



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 328 002**

⑫ Número de solicitud: 200800591

⑤① Int. Cl.:
C12P 7/22 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **29.02.2008**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2009**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.11.2009

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Alicante**
Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES
Universidad de Murcia

⑦② Inventor/es: **Pedreño García, María Ángeles;**
Belchi Navarro, Sarai;
Almagro Romero, Lorena y
Bru Martínez, Roque

⑦④ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la producción de resveratrol.**

⑤⑦ Resumen:

Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la producción de resveratrol.

El uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la promover la producción de resveratrol por parte de células capaces de sintetizar este compuesto y la acumulación extracelular del mismo.

ES 2 328 002 A1

DESCRIPCIÓN

Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la producción de resveratrol.

- 5 La presente invención se refiere al uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol por parte de células capaces de sintetizar este compuesto y la acumulación extracelular del mismo.

Estado de la técnica anterior

- 10 Los estilbenoides son compuestos fenólicos biológicamente activos con un amplio espectro de actividad antibiótica y farmacológica. Este tipo de compuestos es sintetizado por ciertas plantas, entre ellas la vid, como mecanismo adaptativo en respuesta a un estrés, como la irradiación de rayos ultravioleta, una infección microbiana, la exposición a metales pesados o tratamientos con ozono. Dentro de este grupo de compuestos cabe destacar el t-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), uno de los principales constituyentes de los estilbenoides producidos en respuesta al stress.
- 15 El isómero cis-resveratrol se suele encontrar en extractos de plantas que producen t-resveratrol y productos derivados. Su presencia se debe a la lenta fotoisomerización del isómero trans por irradiación con luz ultravioleta.

- En base a estudios epidemiológicos y de laboratorio sobre humanos, animales, células animales en cultivo y ensayos enzimáticos, se ha puesto de manifiesto que los estilbenoides, y en particular el resveratrol, tienen efectos favorables para la salud, lo que hace deseable su inclusión en la dieta humana y animal.
- 20

- El resveratrol está presente en el vino y puede estar implicado en los efectos saludables de su consumo moderado de vino. Se ha propuesto el incremento en el consumo de resveratrol como una vía para reducir la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares en humanos. El resveratrol y los extractos de plantas que contienen resveratrol se muestran efectivos en la prevención y terapia de la arteroesclerosis, como agentes antiinflamatorios y como agentes anti-hiperoxidativos. El resveratrol genera una inhibición significativa de la formación de criptas en colon aberrante en un modelo de rata tratado con un agente carcinogénico (azoximetano), sugiriendo su utilidad como inhibidor de generación de tumores en humanos. El resveratrol actúa como promotor de la formación de nitróxidos que son agentes vasodilatadores y anti-agregación plaquetaria.
- 25

- Tenido en cuenta el papel beneficioso del resveratrol sobre la salud humana y animal, es importante poder disponer de una fuente biológica adecuada que permita la obtención de resveratrol en cantidades suficientes para satisfacer la demanda. Con esta finalidad se han llevado a cabo diversos estudios.
- 30

- En la solicitud internacional WO 0044921 se utiliza el gen o una porción del gen de la resveratrol sintasa obtenido de una planta que produce resveratrol y se transfiere a una planta que no produce resveratrol de forma natural para que lo exprese constitutivamente y acumule el derivado resveratrol glucósido en sus tejidos.
- 35

- En la solicitud internacional WO 9718715 se describe como plantas enteras de vid son tratadas con cloruro de aluminio, que actúa como agente inductor de la síntesis de resveratrol, para aumentar el contenido en resveratrol de la planta y los productos derivados de ella, como la uva, el mosto y el vino. En otro estudio, suspensiones de células vegetales procedentes de plantas que producen resveratrol son estimuladas con trozos de paredes celulares de hongos para inducir la síntesis de resveratrol y su acumulación en el medio de cultivo y en las células (Liswidowati, *et al.* 1991, "Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells" Planta 183:307-314).
- 40

- Dentro de los compuestos propuestos como inductores de la síntesis de resveratrol en plantas potencialmente productoras del mismo, cabe destacar el grupo de las ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de 6 a 8 residuos de alfa-D-glucopiranosos unidos mediante enlaces Alfa-(1-4). Existen numerosos derivados de este compuesto obtenidos por modificación de los grupos hidroxilos de las posiciones 2,3 y/o 6 de los restos de glucosilo de la molécula. A continuación se detallan algunos de los ensayos llevados a cabo en este sentido:
- 45

- 1) El tratamiento de suspensiones celulares de vid con una ciclodextrina doblemente metilada en las posiciones 2 y 6 de cada uno de los restos de glucosilo de la molécula (DIMEB), produce la inducción de la síntesis de t-resveratrol, el cual se excreta al medio de cultivo (Morales *et al.* 1998, "Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*" Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53:179-187).

55

- 2) Ciclodextrinas metiladas aleatoriamente en las posiciones 2, 3 y/o 6 de cada uno de los restos de glucosilo de la molécula, con un grado medio de metilación 13, o ciclodextrinas hidroxipropiladas, son capaces de inducir síntesis de t-resveratrol en suspensiones celulares de vid de dos variedades, el cual es excretado en el medio de cultivo durante al menos 96 horas, llegando a acumular hasta 6000 microg/g peso fresco (ES2190771).

60

- 3) Al ser tratadas con ciclodextrinas distintas líneas celulares del género *Vitis* muestran una acumulación extracelular de estilbenos en el medio de cultivo, especialmente de t-resveratrol. Dependiendo de las condiciones de incubación se puede modificar la proporción de trans y cis resveratrol. (Roque Bru *et al.* 2006 "Modified Cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures" Journal of Agricultural and food chemistry, 54, 65-71).

65

Estos estudios demuestran que una ciclodextrina doblemente metilada en las posiciones 2 y 6 de cada uno de los restos de glucosilo de la molécula o aleatoriamente metilada, o hidoxipropilada, inducen la acumulación de forma extracelular de t-resveratrol en cultivos celulares de células de vid.

