



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 336 992**

② Número de solicitud: 200802437

⑤ Int. Cl.:
C12P 17/10 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.04.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Murcia** (Titular al 90 %)
Avda. Teniente Flomesta, 5
Edificio Covalecencia
30003 Murcia, ES
Viveros Bermejo, S.L. (Titular al 10 %)

⑱ Inventor/es: **Pedreño García, María Ángeles;**
Almagro Romero, Lorena;
Sabater Jara, Ana Belén y
López Pérez, Antonio José

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Uso combinado de ciclodextrinas y jasmonato de metilo para incrementar la producción de alcaloides indólicos.**

㉕ Resumen:

Uso combinado de ciclodextrinas y jasmonato de metilo para incrementar la producción de alcaloides indólicos. Composición que comprende ciclodextrinas y jasmonato de metilo, y método para incrementar la producción de alcaloides indólicos en cultivos de células vegetales, tejidos de plantas, vitroplantas y plantas que son capaces de sintetizar estos compuestos, excretarlos y acumularlos en el medio de cultivo.

ES 2 336 992 A1

DESCRIPCIÓN

Uso combinado de ciclodextrinas y jasmonato de metilo para incrementar la producción de alcaloides indólicos.

5 La presente invención se encuentra dentro de la biología y de la biotecnología, y se refiere al empleo de una composición que comprende ciclodextrinas y jasmonato de metilo para incrementar la producción de alcaloides indólicos en cultivos de células vegetales, tejidos de plantas, vitroplantas y plantas que son capaces de sintetizar estos compuestos, excretarlos y acumularlos en el medio de cultivo.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los alcaloides son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos, aislándose tradicionalmente de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen, pero encontrándose también en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos. De los aproximadamente 12000 alcaloides conocidos, una gran cantidad han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos aún son prominentes fármacos hoy en día. De acuerdo con su origen biogenético se clasifican en cuatro grupos:

- 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico;
- 2) alcaloides purínicos;
- 3) terpenos aminados, y
- 4) alcaloides policétidos.

Dentro del grupo de los alcaloides derivados del triptofano se encuentran los indólicos (que se pueden agrupar, a su vez, en monoterpenos o indol terpenos (iridoides)) y los quinoleínicos. La mayor parte proceden de la triptamina, producto de la descarboxilación del triptofano, que se une en casi todos los casos a otras unidades como son las unidades acetato, mevalonato, secologanósido (aldehído monoterpénico) y otras. Podemos por tanto hablar de varios subgrupos dentro de los alcaloides indólicos. Así, desde un punto de vista químico se pueden reconocer 8 subgrupos: corinante, aspídosperma, iboga, estricnano, plumerano, eburnano, valesiacontamano y aparicino. Otra posible clasificación sería:

- a) Alcaloides simples, derivados normalmente de la triptamina.
- b) Alcaloides derivados de la β -carbolina, biogenéticamente formados por condensación de un aldehído o cetoácido con la triptamina.
- c) Alcaloides procedentes de la ciclación de la triptamina, como la eserina o fisostigmina del Haba del Calabar (*Physostigma venenosum*).
- d) Alcaloides derivados de la ergolina, su estructura química corresponde a la unión de un indol con una quinoleína hidrogenada, aquí se encuentran los alcaloides del cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*).
- e) Alcaloides indolmonoterpénicos, proceden de la unión de la triptamina con el secologanósido.
- f) Alcaloides quinoleínicos, biogenéticamente incluidos en el subgrupo anterior ya que su biosíntesis se realiza a partir del triptófano por unión al secologanósido vía strictosidina pero químicamente su estructura deriva de la quinoleína.

Los alcaloides indolmonoterpénicos ó monoterpén indólicos (AMIs) conforman una familia de más de 3.000 miembros, encontrándose en varias familias vegetales, pero principalmente en las *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nissaceae* y *Rubiaceae*, todas del orden *Gentianales*. Los AMI's se forman a partir del triptofano y de la secologanina, un derivado del isopentenil pirofosfato. El interés en ellos se debe a que algunos, específicamente la catarantina y la vindolina, pueden formar dímeros citotóxicos que se utilizan en los tratamientos contra diferentes tipos de cánceres.

Catharanthus roseus (L.) G. Don es una planta perenne de la familia de las Apocinaceas de distribución pantropical originaria de Madagascar, capaz de biosintetizar más de 130 metabolitos secundarios de naturaleza alcaloide, usada en la medicina tradicional como agente hipoglucémico, siendo además una fuente importante de agentes quimioterapéuticos con actividad anticancerígena, y que produce una gran variedad de AMIs, la mayoría de los cuales poseen actividad farmacológica, se cultiva para obtener industrialmente, a partir de sus hojas, los alcaloides anticancerígenos vincristina, vinblastina y anhidrovinblastina mientras que sus raíces se utilizan como materia prima para la extracción de los alcaloides serpentina y ajmalicina, prescritos para los tratamientos de hipertensión y desordenes circulatorios (Karthikeyan *et al.*, 2007. *Journal of Zhejiang University - Science B* 8(7): 453-457) Jaleel & Panneerselvam, 2007. *Chin J Pharm Tox* 21, 6, 487-494). Estos metabolitos se extraen de los diferentes tejidos de esta planta y las rutas biosintéticas que conducen a su obtención se conocen y están bien descritas en la bibliografía (El-Sayed M & Ver-

poorte R, 2007. *Photochem. Photobiol* 6(2-3): 277-305). La principal demanda de hojas la realiza Estados Unidos y Reino Unido que movilizan más de 100 toneladas anuales mientras que Alemania se interesa por la compra de las raíces (Acosta y Rodríguez, 2002, *Instructivo técnico para el cultivo de Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Rev. Cubana Plant. Med.* 7, 96-99).

Entre los alcaloides más importantes producidos por *C. roseus* están los del tipo bis-indólico que incluyen a la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin, y a la vincristina empleada en el tratamiento de la leucemia; esta planta también produce los agentes antihipertensivos ajmalicina y serpentina utilizados contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral.

Los alcaloides más importantes desde el punto de vista económico son la vinblastina y la vincristina. En la actualidad, estos compuestos se obtienen mediante un proceso extractivo de la materia prima vegetal ya que no existen preparados sintéticos que puedan reemplazar la potente acción antineoplásica que exhiben la vincristina y la vinblastina. Este proceso de extracción es de baja productividad (rendimiento) ya que a partir de 2 toneladas de hojas se recoge 1 gramo de alcaloide activo, cantidad requerida para el tratamiento de un niño con leucemia o linfosarcoma durante seis semanas (Cuellar *et al.*, 1975. *Rev. Cubana Farm.* 9, 183-199). El precio de la vinblastina en el mercado es de aproximadamente un millón de dólares por kilogramo, calculándose que existe una producción anual de 12 Kg. Por otra parte, la vincristina alcanza un precio de 3.5 millones de dólares por kilogramo y su producción anual es de aproximadamente 1 kilogramo. El alto costo de estos alcaloides se debe a que encuentran en concentraciones muy bajas en la planta (alrededor de 0.0005% en peso seco) y su extracción se lleva a cabo en presencia de otros 200 alcaloides con propiedades químicas y físicas similares (De Luca & Laflamme, 2001. *Curr. Opi. Plant Biol.* 2001, 3, 225-233). La complejidad de los procesos genéticos, catalíticos y de transporte de la biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos indólicos hace difícil la obtención de estos compuestos.

Otro método para la obtención de estos compuestos y que ha resultado tener cierto éxito es el de semi-síntesis mediante el acoplamiento de los precursores vindolina (muy abundante en las plantas de *C. roseus*) y catarantina (que puede alcanzar niveles altos en cultivos celulares de *C. roseus*) dando lugar a la vinblastina. Pero para sintetizarlos de *novo* hace falta la intervención de más de 50 pasos metabólicos, habiéndose caracterizado hasta el momento solamente unas 20 enzimas de las 50 requeridas para su biosíntesis.

La biosíntesis de los alcaloides bis-indólicos se inicia con la condensación de la catarantina y la vindolina, para formar la 3',4'-anhidrovinblastina, el precursor de la vinblastina, la vincristina, la leurosina y la Catarina. Esta reacción, al igual que la oxidación posterior, parece ser llevada a cabo por peroxidasas inespecíficas, lo que parece indicar que la limitante de la biosíntesis de este tipo de alcaloides resulta ser la disponibilidad de los precursores monoméricos.

Recientemente se ha purificado una enzima que cataliza específicamente dicho paso y ha sido denominada α -3',4'-anhidrovinblastina sintasa (AVLBS). Esta enzima, dependiente de H₂O₂, que ha sido purificada a homogeneidad aparente (192 veces) a partir de hojas de *C. roseus*, tiene una masa molecular de 45.4 kDa y un pH óptimo de 6.5, si bien también presenta una actividad sustancial en el rango de pH de 4 - 5, el cual es el rango de pH comúnmente determinado en las vacuolas. Además de su actividad de AVLBS la enzima pura tiene actividad de peroxidasa. Su espectro visible de absorbancia muestra máximos de absorción a 404, 501 y 633 nm sugiriendo que se trata de una proteína con hierro en un grupo hemo y que pertenece a la familia de las peroxidasas (Sottomayor *et al.*, 1998. *FEBS Lett.* 428: 299-303).

Encontrar los aspectos que intervienen en la regulación de su biosíntesis a nivel celular y molecular, o encontrar un método que incremente la producción de sus metabolitos intermediarios, resulta de especial interés tanto desde el punto de vista económico como farmacéutico.

Los cultivos *in vitro* de raíces y suspensiones celulares constituyen una alternativa a los métodos clásicos de extracción convencional a partir de materia prima vegetal, aunque hasta el momento actual se han realizado con escaso éxito comercial ya que el principal cuello de botella en la obtención de estos alcaloides por cultivo *in vitro* se encuentra en su producción dependiente de tejidos específicos de la planta (Verpoorte & Memelink., 2002. *Curr. Opi. Biotech.* 13:181-187). Así, en la bibliografía se describen los cultivos de brotes de *C. roseus* como aquellos capaces de acumular catarantina, vindolina y otros alcaloides en cantidades similares a los que se extraen de materia prima vegetal. Otra alternativa biotecnológica para la producción de estos compuestos consiste en el empleo de cultivos celulares sometidos a extracción. Así, mediante la adición de ciertos agentes extractores abióticos como una fuente nitrogenada produce un aumento de la síntesis de alcaloides (Sreevallí Y *et al.*, 2004. *Ind. Crops Prod.* 19: 191-195), la exposición a la luz UV incrementa la producción de catarantina y vindolina en suspensiones celulares (Ramani S & Chelliah, J, 2008. *BMC Plant Biology* 7:61), y los factores bióticos como la adición de jasmonato de metilo (MeJA) a suspensiones celulares de *C. roseus*, suplementadas con los precursores de la ruta de biosíntesis adecuados, aumentan la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de indol alcaloides y por lo tanto su producción (Vasconsuelo & Boland, 2007. *Plant Science* 172:861-875).

En la bibliografía se recogen diferentes procedimientos en los que se pretende incrementar la producción de metabolitos secundarios utilizando cultivos celulares. Así, se ha descrito el empleo de ácido alcanoico (ácido propiónico o butírico) o una sal metálica de estos ácidos, ejemplificado en cultivos celulares del género *Taxus* (WO 2005064002-A1), el tratamiento de la suspensión celular con un adsorbente y uno o más agentes extractores adecuados que incrementen la producción (WO 2005012507-A1), la adición de agentes extractores al final de la fase exponencial del

crecimiento, añadiendo compuestos que estabilizan la viabilidad celular y el aporte de nutrientes a las suspensiones celulares (poliaminas, prolina, ergosterol, sacarosa, calcio, nitrato potásico, etc...) (EP378921-A).

En el caso concreto de cultivos celulares de *C. roseus*, la solicitud de patente internacional W08800968-A describe la inducción de metabolitos (alcaloides, hormonas esteroideas y glicósidos cardíacos) mediante la adición al cultivo celular de un compuesto osmóticamente activo como una sal o un azúcar. Además se describe un nuevo proceso para el aislamiento de alcaloides a gran escala a partir de hojas liofilizadas de *C. roseus*. Con este procedimiento que parte de 1 kilogramo de hojas secas se obtienen 0.4 gramos de catarantina, 0.4 de leurosina y 0.8 de vindolina por lo que el rendimiento del proceso es considerado ventajoso frente a los descritos en otras patentes debido al alto valor añadido que poseen estos compuestos. En la patente US 5037977 se describe una mejora de un método por el que se incrementa la productividad de las drogas antineoplásicas vinblastina, leurosideno y 3',4'-anhidrovinblastina. Concretamente el procedimiento para mejorar la producción de vinblastina se caracteriza por una reacción de catarantina con vindolina en presencia de sales de hierro III, luego eliminar/inactivar el hierro permitiendo que un agente reductor reaccione con el compuesto resultante y otra serie de reacciones concretas que llevan a la síntesis de estas moléculas. De manera similar se describen procedimientos para incrementar la producción de leurosideno y 3',4'-anhidrovinblastina. En todos ellos se trata de reacciones químicas en las que se parte de compuestos químicos catarantina y vindolina no obtenidos por cultivo *in vitro* ni de plantas, ya que se trata de las sales de sulfato de catarantina y de una solución hidroclorada de vindolina.

