de fermentación que contiene lipopéptidos proviene de una bacteria de la especie *Bacillus*.

14. La composición de la reivindicación 13, CARACTERIZADA PORQUE la bacteria de la especie *Bacillus* se selecciona entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* o *Bacillus amiloliquefaciens*.

15. La composición de la reivindicación 14, CARACTERIZADA PORQUE el *Bacillus subtilis* se selecciona entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* QST713 y sus variantes.

16. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma.

17. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es nistatina o un derivado de la misma.

18. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es amfotericina B o un derivado de la misma.

19. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es aureofungina o un derivado de la misma.

20. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es filipin o un derivado de la misma.

21. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE el fungicida poliénico es lucenosomicina o un derivado de la misma.

22. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500.

23. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:100.

24. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10.

25. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la

proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5.

26. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2.

27. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de aproximadamente 1:1.

28. Un método para controlar patógenos fúngicos CARACTERIZADO PORQUE comprende aplicar a un sitio que necesita tratamiento una cantidad efectiva de una composición que comprende una combinación sinérgica de un fungicida poliénico y por lo menos un lipopéptido.

29. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el por lo menos un lipopéptido se selecciona entre el grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fengicina y fusaricidinas.

30. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el por lo menos un lipopéptido son una o más iturinas.

31. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el por lo menos un lipopéptido son una o más surfactinas.

32. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el por lo menos un lipopéptido consiste en uno o más compuestos de tipo fengicina.

33. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es natamicina o un derivado de la misma.

34. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es nistatina o un derivado de la misma.

35. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es amfotericina B o un derivado de la misma.

36. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es aureofungina o un derivado de la misma.

37. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el

fungicida poliénico es filipin o un derivado de la misma.

38. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es lucenosomicina o un derivado de la misma.

39. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 500:1 y aproximadamente 1:500.

40. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:100.

41. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10.

42. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5.

43. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2.

44. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la proporción peso en peso entre el fungicida poliénico y el por lo menos un lipopéptido es de entre aproximadamente 1:1.

45. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el por lo menos un lipopéptido es un extracto de un producto de fermentación que contiene lipopéptidos o parte del mismo.

46. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el producto de fermentación que contiene lipopéptidos proviene de una bacteria de la especie *Bacillus*.

47. El método de la reivindicación 46, CARACTERIZADO PORQUE el *Bacillus* es *Bacillus subtilis* QST713 o sus variantes.

48. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la aplicación se realiza en alimentos posteriores a la cosecha y el patógeno fúngico

es un patógeno que actúa posteriormente a la cosecha.

49. El método de la reivindicación 48, CARACTERIZADO PORQUE el patógeno que actúa posteriormente a la cosecha es son especies de *Penicillium* o especies de *Geotrichum*.

50. El método de la reivindicación 48 ó 49, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es natamicina y el por lo menos un lipopéptido se selecciona entre el grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina y compuestos de tipo fengicina.

51. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el sitio de aplicación es una planta, raíces, semillas o el suelo que rodea a la planta y el patógeno fúngico es un fitopatógeno fúngico .

52. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la aplicación se realiza en alimentos o piensos y el fungicida poliénico es natamicina.

53. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la aplicación se realiza en un humano o un animal y donde el patógeno fúngico es *Candida*.

54. El método de la reivindicación 53, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es nistatina.

55. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la aplicación se realiza en un humano o un animal y donde el patógeno fúngico son especies de *Aspergillus* o especies de *Fusarium* y donde el fungicida poliénico es natamicina.

56. Un método CARACTERIZADO PORQUE es para tratar o prevenir una infección fúngica en un sujeto, donde el método comprende administrar al sujeto una composición que comprende una combinación sinérgica de un fungicida poliénico y por lo menos un lipopéptido.

57. El método de la reivindicación 56, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un humano o un animal y la infección fúngica es causada por *Candida*.

58. El método de la reivindicación 57, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es nistatina.

59. El método de la reivindicación 56, CARACTERIZADO PORQUE la

infección fúngica es causada por especies de *Fusarium* o especies de *Aspergillus*.

60. El método de la reivindicación 59, CARACTERIZADO PORQUE el fungicida poliénico es natamicina.

61. Una composición CARACTERIZADA PORQUE comprende un fungicida poliénico y un producto de fermentación que contiene lipopéptidos.

62. La composición de la reivindicación 61 CARACTERIZADA PORQUE el producto de fermentación que contiene lipopéptidos proviene de una bacteria de la especie *Bacillus*.

63. Un método para controlar patógenos fúngicos CARACTERIZADO PORQUE comprende aplicar a un sitio que necesita tratamiento una composición que comprende un fungicida poliénico y un producto de fermentación que contiene lipopéptidos.

p.p.Agraquest, Inc.

**COMBINACIONES SINÉRGICAS DE FUNGICIDAS POLIÉNICOS Y PÉPTIDOS
NO RIBOSOMALES Y MÉTODOS DE USO RELACIONADOS**

RESUMEN

Composiciones que comprenden una combinación sinérgica de un fungicida poliénico y al menos un lipopéptido y métodos para usar tales combinaciones para controlar patógenos fúngicos.