- 5 En otros estudios se probó la posibilidad de estimular la producción de resveratrol mediante el uso de metiljasmonato (MeJA). El metiljasmonato es un derivado activo del ácido jasmónico, que junto con éste, se encuentra dentro del los compuestos que actúan como reguladores de las respuestas de defensa en plantas sometidas a stress. En este sentido algunos ensayos relevantes se citan a continuación:
- 10 1) El tratamiento con metil jasmonato de tres líneas celulares de suspensiones de vid, conduce a la acumulación intracelular del resveratrol principalmente (entre el 90-95%) en la forma glicosilada llamada piceida, siendo la cantidad de cualquier forma de resveratrol en el medio extracelular despreciable. Los niveles máximos de piceidas acumuladas son de 228 mg/litro. Según los datos de densidad celular del estudio, esto equivaldría a unos 11 mg/g peso seco u 500 microg/g peso fresco. En los controles la piceida acumulada al cabo de
- 15 14 días es 0.05 mg/g peso fresco. (Krisa *et al.* (1999) *Stilbene production by Vitis vinifera cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and 13C biolabelling*. J. Nat. Prod. 62: 1688-1690).
- 20 2) En otro estudio, se tratan suspensiones celulares de vid con metil jasmonato y se analizan las formas libres cis y trans del resveratrol en extractos celulares y en el medio extracelular. Solo se aprecian incrementos respecto a los controles entre los 6 y los 8 días. Las diferencias están en torno a 0.34 microg/g peso fresco. (Tasoni *et al* (2005) *Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in V. vinifera cv. Barbera cell cultures*. New Phytologist 166: 895-905). Esta cantidad representa aproximadamente un 0.006% de la que se acumula en presencia de ciclodextrinas (ES2190771). Por tanto, la cantidad de resveratrol en el medio extracelular debido al tratamiento con metiljasmonato es significativamente inferior con
- 25 respecto a la que se acumula debido al tratamiento con ciclodextrinas.

Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que el metiljasmonato induce la acumulación de la forma glicosilada del resveratrol o piceida en el cultivo de células de vid de forma intracelular, no afectando de forma significativa a la acumulación de las formas libres intra o extracelulares.

Explicación de la invención

En la presente invención se combina el tratamiento de ciclodextrinas (ciclodextrina metilada aleatoriamente o

35 ciclodextrina hidroxipropilada) con metiljasmonato, a fin de promover la producción de resveratrol en células potencialmente productoras del mismo.

Tomando en consideración el estado de la técnica anteriormente descrito, del tratamiento conjunto de las suspensiones celulares de vid con ciclodextrinas y Metiljasmonato cabría esperar que la acumulación global de resveratrol en el cultivo consistiera en la suma de las cantidades y formas que se acumulan con los tratamientos individuales, es decir, en torno a 500 microg/g peso fresco de piceida intracelular y en torno a 6000 microg/g peso fresco de resveratrol extracelular.

De forma sorprendente e inesperada, el uso conjunto de ciclodextrinas y Metiljasmonato descrito en la presente invención:

- 45 a. tiene un efecto sinérgico sobre la producción de resveratrol siendo las concentraciones de t-resveratrol acumuladas extracelularmente obtenidas muy superiores a las esperadas.
- 50 b. la acumulación del resveratrol se realiza de forma extracelular únicamente; este hecho resulta ventajoso, al ser mucho más sencilla la extracción y purificación de este compuesto si se acumula en el medio de cultivo en vez de intracelularmente (no es necesaria la tisis y posterior eliminación de los restos celulares).
- 55 c. Se genera de forma casi exclusiva t-resveratrol (forma de interés frente al cis-resveratrol), aumentando el ratio de trans/cis.

Este efecto se ejemplifica en una diversidad de casos, tales como con líneas celulares de vid de distintas variedades (Gamay, Monastrell, Moscatel de Hamburgo), con diferentes medios de cultivo minerales (MS, Gamborg), a diferentes densidades celulares (baja, alta y media).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención es el método de obtención de resveratrol, que comprende la adición de ciclodextrinas y metiljasmonato al medio de cultivo, la adición al medio de cultivo de células potencialmente productoras de resveratrol, su incubación y la separación del resveratrol obtenido durante la incubación del medio de cultivo.

Una realización preferida de esta invención además comprende la purificación del resveratrol obtenido.

En otra realización preferida de la presente invención la concentración de Metiljasmonato es de entre 5 y 450 micromoles/por litro de medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de Metiljasmonato es de entre 50 y 150 micromoles/L medio de cultivo y aun más preferiblemente de entre 75 y 125 micromoles/L medio de cultivo.

En otra realización preferida de la invención las ciclodextrinas se eligen del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) o ciclodextrina hidroxipropilada (CDHA).

En particular, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de entre 1 y 3, más preferiblemente de entre 1,5 y 2, y aún más preferiblemente de entre 1,6 y 1,9.

Por otro lado, el grado de sustitución por hidroxipropilos por unidad de glucosa (anhidra) de CDHA es de entre 0,3 a 1,5, más preferiblemente de entre 0,5 y 1, y aún más preferiblemente de entre 0,6 y 0,9.

En otra realización preferida de la invención la concentración de ciclodextrinas es de entre 6,5 y 130 g/L medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de ciclodextrinas es de entre 10 y 100 g/L medio de cultivo y aún más preferiblemente es de entre 50 y 75 g/L medio de cultivo.

En otra realización preferida de la invención las células productoras de resveratrol proceden de la especie *Vitis vinifera*.

En otra realización preferida de la invención las células proceden del grupo de especies que comprende *Pinus sibirica*, *P. sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucalyptus*, *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactylifera*, *Festuca versuta*, *Carex fedia*, o *Veratrum grandiflorum*.

Se entiende por células potencialmente productoras de resveratrol, cualquier línea celular capaz de producir resveratrol bien de forma natural o tras modificación genética.

En otra realización preferida de la invención el tiempo de incubación es de entre 4 y 288 horas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo que comprende metiljasmonato y ciclodextrinas.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un medio de cultivo que comprende Metiljasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol en células productoras del mismo.

Finalmente, un último aspecto de la invención es el uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol en células productoras del mismo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se - proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Fig 1: Producción de t-resveratrol por unidad de volumen de medio extracelular (g/litro de medio) de *Vitis vinifera Monastrell* a lo largo de 288 horas de incubación. Se muestra la media y desviación estandar de cuatro replicas biológicas.

Fig 2: Análisis cromatográfico (HPLC-UV-MS) de caldos de *Vitis vinifera Monastrell Verde* tras 96 horas de incubación. Se muestra un experimento representativo de cuatro replicas biológicas.

A y B: Incubado con CDMA a la concentración de 62.5 g/l.

C y D: Incubado con CDMA a la concentración de 62.5 g/l y metiljasmonato 100 micromolar.

A y C son los registros cromatográficos de absorción a 306 nm.

B y D son registros cromatográficos del ión $m/z = 229$ en modo positivo. Los picos correspondientes a las formas trans y cis están indicados.

Figura 3: Efecto sobre la cinética de acumulación extracelular de resveratrol de la adición de forma secuencial de CDMA seguida de MeJa a un cultivo de *Vitis vinifera variedad Gamay*. Adición de CDMA al cultivo y posterior adición de MeJa tras 48 horas (CD+MeJa (48 h)), frente al efecto de su adición conjunta (CD+MeJa) o el uso de CDMA de forma exclusiva(CD). Se muestra la media y desviación estandar de cuatro replicas biológicas.