En Xu & Dong, 2005. (*Enzyme Microb. Technol.* 36: 280-284) suspensiones de células vegetales de *C. roseus* son extraídas con paredes celulares de *Aspergillus niger* para inducir la activación de una enzima responsable de la biosíntesis de fenilalanina (PAL) y la síntesis de catarantina en las células, sugiriendo que en esta última la ruta de señalización implica especies reactivas de oxígeno. Es también destacable las experiencias de producción de catarantina, serpentina y ajmalicina publicadas por Zhao *et al.*, 2001 (*Enzyme Microb. Technol.* 28:673-681), en las que utilizando una combinación de agentes extractores observa un efecto sinérgico en la acumulación de alcaloides indólicos tanto en las células cultivadas en suspensión como en los medios de extracción. Así, describen los valores de producción más elevados de catarantina cuando extraen las suspensiones celulares en presencia de malato (40 mg/l) y alginato sódico (1.5% p/v) tanto en células (0.57 mg/g peso seco) como en el medio de cultivo (25.2 mg/l). En estas condiciones también se recogen valores elevados de serpentina y ajmalicina en células (0.28 y 0.84 mg/g peso seco) y en el medio de cultivo (4.4 y 35 mg/l).

Tenido en cuenta el papel beneficioso de los alcaloides indólicos sobre la salud humana es importante poder disponer de una fuente biológica adecuada y de un procedimiento que permita la obtención de estos compuestos en cantidades suficientes para satisfacer la demanda.

Explicación de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método que incrementa la producción de alcaloides indólicos en cultivos de células vegetales que son capaces de sintetizar estos compuestos, excretarlos y acumularlos en el medio de cultivo, mediante el tratamiento combinado de ciclodextrinas con jasmonato de metilo.

El tratamiento combinado con ambos agentes extractores tiene un efecto sinérgico en la producción de alcaloides indólicos, originando una mayor producción de catarantina en *C. roseus* que el tratamiento con dichos agentes extractores por separado. Así, mediante el tratamiento de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot con ciclodextrina metilada al azar (CDMA)+MeJA se alcanzaron valores de 5056 $\mu\text{g/g}$ peso seco de catarantina, lo que incrementa hasta 5.5 veces más la producción que si se utilizan separadamente MeJA (912 $\mu\text{g/g}$ peso seco) o CDMA (965 $\mu\text{g/g}$ peso seco). En cuanto a la producción de ajmalicina también se observó un mayor incremento con respecto a *C. roseus* (L.) G. Don, alcanzándose valores de 3368 $\mu\text{g/g}$ peso seco cuando se extrae con el tratamiento combinado CDMA y MeJA.

El incremento de la síntesis de alcaloides indólicos se ejemplifica en varios cultivares de *C. roseus* (L.) G. Don, una de las especies productoras de indolalcaloides más importantes, por su capacidad de sintetizar más de 130 compuestos de naturaleza alcaloide, y por la especial relevancia de estos alcaloides en la salud humana.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención es el método de obtención de alcaloides indólicos, que comprende:

- a) la adición de ciclodextrinas y jasmonato de metilo a un medio de cultivo,
- b) la adición de células potencialmente productoras de alcaloides indólicos al medio de cultivo de a),
- c) la incubación de las células del paso b) en el medio de cultivo del paso a),
- d) la separación de los alcaloides indólicos obtenidos tras el paso c) del medio de cultivo.

Las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos pueden provenir de hojas, tejidos u órganos que han sido establecidas previamente, o no, en cultivo *in vitro*. Por tanto, se entiende por células potencialmente productoras de alcaloides indólicos, cualquier línea celular capaz de producir indolalcaloides, bien de forma natural o tras modificación genética.

ES 2 336 992 A1

Cualquier órgano, tejido o célula vegetal capaz de producir indolalcaloides puede ser empleado en la invención. Esto incluye aquellas células procedentes de un organismo que, aunque no posean de forma natural la capacidad de sintetizar alcaloides indólicos, ha adquirido dicha capacidad mediante procesos de manipulación genética. En una realización preferida, son tejidos o células vegetales procedentes de plantas de especies del orden *Gentianales*. En otra realización más preferida pertenecen a las familias *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nissaceae* y *Rubiaceae*. En otra realización aún más preferida, pertenecen al género *Catharanthus*, y en otra realización particular de la invención, pertenecen a la especie *C. roseus* (L.) G. Don.

El término “planta” u “organismo” incluye partes, tejidos, células o protoplastos procedentes de la planta o del organismo, cultivos de células, cultivos de tejidos, callos, óvulos, embriones y semillas procedentes en última instancia de la planta o el organismo.

Taxonómicamente *C. roseus* (L.) G. Don. se define como un organismo celular, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Gentianales*, familia *Apocynaceae*, Subfamilia *Rauvolfioideae*, tribu *Vinceae*, género *Catharanthus*.

El término “cultivo de células” en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta o en tejidos (cultivos tisulares). Tipos de cultivos de este tipo son, por ejemplo, cultivos de protoplastos, callos (grupo de células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa) y células vegetales que están aisladas de plantas o partes de las plantas, tales como embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas, raíces, raíz inclina, antera, pistilo, flor, semilla, vaina o vástago de la planta.

También se entienden como células productoras de indolalcaloides aquellas que provienen de vitroplantas, órganos o tejidos de dichas vitroplantas, y específicamente, de vitroplantas, órganos o tejidos de vitroplantas de *C. roseus*. Ensayos que han realizado los inventores demuestran que la extracción, en el medio de cultivo que comprende ciclodextrinas y jasmonato de metilo, de hojas de vitroplantas de *C. roseus* da lugar a una mayor producción de metabolitos secundarios que cuando se extraen hojas procedentes de plantas de invernadero. Por tanto, en una realización preferida, las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos proceden de vitroplantas, y más preferiblemente, de vitroplantas del orden *Gentianales*, y más preferiblemente, de vitroplantas que se seleccionan de las familias *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nissaceae* y/o *Rubiaceae*, más preferiblemente, de vitroplantas procedentes de plantas del género *Catharanthus*, y más preferiblemente vitroplantas procedentes de plantas de *C. roseus*. Aún más preferiblemente, proceden de las hojas de dichas vitroplantas.

El jasmonato de metilo es un regulador del crecimiento, modulando múltiples aspectos del desarrollo de las plantas (maduración de frutos, viabilidad del polen, crecimiento de la raíz, curvatura de los zarcillos) y que promueve el envejecimiento foliar, produciendo senescencia. Parece actuar de forma específica sobre la expresión de genes implicados en la defensa de las plantas a ataques de insectos y patógenos y genes que codifican para proteínas de reserva.

En otra realización preferida de la presente invención la concentración de jasmonato de metilo es de entre 5 y 500 micromoles/por litro de medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de jasmonato de metilo es de entre 25 y 150 micromoles/L medio de cultivo y aun más preferiblemente de entre 75 y 125 micromoles/L medio de cultivo.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que se forman en algunos procesos de degradación del almidón. A veces también son llamadas cicloamilosas. Presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden atrapar moléculas orgánicas no polares. Para cambiar las propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas se han desarrollado diversos derivados. Unos de los más utilizados son los derivados parcialmente metilados que tienen una solubilidad en agua hasta 150 veces superior a la del producto de partida.

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

Preferiblemente, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de entre 1 y 3. En particular, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de 2. En otra realización preferida de este aspecto de la invención un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo α ($1 \rightarrow 4$) (β -ciclodextrinas).

En otra realización preferida de este aspecto 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, la concentración celular es de entre 10 g de peso fresco/litro, 1 g de peso seco/litro y 400 g de peso fresco/litro, 20 gramos de peso seco/litro. Más preferiblemente, la concentración celular es de entre 75 g de peso fresco/litro, 4 g de peso seco/litro y 300 g peso fresco/litro, 15 g de peso seco/litro, y aún más preferiblemente es de entre 100 peso fresco/litro, 5 g de peso seco/litro y 250 g de peso fresco/litro, 12 g de peso seco/litro.

ES 2 336 992 A1

La irradiación de las suspensiones celulares que comprenden jasmonato de metilo y ciclodextrina, con luz UV a 254 nm, en agitación continua para evitar, en la medida de lo posible, que las células sedimentaran y la exposición al tratamiento con luz UV fuera real, dio lugar a un incremento de la producción de alcaloides. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de cultivo del método de la invención, que contiene las suspensiones de células potencialmente productoras de alcaloides indólicos y la combinación de ciclodextrinas y jasmonato de metilo, se somete a luz UV. Los ensayos se realizaron con irradiaciones cortas de 15 minutos, y también con tiempos largos de 120 minutos. Los mejores resultados se obtuvieron con tiempos de irradiación cortos, por lo que preferiblemente, se somete a luz UV durante tiempos cortos de entre 5 y 30 minutos.

Tanto durante la irradiación de 15 minutos como en la de 120 minutos horas las suspensiones deben permanecer en agitación continua para evitar, en la medida de lo posible, que las células sedimenten y no reciban la exposición al tratamiento con luz UV.

Tal y como se observa en los ejemplos, el oxígeno parece ser un factor limitante en la producción de indolalcaloides a partir de suspensiones celulares, pues existe un aumento de acumulación extracelular de ajmalicina, serpentina y catarantina en matraces de capacidad 1000 ml respecto a los de 250 ml. Se ha visto que la mayor producción tiene lugar a valores cercanos a la saturación, siendo necesario en el caso de la catarantina, valores de concentración de oxígeno en el medio superiores al 40% para que sea excretada al medio. Así, otra realización preferida de este aspecto de la invención, la concentración de oxígeno en el medio es de entre un 40% y un 100%.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende MeJA y ciclodextrinas. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición que comprende MeJA y ciclodextrinas para promover la producción de alcaloides indólicos en células productoras de los mismos. Un último aspecto de la invención se refiere al uso combinado de jasmonato de metilo y ciclodextrinas para promover la producción de alcaloides indólicos en células productoras de los mismos.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Estudio de la producción de indolalcaloides mediante análisis cromatográfico (HPLC/UV-VIS) de medios de cultivo de *C. roseus* (L.) G. Don tras 96 horas de incubación utilizando una densidad celular elevada (230 g de peso fresco/litro, 9.2 g de peso seco/litro). Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

Control: medio de cultivo sin agentes extractores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Fig. 2. Producción de serpentina excretada al medio de cultivo por suspensiones celulares de *C. roseus* en respuesta a los diferentes agentes extractores bajo las condiciones descritas en la Fig. 1, tras 96 h de incubación utilizando una densidad celular elevada (230 g de peso fresco/litro, 9.2 g de peso seco/litro).

Fig. 3. Efecto de la combinación de CDMA y MeJA utilizando una densidad celular elevada (225 g de peso fresco/litro, 12 g de peso seco/litro) sobre la cinética de acumulación extracelular de indolalcaloides en la línea *C. roseus* (L.) G. Don.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Fig. 4. Efecto de la adición de MeJA combinado con CDMA sobre la cinética de acumulación extracelular de catarantina y serpentina utilizando una densidad celular elevada bajo las condiciones descritas en la Fig. 3.

Fig. 5. Análisis cromatográfico (HPLC-UV) de caldos de *C. roseus* (L.) G. Don tras 96 horas de incubación utilizando una densidad celular baja (110 g de peso fresco/litro), en respuesta a los diferentes agentes extractores. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

Control: medio de cultivo sin agentes extractores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

ES 2 336 992 A1

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

5 CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

10 Fig. 6: Producción de serpentina y catarantina por suspensiones celulares de *C. roseus* (L.) G. Don en respuesta a diferentes agentes extractores bajo las condiciones descritas en la figura 5.

Fig. 7. Efecto de CDMA combinado con MeJA utilizando una densidad celular baja (95 g de peso fresco/litro) sobre la cinética de acumulación extracelular de indolalcaloides en la línea *C. roseus* (L.) G. Don.

15

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

20

Fig. 8. Efecto de la adición de MeJA combinado con CDMA sobre la cinética de acumulación extracelular de catarantina y serpentina bajo las condiciones descritas en la figura 7.

25 Fig. 9. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la acumulación extracelular de indolalcaloides a partir de suspensiones celulares de *C. roseus* (L.) G. Don. extraídas con CDMA y MeJA utilizando una densidad celular elevada (200 g peso fresco/litro, 9.2 g de peso seco/litro).

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

30

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Fig. 10. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la acumulación en el medio de cultivo de catarantina y serpentina bajo las condiciones descritas en la figura 9.

35

Fig. 11. Producción de ajmalicina y catarantina por suspensiones celulares de *C. roseus* en respuesta a los diferentes agentes extractores tras 96 h de incubación utilizando una densidad celular elevada (218 g de peso fresco/litro, 6.4 g peso seco/litro) de medios de cultivo de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot.

