



TÍTULO DE PATENTE NO. 341145

Titular(es): JESUS CAMPOS GARCIA; JOSE LOPEZ BUCIO; RANDY ORTIZ;
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Domicilio: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edif. B-3, Ciudad Universitaria,
Av. Francisco J. Mujica S/N, 58030, Morelia, Michoacán, MÉXICO; Santiago Tapia
403, Col. Centro, 58000, Morelia, Michoacán, MÉXICO.

Denominación: CICLODIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD AUXÍNICA REGULADORES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL.

Clasificación: Int.CI.8: A01N37/10; A01N43/00; A01N47/08; A61K38/00; C07K14/00

Inventor(es): JESUS CAMPOS GARCIA; JOSE LOPEZ BUCIO; RANDY ORTIZ CASTRO.

SOLICITUD

Número:	Fecha de presentación:	Hora:
MX/a/2012/004547	10 de abril de 2012	10:30

PRIORIDAD

País:	Fecha:	Número:
--------------	---------------	----------------

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 10 de abril de 2032

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

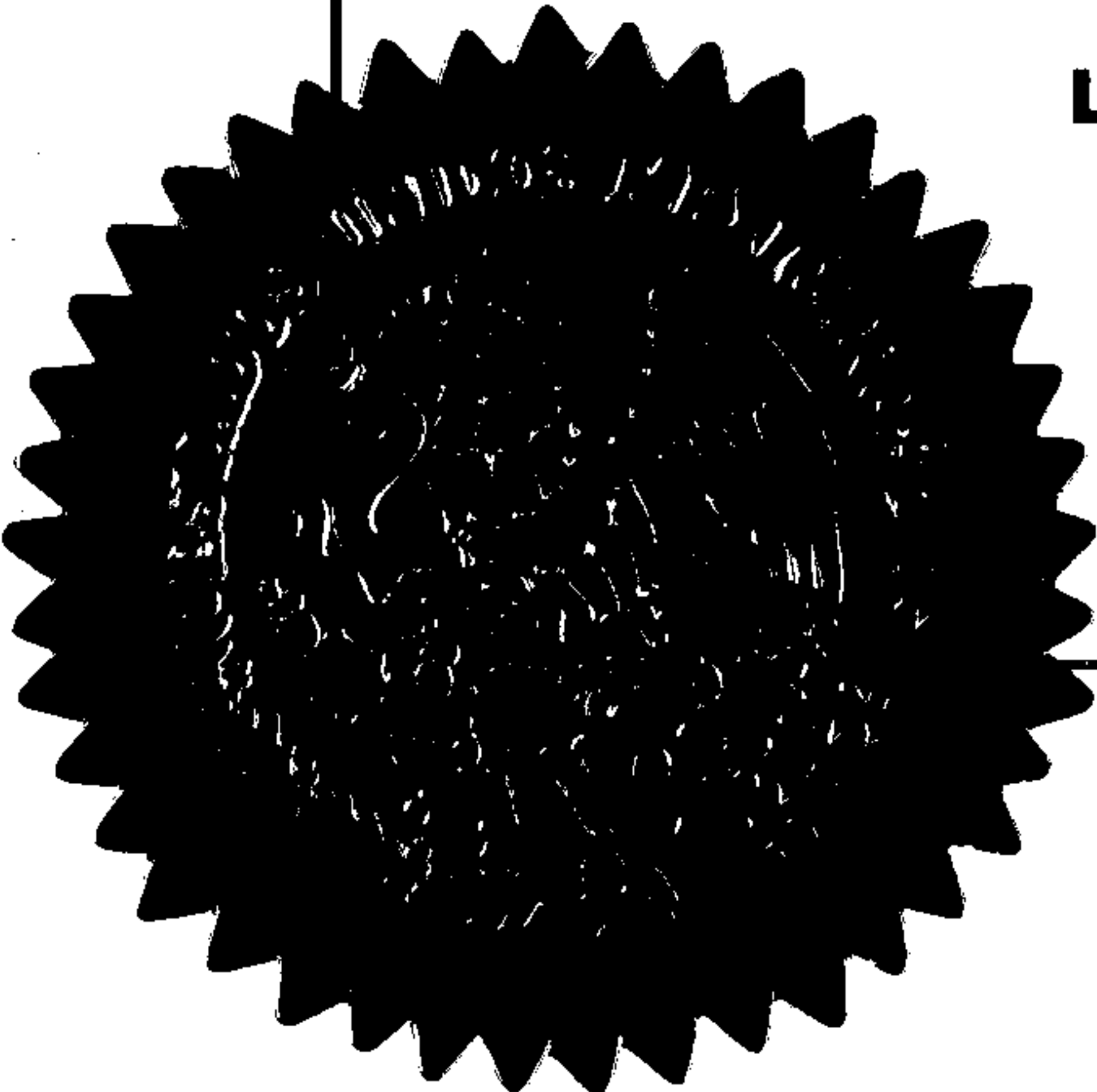
De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 28/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 7 de agosto de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