Figura 4: Efecto sobre la cinética de acumulación extracelular de resveratrol de la adición de forma secuencial de MeJa seguida de CDMA a un cultivo de *Vitis vinifera variedad Gamay*.

Círculos negros: cultivo preincubado 48 horas en medio de cultivo y suplementado al cabo de ese tiempo con CDMA a la concentración final de 62.5 g/l.

5 Círculos grises: cultivo preincubado 48 horas en medio de cultivo y suplementado al cabo de ese tiempo con CDMA a la concentración final de 62.5 g/l y MeJA a la concentración final de 100 micromolar.

Triángulos: cultivo preincubado 48 horas en medio de cultivo con MeJA 100 micromolar y suplementado al cabo de ese tiempo con CDMA a la concentración final de 62.5 g/l.

10 El tiempo 0 indica el momento en que los cultivos se suplementan con CDMA; anteriormente no hay acumulación de resveratrol. Se muestra la media y desviación estandar de cuatro replicas biológicas.

Exposición detallada de modos de realización

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto el efecto sinérgico en el uso conjunto de Metiljasmonato y diferentes tipos de ciclodextrinas en la producción de t-resveratrol por parte de distintas variedades de células productoras de resveratrol.

Preparación y mantenimiento de material vegetal

20 *Línea celular Vitis vinifera var. Gamay*

La línea celular de *Vitis vinifera var. Gamay* fue establecida por J. C. Pech en 1978 (ENSAT, Toulouse, Francia) a partir de frutos inmaduros de vid del cultivar Gamay Fréaux.

25 Los callos se mantuvieron a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 horas de iluminación (6 W/m²) y 8 h de oscuridad, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio G20, consistente en medio basal Gamborg B₅ (Gamborg y cols. 1968, Experimental Cell Research 50:151-158) suplementado con las vitaminas de Morel (Morel, G. 1970, "Le problème de la transformation tumorale chez les végétaux". Physiologie Végétale, 8:189-204), hidrolizado de caseína (0.25 g/l), sacarosa (20 g/l) como fuente carbonada y ácido alfa-naftalenacético (0.1 mg/l) y kinetina (0.2 mg/l) como hormonas. Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l), cuando el medio se enfría.

35 Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables obtenidos, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio G20 sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 horas de iluminación (6 W/m²) y 8 h de oscuridad.

40 *Líneas celulares Vitis vinifera var. Monastrell y var. Moscatel de Hamburgo*

Las líneas celulares de *Vitis vinifera var. Monastrell* y *var. Moscatel de Hamburgo* se establecieron a partir de frutos inmaduros de vid de los cultivares Monastrell y Moscatel de Hamburgo respectivamente.

45 Uvas inmaduras de aproximadamente 5 mm de diámetro se esterilizaron superficialmente por inmersión en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo y siempre bajo condiciones estériles, las uvas se lavaron 3 veces con agua bidestilada estéril, se eliminaron las semillas y se dividieron en 4 porciones. Estas porciones (explantos) se depositaron en una placa de Petri en oscuridad a 25°C hasta la aparición de microcallos. La placa de Petri contenía medio de cultivo sólido MS2, basado en el descrito por Murashige y Skoog (Murashige, T y Skoog, F. 1962, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". Physiologia Plantarum 15:473-497), suplementado con la vitaminas de Morel, hidrolizado de caseína (0.25 g/l), sacarosa (30 g/l) como fuente carbonada, ácido alfa-naftalenacético (0.2 mg/l) y kinetina (0.4 mg/l) como hormonas, 8 g/l de agar purificado y ajustado a pH 6.

55 Los microcallos obtenidos se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de este mismo medio de cultivo sólido para el desarrollo de los callos en oscuridad a 25°C. Los callos se mantuvieron por subcultivo periódico en el mismo medio y condiciones.

60 Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio G20, o del medio MS2 en ausencia de agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C en oscuridad.

Estimulación de las células

65 En cada experiencia de estimulación se tomaron, en condiciones de esterilidad, entre 20 y 200 g de peso fresco de células que habían sido previamente lavadas con medio fresco y filtradas. Estas células se transfirieron a un matraz de entre 250 y 2000 ml de capacidad y se resuspendieron mediante la adición de entre 100 y 1000 ml de medio fresco estéril suplementado:

ES 2 328 002 A1

- solo con una β -ciclodextrina metilada aleatoriamente con un grado de sustitución por metilos de ente 1,6 y 1,9 (CDMA) a una concentración comprendida entre 6.5 y 130 g/L o
- hidroxipropilada aleatoriamente con un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9 (CDHA), a una concentración comprendida entre 6.5 y 130 g/L, o
- con una de las ciclodextrinas anteriormente mencionadas (CDMA) o (CDHA) a una concentración comprendida entre 6.5 y 130 g/L y con metiljasmonato a una concentración comprendida entre 5 y 450 micromolar.

El metiljasmonato se esteriliza aparte del medio por filtración, disuelto en etanol, y posteriormente se mezcla con el resto del medio estéril. La concentración final de etanol en el medio de cultivo es de 0.2% en volumen.

Los matraces se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para su mantenimiento en medio líquido durante periodos de tiempo comprendidos entre 24 y 256 horas.

Muestreo y preparación de muestras para análisis

De los cultivos incubados con inductores se extrajeron periódicamente alícuotas para análisis. Las células fueron separadas del medio por filtración realizando un ligero vacío, recogiendo por separado las células y el filtrado. El filtrado se utilizó para análisis por HPLC.

Análisis de trans-resveratrol en el medio extracelular

Una alícuota del medio extracelular recuperado se diluyó en agua, se filtró a través de un filtro Anopore de 0.2 μm , y 20 μl del filtrado se analizaron por HPLC inyectados en una columna LiChrospher 100 RP-18 (250x4 mm, tamaño de partícula 5 μm). Como fase móvil se utilizaron dos clases de disolventes: disolvente A, 0.05% de ácido trifluoroacético en agua y disolvente B, 0.05% de ácido trifluoroacético en metanol:acetonitrilo 60:40 vol/vol. La muestra se eluye a un flujo de 1 ml/min de la siguiente mezcla de los disolventes: 0 min. 10% B; 5 min, 15% B; 40 min, 35% B; 45 min, 65% B; 50 min, 65% B; 55 min 10% B; y a una temperatura de la columna de 35°C (Dalluge *et al.*, 1998, J. Chromatogr. A 793:265-274). El eluido de la columna se pasa por un detector UV-vis y seguidamente por un espectrómetro de masas con fuente electrospray de ionización a presión atmosférica.