40

Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

Control: medio de cultivo sin agentes extractores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

45

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

50

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

55 Fig. 12. Efecto de la combinación de CDMA con MeJA utilizando una densidad celular elevada (232 g de peso fresco/litro, 6.8 g de peso seco/litro), sobre la cinética de acumulación extracelular de indolalcaloides en la línea *C. roseus* cv. First Kiss Apricot.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

60

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

65 Fig. 13. Efecto de la adición de MeJA combinado con CDMA sobre la cinética de acumulación extracelular de ajmalicina bajo las condiciones descritas en la figura 12.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto el efecto en el uso conjunto de jasmonato de metilo y ciclodextrinas en la producción de indolalcaloides mediante la utilización de suspensiones celulares de *C. roseus*.

Preparación y mantenimiento de material vegetal

10 Línea celular: *C. roseus* (L.) G. Don

Línea celular: *C. roseus* cultivares First Kiss Apricot, Victory Red Blue Berry y Victory Bright.

15 La línea celular de *C. roseus* (L.) G. Don fue obtenida de Germán Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Braunschweig, Alemania).

Para la inducción de callos de *C. roseus* de los demás cultivares se recolectaron hojas jóvenes de 0.5-2.0 cm de longitud, de tres variedades: First Kiss Apricot, Victory Red Blue Berry y Victory Bright. A continuación se lavaron tres veces con agua jabonosa. Posteriormente se llevó a cabo la desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito cálcico al 2% durante 15 minutos. Tras la desinfección, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Una vez desinfectadas se cortaron en fragmentos de 1.5-2.0 mm que se depositaron sobre placas con distintos medios de cultivo. De entre todos los medios que se probaron, el que dio los mejores resultados fue el medio LS. Por ello, los callos se mantuvieron a 25°C en oscuridad, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del medio LS, consistente en medio basal LS (Linsmaier, E.M. & Skoog, F. 1965 *Physiol. Plant.* 18, 100-127) suplementado con Tiamina (0,4 mg/l) y Mio-inositol (100 mg/l, sacarosa (30 g/l) como fuente carbonada y ácido alfa-naftalenacético (0.186 mg/l) y 2.4-diclorofenoxiacético (0.22 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.

30 Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables obtenidos, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio LS sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C en la oscuridad.

Extracción de las células

En cada experiencia de extracción se tomaron, en condiciones de esterilidad, entre 90 y 240 g de peso fresco de células por litro que habían sido previamente lavadas con medio fresco y filtradas. Utilizando esta densidad celular, las células se repartieron en matraces de 250, 500, 1000 ml que contenían 100 ml de medio fresco.

- 40 • sólo con una β -ciclodextrina metilada aleatoriamente con un grado de sustitución por metilos de entre 1,6 y 1,9 (CDMA) a una concentración de 62,4 g/l.
- 45 • hidroxipropilada aleatoriamente con un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9 (CDHA), a una concentración de 62,4 g/l.
- con una de las ciclodextrinas anteriormente mencionadas (CDMA) o (CDHA) a una concentración 62,4 g/l y con jasmonato de metilo a una concentración 100 micromolar.

50 El jasmonato de metilo 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 192 horas.

Obtención de vitroplantas a partir de brotes de plantas de C. roseus cv. First kiss Apricot

Para la obtención de vitroplantas de *Catharanthus* se utilizaron brotes de plantas jóvenes crecidas en invernadero. Los brotes se lavaron con agua jabonosa. A continuación se procedió a su desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito cálcico al 2 % durante 15 minutos. Tras la desinfección, se lavaron con abundante agua destilada estéril. Una vez desinfectados y trabajando en cabina de flujo laminar, los brotes se cultivaron en recipientes que contenían 50 ml de medio de cultivo optimizado consistente en medio basal MS (Murasighe and Skoog, 1962) suplementado con vitaminas de Morel, 6-bencilaminopurina (0, 680 mg/l), ácido alfa-naftalenacético (0,180 mg/l), sacarosa (20 g/l), carbón activo (1.2 g/l). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y se esterilizó mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm y se solidificó mediante la adición de agar (8 g/l). Otras vitroplantas se mantuvieron en un medio de cultivo constituido por una doble capa, consistente en una capa de medio de cultivo sólido y otra de medio de cultivo líquido de idéntica composición pero sin agar.

ES 2 336 992 A1

Los brotes se mantuvieron en cámara de cultivo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad.

Extracción de las vitroplantas

5

Para la estimulación de la producción de alcaloides indólicos, se añadieron al medio de cultivo de las vitroplantas los siguientes agentes extractores:

10

- Jasmonato de metilo a una concentración 100 micromolar.
- Jasmonato de metilo a una concentración 100 micromolar y β -ciclodextrina hidroxipropilada con un grado de sustitución por metilos de entre 0.6 y 0,9 (CDHA) a una concentración de 62,4 g/l.

15

El jasmonato de metilo se esteriliza aparte del medio por filtración, disuelto en etanol al 2%, y posteriormente se mezcla con el resto del medio estéril.

Muestreo y preparación de muestras para análisis

20

Los cultivos incubados con agentes extractores se recogieron diariamente o cada cierto tiempo para su análisis. En el caso de las vitroplantas, una vez transcurrido el tiempo de extracción, se recolectaron las hojas para la extracción y análisis de indolalcaloides por HPLC con detector de fotodiodo array.

25

En el caso de las suspensiones celulares, 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 la extracción de los compuestos y posterior análisis por HPLC con detector de fotodiodo array.

30

Análisis de indolalcaloides en el medio extracelular

35

Una vez realizados los experimentos de extracción, la extracción de los compuestos secretados al medio de cultivo de *C. roseus*, se realizó basificando el medio extracelular con amoníaco hasta alcanzar un pH de 9.5. A continuación se realizó una primera extracción con acetato de etilo (v:v) durante un periodo de tres horas. Transcurrido ese tiempo se recogió la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporó en un rotavapor a 40°C a vacío; el residuo seco se resuspendió en metanol y se procedió a su análisis cromatógrafo.

40

Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema cromatográfico Waters LC 600 acoplado a un detector de selección fotodiodo en batería Waters 996. La estación de control y procesado de datos se realizó mediante el software Millennium.

45

La separación en fase reversa HPLC se llevó a cabo sobre una columna Spherisorb ODS2 C18. El volumen de inyección fue de $20 \mu\text{l}$ y la velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 ml/minuto, utilizando como disolvente: metanol, acetonitrilo, trietilamina, acetato de amonio en proporción 15:1:45:40 (vol:vol:vol:vol) (Morforte-González *et al.*, (1992) *Phytochem Anal* 3:117-121).

50

El tiempo de retención de los diferentes indolalcaloides y la respuesta del detector a la concentración de los mismos (curva de calibrado para cuantificación) se determinó usando patrones externos. La extracción de los cromatogramas correspondientes a los indolalcaloides se realizó a 254 nm.

Análisis de indolalcaloides en hojas de vitroplantas

55

Una vez realizados los experimentos de extracción y recolectadas las hojas, la extracción de los compuestos se realizó macerando las hojas en un mortero con metanol (1:2 p/v). A continuación, el triturado se filtra utilizando una tela de Nylon y el filtrado se centrifuga a 120 g durante 6 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se lleva a sequedad aplicando N_2 . El residuo seco obtenido se resuspende en 2 ml de H_2SO_4 al 2% y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 7 ml de acetato de etilo y se centrifuga a 20000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se elimina el acetato de etilo y la fase acuosa restante se basifica añadiendo amonio hasta alcanzar un pH de 9.5. A continuación se añaden 40 ml de acetato de etilo durante un periodo de tres horas. Transcurrido ese tiempo se recoge la fase orgánica (acetato de etilo) y se evapora en un rotavapor a 40°C a vacío; el residuo seco se resuspendió en metanol y se procedió a su análisis cromatógrafo.

65

Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema cromatográfico Waters LC 600 acoplado a un detector de selección fotodiodo en batería Waters 996. La estación de control y procesado de datos se realizó mediante el software Millennium.

ES 2 336 992 A1

La separación en fase reversa HPLC se llevó a cabo sobre una columna Spherisorb ODS2 C18. El volumen de inyección fue de 20 μ l y la velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 ml/minuto, utilizando como disolvente: metanol, acetonitrilo, trietilamina, acetato de amonio en proporción 15:1:45:40 (vol:vol:vol:vol) (Morforte-González *et al.*, (1992) *Phytochem Anal* 3:117-121).

5

El tiempo de retención de los diferentes indolalcaloides y la respuesta del detector a la concentración de los mismos (curva de calibrado para cuantificación) se determinó usando patrones externos. La extracción de los cromatogramas correspondientes a los indolalcaloides se realizó a 254 nm.

10 Ejemplo 1

Extracción de células de vinca (C. roseus (L.) G. Don) con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (232 g de peso fresco/litro, 9.2 g de peso seco/litro)

15 Las suspensiones de *C. roseus* (L.) G. Don se trataron con:

- controles sin CDMA ni MeJA
- con MeJA (100 micromoles/l)
- 20 • con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- 25 • con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

30 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 ajmalicina y serpentina en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla A y Fig. 1 y 2.

35 Cuando el cultivo se extrajo solo con CDMA o CDHA, se observó una acumulación extracelular de ajmalicina por unidad de biomasa ligeramente superior que en los controles y a los obtenidos sólo con MeJA.

Sólo la combinación de CDHA con MeJA se tradujo en un incremento en la producción de ajmalicina.

40 Por otro lado se observó que no existían diferencias significativas con los distintos tratamientos tras 96 horas de extracción en la producción de serpentina.

TABLA A

45 *Producción de ajmalicina y serpentina en μ g/g peso seco de *C. roseus* (L.) G. Don tras 96 horas de incubación*

45

Tratamiento	Ajmalicina μg/g peso seco	Serpentina μg/g peso seco
Control	51,20	21,62
MeJA	44,56	18,72
55 CDMA	75,88	17,35
CDHA	71,36	19,22
DMA+MeJA	69,87	8,98
60 CDHA+MeJA	102,69	12,93

50

55

60

Densidad celular: 9.2 g de peso seco/litro

65

Control: medio de cultivo sin agentes extractores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l

ES 2 336 992 A1

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

5 CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

10 Ejemplo 2

Dependencia de la producción de indolalcaloides del tiempo de incubación: cinética de acumulación de alcaloides tras extracción de células de C. roseus(L.) G. Don con beta ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (225 g de peso fresco/litro, 12 g de peso seco/litro)

15

Las suspensiones celulares de *C. roseus* (L.) G. Don se trataron con:

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

20

Periódicamente se extrajeron muestras y se recogieron las células y el medio por separado. A continuación, se cuantificó la cantidad de indolalcaloides en el medio extracelular como se describe en los modos de realización. Los resultados se muestran en la tabla B y Figuras 3 y 4.

25

En presencia de CDMA y MeJA la catarantina se acumula durante las primeras 72 horas, desapareciendo su producción a las 96 horas hasta el final del tiempo de extracción. En relación a la ajmalicina se observó un aumento desde las 24 horas después de la extracción y un pico de máxima producción a las 96 horas. A partir de ese momento hay una disminución progresiva de la cantidad de ajmalicina detectada en el medio extracelular disminución que probablemente este relacionada con el aumento de serpentina a partir de 120 horas, ya que la ajmalicina es el precursor inmediato de la serpentina.

30

TABLA B

Producción de alcaloides en µg/g peso seco de C. roseus a lo largo de 192 horas de incubación (12 g de peso seco/litro)

35

Tiempo (horas)	Catarantina µg/g peso seco	Ajmalicina µg/g peso seco	Serpentina µg/g peso seco
24h	31,48	107,17	5,21
48h	23,72	91,76	3,13
72h	26,83	113,15	6,17
96h	0	125,00	8,25
120h	0	60,83	12,79
168h	0	32,89	20,41
192h	0	24,49	16,51

40

45

50

55

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA;

60

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

65

ES 2 336 992 A1

Ejemplo 3

Extracción de células de *C. roseus* (L.) G. Don con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (110 g de peso fresco/litro, 6 g de peso seco/litro)

Las suspensiones de *C. roseus* se trataron con:

- controles sin CDMA ni MeJA
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo utilizando una densidad celular baja (110 g/peso fresco/litro). 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 ajmalicina y serpentina en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla C y Fig. 5 y 6.

Cuando el cultivo se extrajo sólo con CDMA o CDHA, no se observaron diferencias significativas con respecto al control de acumulación extracelular de alcaloides, aunque el tratamiento sólo con MeJA presentó una disminución en la producción de ajmalicina y un aumento de serpentina respecto a los controles. Asimismo, la combinación de CDHA y CDHA con MeJA, se tradujo en un incremento en la producción de ajmalicina y serpentina.