TÍTULO DE LA PATENTE

**CICLODIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD AUXÍNICA
CRECIMIENTO VEGETAL.**

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

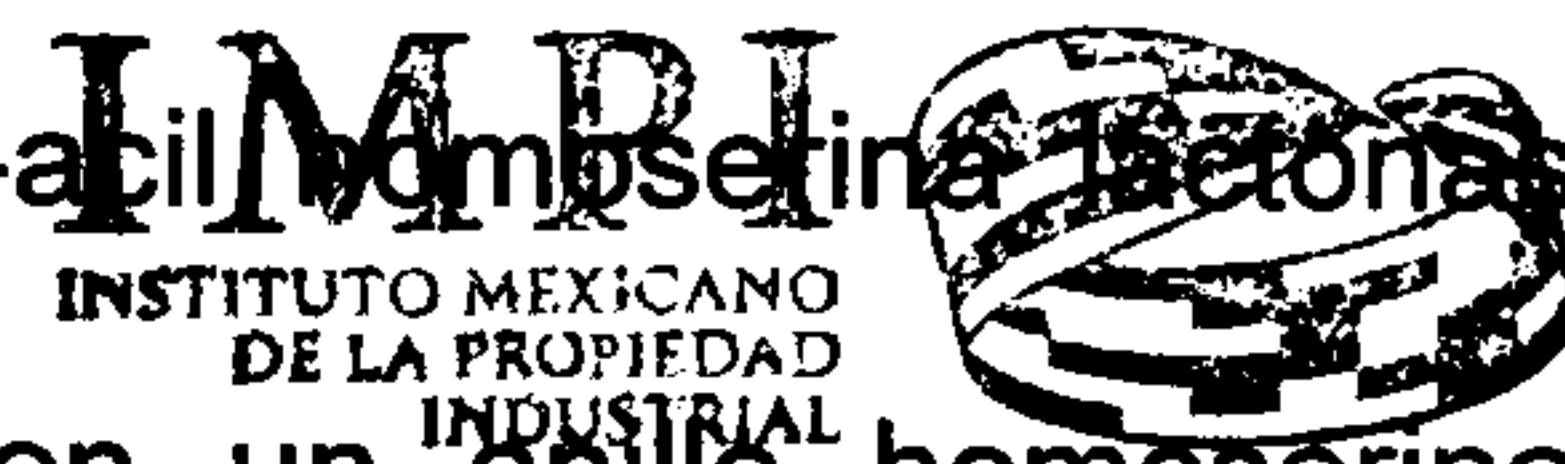
5 La presente invención se refiere a ciclodipéptidos con actividad auxínica como reguladores y promotores del crecimiento vegetal. En particular la presente invención se refiere al efecto promotor del crecimiento vegetal causado por los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) con actividad auxínica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Las bacterias utilizan moléculas pequeñas como señales químicas para la comunicación celular, esta comunicación necesita la producción, liberación y detección de factores hormonales, conocidos como autoinductores. Esto les permite a las bacterias coordinar la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional, en un proceso comúnmente denominado como Quorum-Sensing (QS).

15 Uno de los primeros sistemas de quorum-sensing descritos es el de *Vibrio fischeri* una bacteria marina bioluminiscente que se encuentra asociada en simbiosis con organismos marinos abismales incluyendo peces y calamares. El sistema de quorum-sensing en *V. fischeri* está regulado por dos proteínas, LuxI y LuxR, que controlan la expresión del operón de la luciferasa (*luxICDABE*) requeridas para la

20 producción de luz.



Diversas especies de bacterias Gram negativas usan *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) para regular su QS, estos compuestos contienen un anillo homoserina lactona (HL) conservado, el cual se encuentra unido principalmente a una cadena (*N*)-acil de ácido graso unida a través de un enlace amida. La longitud de la cadena de ácidos grasos puede variar entre 4 a 18 carbonos, usualmente por incrementos de 2 carbonos. Estos pueden estar saturados o insaturados y con o sin sustituyentes en el carbono 3 (C-3).

Pseudomonas aeruginosa es uno de los ejemplos más estudiados del sistema de QS, en esta bacteria se han identificado dos sistemas jerárquicos: los cuales están comprendidos por los sistemas LasR-LasI y el RhIR-RhII, regulados por 3-oxo-dodecanoil-HL (3-oxo-C12-HL) y butanoil-HL (C4-HL), respectivamente.