El tiempo de retención del t-resveratrol y la respuesta del detector a la concentración del mismo (curva de calibrado para cuantificación) se determinó usando t-resveratrol comercial de pureza >99%. La presencia de resveratrol y otros estilbenoides se detectó a 306 nm y su identidad se confirmó mediante espectrometría de masas en línea.

Para análisis rutinario de t-resveratrol, una alícuota del filtrado fue diluida con medio fresco y su espectro de absorción ultravioleta fue registrado usando un espectrofotómetro usando como referencia el medio fresco. La concentración de t-resveratrol en el sobrenadante fue estimada utilizando un coeficiente de extinción molar a 306 nm de 26800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Siemann, E.H. and Creasy, L.L. 1992, "Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine" Am. J. Enol. Vitic. 43:49-52).

Ejemplo 1

Determinación de la concentración de Metiljasmonato (MeJa) óptima a concentraciones de beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) variables

La suspensión celular de *Vitis vinifera* var. *Monastrell* se trató:

- a. con metiljasmonato a concentraciones comprendidas entre 5 y 450 micromoles por litro de medio de cultivo
- b. con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a una concentración de 62.5 g/litro y metiljasmonato (MeJa) a concentraciones comprendidas entre 5 y 450 micromoles por litro de medio de cultivo,
- c. control sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) ni metiljasmonato (MeJA)
- d. Control sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) ni metiljasmonato (MeJA) pero con etanol 0.2% v/v.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de t-resveratrol en el medio extracelular.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla A. Las pequeñas cantidades de t-resveratrol extracelular acumuladas en los tratamientos con metiljasmonato solo no son estadísticamente diferentes a las inducidas por el etanol solo.

- 5 El incremento en acumulación al combinar ciclodextrinas y metiljasmonato si es estadísticamente significativo respecto al tratamiento solo con ciclodextrinas y mucho mayor que la suma de las cantidades acumuladas con los inductores usados separadamente.

La concentración óptima en estas condiciones es de 100 micromoles/litro de medio de cultivo.

TABLA A

Producción de t-resveratrol por unidad de peso de células de Vitis vinifera Monastrell en función de la concentración de MeJA, con y sin CDMA, tras 96 horas de incubación

Tratamiento	tR (mg/g peso fresco)
Control	No detectado
EtOH	0,08±0.01
MJ5	0,06±0.01
MJ25	0,16±0.03
MJ100	0,19±0.04
MJ270	0,01±0.01
MJ450	No detectado
CD	7,41±1.12
CDMJ5	14,63±1.21
CDMJ25	15,16±1.57
CDMJ100	21,78±1.83
CDMJ270	11,22±1.66
CDMJ450	9,86±1.02

Control: medio de cultivo sin inductores;

EtOH: medio de cultivo sin inductores con 0.2% v/v de etanol;

MJ: Tratamiento con metiljasmonato a la concentración indicada por el número en micromolar

CD: Tratamiento con ciclodextrina CDMA a la concentración de 62.5 g/l

CDMJ: Tratamiento con ciclodextrina CDMA a la concentración de 62.5 g/l y metiljasmonato a la concentración indicada por el número en micromolar.

Ejemplo 2

Determinación de la densidad celular optima del cultivo

La densidad celular de las suspensiones de *Vitis vinifera var. Monastrell* durante la estimulación se manejó añadiendo diferentes cantidades de células frescas filtradas a un volumen constante de medio de cultivo.

ES 2 328 002 A1

Suspensiones de densidades comprendidas entre el 25 y el 75% del volumen de empaquetamiento celular (volumen que ocupan las células respecto del volumen total del cultivo) se trataron con:

- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/l
- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/l y metiljasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo.

Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de t-resveratrol en el medio extracelular.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla B. Cuando el cultivo se estimuló bien con CDMA solo o combinado con MeJA, se dió una correlación negativa entre la acumulación extracelular de t-resveratrol por unidad de biomasa y la biomasa total, de modo que la densidad celular óptima es la más baja (25% VEC).

Sin embargo el descenso en producción por unidad de biomasa fue menos acusado al combinar CDMA con MeJA.

TABLA B

Producción de t-resveratrol (tR) por unidad de peso de células de Vitis vinifera Monastrell en función de la densidad celular medida como volumen de empaquetamiento celular (VEC) tras 96 horas de incubación

VEC (%)	tR (mg/g peso fresco)
25CD	4,96±0.91
50CD	1,52±0.33
75CD	0,51±0.06
25CDMJ	9,39±0.32
50CDMJ	6,65±0.74
75CDMJ	5,55±0.91

25, 50 y 75: porcentaje de volumen de empaquetamiento celular

CD: tratadas con CDMA a la concentración de 62.5 g/l.;

CDMJ: tratadas con CDMA (62.5 g/l) y metiljasmonato 100 micromolar.

Ejemplo 3

Observación del efecto sinérgico del uso combinado de CDMA y Metiljasmonato

Suspensiones de *Vitis vinifera var Gamay* de densidad 25% V.E.C. se trataron:

- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/litro,
- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/litro y 0.2% etanol,
- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/litro y metiljasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l
- control sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente ni metiljasmonato, ni etanol.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de t-resveratrol en el medio extracelular.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla C. Cuando el cultivo se estimula solo con CDMA, hay una acumulación extracelular de tR por unidad de biomasa importante; la presencia del etanol junto con CDMA tiene un efecto negativo, reduciendo a prácticamente la mitad el nivel de tR acumulado. Por el contrario, la combinación de CDMA con MeJA, aunque contiene también 0.2% etanol, se traduce en un incremento de 4.5 veces en la acumulación extracelular de tR. Por tanto, el efecto sinérgico de CDMA y MeJA observado en la variedad *Monastrell* se da también en *Gamay*.

TABLA C

Producción de t-resveratrol por unidad de peso de células de Vitis vinifera Gamay tras 96 horas de incubación

Tratamiento	tR (mg/g peso fresco)
Control	No detectado
CDMA	1.97 ± 0.32
CDMA + 0.2% Etanol	0.79 ± 0.09
CDMA + MJ	10.06 ± 2.19

CDMA; tratamiento con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente a la concentración de 62.5 g/l;

MJ: tratamiento con metiljasmonato 100 micromolar.

Ejemplo 4

Efecto del medio mineral, el tipo de ciclodextrina y la densidad celular del cultivo (Vitis vinifera var. Moscatel de Hamburgo)

Suspensiones celulares de vid *Moscatel de Hamburgo* que habían sido establecidas en diferentes medios minerales, particularmente Gamborg B5 (G) y Murashige-Skoog (MS2), fueron estimuladas en los medios que se indica en diferentes condiciones de densidad celular y tipo de ciclodextrina (beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente o CDMA y ciclodextrina hidroxipropilada o CDHA) en ausencia o presencia de metiljasmonato.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de t-resveratrol en el medio extracelular.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla D.