TABLA C

Producción de ajmalicina y serpentina en $\mu\text{g/g}$ peso seco de *C. roseus* tras 96 horas de incubación (6 g de peso seco/litro)

Tratamiento	Catarantina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Ajmalicina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Serpentina $\mu\text{g/g}$ peso seco
Control	0	66,39	8,87
MeJA	0	27,97	22,37
CDMA	3,43	54,08	6,72
CDHA	0	63,77	14,09
CDMA+MeJA	7,14	87,27	11,43
CDHA+MeJA	2,81	70,49	19,04

Control: medio de cultivo sin agentes extractores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

ES 2 336 992 A1

Ejemplo 4

Dependencia de la producción de indolalcaloides: cinética de acumulación de alcaloides tras extracción de células de *C. roseus* (L.) G. Don con beta ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (95 g de peso fresco/litro, 2.6 g de peso seco/litro)

Las suspensiones celulares de *C. roseus* (L.) G. Don se trataron con:

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

Periódicamente se extrajeron muestras y se recogieron las células y el medio por separado. A continuación, se cuantificó la cantidad de alcaloides en el medio extracelular como se describe en los modos de realización. Los resultados se muestran en la tabla D y Fig. 7 y 8.

En presencia de CDMA y MeJA la catarantina se acumula a partir de las 48 horas, manteniendo su valor constante hasta las 96 horas y desapareciendo desde 120h hasta el final del tiempo de incubación. En cuanto a la ajmalicina se observó un pico de máxima producción a las 48 horas, a partir de 120 horas no se detecta ajmalicina en el medio extracelular, y sin embargo, se comienza a observar un aumento de serpiente.

TABLA D

Producción de alcaloides por gramo de peso seco de *C. roseus* a lo largo de 168 horas de incubación (2.6 g de peso seco/litro)

Tiempo (horas)	Catarantina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Ajmalicina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Serpentina $\mu\text{g/g}$ peso seco
24 h	-	-	-
48 h	6,86	67,27	2,91
72 h	5,90	39,33	4,18
96 h	6,09	55,89	4,25
120 h	-	-	6,34
168 h	-	-	16,27

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA;

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Ejemplo 5

Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción de indol-alcaloides tras la extracción de células de *C. roseus* (L.) G. Don con beta ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (200 g de peso fresco/litro, 9.2 g de peso seco/litro)

Las suspensiones celulares de *C. roseus* (L.) G. Don se trataron con:

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

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml, 500 ml y 1000 ml conteniendo cada uno de ellos 100 ml de medio 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 indolalcaloides en el medio de cultivo. El resultado del experimento se muestra en la Tabla E y Figuras 9 y 10.

ES 2 336 992 A1

En presencia de CDMA y MeJA se observa un aumento de acumulación extracelular de ajmalicina, serpentina y catarantina en matraces de capacidad 1000 ml respecto a los de 250 ml por lo que hay un claro indicio de la actuación del oxígeno como factor limitante en la producción de indolalcaloides a partir de suspensiones celulares de *C. roseus*. Se observa como en concentraciones de oxígeno próximas a la saturación se obtiene mayor producción de alcaloides, y en el caso concreto de la catarantina se requiere más del 40 % para que se excrete al medio de cultivo.

TABLA E

Producción de alcaloides en $\mu\text{g/g}$ peso seco de células de *C. roseus* realizando el proceso de extracción en matraces de diferente capacidad

CDMA+MeJA	Catarantina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Ajmalicina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Serpentina $\mu\text{g/g}$ peso seco	[O ₂] ppm	[O ₂] %
250 ml	-	139,42	6,67	3,20	40,3
500 ml	34,17	185,40	9,36	6,10	74,0
1000 ml	54,05	366,51	11,51	9,32	97,5

Densidad celular: 9.2 g de peso seco/litro.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Ejemplo 6

Extracción de células de vinca (*C. roseus* cv. First Kiss Apricot) con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (218 g peso fresco/litro)

Las suspensiones de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot de densidad alta (218 g peso fresco/litro) se trataron con:

- controles sin CDMA ni MeJA
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio 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 ajmalicina y serpentina en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla F y la Fig. 11.

Tras analizar los resultados obtenidos en el ejemplo 2 (Tabla B) y ejemplo 6 (Tabla F) se observó que la línea celular de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot es más productora que la línea celular de *C. roseus* (L.) G. Don, por lo que la producción de indolalcaloides depende del cultivar de *C. roseus* que se utilice.

El tratamiento que originó una mayor producción de catarantina en *C. roseus* cv. First Kiss Apricot fue CDMA+MeJA alcanzando valores de 5056 $\mu\text{g/g}$ peso seco (Tabla F). Por lo cual el uso de combinado de ambos agentes extractores incrementa hasta 5.5 veces más la producción que si se utilizan separadamente MeJA (912 $\mu\text{g/g}$ peso seco) o CDMA (965 $\mu\text{g/g}$ peso seco).

ES 2 336 992 A1

En cuanto a la producción de ajmalicina también se observó un mayor incremento con respecto a *C. roseus* (L.) G. Don (Tabla B), alcanzándose valores de 3368 $\mu\text{g/g}$ peso seco cuando se extrae con el tratamiento combinado CDMA y MeJA.

TABLA F

*Producción de ajmalicina y catarantina en $\mu\text{g/g}$ peso seco de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot tras 96 horas de incubación*

Tratamiento	Catarantina $\mu\text{g/g}$ peso seco	Ajmalicina $\mu\text{g/g}$ peso seco
Control	361,46	152,93
MeJA	912,57	1034,28
CDMA	965,11	339,43
CDHA	874,86	1017,05
CDMA+MeJA	5056,53	3368,66
CDHA+MeJA	3699,54	858,67

Control: medio de cultivo sin agentes extractores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

Ejemplo 7

*Dependencia de la producción de indolalcaloides: cinética de acumulación de alcaloides tras extracción de células de *C. roseus* cv. First Kiss Apricot con beta ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (232 g de peso fresco/litro, 6.8 g de peso seco/litro)*

Las suspensiones celulares de *C. roseus* cv First Kiss Apricot se trataron con:

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

Periódicamente se extrajeron muestras y se recogieron las células y el medio de cultivo por separado. A continuación, se cuantificó la cantidad de alcaloides en el medio de cultivo. Los resultados se muestran en la tabla G y Fig. 12 y 13.

En presencia de CDMA y MeJA la catarantina se acumula durante las primeras 96 horas alcanzando un *plateau*. En cuanto a la ajmalicina se observó un aumento máximo mantenido desde las 72 horas hasta 120 horas mientras que la máxima producción de serpentina comienza a las 96 horas y se mantiene hasta el final del experimento.

ES 2 336 992 A1

TABLA G

Producción de alcaloides en µg/g peso seco de C. roseus a lo largo de los diferentes tiempos

Tiempo (horas)	Catarantina µg/g peso seco	Ajmalicina µg/g peso seco	Serpentina µg/g peso seco
24 h	446,84	180,18	1072,36
48 h	3381,63	398,40	779,28
72 h	7107,54	972,23	No detectado
96 h	13629,06	790,71	4041,01
120 h	13916,84	920,24	3138,48
168 h	14217,70	110,48	4241,89

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA;

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

Ejemplo 8

Análisis de la producción de indolalcaloides en hojas de plantas de invernadero y vitroplantas de C. roseus cv. First Kiss Apricot

Se tomaron muestras de hojas de plantas crecidas en invernadero y vitroplantas sin ningún tratamiento. A continuación, se cuantificó la cantidad de indolalcaloides como se describe en los modos de realización.

Los resultados se muestran en la tabla H.

Tras analizar los resultados obtenidos, se observa la presencia de vindolina, no detectada en los cultivos celulares. Asimismo, observamos que las hojas derivadas de cultivo *in vitro*, muestran mayor producción de vindolina, catarantina y ajmalicina que las hojas de plantas de invernadero.

TABLA H

Producción de indolalcaloides en µg/g peso seco a partir de hojas obtenidas de C. roseus cv. First Kiss Apricot

Material vegetal	Vindolina µg/g peso seco	Ajmalicina µg/g peso seco	Catarantina µg/g peso seco
Hojas obtenidas de plantas de invernadero	52.6	1778	-
Hojas obtenidas de plantas <i>in vitro</i>	2163.3	4142.8	5.8

Ejemplo 9

Extracción de vitroplantas de C. roseus cv. First Kiss Apricot con jasmonato de metilo (MeJA) sólo o en combinación con ciclodextrinas (CDHA)

Al cabo de 96 horas de tratamiento, se recolectaron las hojas de las vitroplantas, se pesaron y se determinó la cantidad total de indol alcaloides producidos. El resultado del experimento se muestra en la Tabla I.

ES 2 336 992 A1

El tratamiento CDHA+MeJA originó una mayor producción de vindolina y catarantina (Tabla I) hasta 1.6 y 10 veces respectivamente, en comparación con los datos de las vitroplantas extraídas sólo con MeJA.

5 En cuanto a la ajmalicina y serpentina se observó que aquellas vitroplantas que fueron extraídas sólo con MeJA presentaban mayor producción que que las vitroplantas tratadas con ambos agentes extractores.

TABLA I

10 *Producción de indolalcaloides en µg/g peso seco a partir de hojas obtenidas de vitroplantas de C. roseus cv. First Kiss Apricot sometidas a extracción*

Tratamiento	Vindolina µg/g peso seco	Ajmalicina µg/g peso seco	Catarantina µg/g peso seco	Serpentina µg/g peso seco
MeJA	1239	3290.4	8.6	1382.7
CDHA+MeJA	2007	325.3	85.8	155.4

25 MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA;

CDHA: tratamiento con 62.4 g/l de CDMA.

ES 2 336 992 A1

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de alcaloides indólicos, que comprende:

- a. la adición de ciclodextrinas y jasmonato de metilo a un medio de cultivo,
- b. la adición de células potencialmente productoras de alcaloides indólicos al medio de cultivo de a),
- c. la incubación de las células del paso b) en el medio de cultivo del paso a),
- d. la separación de los alcaloides indólicos obtenidos tras el paso c) del medio de cultivo.

2. Método según la reivindicación anterior, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos son células vegetales procedentes de plantas del orden *Gentianales*.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos son células vegetales procedentes de plantas que se seleccionan de las siguientes familias: *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nissaceae* y/o *Rubiaceae*.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos son células vegetales procedentes de plantas del género *Catharanthus*.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos son células vegetales procedentes de *C. roseus*.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos proceden de vitroplantas.

7. Método según la reivindicación anterior, donde las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos proceden de las hojas de las vitroplantas.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la concentración de jasmonato de metilo es de entre 5 y 500 micromoles/ litro de medio de cultivo.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la concentración de jasmonato de metilo es de entre 25 y 150 micromoles/ litro de medio de cultivo.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la concentración de jasmonato de metilo es de entre 75 y 125 micromoles/ litro de medio de cultivo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde las ciclodextrinas se seleccionan del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente o ciclodextrina hidroxipropilada.

12. Método según la reivindicación 11 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1 y 3.

13. Método según la reivindicación 11 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente es dimetilada.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la ciclodextrina es una β -ciclodextrina.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 6.5 y 130 g/L medio de cultivo a).

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 10 y 100 g/L medio de cultivo a).

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 50 y 75 g/L medio de cultivo a).

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 donde la concentración de células de b) en el medio a) es de entre 10 g de peso fresco/litro, 1 g de peso seco/litro y 400 g de peso fresco/litro, 20 g de peso seco/litro.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde la concentración de células de b) en el medio a) es de entre 75 g de peso fresco/litro, 4 g de peso seco/litro y 300 g de peso fresco/litro, 15 g de peso seco/litro.

ES 2 336 992 A1

20. Método según la reivindicación 19 donde la concentración de células de b) en el medio a) es de entre 100 g de peso fresco/litro, 5 g de peso seco/litro y 250 g de peso fresco/litro, 10 g de peso seco/litro.

5 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde el medio de cultivo que comprende las ciclodextrinas, el jasmonato de metilo y las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos se someten a radiación UV.

10 22. Método según la reivindicación anterior, donde los donde el medio de cultivo que comprende las ciclodextrinas, el jasmonato de metilo y las células potencialmente productoras de alcaloides indólicos se someten a radiación UV durante tiempos cortos de entre 5 y 30 minutos.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde el porcentaje de saturación de oxígeno en el medio de cultivo es de entre 40% y un 100%.

15 24. Composición que comprende jasmonato de metilo y ciclodextrinas.

25. Uso de la composición de la reivindicación 24 para promover la producción de alcaloides indólicos en células productoras de los mismos.