Diversos procesos en las bacterias están regulados por QS, incluyendo la simbiosis, la virulencia, la producción de antibióticos y la formación de biopelículas. *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa aislada del suelo, agua y plantas y es un patógeno oportunista en humanos infectando pacientes inmunocomprometidos o en pacientes con infecciones crónicas pulmonares como la fibrosis quística. Además puede infectar otros organismos como insectos, nematodos y plantas. Esta facilidad de infección de *P. aeruginosa* es debido a la producción de factores de virulencia, mecanismos de resistencia a multidroga y formación de biopelículas. En *P. aeruginosa* al menos el 20% de los genes están sujetos a la regulación por el QS.

Las bacterias asociadas a plantas son capaces de comunicarse por medio de AHLs, lo que ha planteado la posibilidad de que las plantas son capaces de reconocer estos compuestos y responder ajustando su metabolismo.



Un primer reporte indicando que las plantas pueden percibir las AHLs fue publicado en 2003 [Mathesius U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anollés, B.G.

Rolfe y W.D. Bauer. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proceedings of the National Academic of Sciences USA 100:1444-1449], donde se muestra que la aplicación de AHLs afecta un rango amplio de funciones en *Medicago truncatula*, incluyendo respuestas de defensa y respuesta a estrés, regulación transcripcional, procesamiento de proteínas, respuestas a hormonas de la planta y sobre elementos de citoesqueleto, así como también el metabolismo primario y secundario de la planta.

Posteriormente se encontró que la presencia de bacterias productoras de AHLs en la rizósfera de tomate induce respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico y etileno, las cuales juegan un papel importante en la activación de resistencia sistémica en plantas y confiere resistencia al hongo patógeno *Alternaria alternata* [Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Van Breusegem F., Eber L., Hartmann A. & Langebartels C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizospheric bacteria. Plant Cell and Environment 29:909-918]. El hecho de que ciertas mutantes de *Rhizobium* alteradas en la producción o respuesta a AHLs fueron incapaces de nodular plantas de leguminosas respalda la hipótesis de que las AHLs pueden participar en las interacciones planta-bacteria [Zheng H., Zhong Z., Lai X., Chen W.X., Li S. & Zhu J. (2006). A luxR/luxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. Journal of Bacteriology 188:1943-1949].



En un estudio reciente se demostró que pequeñas concentraciones de AHLs pueden causar cambios sustanciales en la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*

thaliana, [Ortiz-Castro R., M. Martínez-Trujillo y J. López-Bucio. (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: A class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell and Environment 31:1497-1509]. Quedando la necesidad de esclarecer si las AHLs son la única clase de compuestos del QS que son capaces de modular el desarrollo de las plantas y de establecer si regulando el QS en bacterias promotoras del crecimiento vegetal se puede favorecer la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal por parte de las bacterias de la rizósfera.

Los ciclodipeptidos, también referidos como dipéptidos cíclicos o dicetopiperazinas - cuyos términos serán referidos en el presente documento de manera indistinta, constituyen una numerosa familia de compuestos con amplio rango de usos, que van desde aditivos alimenticios (Patentes US 4,006,261), en la industria cosmética (Patente US 7,347,991), antibacterianos, antifúngicos, antivirales y con actividades inmunosupresoras y antitumorales (publicado en la Patente US 7,237,082). Los ciclodipeptidos son producidos por diferentes microorganismos tales como bacterias, hongos filamentosos, levaduras y líquenes, aunque también se han aislado de organismos marinos tales como esponjas y estrellas de mar.

Adicionalmente, se ha encontrado que los ciclodipeptidos tienen actividad biológica sobre plantas. La patente US 5,446,021 describe una composición de uso agrícola para inducir resistencia en plantas al estrés hídrico y salino que comprende como ingrediente activo a ciclodipeptidos. En fracciones de sobrenadantes de cultivos de



Pseudomonas putida WCS358 con actividad promotora del crecimiento vegetal, se identificaron predominantemente ciclodipeptidos, lo cual sugiere que son los responsables del efecto promotor del crecimiento vegetal inducido por la bacteria [Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Venturi V (2002). Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol 45:250–254]. La solicitud de patente WO2012008781 se refiere a una composición agrícola con derivados de 2,5-dicetopiperazinas con capacidad de controlar enfermedades vegetales y promover el desarrollo vegetal. Con esto se establece que existen compuestos producidos por las bacterias diferentes a las AHLs con capacidad de regular el crecimiento vegetal, pero queda la necesidad de determinar si regulando el QS se puede incrementar la producción de compuestos microbianos capaces de promover el crecimiento vegetal y establecer los mecanismos a través de los cuales las plantas los perciben.