Independientemente del tipo de ciclodextrina ensayado, de la densidad celular del cultivo o de la composición del medio mineral, las ciclodextrinas CDMA y CDHA indujeron la acumulación de t-resveratrol extracelular ambas a un nivel similar, el metiljasmonato por sí mismo no indujo la acumulación de t-resveratrol extracelular, mientras que combinado con CDMA o CDHA la acumulación era entre 1.5 y 9.4 veces respecto a la conseguida con la ciclodextrina sola, aunque en la mayoría de las condiciones el incremento de acumulación está en torno a tres veces.

El efecto sinérgico para acumulación de t-resveratrol extracelular conseguido al combinar ciclodextrinas CDMA o CDHA con MeJA se da también en la variedad *Moscatel de Hamburgo*, e independientemente de la composición del medio mineral y de la densidad celular.

ES 2 328 002 A1

TABLA D

Producción de t-resveratrol por unidad de peso de células ± desviación estándar (mg/g peso fresco) de Vitis vinifera Moscatel de Hamburgo, en función del medio mineral empleado, la densidad celular y el tipo de ciclodextrina, tras 96 horas de incubación

MEDIO	Densidad	Tratamiento					
		Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
G	baja	0,00±0,00	0,01±0,01	2,53±0,09	7,23±1,37	4,98±1,24	7,57±2,96
	alta	0,00±0,00	0,00±0,00	1,97±0,17	5,12±0,68	1,20±0,21	3,67±0,43
MS2	baja	0,00±0,00	0,00±0,00	2,37±0,69	5,61±1,54	1,82±0,44	5,00±1,27
	alta	0,00±0,00	0,00±0,00	1,66±0,29	4,56±0,74	0,73±0,34	2,82±0,00
GMS2	baja	0,00±0,00	0,00±0,00	6,12±0,34	10,75±3,16	5,11±0,64	7,85±1,11
	alta	0,00±0,00	0,00±0,00	1,61±0,56	9,75±0,07	1,09±0,14	10,28±1,74

Densidad baja: 15 g peso fresco/100 ml suspensión celular;

Densidad alta: 37 g peso fresco/100 ml suspensión celular;

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de Metiljasmonato;

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente;

CDHA: tratamiento con 69 g/l de ciclodextrina hidroxipropilada;

G: medio Gamborg B5;

MS2: medio Murashige-Skoog;

GMS2: medio Gamborg B5 con la composición hormonal de MS2.

Ejemplo 5

Determinación del tiempo de incubación y cinética de acumulación de t-Resveratrol tras estimulación de células de vid con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) y metiljasmonato (MeJA)

Las suspensiones celulares de *Vitis vinifera* var. *Monastrell* se trataron

- con metiljasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/litro,
- solo con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/litro
- con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) a concentración de 62.5 g/litro y metiljasmonato MeJA a concentración de 100 micromoles/litro
- controles sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) ni metiljasmonato (MeJA).

Periódicamente se extrajeron muestras y se recogieron las células y el medio por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de t-resveratrol en el medio extracelular. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo. El resultado del experimento se muestra en la Tabla E y Figura 1.

En los controles no llega detectarse la presencia de t-resveratrol y en el tratamiento con MeJA, solo se detecta a las 24 horas, para no volver a ser detectado el resto de tiempo de incubación. En presencia de CDMA el t-resveratrol se

ES 2 328 002 A1

acumula a mayor velocidad durante las primeras 72 horas, decelerándose la acumulación hasta prácticamente detenerse a partir de 144 horas. En presencia de ambos, CDMA y MeJA, la acumulación es rápida y mantenida durante las primeras 168 horas, para decelerarse a partir de ese momento hasta prácticamente detenerse. Así pues, la mayor acumulación en presencia de CDMA y MeJA se debe a dos factores:

- mayor velocidad de acumulación, de 0.16 frente a 0.45 g/litro.día y
- periodo de acumulación mantenida más prolongado de 72 frente a 168 horas.

TABLA E

Producción de t-resveratrol por unidad de volumen de medio extracelular $\pm$ desviación estándar (g/litro medio) de Vitis vinífera Monastrell a lo largo de 288 horas de incubación

tiempo (horas)	Control	CDMA	MeJA	CDMA+MeJA
4	No detectado	0.006 $\pm$ 0.005	No detectado	0.002 $\pm$ 0.001
24	No detectado	0.132 $\pm$ 0.007	0.016 $\pm$ 0.014	0.280 $\pm$ 0.078
72	No detectado	0.486 $\pm$ 0.025	No detectado	1.319 $\pm$ 0.149
96	No detectado	0.525 $\pm$ 0.028	No detectado	1.769 $\pm$ 0.045
120	No detectado	0.531 $\pm$ 0.016	No detectado	2.099 $\pm$ 0.125
144	No detectado	0.650 $\pm$ 0.005	No detectado	2.603 $\pm$ 0.158
168	No detectado	0.699 $\pm$ 0.065	No detectado	2.915 $\pm$ 0.259
216	No detectado	0.582 $\pm$ 0.045	No detectado	3.032 $\pm$ 0.355
240	No detectado	0.527 $\pm$ 0.119	No detectado	3.203 $\pm$ 0.085
288	No detectado	0.629 $\pm$ 0.005	No detectado	3.106 $\pm$ 0.237

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA;

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Ejemplo 6

Estimulación de células de vid (Vitis vinífera var. Monastrell verde) con CDMA y MeJA

Se trataron suspensiones de *Vitis vinífera Monastrell* verde de densidad alta (48 g peso fresco/100 mL) con:

- (i) con CDMA (62.5 g/litro)
- (ii) con CDMA (62.5 g/litro) y MeJA (100 micromoles/l),
- (iii) con MeJA (100 micromoles/l)
- (iv) controles sin CDMA ni MeJA.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de tR en el medio extracelular.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla F.

Cuando el cultivo se estimuló solo con CDMA, se observó una acumulación extracelular de tR por unidad de biomasa, si bien ésta fue inferior a la acumulada por otras variedades -*Gamay*, *Monastrell Albina*, *Moscatel* = *Hamburgo*- en condiciones similares.

Por el contrario, la combinación de CDMA con MeJA, se tradujo en un incremento en la acumulación extracelular de tR; dado que la producción solo con CDMA fue muy baja, el incremento fue de 37 veces.

Por tanto, el efecto sinérgico de CDMA y MeJA observado en la variedad *Monastrell Albina* se dió también en *Monastrell Verde*.