20 26. Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de alcaloides indólicos en células productoras de los mismos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

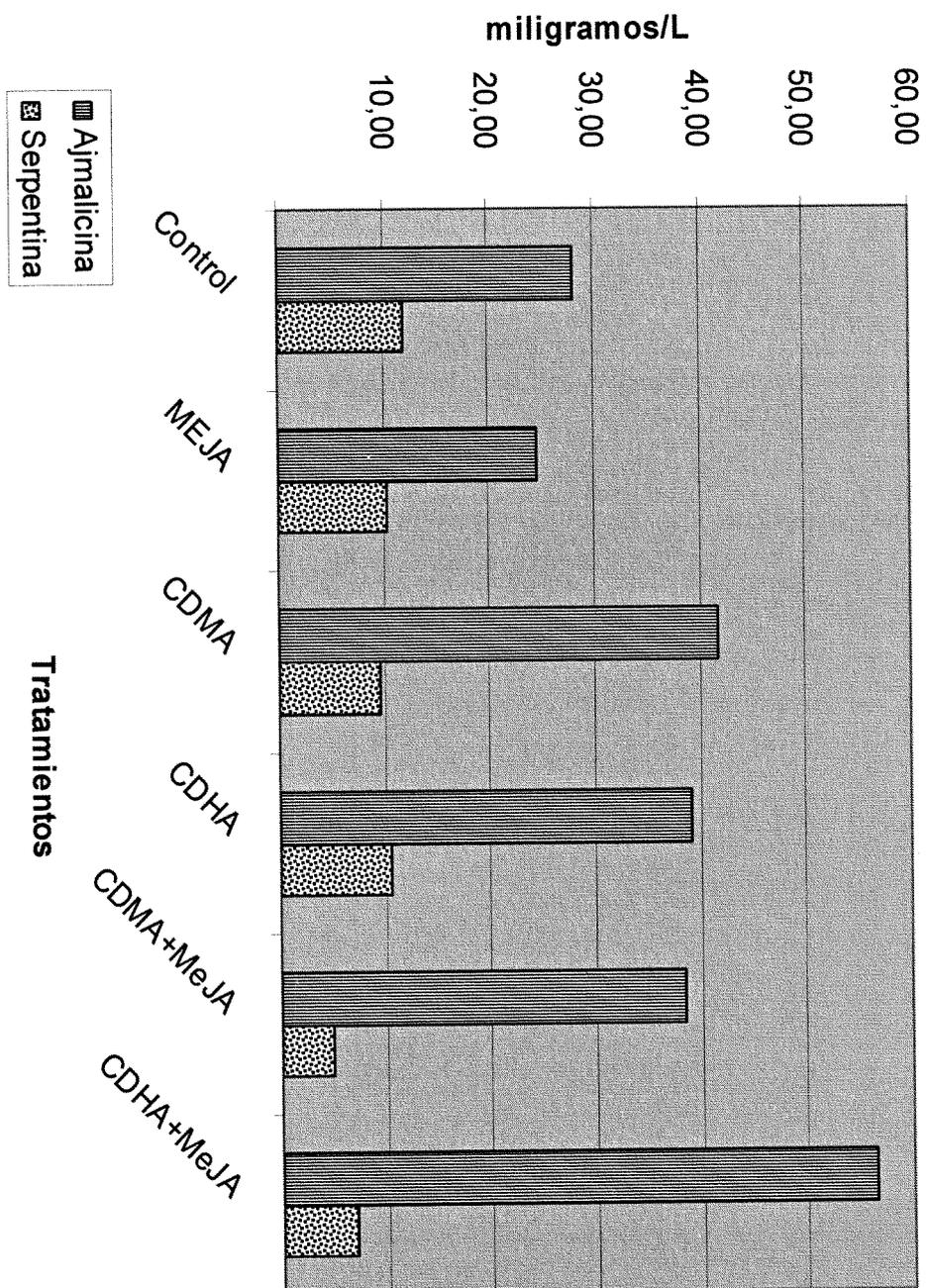