FIGURA 1

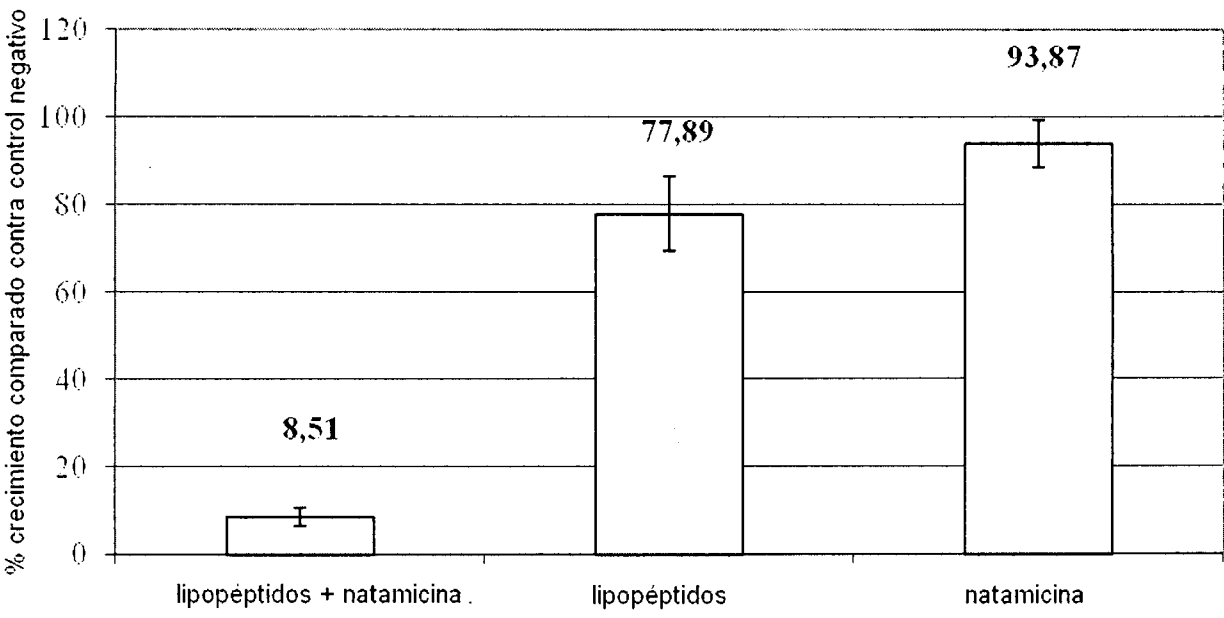


FIGURA 2

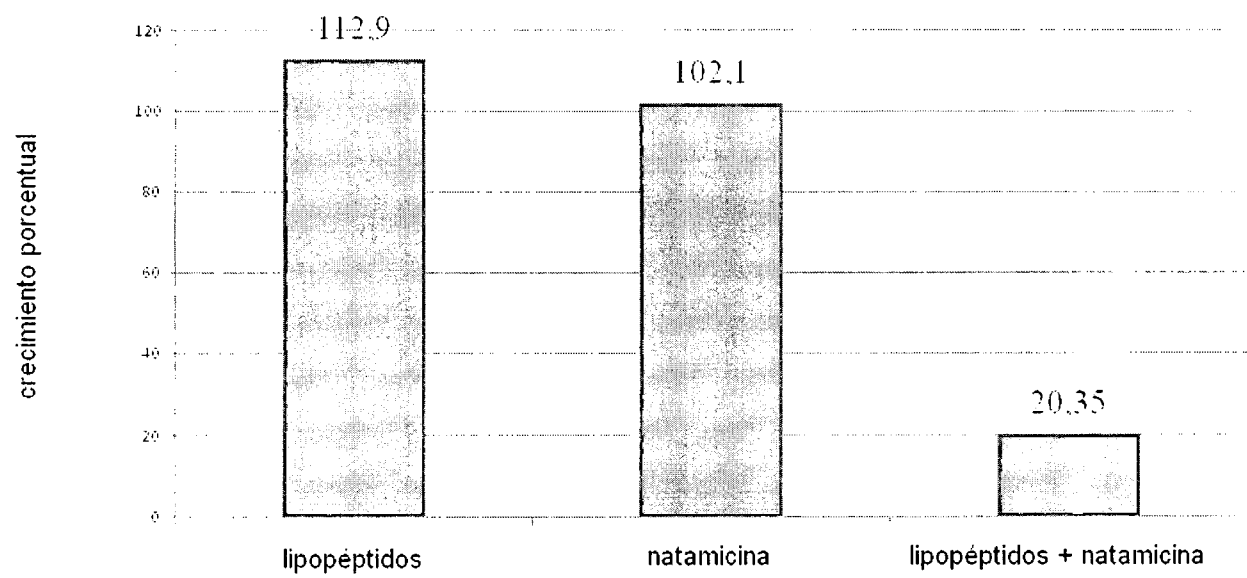


FIGURA 3

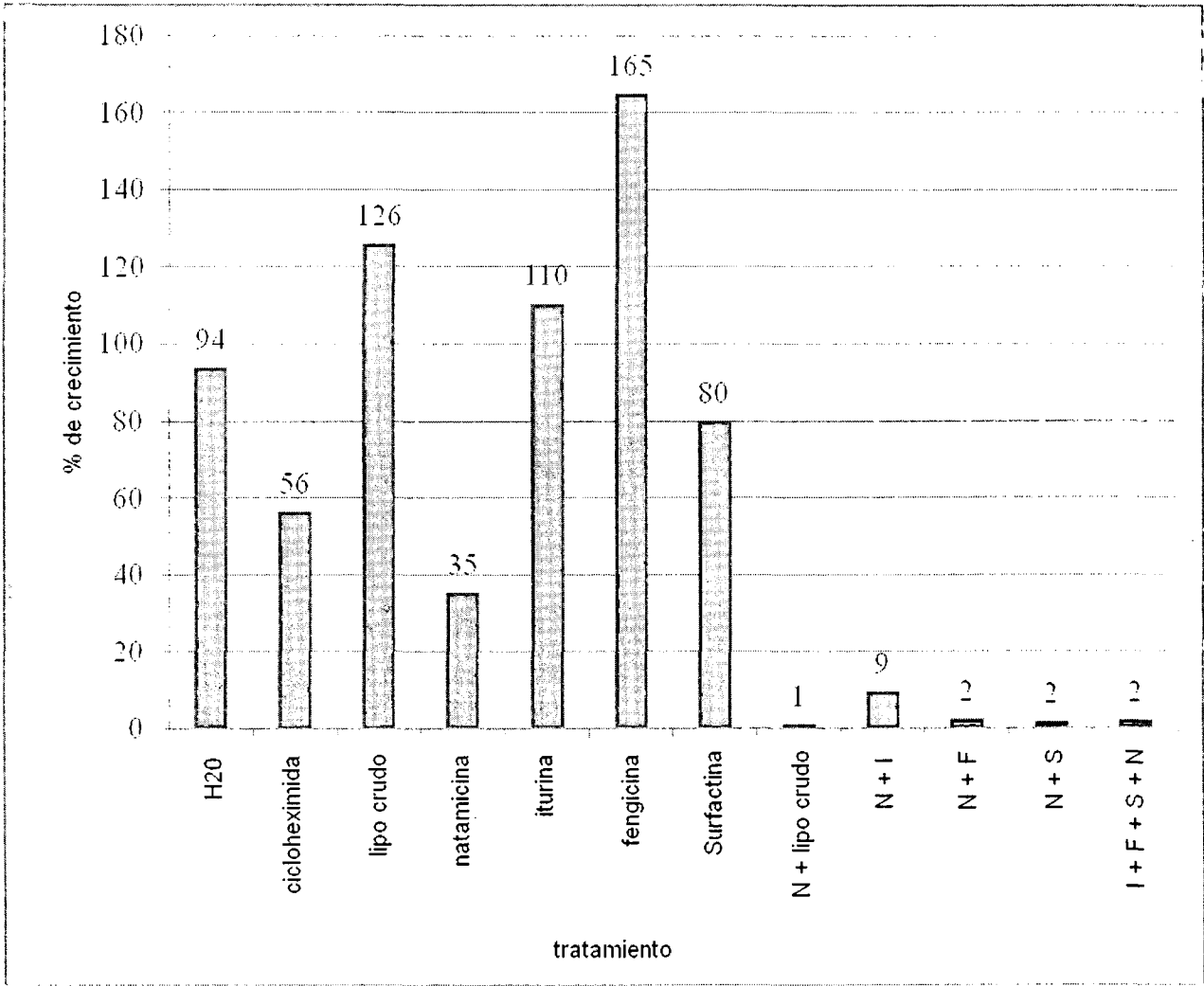


FIGURA 4

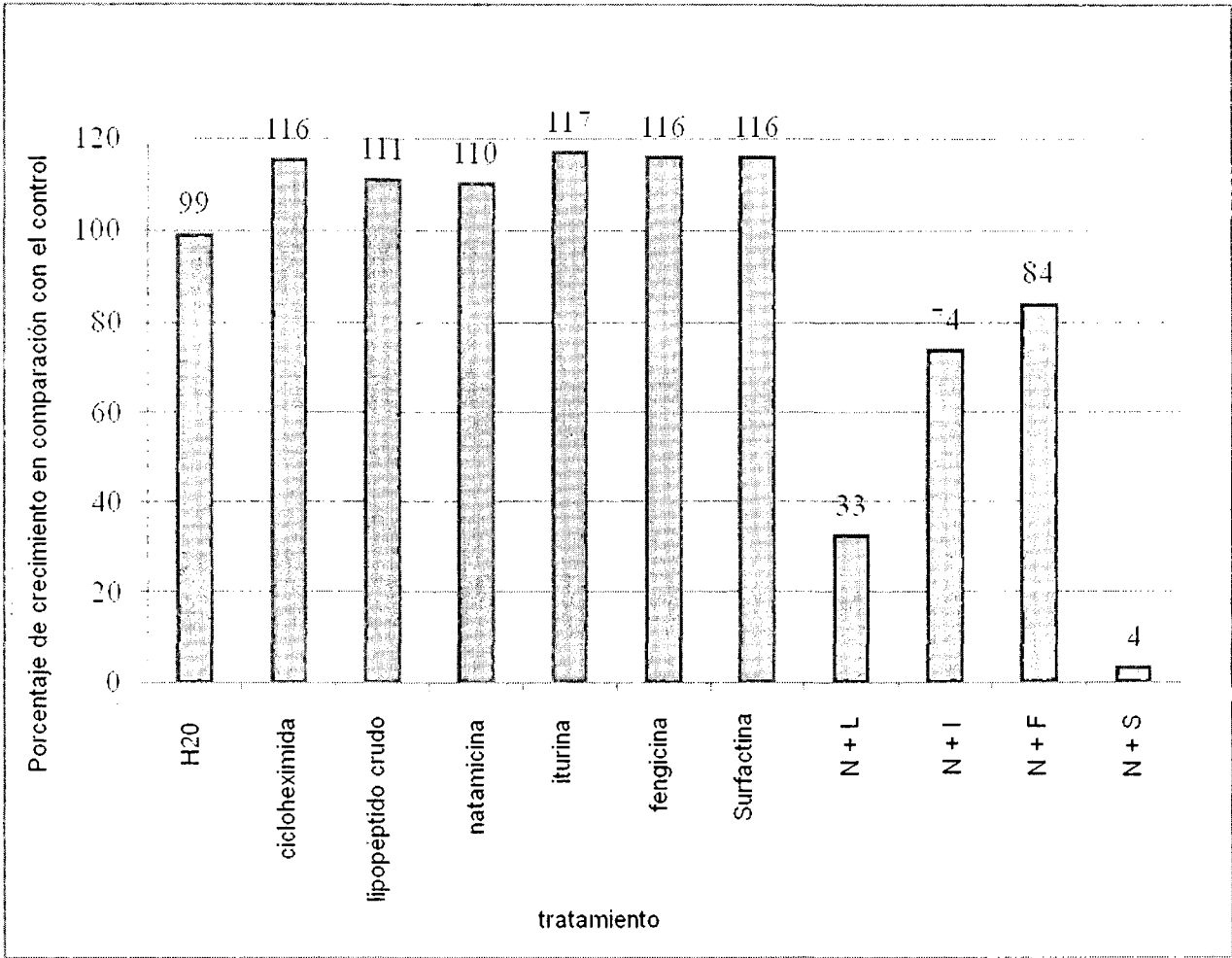


FIGURA 5