TABLA F

Producción de tR por unidad de peso de células de Vitis vinifera Monastrell Verde tras 96 horas de incubación

Tratamiento	tR (mg/g peso fresco)	Ratio área trans/cis
Control	No detectado	--
MJ	No detectado	--
CDMA	0.21± 0.08	1.83± 0.35
CDMA + MJ	7.84± 1.95	16.3± 0.94

CDMA a la concentración de 62.5 g/l.;

MJ: metiljasmonato 100 micromolar.

En Bru y Pedreño (ES2190771) se indica que en cultivos de la variedad *Monastrell verde*, como la del objeto de este ejemplo, se acumula también el isomero cis-resveratrol a niveles próximos a los de trans-resveratrol cuando se tratan con CDMA. Como se observa en la Figura 2A y 2B y la tabla F, este resultado se obtuvo también en el presente ejemplo. Sin embargo, como se muestra en Figura 2C y 2D y en la tabla F, la inclusión de MeJA en el medio de estimulación causó un efecto adicional a la mayor producción de resveratrol que fue el espectacular incremento de la ratio trans/cis, pasando de casi 2 veces a 16 veces. Dado que en otras variedades la ratio trans/cis es muy elevada, el efecto no había sido apreciado hasta utilizar esta variedad.

Ejemplo 6

Estimulación de células de vid (Vitis vinifera var. Gamay) con CDMA y MeJA aplicados secuencialmente y en diferente orden

En los ejemplos anteriores, los inductores se han aplicado conjuntamente al inicio de la incubación del cultivo para estimulación. Para determinar si la adición secuencial de los inductores y el orden tiene alguna influencia sobre el efecto sinérgico en la producción de tR se llevaron a cabo dos experiencias.

En la primera, la estimulación se inició solo con CD y al cabo de un tiempo se añadió el metil jasmonato. Como controles se utilizó un cultivo tratado con CD y MeJA desde el principio, y otro cultivo tratado solo con CD.

Como se muestra en la Figura 3, el cultivo en que se añadió primero CD y luego MeJA mostró el efecto sinérgico a partir de la adición de MeJA, alcanzando a las 168 horas niveles iguales de producción que el control tratado con CD y MeJA desde el principio.

En la segunda experiencia, el cultivo con una densidad de 50% VEC se trató con 100 micromolar MeJA y al cabo de un tiempo se añadió CDMA mediante dilución 1:1 del cultivo en un medio que contenía 125 g/l de CDMA y 100 micromolar MeJA.

De esta forma, las concentraciones finales de células, CDMA y MeJA eran 25% VEC, 62,5 g/l CDMA y 100 micromolar MeJA.

Los controles empleados fueron:

a) cultivo con una densidad de 50% VEC que al tiempo indicado se añadió CDMA y MeJA mediante dilución 1:1 del cultivo en un medio que contenía 125 g/l de CDMA y 200 micromolar MeJA

b) cultivo con una densidad de 50% VEC que al tiempo indicado se añadió CDMA mediante dilución 1:1 del cultivo en un medio que contenía 125 g/l de CDMA.

No se detectó producción de resveratrol durante la exposición de 48 horas al MeJA ni en los controles empleados. Como se muestra en la Figura 4, desde el momento en el que se adicionaron las CDs (tiempo 0 en el gráfico) se

empiezo a acumular el resveratrol. El efecto sinérgico se observó claramente durante todo el tiempo de incubación al comparar la acumulación en los controles (círculos negros) que solo llevaban CD con los cultivos que llevaban CD y MeJA. En estos últimos, durante las primeras 72 horas de incubación, no se apreciaron diferencias significativas en los niveles acumulados entre los cultivos pre-expuestos a MeJA (triángulos) y los no expuestos (círculos grises). A partir de ese tiempo, los cultivos preexpuestos sufrieron una deceleración en la acumulación de resveratrol, mientras que los no expuestos se aceleraron, llegando casi a duplicar los niveles de los pre-expuestos y casi cuadruplicar los de controles sin MeJA.

Como conclusión se estableció que el efecto sinérgico observado era independiente del orden en que se adicionaron los inductores CD y MeJA.

Ejemplo 7

*Estimulación de células de vid (*Vitis vinifera* var. *Gamay*) con CDMA, CDHA y MeJA*

Con el fin de determinar el efecto del MeJA con una mezcla de las dos ciclodextrinas, se lleva a cabo una experiencia de cultivo en presencia de:

- a) cultivo con 31,5 g/l CDMA, 34,5 g/l CDHA y 100 micromolar MeJA
- b) cultivo con 31,25 g/l CDMA, 34,5 g/l CDHA (control)
- c) cultivo sin inductores (control)
- d) cultivo con MeJA (control).

Como se muestra en la Tabla G el efecto sinérgico observado al tratar con CDs individuales y MeJA se dio también al tratar con una mezcla de las dos CDs y MeJA. Los datos mostrados son la media de cuatro réplicas biológicas.

TABLA G

*Producción de t-resveratrol por unidad de peso de células de *Vitis vinifera* Gamay tras 96 horas de incubación estimuladas con MeJA y una mezcla aproximadamente equimolar de CDMA y CDHA*

Tratamiento	tR (mg/g peso fresco)
Control	No detectado
MJ	No detectado
CDMA + CDHA	2.61± 0.33
CDMA + CDHA + MJ	6.56 ± 0.43

CDMA a la concentración de 31.25 g/l.

CDHA a la concentración de 34.5 g/l;

MJ: metiljasmonato 100 micromolar.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de resveratrol, que comprende:

- a. adición de ciclodextrinas y Metiljasmonato a un medio de cultivo
- b. adición al medio de cultivo obtenido en el paso a) de células potencialmente productoras de resveratrol
- c. incubación del medio de cultivo celular del paso b)
- d. separación del resveratrol obtenido en el paso c) del medio de cultivo.

2. Método según la reivindicación 1 que además comprende:

- e. purificación del resveratrol separado en el paso d).

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la concentración de Metiljasmonato es de entre 5 y 450 micromoles/litro de medio de cultivo.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la concentración de Metiljasmonato es de entre 50 y 150 micromoles/L medio de cultivo.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde las ciclodextrinas se seleccionan del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente o ciclodextrina hidroxipropilada.

6. Método según la reivindicación 5 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1 y 2.

7. Método según la reivindicación 6 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1,5 y 2.

8. Método según la reivindicación 6 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1,6 y 1,9.

9. Método según la reivindicación 5 donde la ciclodextrina hidroxipropilada tiene un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,2 y 1,3.

10. Método según la reivindicación 9 donde la ciclodextrina hidroxipropilada tiene un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,5 y 1.

11. Método según la reivindicación 10 donde la ciclodextrina hidroxipropilada tiene un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 6,5 y 130 g/L medio de cultivo.