FIG. 1

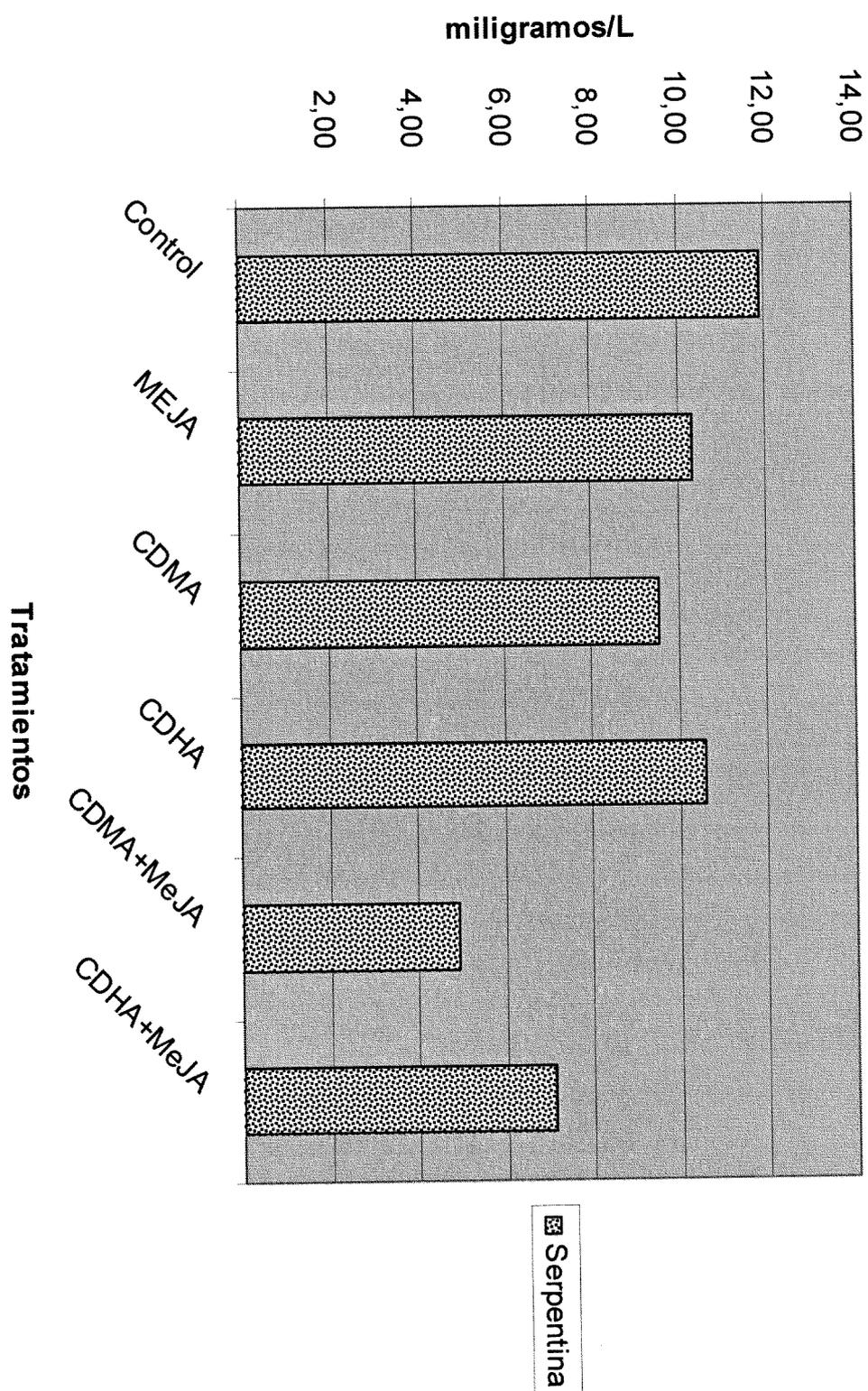


FIG. 2

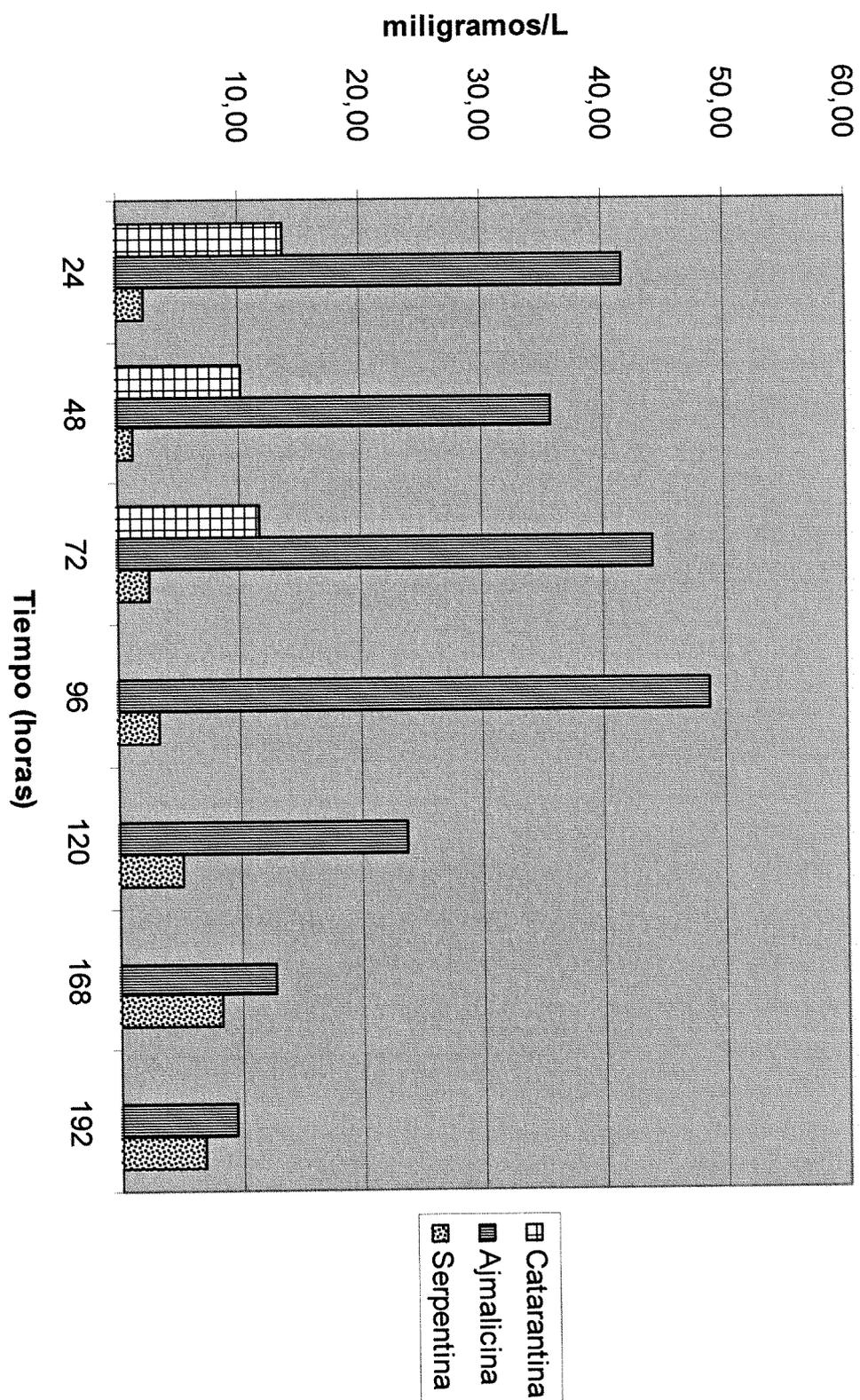


FIG. 3

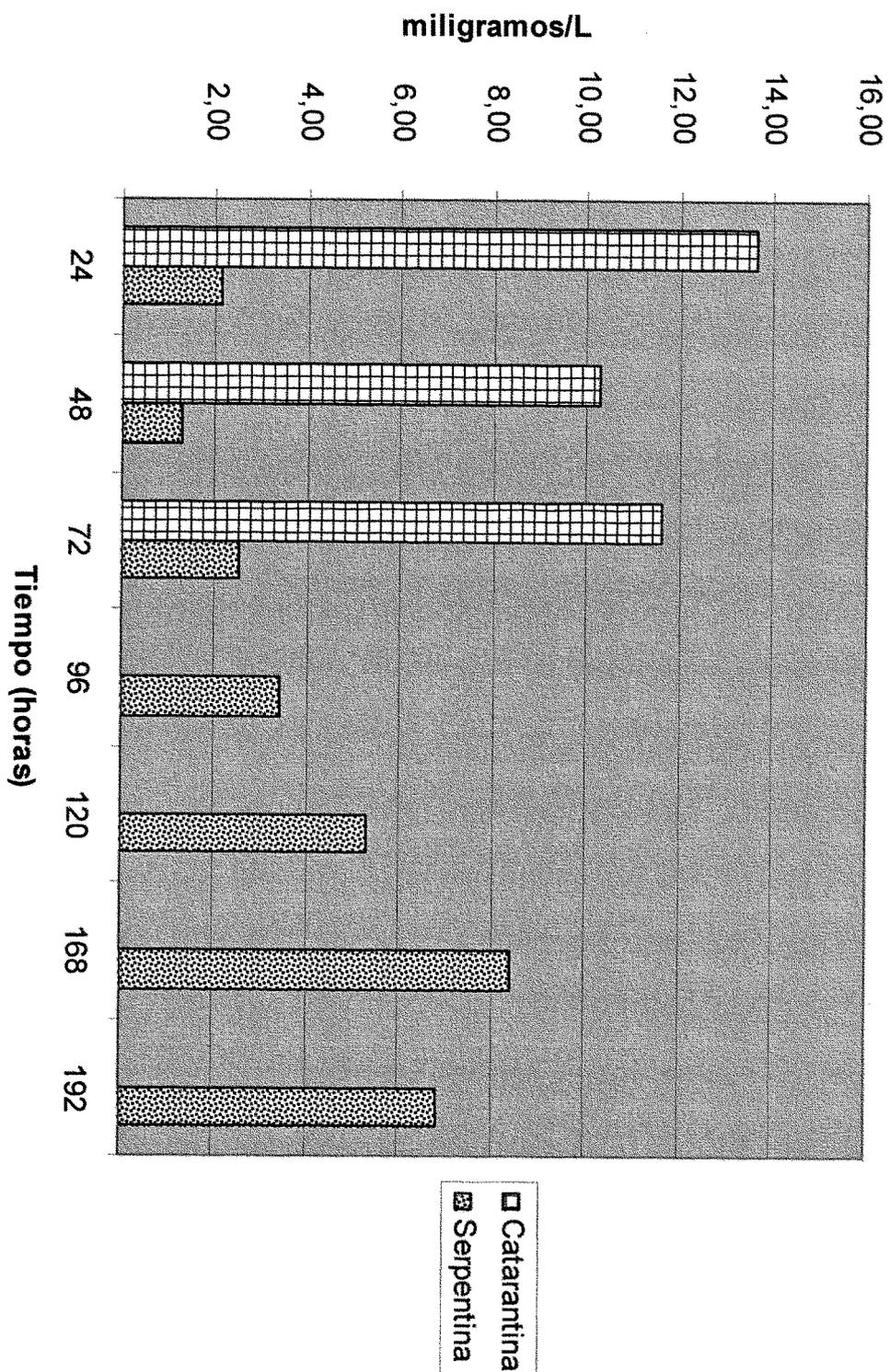


FIG. 4

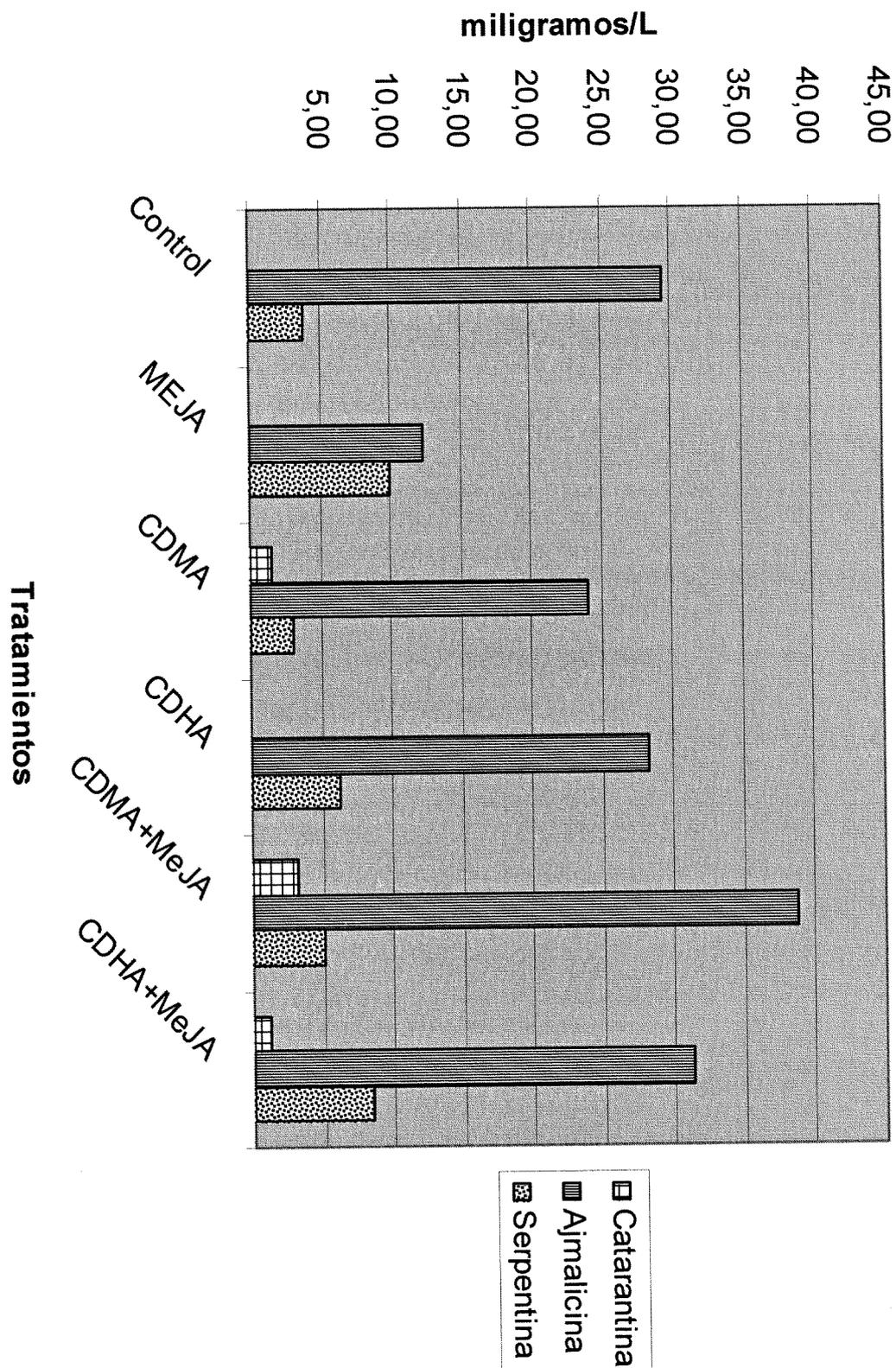