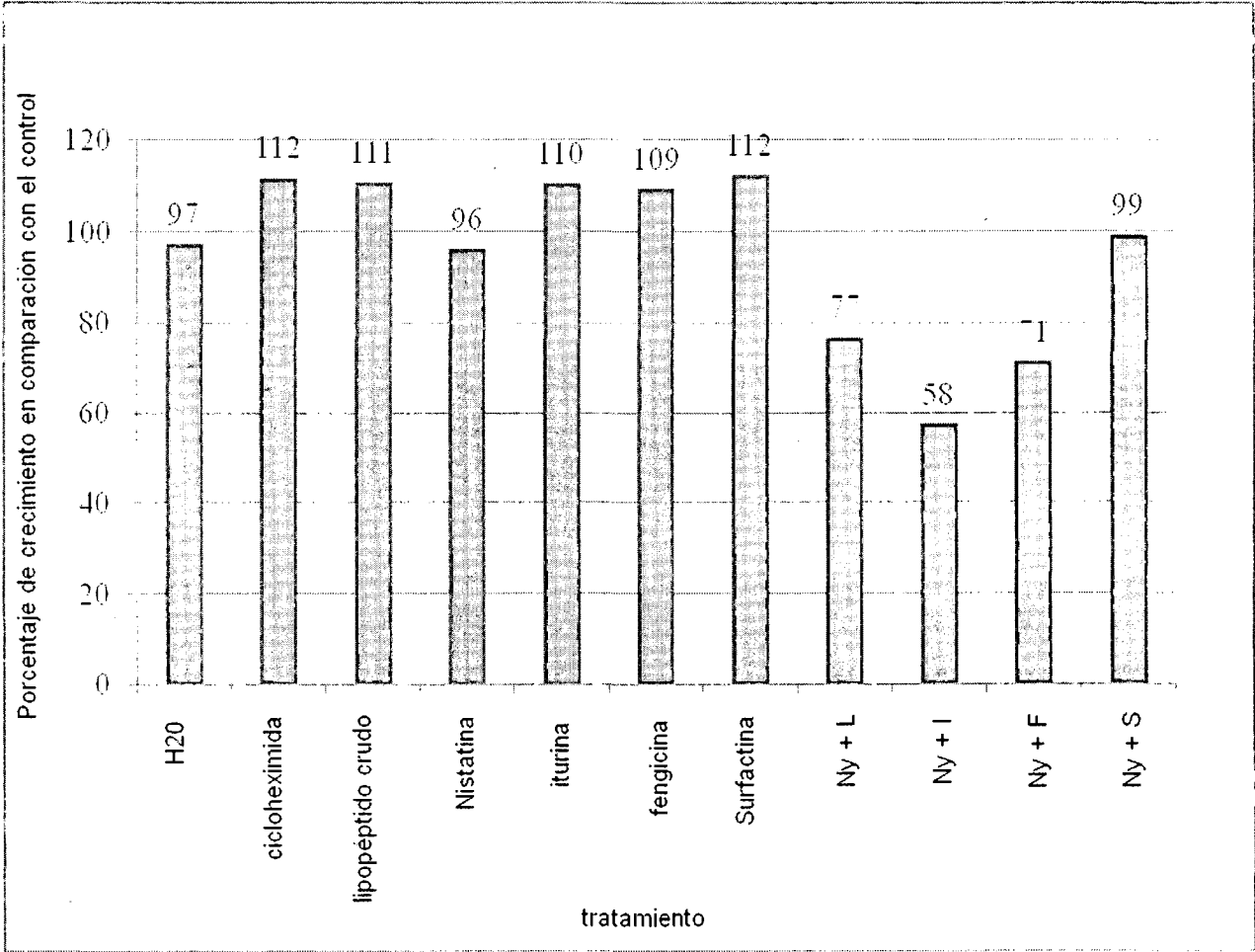


FIGURA 6

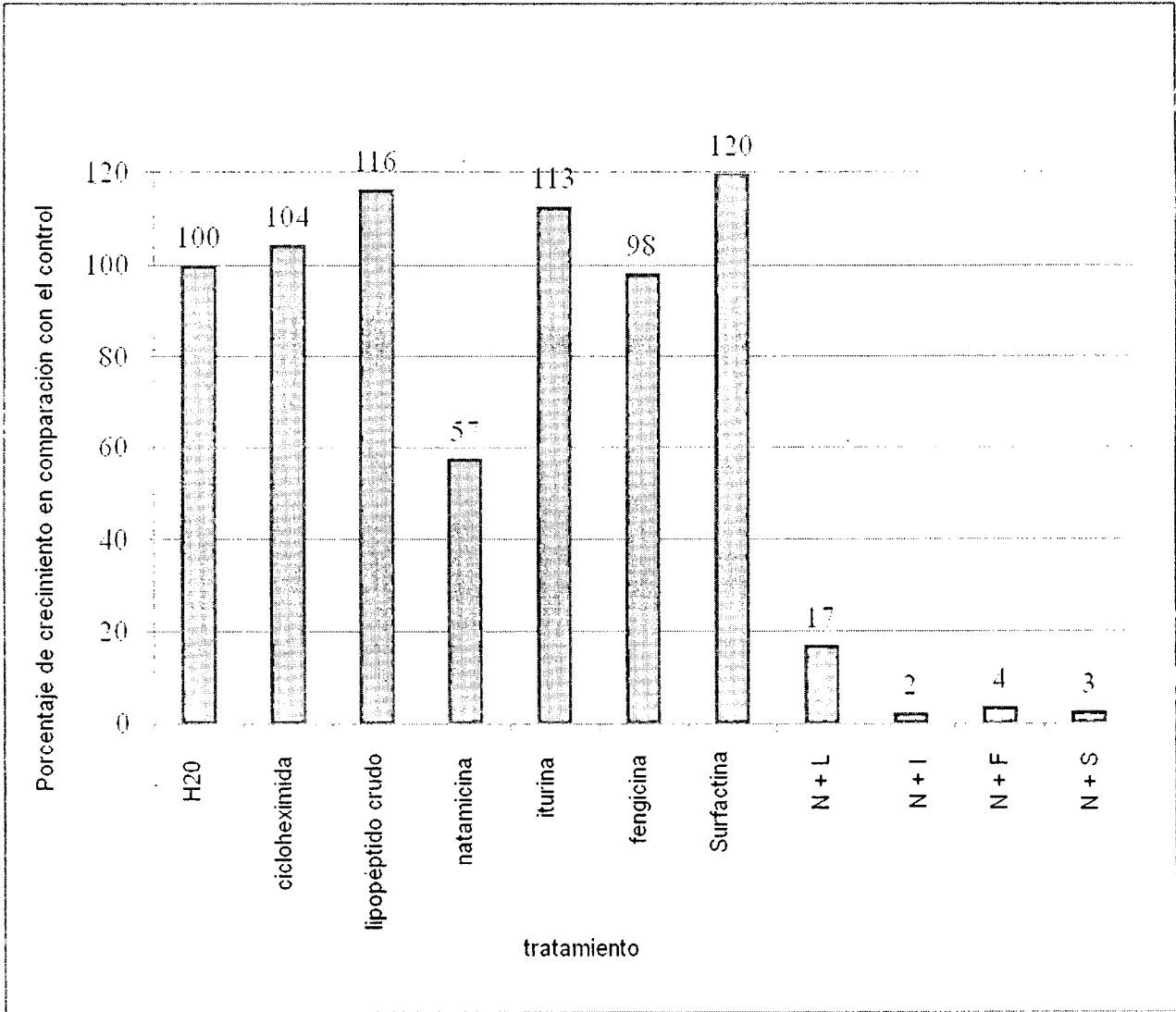


FIGURA 7

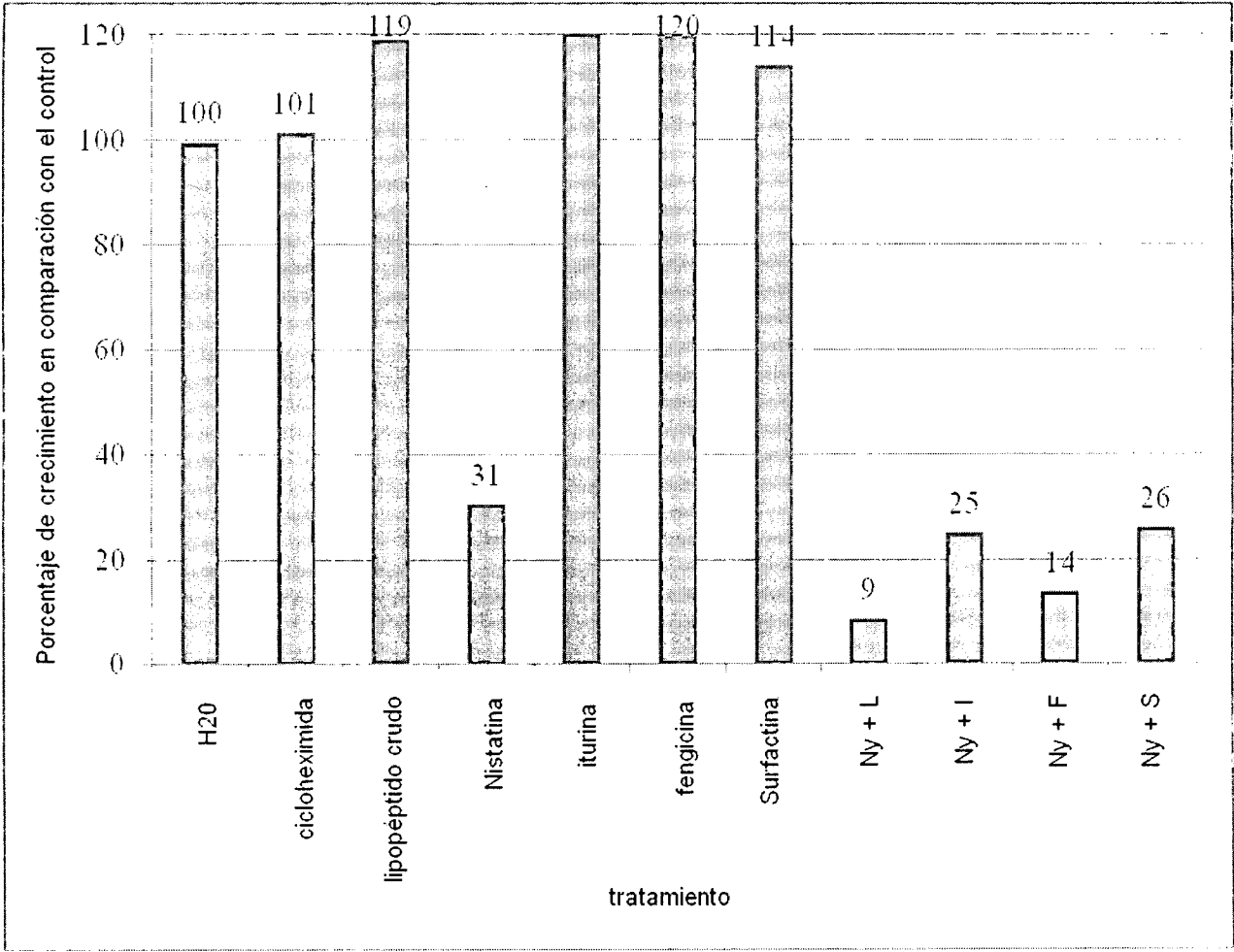


FIGURA 8

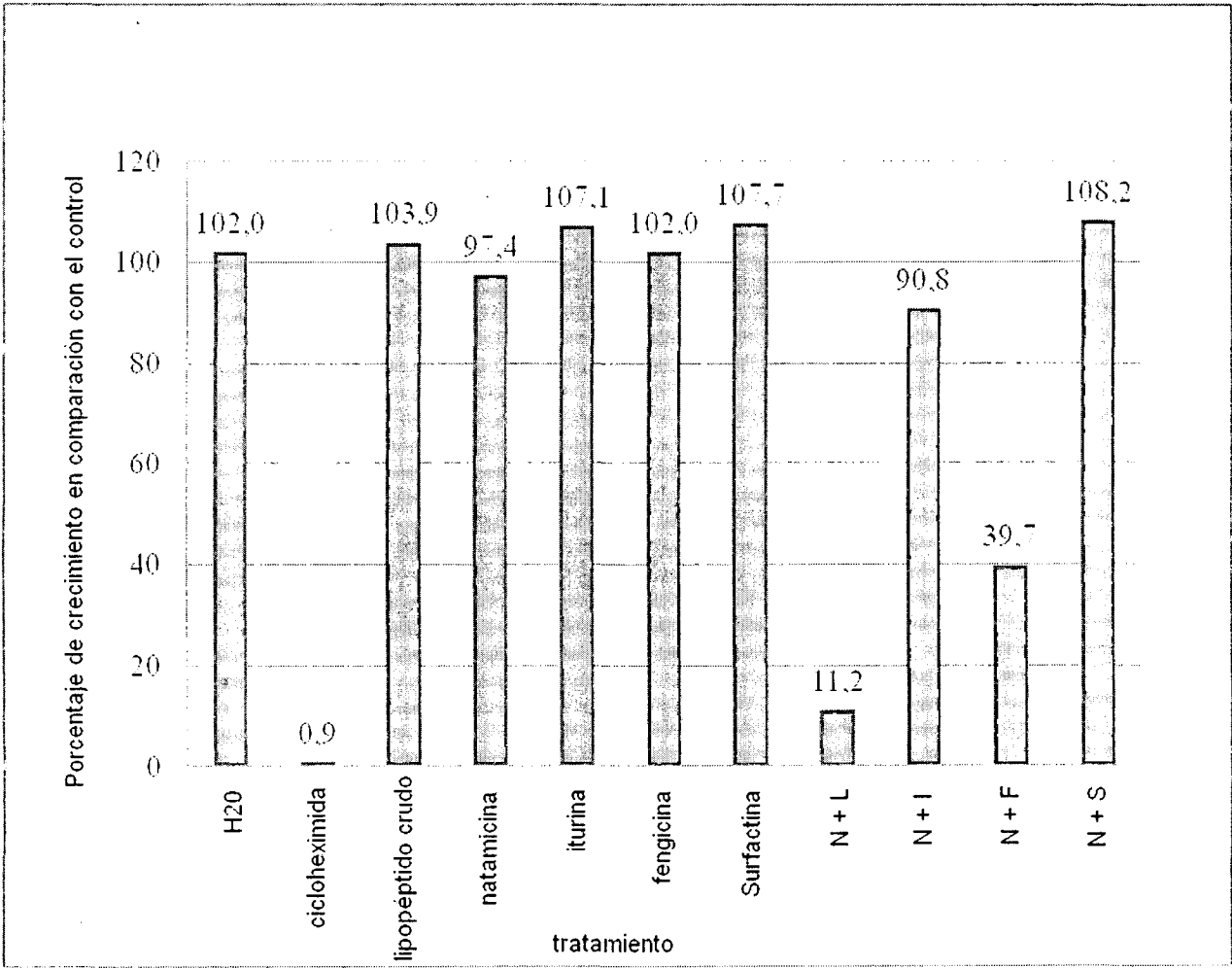
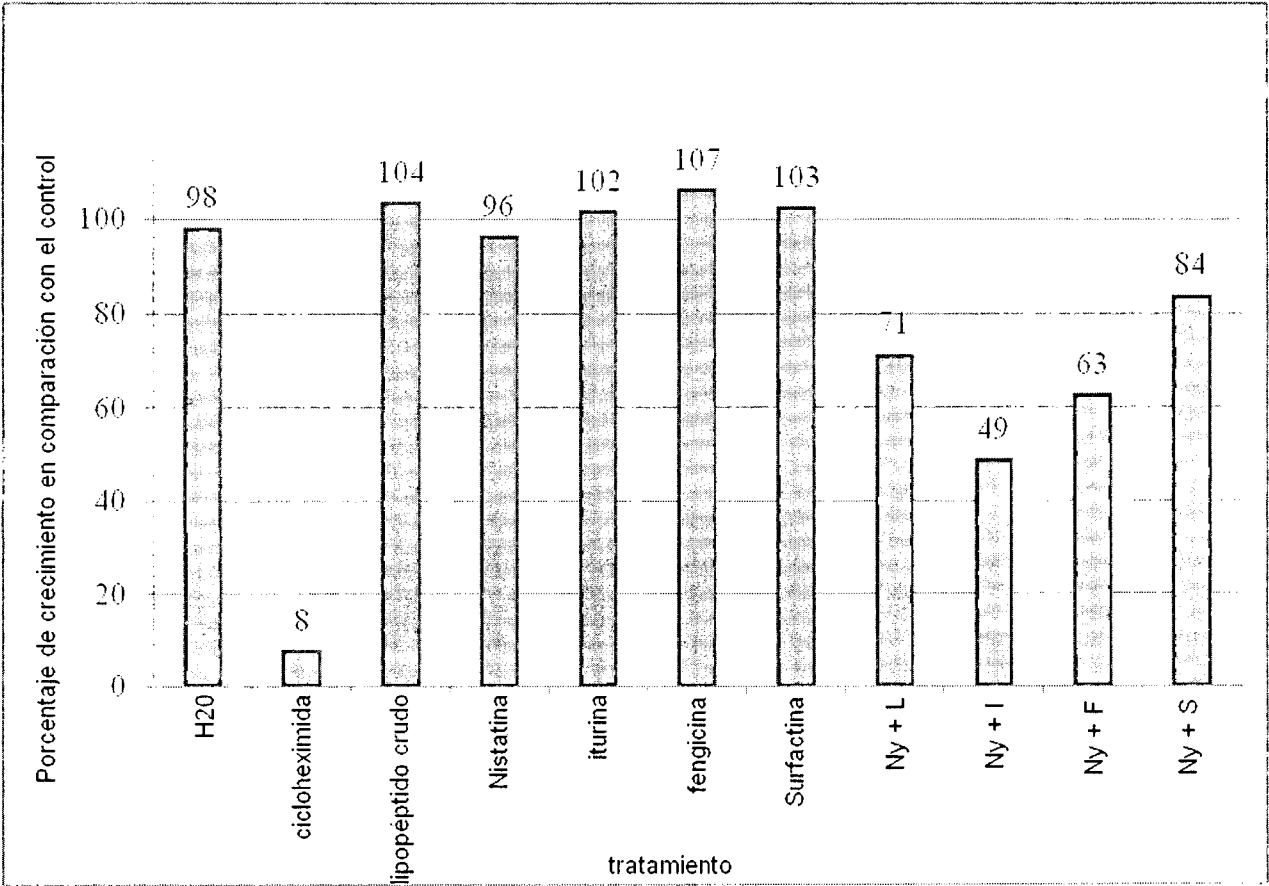


FIGURA 9



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 November 2012 (29.11.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/162412 A2

(51) International Patent Classification:

A01N 43/16 (2006.01) C07K 7/56 (2006.01)
A01N 43/713 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
C07H 17/08 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/039178

(22) International Filing Date:

23 May 2012 (23.05.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/489,640 24 May 2011 (24.05.2011) US
61/615,075 23 March 2012 (23.03.2012) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
AGRAQUEST, INC., A DELAWARE CORPORATION [US/US]; 1540 Drew Avenue, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GUIL-HABERT-GOYA, Magalie [US/FR]; 2009 Renoir Court, Davis, CA 95618 (US). MARGOLIS, Jonathan, S. [US/US]; 1737 Evergreen Court, Davis, CA 95618 (US).