13. Método según la reivindicación 12 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 10 y 100 g/L medio de cultivo.

14. Método según la reivindicación 13 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 50 y 75 g/L medio de cultivo.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde las células productoras proceden de la especie *Vitis vinifera*.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde el tiempo de incubación es de entre 4 y 256 horas.

17. Medio de cultivo que comprende Metiljasmonato y ciclodextrinas.

18. Uso del medio de cultivo de la reivindicación 17 para promover la producción de resveratrol en células productoras del mismo.

19. Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol en células productoras del mismo.

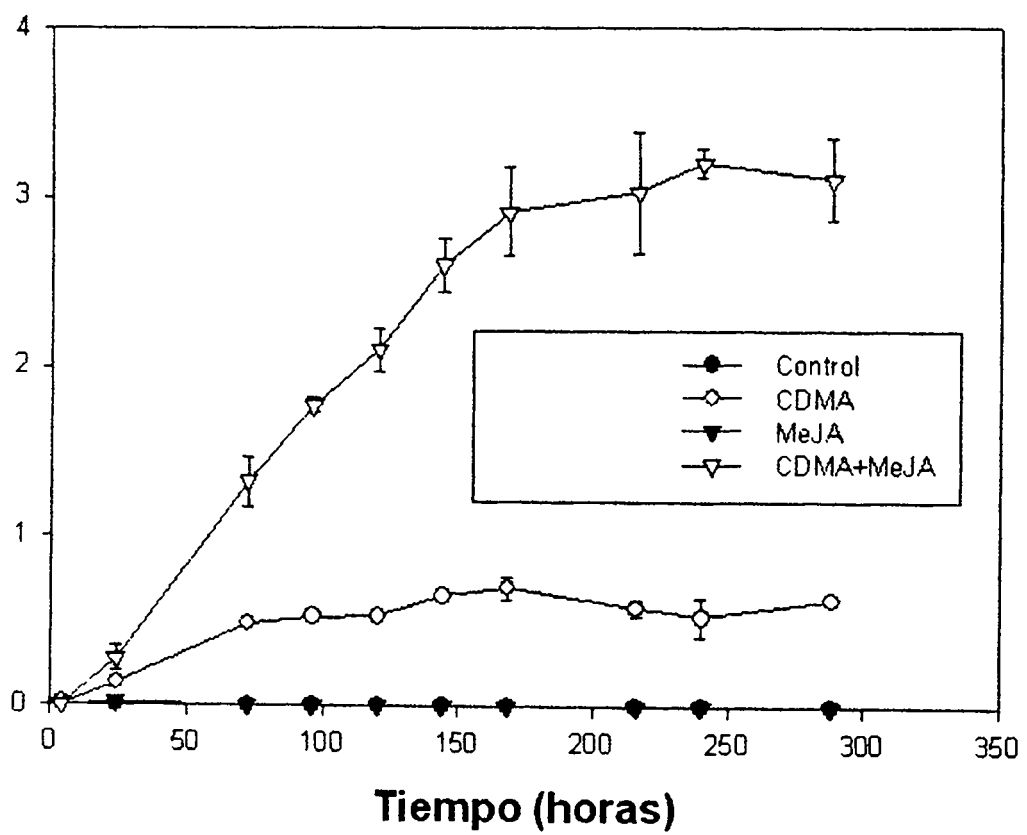


FIG 1

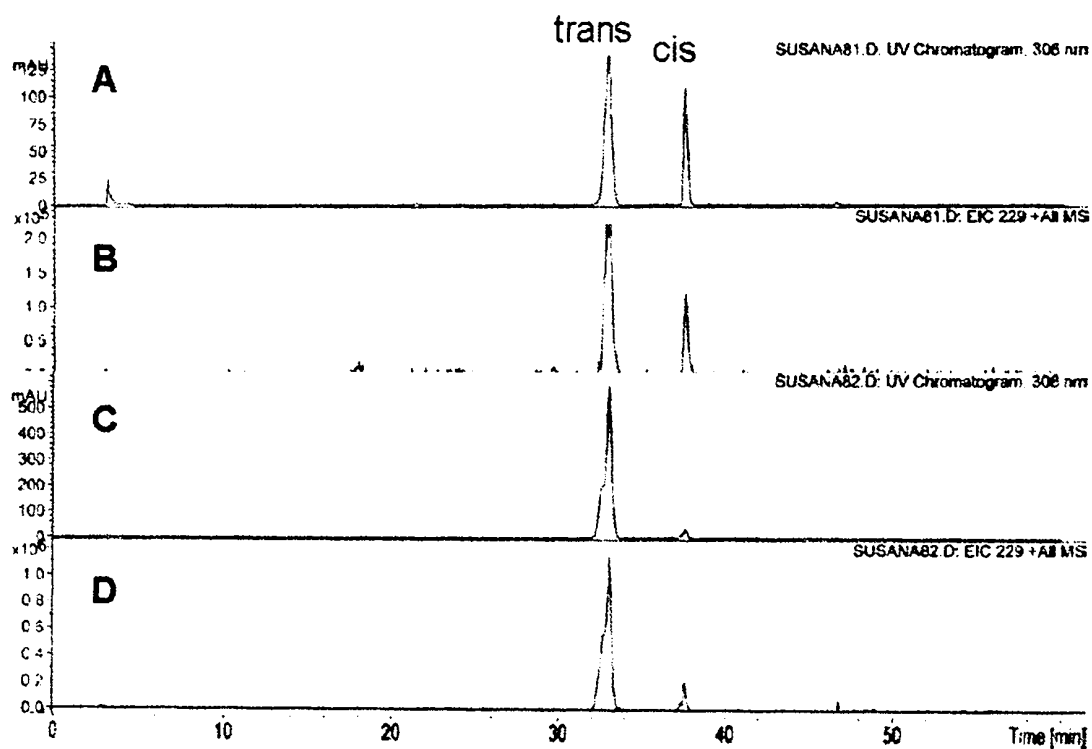


FIG 2

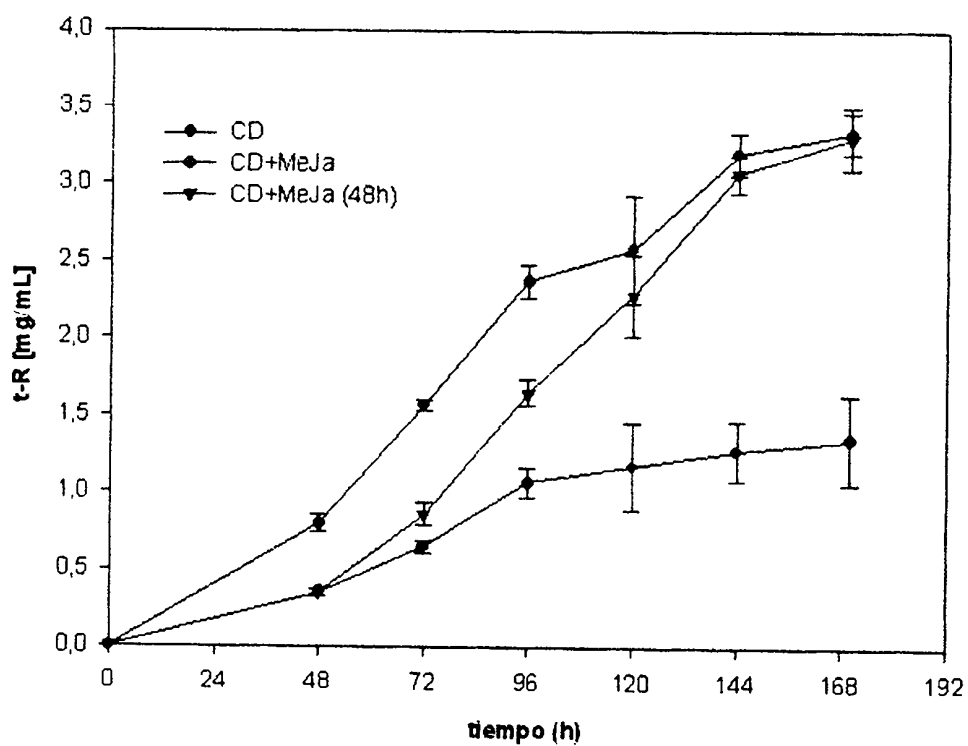


FIG 3

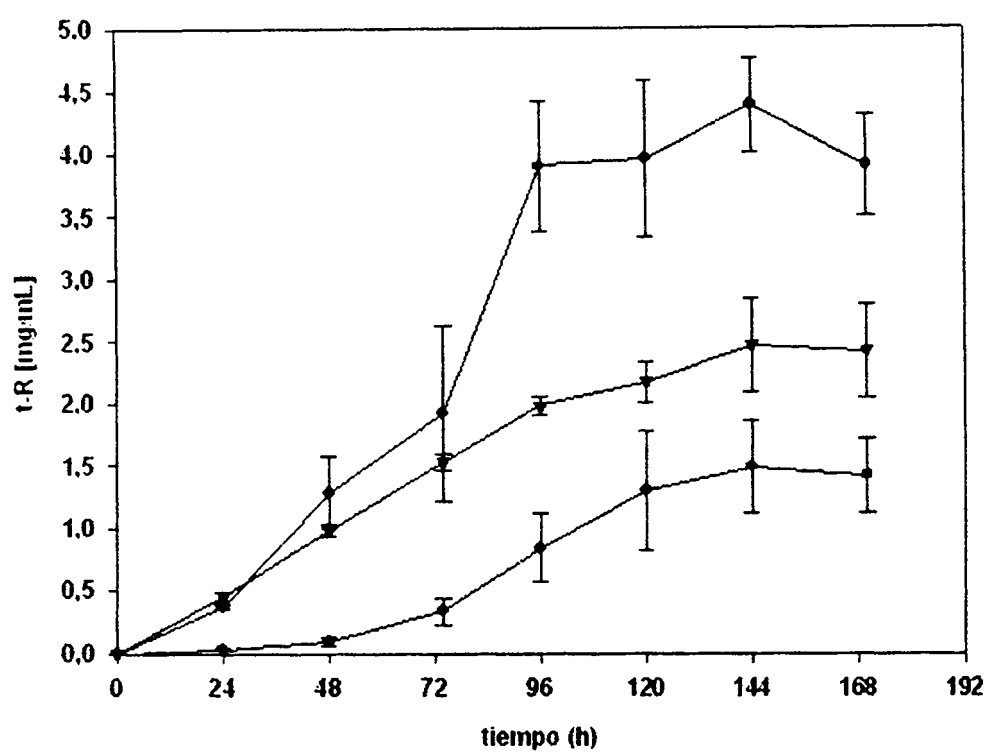


FIG 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

- ⑪ ES 2 328 002
⑫ Nº de solicitud: 200800591
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **29.02.2008**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **C12P 7/22** (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005012507 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 10.02.2005, todo el documento.	1-19
A	EP 1471141 A1 (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 27.10.2004, todo el documento.	1-19
A	TASSONI, A. et al.: "Jasmonates and Na-Orthovanadate Promote Resveratrol Production in Vitis vinifera cv. Barbera Cell Cultures", New Phytologist, (2005), vol. 166, pp.: 895-905, todo el documento.	1-19
A	VEZZULLI, S. et al.: "Methyl Jasmonate Treatment as a Trigger of Resveratrol Synthesis in Cultivated Grapevine", American Journal of Enology and Viticulture, (2007), vol. 58 (4), pp.: 530-533, todo el documento.	1-19