FIG. 5

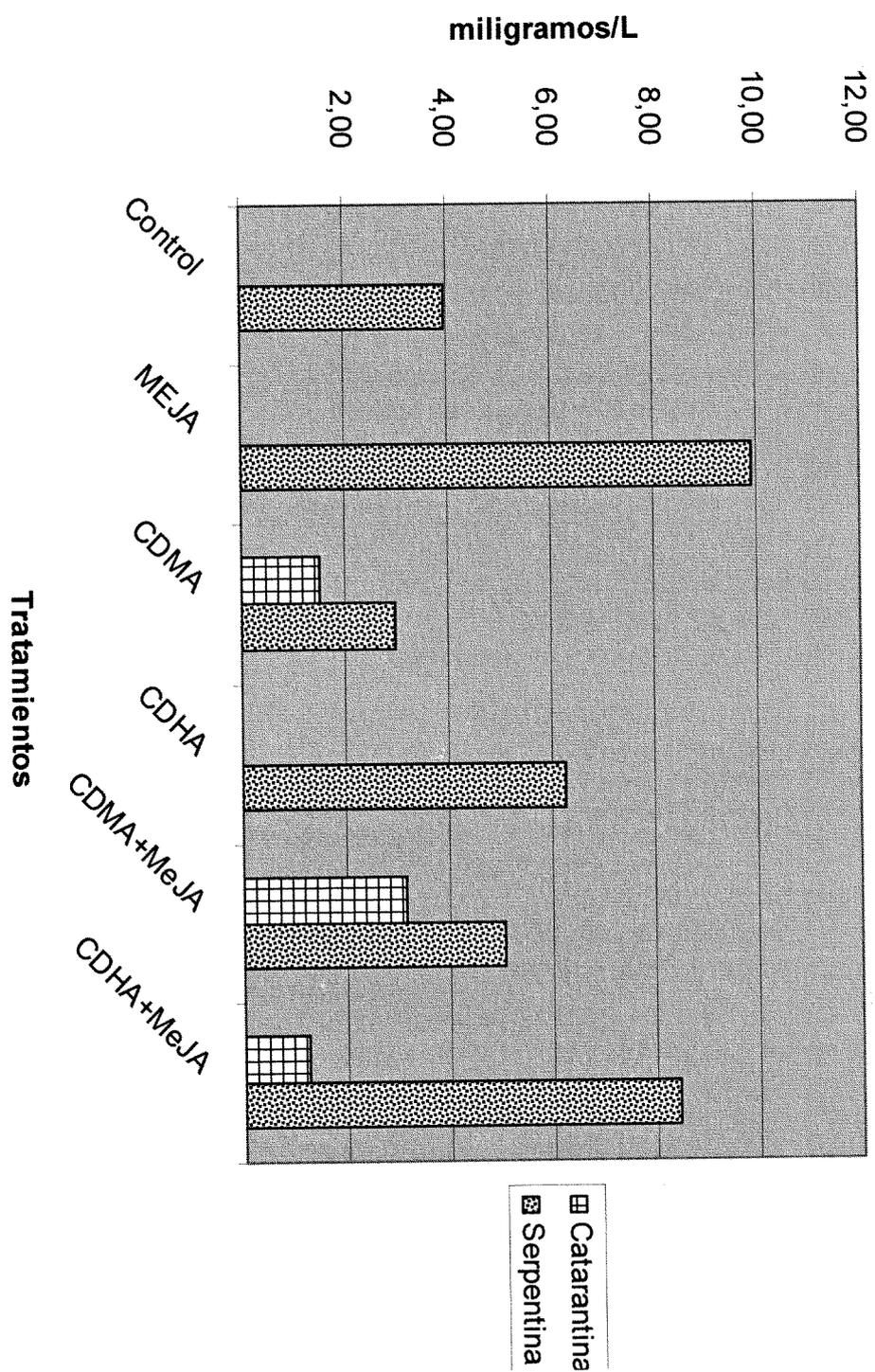


FIG. 6

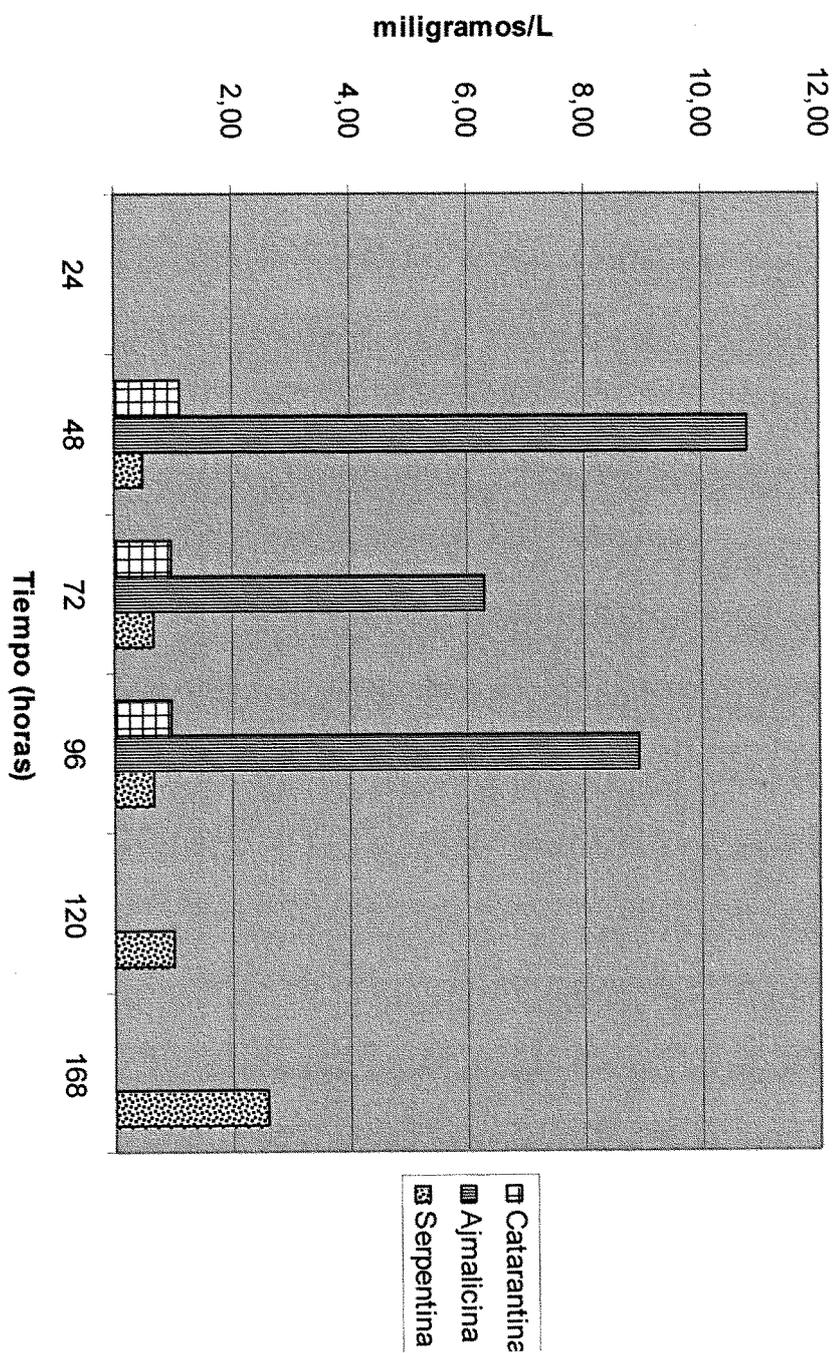


FIG. 7

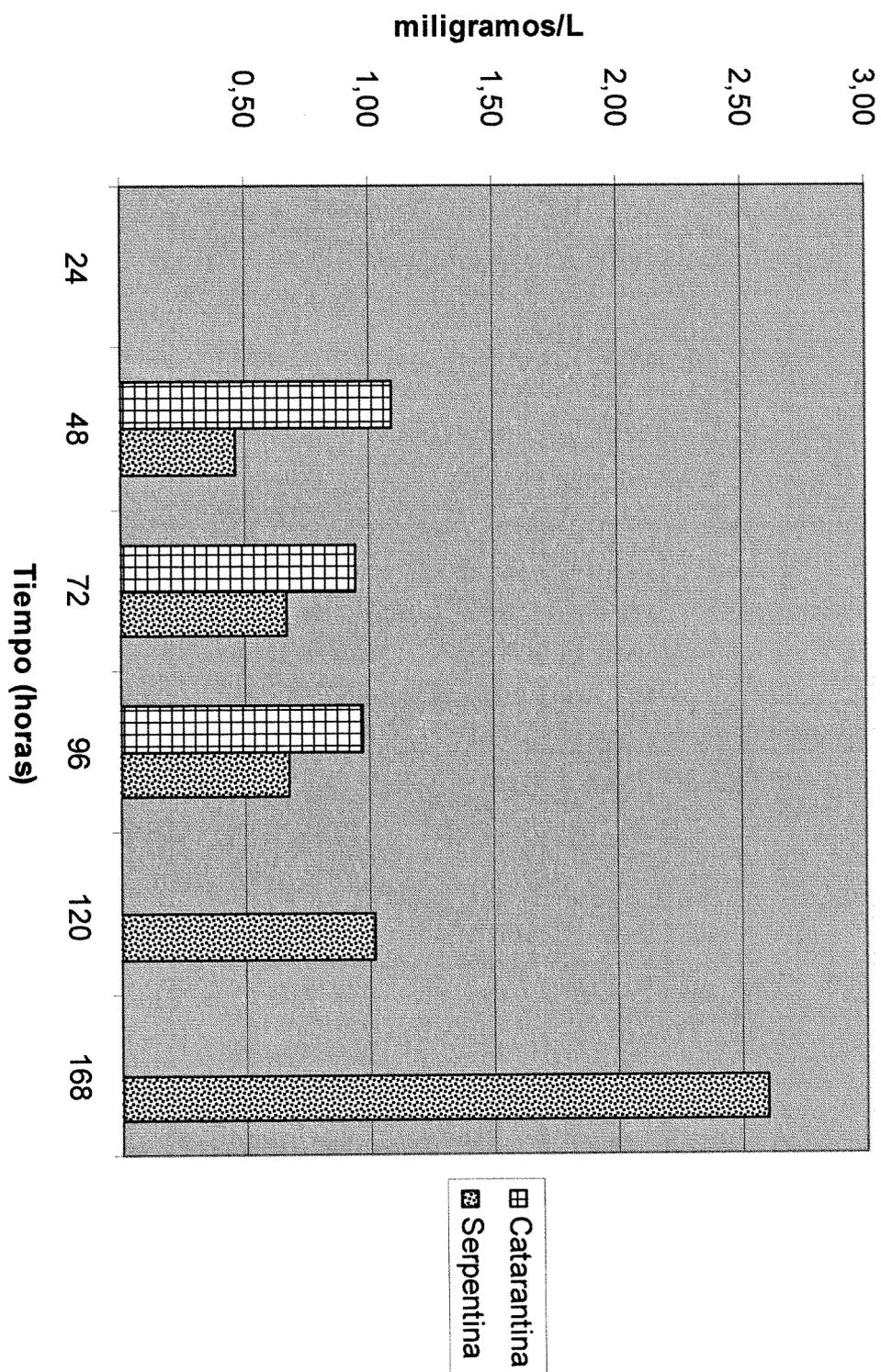
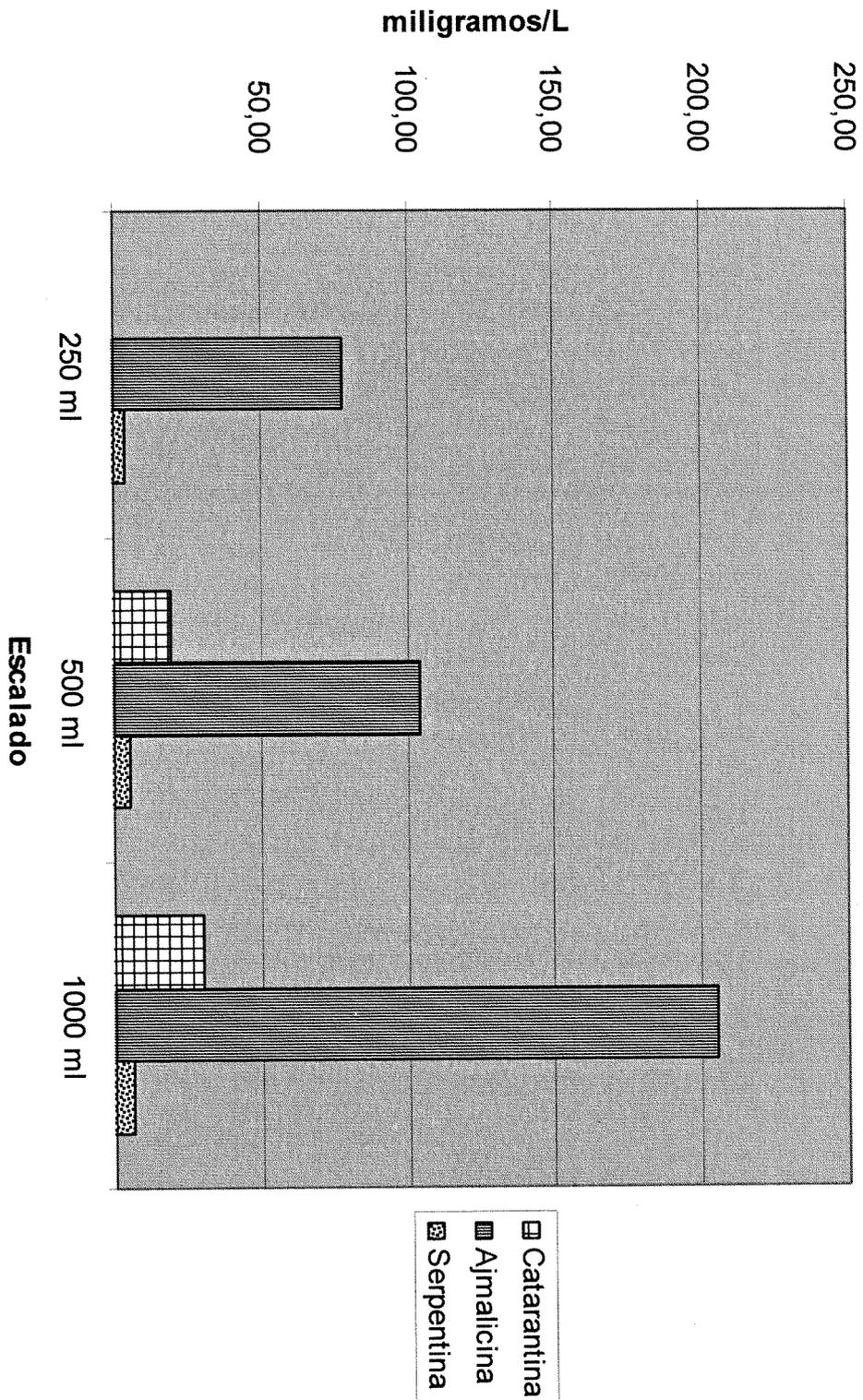