El crecimiento y desarrollo de las plantas involucra la integración de diversas señales endógenas y ambientales que, junto con el programa genético intrínseco, determinan la forma y funcionamiento de los diferentes tejidos, incluyendo la raíz. Las plantas cuentan con un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y para responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos, de igual manera, poseen mecanismos para la comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. Virtualmente cada aspecto del desarrollo de la planta desde la embriogénesis hasta la senescencia está sujeto a una regulación química mediada por diferentes

substancias reguladoras del crecimiento vegetal conocidas como fitohormonas o hormonas vegetales.



Las fitohormonas más estudiadas son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el etileno y más recientemente los
5 brasinosteroides. Todas las anteriores son moléculas orgánicas pequeñas las cuales actúan a bajas concentraciones. Estas se sintetizan en los diferentes tejidos de la planta y pueden transportarse a otros tejidos a través del sistema vascular (como el caso de las auxinas) o difundirse libremente a través de las membranas como el etileno [Gray W.M. (2004). Hormonal Regulation of plant growth and development.
10 PLoS Biol 2:1270-1273.].

Respecto a la aplicación de fitohormonas únicamente en el desarrollo vegetal, las más importantes son la estimulación de la elongación y diferenciación celular inducidas por auxinas y giberelinas, el efecto de las citocininas, auxinas y giberelinas en la división celular y el efecto de auxinas y citocininas en la diferenciación de
15 órganos (Patente US 8,101,552).

Las fitohormonas tienen valor comercial en la agricultura y la horticultura. Una lista limitada de aplicaciones relacionadas a la estimulación del desarrollo incluyen el mejoramiento de las uvas sin semilla por el ácido giberélico (GA), el desarrollo de frutas partenocárpicas por las auxinas, la inducción de raíces en la propagación por
20 auxinas, etc., por lo que el aislamiento de compuestos naturales con capacidades de regular el desarrollo vegetal, como los de la presente invención, tienen también un potencial valor comercial.



La presente invención se refiere a tres ciclodipéptidos con actividad auxínica, aislados de cultivos microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con capacidad promotora del crecimiento vegetal. Los ciclodipéptidos de la presente invención fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y su estructura confirmada por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono ($^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$, respectivamente). Los ciclodipéptidos de la presente invención son el ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) todos con actividad auxínica y responsables de la actividad promotora del crecimiento vegetal.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de la inoculación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Fotografías representativas de plantas crecidas durante 12 días en condiciones control (A), o co-inoculadas con *P. aeruginosa* silvestre (B) y la mutante de *P. aeruginosa LasI* (C).

15

Figura 2. Gráficas representativas del efecto de la co-inoculación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la producción de biomasa en *Arabidopsis thaliana*.

Se midieron y se graficaron el peso fresco del follaje (A) y el peso fresco de la raíz (B) de plantas crecidas en medio sin inocular (barras blancas) y plantas co-inoculadas con *P. aeruginosa* silvestre (barras negras) y la mutante de *P. aeruginosa*

20

lasI (barras grises). Los números en el eje de las Y en ambas gráficas representan el peso en miligramos; en el eje de las X se grafican los tratamientos A, B y C,

respectivamente. Los datos graficados son la media \pm la desviación estándar de 20 plantas.



Figura 3. Cromatograma representativo del HPLC semi-preparativo del sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. A) Las flechas indican los picos colectados que fueron evaluados para su actividad promotora de crecimiento vegetal. B) Cromatograma representativo del resultado de la purificación, este ejemplo corresponde a la purificación del pico 7, presentando un enriquecimiento $> 90\%$. Se grafica en el eje de las Y la abundancia relativa en % y en el eje de las X, el tiempo de retención en minutos para (A y B) o la masa molecular del ión (M/Z) para (C).

Figura 4. Análisis cromatográfico de la fracción purificada de ciclodipéptidos presentes en el extracto de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto total obtenido de sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* por la extracción con acetato de etilo acidificado, sometido posteriormente a análisis por GC-MS. A) Perfil cromatográfico (GC-MS) del extracto total sin purificar. B) Fracción purificada por HPLC semi-preparativo (proceso referido en la figura 3B) sometida al análisis por GC-MS. C) Perfil de fragmentación iónica obtenida por espectrometría de masas, correspondiente al pico purificado de la figura 3B (ciclo L-Pro-L-Phe). El análisis fue realizado en un cromatografo de gases Agilent 6850 Series II, equipado con detector de masas Agilent MS detector (modelo 5973) y una columna capilar de 30m \times 0.2mm \times 0.25mm de 5% phenylmethylsiloxane (Agilent). En todas las gráficas se indica en el eje de las Y la abundancia relativa en mV y en el eje de las X, tiempo de retención para (A y B) o la masa molecular del ión (M/Z) para (C).