A	RIGHETTI, S. et al.: "Resveratrol Production in Vitis vinifera Cell Suspensions Treated with Several Elicitors" Caryologia, (ENE-JUN 2007), vol. 60 (1-2), pp.: 169-171, todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.10.2009

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.10.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-17	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-17	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005/012507 A1	10-02-2005
D02	EP 1471141 A1	27-10-2004
D03	TASSONI, A. et al., New Phytologist, vol. 166, pp.: 895-905	2005
D04	VEZZULLI, S. et al., American Journal of Enology and Viticulture, vol. 58 (4), pp.: 530-533	2007
D05	RIGHETTI, S. et al., Caryologia, vol. 60 (1-2), pp.: 169-171	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento para obtener resveratrol a partir de un cultivo de células de *Vitis vinifera* en el que se adicionan ciclodextrinas y metiljasmonato. El solicitante describe un inesperado efecto sinérgico, en la síntesis de resveratrol, al añadir conjuntamente estos dos estimuladores de su síntesis.

En el estado de la técnica anterior (D01-D05) se han encontrado varios ejemplos de procedimientos de obtención de resveratrol a partir de cultivos. En algunos se utilizan jasmonatos como estimuladores de la síntesis de resveratrol (D03, p. ej.); en otros, ciclodextrinas (D02, p. ej.). Sin embargo, no se ha encontrado ningún documento en el que se utilicen ciclodextrinas y metiljasmonato conjuntamente. Tampoco se ha encontrado referencia alguna al efecto sinérgico descrito en la solicitud. Por otro lado, de la técnica anterior no se infiere que, con la utilización de una combinación como la empleada en la solicitud, podría conseguirse un efecto (sinérgico) inesperado como el descrito.

De este modo, se considera que las reivindicaciones 1-19 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.