(74) Agent: SAMONEK, Michelle, L.; AGRAQUEST, INC., 1540 Drew Avenue, Davis, CA 95618 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: SYNERGISTIC COMBINATIONS OF POLYENE FUNGICIDES AND NON-RIBOSOMAL PEPTIDES AND RELATED METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention includes compositions comprising a synergistic fungicidal combination of a polyene fungicide and at least, one lipopeptide and methods for using such compositions in controlling fungal pathogens.

WO 2012/162412 A2

6A

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SAMONEK, Michelle, L.
AgraQuest, Inc.
1540 Drew Avenue
Davis, CA 95618
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 14 November 2013 (14.11.2013)	
Applicant's or agent's file reference 244-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2012/039178	International filing date (day/month/year) 23 May 2012 (23.05.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address AGRAQUEST, INC., 1540 Drew Avenue Davis, CA 95618 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 530-750-0150	
	Facsimile No. 530-750-0153	
	E-mail address ip@agraquest.com	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☒ the name	☐ the address
☐ the nationality	☐ the residence	
Name and Address BAYER CROPSCIENCE LP 1540 Drew Avenue Davis, CA 95618 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 530-750-0150	
	Facsimile No. 530-750-0153	
	E-mail address ip@agraquest.com	
	☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zoltanski Andrzej
Facsimile No. +41 22 338 70 80	e-mail pt03.pct@wipo.int
	Telephone No. +41 22 338 74 03

p-3826

Clarke, Modet & C^o
COLOMBIA

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Td: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s), Michael J. Miille,

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
Bayer CropScience LP

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de Delaware

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 1540 de
Drew Avenue, Davis, California 95618, EE.UU.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor
de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en Davis, California

en este 12 día de junio de 2013

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned, Michael J. Miille,

legal representative(s) of Bayer CropScience LP

an organization existing under the laws of Delaware

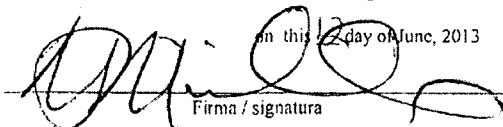
and in present execution of its business activity, domiciled at 1540 Drew Avenue, Davis, California 95618, U.S.A.

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 residing in Bogotá Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Davis, California

on this 12 day of June, 2013

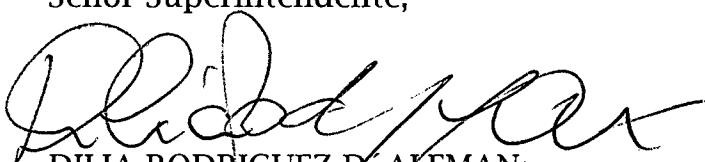

Firma / signature

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

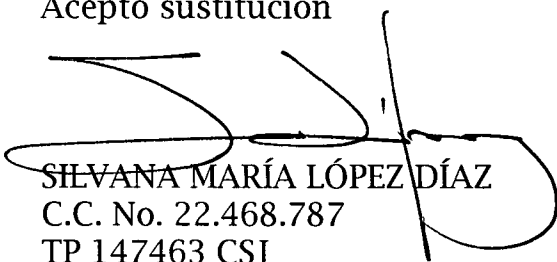
Yo, **DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN**, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, Colombia, atentamente informo a usted que sustituyo el poder con que obro a la doctora **SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ**, domiciliada en Bogotá, identificada con la Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 y portadora de la tarjeta profesional No. 147.463 del CSJ, con las mismas facultades con que me fueron conferidas para este caso.

Señor Superintendente,



DILIA RODRIGUEZ D' ALEMAN
C.C. 41.654.882 de Bogotá
TP 20824 CSJ

Acepto sustitución



SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ
C.C. No. 22.468.787
TP 147463 CSJ

PRESENTACION PERSONAL

El anterior escrito fue presentado ante el
NOTARIO ONCE (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.
personalmente por **RODOLFO RODRIGUEZ**

ALFAR
quien exhibió la c.c. **ME34882**
y Tarjeta Profesional No. **20624** C.S.J. **20 SEP 2013**

Firma

Fecha

Nelson J. Sánchez García
NOTARIO (E)



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 112411

Bogotá D.C., Noviembre 05 de 2013 - 16:52:33

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	406756884	05/11/2013	72.360.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275266- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:27:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 5 de 2013 - 16:52:59

68

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 119573

Bogotá D.C., Noviembre 22 de 2013 - 12:02:15

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	119511	22/11/2013		9.090.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
53	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.590.000.00
				<u>\$1.590.000.00</u>
			=====	

SON: **UN MILL&OACUTE;N QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275266- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:27:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 22 de 2013 - 12:02:16

69

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275266-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:27:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

PI02-F06 (2009-11-10)