FIG. 8



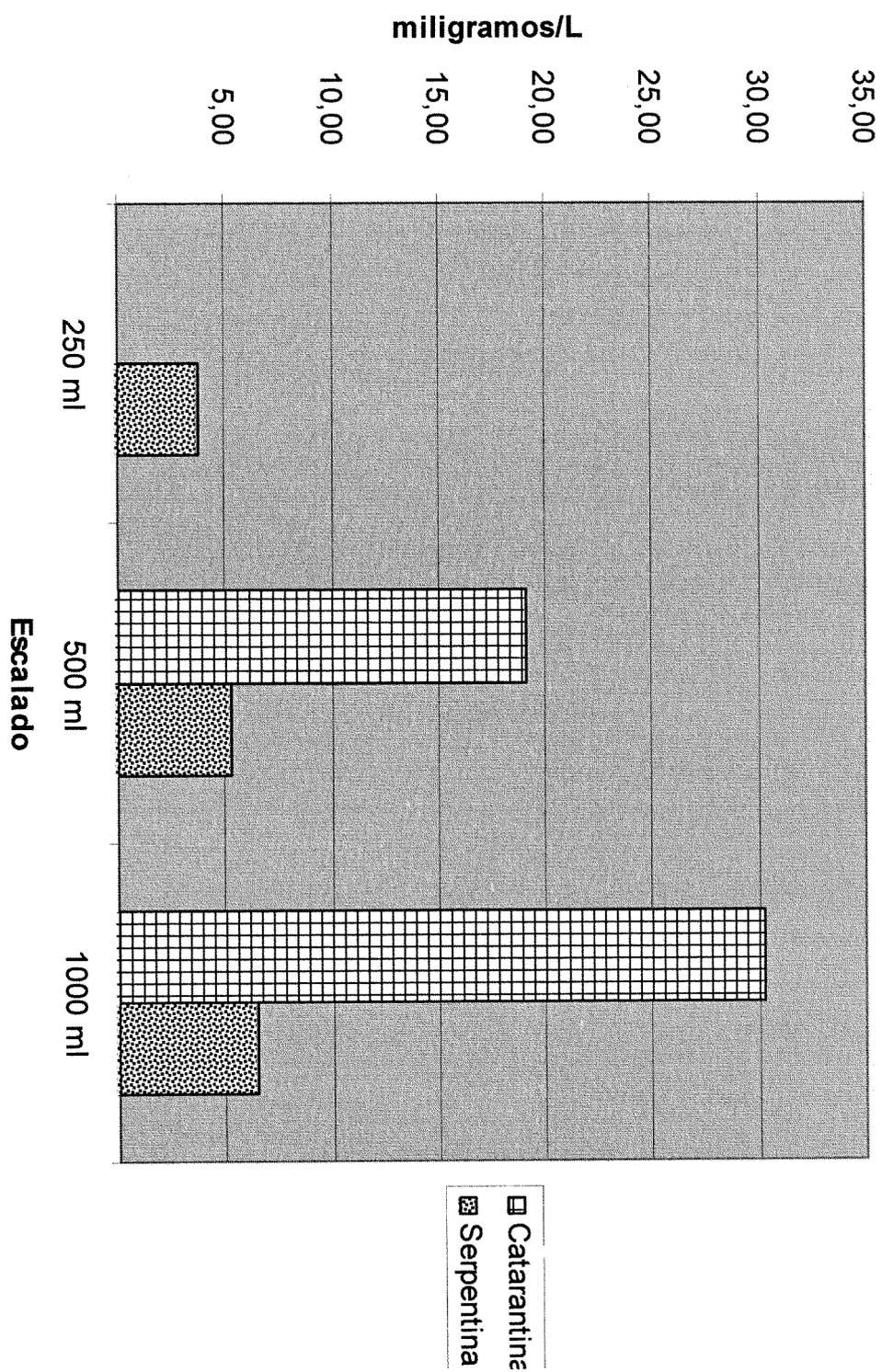


FIG. 10

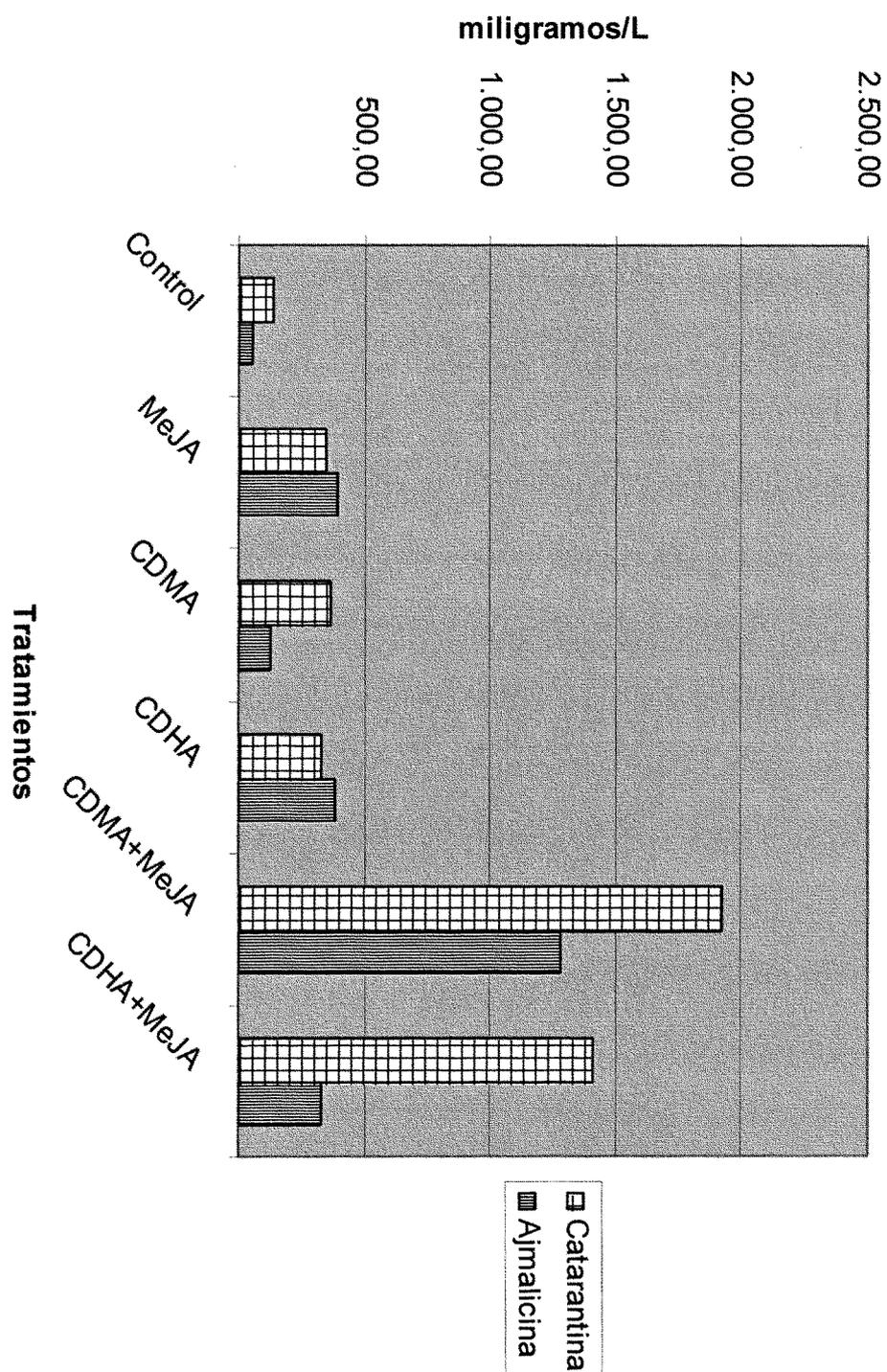


FIG. 11

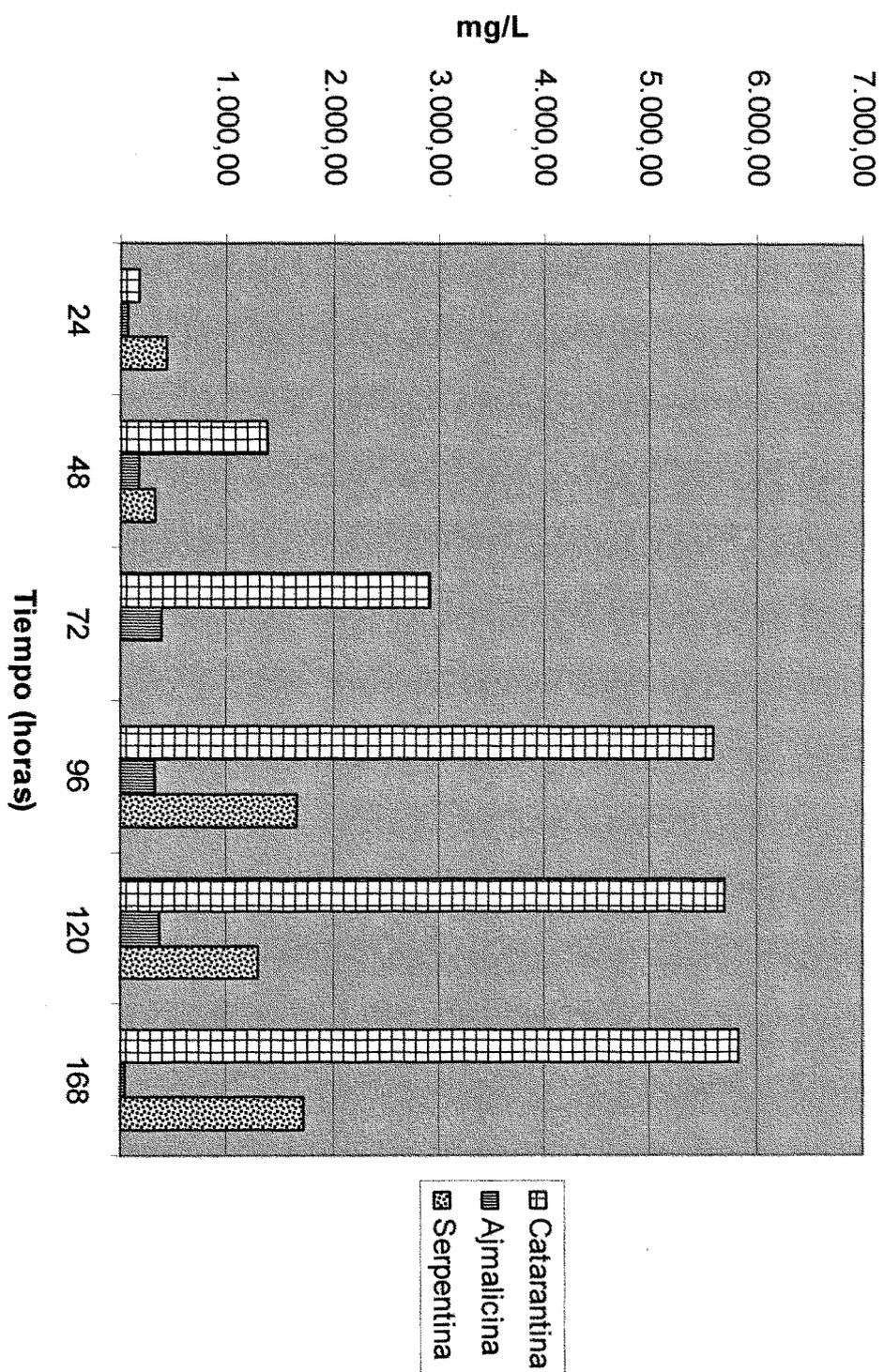


FIG. 12

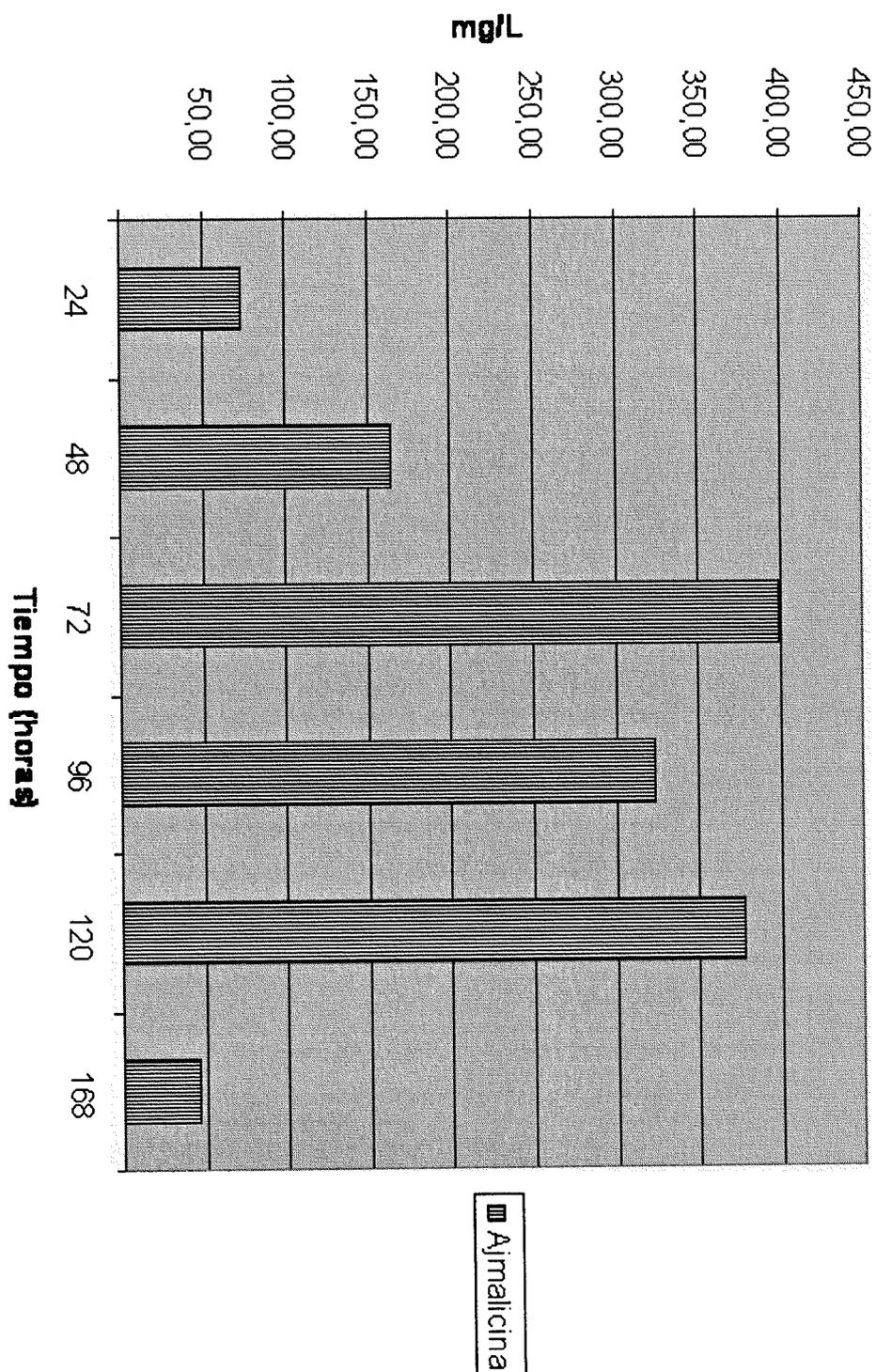


FIG. 13



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 992

② Nº de solicitud: 200802437

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12P 17/10 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KOMARAI AH, P. et al.: "Enhanced Production of Antimicrobial Sesquiterpenes and Lipoxygenase Metabolites in Elicitor-Treated Hairy Root Cultures of Solanum tuberosum", Biotechnol. Lett. (2003), vol. 25, pp.: 593-597, todo el documento.	1-26
A	VÁZQUEZ-FLOTA, F. et al.: "Catharantine and Ajmalicine in Catharanthus roseus Hairy Root Cultures. -Medium Optimization and Elicitation-", Plant Cell. Tissue and Organ Culture (1994), vol. 38, pp.: 273-279, todo el documento.	1-26
A	GANTET, P. et al.: "Necessity of a Functional Octadecanoic Pathway for Indole Alkaloid Synthesis by Catharanthus roseus Cell Suspensions Cultured in an Auxin Starved Medium", Plant Cell Physiol. (1998), vol. 39 (2), pp.: 220-225, todo el documento.	1-26
A	BURNETT, R.J. et al.: "Expression of a 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Gene from Camptotheca acuminata Is Differentially Regulated by Wounding and Methyl Jasmonate", Plant Physiol. (1993), vol. 103, pp.: 41-48, todo el documento.	1-26

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

31.03.2010

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	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	KOMARAI AH, P. et al.: "Enhanced Production of Antimicrobial Sesquiterpenes and Lipoxygenase Metabolites in Elicitor-Treated Hairy Root Cultures of <i>Solanum tuberosum</i> ", <i>Biotechnol. Lett.</i> (2003), vol. 25, pp.: 593-597, todo el documento.	--
D02	VÁZQUEZ-FLOTA, F. et al.: "Catharantine and Ajmalicine in <i>Catharanthus roseus</i> Hairy Root Cultures. -Medium Optimization and Elicitation-", <i>Plant Cell. Tissue and Organ Culture</i> (1994), vol. 38, pp.: 273-279, todo el documento.	--
D03	GANTET, P. et al.: "Necessity of a Functional Octadecanoic Pathway for Indole Alkaloid Synthesis by <i>Catharanthus roseus</i> Cell Suspensions Cultured in an Auxin Starved Medium", <i>Plant Cell Physiol.</i> (1998), vol. 39 (2), pp.: 220-225, todo el documento.	--
D04	BURNETT, R.J. et al.: "Expression of a 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Gene from <i>Campotheca acuminata</i> Is Differentially Regulated by Wounding and Methyl Jasmonate", <i>Plant Physiol.</i> (1993), vol. 103, pp.: 41-48, todo el documento.	--

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 alcaloides indólicos mediante la adición combinada de jasmonato de metilo y ciclodextrinas a un medio de cultivo que contiene células de *Catharanthus roseus*. Según la solicitud, la adición simultánea al medio de cultivo de jasmonato de metilo y ciclodextrinas tiene un efecto sinérgico sobre la producción de indoles.

En el estado de la técnica anterior (D01-D04) se han encontrado referencias al efecto estimulador del metil jasmonato (sin ciclodextrinas) sobre la producción de indoles. En D01 se ha descrito el efecto estimulador conjunto de metil jasmonato y ciclodextrinas sobre la producción de sesquiterpenos y de metabolitos de la lipooxigenasa. Sin embargo, no parece obvio para un experto en la materia llegar al objeto de la invención tomando como punto de partida lo conocido del estado de la técnica anterior.

Es por todo lo anterior que se considera que la solicitud cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva.