

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 553**

51 Int. Cl.:

**C12P 5/00** (2006.01)

**C12P 17/04** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/04** (2006.01)

**A01H 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2014 PCT/IB2014/002638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15082978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2014 E 14835563 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3077523**

54 Título: **Producción de tpsigarginas por cultivo en suspensión de células de *Thapsia***

30 Prioridad:

**02.12.2013 US 201361910919 P**

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

**18.02.2021**

73 Titular/es:

**PHYTON HOLDINGS, LLC (100.0%)  
3909 Hulen St.  
Fort Worth, TX 76107, US**

72 Inventor/es:

**GORR, GILBERT;  
HECKENMÜLLER, HARALD;  
WILKE, JENS, STEFAN;  
ULLISCH, DAVID, ALEXANDER y  
SANKAR-THOMAS, YANTREE, DEVI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 806 553 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción de tapsigarginas por cultivo en suspensión de células de *Thapsia*

5 La presente divulgación se refiere a un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; y (b) recuperar una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a). La presente divulgación se refiere además a un cultivo celular en suspensión que comprende células vegetales del género *Thapsia*, en el que las células vegetales son capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina y a una biomasa de células vegetales que comprende células vegetales del género *Thapsia* obtenidas de dicho cultivo celular en suspensión.

15 Las plantas contienen una amplia gama de compuestos químicos incluyendo productos farmacéuticos. En muchos casos, tales metabolitos secundarios se han investigado para encontrar una actividad farmacéutica. El ejemplo más destacado es el compuesto anticancerígeno paclitaxel, que se expresa por miembros del género *Taxus*. Desde hace muchos años, se comercializan productos que contienen paclitaxel como principio farmacéutico activo. Se ha mostrado que el paclitaxel destruye células humanas con alta proliferación (el crecimiento celular rápido es característico de muchos tumores) eficazmente.

20 Las tapsigarginas que se producen de manera natural, que pertenecen a la clase química de lactonas sesquiterpénicas, se han investigado para determinar su actividad inductora de muerte celular. Se ha encontrado que miembros de la familia de tapsigargina de lactonas sesquiterpénicas actúan como inductores de apoptosis de una manera independiente de la proliferación. Se descubrió que la tapsigargina (figura 1), un miembro distinto de la familia de tapsigargina, es un inhibidor específico de la familia de ATPasa de transporte de calcio en el retículo sarcoendoplásmico (SERCA), sugiriendo así un posible uso en la lucha contra el cáncer. Con el fin de dirigir la tapsigargina a células cancerosas, tales como por ejemplo células de cáncer de próstata, puede conjugarse con péptidos que actúan como sustratos selectivos para enzimas proteolíticas específicas de células cancerosas, tales como por ejemplo el antígeno específico de próstata (PSA) [SB Christensen *et al.* 2009, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry; 9: 276-294]. Un denominado profármaco de este tipo que comprende tapsigargina como compuesto citotóxico está actualmente en desarrollo clínico.

35 Los miembros de la familia de tapsigargina se aíslan habitualmente de plantas del género *Thapsia*, tales como por ejemplo *Thapsia garganica*, *Thapsia transtagana* y *Thapsia villosa* o cualquiera de las plantas de *Thapsia* mencionadas en la tabla 2. La distribución de tapsigarginas en los diferentes miembros del género *Thapsia* podría variar. El compuesto más relevante, la tapsigargina, se ha aislado originalmente de *Thapsia garganica* pero se ha identificado en otros miembros del género *Thapsia* también.

40 En la actualidad, las plantas de *Thapsia garganica* son la única fuente comercialmente razonable para el compuesto tapsigargina porque, debido a la compleja estructura química de este compuesto, no puede sintetizarse químicamente a un precio económicamente razonable. Cultivos *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios valiosos derivados de plantas se han reconocido desde hace mucho tiempo como una fuente alternativa. La escalabilidad de los cultivos *in vitro* permitiría el suministro comercial de un compuesto dado en grandes cantidades de una manera sostenible e independiente del entorno natural.

45 Jäger *et al.* [Jäger *et al.* 1993; Plant Cell Reports: 12, 517-520] investigaron especies de *Thapsia* cultivadas *in vitro* como fuente alternativa para la producción de tapsigarginas. Cuando investigaron material vegetal *in vitro* diferenciado cultivado sobre medios sólidos, es decir, embriones, brotes y raíces cotiledonarios verdes, los autores identificaron las tapsigarginas pentaóxigenadas nortrilobolido y trilobolido en dicho material vegetal. Sin embargo, no se han identificado tapsigarginas hexaóxigenadas. Véase también Smitt *et al.* 1996 [Smitt, UW, Jäger, AK, y Nyman, U; XXIV *Thapsia garganica* L.: In vitro culture, somatic embryogenesis, and the production of Thapsigargin; en: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 37; Medicinal and Aromatic Plants IX (ed. por YPS Bajaj); Springer-Verlag Berlín Heidelberg 1996].

55 Además, cuando se usa otro material *in vitro* tal como callos, conglomerados proembriogénicos o embriones en estadio globular cultivados o bien sobre medio sólido o bien en cultivo en suspensión, estos autores no identificaron en absoluto lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina.

60 Por tanto, a pesar de que se ha invertido mucho esfuerzo en métodos para establecer cultivos de células vegetales para la producción de tapsigarginas, hasta ahora no existe ningún método que permita la producción económica y sencilla de estos compuestos a partir de cultivos de células vegetales, particularmente cultivos adecuados para enfoques a gran escala. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de proporcionar tales métodos y tales cultivos celulares.

65 Esta necesidad se aborda mediante la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona diversos métodos de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina a partir de un cultivo de células vegetales. Un objetivo de la invención es obtener cantidades comercialmente significativas del producto final a partir de cultivos en suspensión.

La invención proporciona por tanto un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células vegetales son células no embriogénicas y en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, y en el que las células no embriogénicas se seleccionan del grupo de células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas; y (b) recuperar una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

Las células vegetales son células de *Thapsia*. Preferiblemente, las células vegetales se seleccionan del grupo que consiste en células de *Thapsia garganica*, *Thapsia villosa*, *Thapsia transtagana*, *Thapsia gymnesica*, *Thapsia maxima*, *Thapsia decussate*, *Thapsia laciniata*, incluyendo las subespecies/variedades *Thapsia garganica* ssp. *decussata* var. *Angusta*, *Thapsia villosa* var. *dissecta*, *Thapsia villosa* var. *microcarpa* y *Thapsia villosa* var. *Stenoptera*. Incluso más preferiblemente, las células son células indiferenciadas, células desdiferenciadas o células meristemáticas o mezclas de las mismas, pero no células embriogénicas.

Se prefiere además que las células vegetales se cultiven en un medio de crecimiento. Más preferiblemente, el medio de crecimiento es capaz de inducir un crecimiento de al menos el 50% en una semana. Alternativa o adicionalmente, las células vegetales se cultivan en un medio de producción. Incluso más preferiblemente, las células vegetales se cultivan en un medio de crecimiento y luego se cultivan posteriormente en un medio de producción. Preferiblemente, los medios de crecimiento y de producción son diferentes. Se prefiere además que el medio de crecimiento no comprenda el regulador del crecimiento vegetal 2,4-D y/o que el medio de producción no comprenda el regulador del crecimiento vegetal 2,4-D.

## Breve descripción de las figuras

Las figuras muestran:

Figura 1: estructura general del núcleo de lactonas sesquiterpénicas hexaoxigenadas de la familia de tapsigargina, para el resumen detallado de los sustituyentes R1 y R2 véase la tabla 1.

Figura 2: estructura molecular de tapsigargina.

Figura 3: se detectaron espectros de UPLC-EM/EM de muestras de biomasa de *Thapsia garganica* derivadas de cultivo en suspensión de células no embriogénicas y patrón de tapsigargina analizados por UPLC/EM. Dos iones hijos (gráfico primero (patrón) y tercero (muestra)  $m/z = 491$  y gráfico segundo (patrón) y cuarto (muestra)  $m/z = 551$ ) obtenidos del ion madre de tapsigargina ( $m/z = 668$ ;  $M+NH_4^+$ ) se detectaron por encima del nivel de ruido en muestras derivadas de cultivo en suspensión de células no embriogénicas.

## Descripción detallada

La presente invención se refiere a un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células vegetales son células no embriogénicas y en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, y en el que las células no embriogénicas se seleccionan del grupo de células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas; y (b) recuperar una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

La presente divulgación también proporciona un cultivo celular en suspensión que comprende células vegetales del género *Thapsia*, en el que las células vegetales son capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina y en el que las células vegetales son células no embriogénicas. La presente divulgación proporciona además una biomasa de células vegetales que comprende células vegetales del género *Thapsia* obtenidas del cultivo celular en suspensión de la reivindicación 9, en la que la biomasa de células vegetales comprende células vegetales del género *Thapsia* y en la que las células vegetales son capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina y en la que las células vegetales son células no embriogénicas.

El término "lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina", usado de manera intercambiable en el presente documento con el término "tapsigarginas", se refiere a cualquier miembro de la superfamilia de guaianólidos que comprende un núcleo de  $2\beta,3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -hexaoxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido, es decir, las tapsigarginas hexaoxigenadas (figura 1), o un núcleo de  $3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -pentaóxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido, es decir, las tapsigarginas pentaóxigenadas. Un rasgo característico de las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina es el grupo  $7\beta$ -hidroxilo que da como resultado una trans-anelación del anillo de lactona. Los miembros no limitativos

de la familia de tapsigargina son las tapsigarginas hexaoxigenadas que difieren en la estructura de los grupos de acilo unidos a O(2) y O(8) como tapsigargina (figura 2), tapsigargicina, tapsitranstagina, tpsivillosina A, tpsivillosina B, tpsivillosina C, tpsivillosina D, tpsivillosina E, tpsivillosina G, tpsivillosina H, tpsivillosina I, tpsivillosina J y tpsivillosina K y las tapsigarginas pentaoxigenadas que difieren en la estructura de los grupos acilo unidos a O(8) como trilobolida, nortrilobolida y tpsivillosina F [Christensen *et al.* 1997; 129-167; en Progress in the Chemistry of Organic Natural Compounds; Ed. Herz, Kirby, Moore, Steglich y Tamm; Springer-Verlag Viena; ISBN 3-211-82850-8].

Tabla 1: Lactonas sesquiterpénicas a modo de ejemplo de la familia de tapsigargina. Los números de registro CAS asignados por Chemical Abstracts Service se indican cuando estén disponibles. Oct = ácido octanoico, But = ácido butírico, Hex = ácido hexanoico, 2-MeBut = ácido 2-metilbutírico, 6-MeOct = ácido 6-metiloctanoico, Sen = ácido seneciico, Ang = ácido angélico, 6-MeHep = ácido 6-metilheptanoico, iVal = ácido isovalérico ácido 3-metilbutanoico, según Christensen *et al.* 2009 [SB Christensen *et al.* 2009, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry; 9: 276-294]

Nombre (tapsigarginas hexaoxigenadas)	N.º de reg. CAS/(patrón de sustitución)
Tapsigargina	67526-95-8 / (R <sup>1</sup> = Oct / R <sup>2</sup> = But)
Tapsigargicina	67526-94-7 / (R <sup>1</sup> = Hex / R <sup>2</sup> = But)
Tapsitranstagina	81127-21-1 / (R <sup>1</sup> = iVal / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Tpsivillosina A	81127-16-4 / (R <sup>1</sup> = Ang / R <sup>2</sup> = Sen)
Tpsivillosina B	81127-17-5 / (R <sup>1</sup> = Ang / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Tpsivillosina C	- / (R <sup>1</sup> = Oct / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Tpsivillosina D	- / (R <sup>1</sup> = 6-MeOct / R <sup>2</sup> = Sen)
Tpsivillosina E	81127-19-7 / (R <sup>1</sup> = 6-MeOct / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Tpsivillosina G	- / (R <sup>1</sup> = 6-MeHep / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Tpsivillosina H	- / (R <sup>1</sup> o R <sup>2</sup> = Ang o Sen)
Tpsivillosina I	94567-55-2 / (R <sup>1</sup> = Ang / R <sup>2</sup> = But)
Tpsivillosina J	- / (R <sup>1</sup> = iVal / R <sup>2</sup> = But)
Tpsivillosina K	- / (R <sup>1</sup> = Sen / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Trilobolida	50657-07-3 / (R <sup>1</sup> = Desoxi / R <sup>2</sup> = 2-MeBut)
Nortrilobolida	136051-63-3 / (R <sup>1</sup> = Desoxi / R <sup>2</sup> = But)
Tpsivillosina F	- / (R <sup>1</sup> = Desoxi / R <sup>2</sup> = Sen)

Preferiblemente, la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina es una lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina capaz de producirse a partir de una célula de *Thapsia*. Incluso más preferiblemente, la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina capaz de producirse a partir de una célula de *Thapsia* es el compuesto tpsigargina.

También se prefiere que la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina tenga actividad terapéutica, o que pueda modificarse para producir compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos se caracterizan porque comprenden una lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina que presenta actividad terapéutica fusionada con un péptido de direccionamiento tal como se describe por ejemplo en el documento [US 7.468.345]. La lactona sesquiterpénica de la propia familia de tapsigargina puede presentar actividad terapéutica y puede dirigirse a un determinado entorno en el cuerpo humano o animal mediante fusión a un péptido de direccionamiento que se escinde específicamente en dicho entorno del cuerpo humano o animal mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteasa.

El término “que comprende”, tal como se usa en el presente documento, indica que pueden incluirse etapas y/o componentes adicionales además de las etapas y/o componentes mencionados específicamente. Sin embargo, este término también abarca que la materia objeto reivindicada consiste exactamente en las etapas y/o componentes mencionados.

Según la presente invención, se cultivan células que producen lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina para producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, tal como se definió anteriormente. El término “células que producen lactonas sesquiterpénicas de la familia tpsigargina” se refiere a cualesquiera células capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tpsigargina en al menos un conjunto de condiciones de cultivo. Según la presente invención, las “células que producen lactonas sesquiterpénicas de la familia de tpsigargina” son células que producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tpsigargina en una cantidad detectable en las condiciones de cultivo tal como se definen en el método de la invención.

Según el método de la invención, el cultivo celular comprende células del género *Thapsia*. Las plantas del género *Thapsia* incluyen, sin limitación *Thapsia garganica*, *Thapsia villosa*, *Thapsia transtagana*, *Thapsia gymnesica*, *Thapsia maxima*, *Thapsia decussate*, *Thapsia laciniata*, incluyendo la subespecie/variedades *Thapsia garganica* ssp. *decussata* var. *angusta*, *Thapsia villosa* var. *dissecta*, *Thapsia villosa* var. *microcarpa* y *Thapsia villosa* var. *stenoptera*, tal como se muestra en la tabla 2 a continuación. En una realización preferida del método de la invención, se seleccionan las células vegetales del cultivo del grupo que consiste en células de *Thapsia garganica*, células de *Thapsia gymnesica* y células de *Thapsia villosa*. En una realización más preferida del método de la invención, el cultivo

celular comprende células de *Thapsia garganica*.

Tabla 2: Especies celulares a modo de ejemplo útiles para la producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina

5

Género	Especie a modo de ejemplo	Subespecie/variedades a modo de ejemplo
<i>Thapsia</i>	<i>T. garganica</i>	
	<i>T. villosa</i>	
	<i>T. transtagana</i>	
	<i>T. gymnesica</i>	
	<i>T. maxima</i>	
	<i>T. decussata</i>	
	<i>T. laciniata</i>	
	<i>T. garganica</i>	<i>ssp. decussata var. angusta</i>
	<i>T. villosa</i>	<i>Var. dissecta</i>
		<i>Var. microcarpa</i>
		<i>Var. stenoptera</i>

Por ejemplo, las células en un mismo cultivo celular en suspensión pueden ser de una o más especies, subespecies, variedades o cepas. Preferiblemente, las células son de una especie, más preferiblemente de una subespecie, incluso más preferiblemente de una variedad y lo más preferiblemente de una cepa.

10

El tejido vegetal usado para iniciar el cultivo celular en suspensión puede ser cualquier tejido vegetal, preferiblemente un tejido seleccionado basándose en, por ejemplo, la capacidad de favorecer la producción de una o más lactonas sesquiterpénicas particulares de la familia de tapsigargina. Ejemplos no limitativos de tejido para su uso en el inicio del cultivo en suspensión son células obtenidas de partes de plantas, tales como por ejemplo raíces, hojas, tallos, meristemos o células obtenidas de un callo previamente formado, preferiblemente de material de callo desmenuzable. Las células vegetales pueden ser células obtenidas directamente de una planta o células crioconservadas.

15

El método incluye una etapa de cultivar el cultivo en suspensión en un medio nutriente. El método también puede incluir más de una etapa de cultivar el cultivo en suspensión en un medio nutriente.

20

Según la presente invención, se emplea un medio nutriente. El término "medio nutriente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un medio que es adecuado para el cultivo de callos de células vegetales y/o cultivos en suspensión. El término "medio nutriente" abarca tanto "medio de crecimiento" como "medio de producción". El término "medio de crecimiento" se refiere a un medio nutriente que favorece el crecimiento de las células cultivadas. En una realización preferida, el medio de crecimiento proporciona un aumento del crecimiento de al menos el 50% en una semana. Preferible pero no exclusivamente, el aumento del crecimiento se determina basándose en el peso seco. Más preferiblemente, el aumento del crecimiento se determina en peso fresco. Un "medio de producción", según la presente invención, es un medio nutriente que favorece la producción de una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina. Se apreciará que el crecimiento también puede producirse en un medio de producción y que la producción puede tener lugar en un medio de crecimiento, de manera que el medio de crecimiento y el de producción pueden ser idénticos. Más preferiblemente, sin embargo, se elige un medio de producción que favorece la producción de compuestos objetivo en mayor grado que el medio de crecimiento empleado.

25

30

Se sabe bien en la técnica que el crecimiento celular se favorece generalmente por una razón equilibrada o relativamente baja de componentes de carbono con respecto a inorgánicos tales como nitrógeno y fosfato, mientras que el crecimiento celular está limitado por una razón relativamente alta de carbono con respecto a componentes inorgánicos. En consecuencia, el medio de producción puede utilizar condiciones limitantes del crecimiento, por ejemplo, una elevada razón de componentes de carbono con respecto a inorgánicos, para promover la producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina en contraposición a crecimiento celular [véase, por ejemplo, Majerus F. & Pareilleux A., "Alkaloid accumulation in Ca-alginate entrapped cells of *Catharanthus roseus*: Using a limiting growth medium", *Plant Cell Reports* (1986) 5: 302-305].

35

40

Los medios nutrientes están bien establecidos en la técnica y pueden basarse, por ejemplo, en sales basales de Murashige y Skoog (MS), sales basales de Schenk y Hildebrandt (SH) o una composición de compuestos según Gamborg (B5).

45

Los medios de producción a modo de ejemplo (PM) incluyen, pero no se limitan, a medios que contienen una base de sal (por ejemplo, MS o SH), más macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y una fuente de carbono, preferiblemente sacarosa.

50

Las cantidades preferidas de sacarosa que van a emplearse están entre el 0,01% y el 10%, más preferiblemente entre el 0,05 y el 8,%, más preferiblemente entre el 0,5 y el 6%, tal como por ejemplo entre el 1% y el 4% y lo más preferiblemente la cantidad es de aproximadamente el 3%. La sacarosa puede obtenerse de, por ejemplo, Sigma

Aldrich, Carl Roth y/o VWR. Las cantidades preferidas de nitrógeno que van a emplearse están entre el 0,1% y el 10%, más preferiblemente entre el 0,5% y el 5%, tal como por ejemplo entre el 1% y el 3% y lo más preferiblemente el 2,63%. Puede obtenerse nitrógeno a partir de nitrato, amonio y aminoácidos.

- 5 Los medios de crecimiento a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan, a medios que contienen una base de sal (por ejemplo, MS o SH o B5), más una fuente de carbono, preferiblemente sacarosa.

10 Las cantidades preferidas de sacarosa que van a emplearse están entre el 0,01% y el 6%, más preferiblemente entre el 0,1 y el 5%, tal como por ejemplo entre el 1% y el 3% y lo más preferiblemente la cantidad es de aproximadamente el 2%. La sacarosa puede obtenerse de, por ejemplo, Sigma Aldrich, Carl Roth y/o VWR. Las cantidades preferidas de nitrógeno que van a emplearse están entre el 0,1% y el 10%, más preferiblemente entre el 0,5% y el 5%, tal como, por ejemplo, entre el 1% y el 3% y lo más preferiblemente el 2,63%. Puede obtenerse nitrógeno a partir de nitrato, amonio y aminoácidos.

- 15 Por tanto, un medio de crecimiento preferido contiene una base de sal (por ejemplo, MS o SH o B5), más el 2% de sacarosa.

20 Los cultivos en suspensión que producen lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina son capaces de tasas de crecimiento rápido y altas densidades celulares cuando se usan nutrientes y condiciones de reacción adecuados. Un experto habitual en la técnica puede incorporar, modificar y manipular fácilmente las condiciones de los medios en vista de la orientación proporcionada en el presente documento y disponible en la técnica para lograr un rendimiento óptimo, que puede variar entre líneas celulares.

25 Se sabe que la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión de plantas está influida por reguladores del crecimiento vegetal, asimismo, en el medio de cultivo para la producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, omitir o reducir el contenido de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal puede mejorar la producción. La mejora de la producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina mediante reguladores de crecimiento vegetal seleccionados puede confirmarse experimentalmente por el experto en la técnica sin más dilación.

30 La velocidad de producción de tapsigarginas está determinada no por una única etapa limitante de la velocidad, sino por una compleja interacción entre una pluralidad de factores limitantes. El alivio de uno cualquiera de los factores limitantes potenciará la producción de tapsigarginas, aunque la magnitud de la potenciación dependerá de las condiciones de cultivo particulares, que determinan los efectos limitantes relativos de otras etapas en la producción de tapsigarginas una vez que se haya aliviado una limitación particular. Las condiciones de cultivo que afectan a la interacción entre diversos factores limitantes incluyen: la composición genética de las células; la composición del medio de cultivo y la temperatura.

40 Los reguladores del crecimiento vegetal incluyen una amplia variedad de sustancias fácilmente conocidas de la bibliografía general de plantas. De estos, los reguladores de crecimiento particularmente adecuados para cultivos en suspensión de *Thapsia* incluyen, sin limitarse a, compuestos similares a citocina y/o auxina, por ejemplo, ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido naftalenoacético (NAA), picloram, dicamba, bencilaminopurina, cinetina, zeatina, tidiazurón y ácido indolacético. Los aminoácidos incluyen cualquier aminoácido natural o sintético utilizado por las células tal como glutamina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estos pueden usarse individualmente o en cualquier combinación. Preferiblemente, se emplea una combinación de dicamba, bencilaminopurina y tidiazurón, tal como se muestra en los ejemplos adjuntos.

50 Como regulador del crecimiento vegetal, se conoce el ácido 2,4-diclorofenoxiacético por su impacto sobre la iniciación de la embriogénesis en cultivos en suspensión de *Thapsia*, medios nutrientes libres de ácido 2,4-diclorofenoxiacético son los más preferidos, con el fin de mantener las células vegetales en un estado no embriogénico.

55 También es deseable reducir o evitar el pardeamiento oxidativo en el cultivo celular. Por tanto, pueden añadirse agentes contra el pardeamiento para inhibir la oxidación de exudados fenólicos. Preferiblemente, los cultivos en suspensión son células indiferenciadas, que son menos susceptibles al pardeamiento que las células embrionarias.

60 A continuación, se proporcionan intervalos de concentración sugeridos para estos componentes del medio, pero la optimización de rutina puede demostrar condiciones preferidas fuera de estos intervalos para líneas celulares particulares y/o condiciones de cultivo particulares. Todas las concentraciones se refieren a valores iniciales medios en el medio extracelular después de la adición. Las concentraciones en disoluciones de alimentación y, por tanto, localmente, las concentraciones en contacto con las células podrían ser superiores a las indicadas. Pueden añadirse preparaciones que contienen material celular basándose en la concentración de un constituyente específico de la preparación o como una fracción del volumen de cultivo.

65 Pueden usarse reguladores del crecimiento vegetal en concentraciones de aproximadamente 0,001  $\mu\text{mol/l}$  a aproximadamente 2  $\text{mmol/l}$ , preferiblemente de aproximadamente 0,01  $\mu\text{mol/l}$  a aproximadamente 1  $\text{mmol/l}$ .

Pueden usarse aminoácidos en concentraciones de aproximadamente 1  $\mu\text{mol/l}$  a aproximadamente 20  $\text{mmol/l}$ , preferiblemente de aproximadamente 10  $\mu\text{mol/l}$  a aproximadamente 10  $\text{mmol/l}$ .

5 Usando estas concentraciones sugeridas como guía, la optimización rutinaria puede discernir qué componente, o combinación de componentes, y qué concentraciones, incluyendo concentraciones más allá de las sugerencias anteriores, son útiles para maximizar la producción de lactonas sesquiterpénicas de la de familia de tapsigargina.

10 Las células pueden cultivarse en primer lugar en un medio de crecimiento, y luego las células pueden cultivarse en un medio de producción que es diferente del medio de crecimiento. El medio de crecimiento también comprende fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico tal como un aminoácido. Cuando las células se transfieren de un medio de crecimiento a un medio de producción, el medio de producción tiene preferiblemente un nivel superior de fuente de carbono y/o razón de C:N, por ejemplo, una mayor concentración de un sacárido. El medio de producción también comprende preferiblemente fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico tal como un aminoácido. Otros componentes del medio nutriente pueden introducirse en el cultivo después de que las células y el medio se pongan en contacto por primera vez. En una realización, estos componentes, tal como un sacárido adicional, se suministran en una corriente de alimentación de manera intermitente o continua según sea necesario.

20 Se apreciará que el método de la invención puede incluir una o más etapas de cultivo de las células en un medio de crecimiento y/o una o más etapas de cultivo de las células en un medio de producción.

25 Las condiciones generales de cultivo celular se conocen bien en la técnica y se sabe que el efecto deseado, por ejemplo, crecimiento o producción, puede lograrse manipulando las condiciones de los medios descritas anteriormente añadiendo, eliminando o cambiando la concentración de uno o más nutrientes u otros agentes. Además de modificar los componentes del medio, también pueden modificarse otras condiciones de reacción para obtener el resultado deseado, por ejemplo, manipulando condiciones que incluyen, pero no se limitan a, la temperatura y el pH, o manipulando cualquier combinación de estas condiciones.

30 Por ejemplo, el intervalo de temperatura puede ajustarse. Las temperaturas preferidas incluyen de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, más preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 35°C e incluso más preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C. Incluso más preferiblemente, las condiciones de cultivo celular comprenden condiciones de agitación, preferiblemente a de aproximadamente 40 rpm a aproximadamente 350 rpm, más preferiblemente de aproximadamente 80 rpm a aproximadamente 200 rpm tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 100 rpm y aproximadamente 150 rpm, incluso más preferiblemente 130 rpm aproximadamente y lo más preferiblemente la frecuencia de agitación es de 130 rpm, en la oscuridad a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente 25°C aproximadamente. Además, se prefiere que los cultivos celulares se subcultiven cada 14 días.

40 El término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, abarca los valores explícitamente mencionados, así como pequeñas desviaciones de los mismos. En otras palabras, una velocidad de agitación de “aproximadamente 130 rpm” incluye, pero no tiene que ser exactamente la cantidad mencionada de 130 rpm sino que puede diferir en varias rpm, incluyendo así, por ejemplo, 131 rpm, 132 rpm, 129 rpm o 128 rpm. El experto es consciente de que tales valores son valores relativos que no requieren una exactitud completa siempre que los valores correspondan aproximadamente a los valores mencionados. En consecuencia, una desviación del valor mencionado de, por ejemplo, el 15%, más preferiblemente del 10% y lo más preferiblemente del 5% está abarcada por el término “aproximadamente”.

45 Además de lo anterior, las operaciones generales del procedimiento pueden ajustarse sin más dilación por el experto en la técnica. El modo de funcionamiento para un procedimiento de cultivo de células vegetales se refiere a la manera en que se añaden o retiran nutrientes, células y productos con respecto al tiempo [Payne, G., *et al.*, 1991; “Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System”, 62-66 & 298-297 (Hanser Publishers)]. Los componentes proporcionados a las células pueden proporcionarse de varias maneras diferentes. Los componentes pueden añadirse en una fase particular de crecimiento tal como retardada, exponencial o estacionaria. Todos los componentes pueden proporcionarse a la vez y luego después de un período adecuado de tiempo, el producto puede recuperarse. En otras circunstancias, no todos los componentes pueden proporcionarse todos a la vez. Más bien, uno o más de ellos puede proporcionarse en diferentes momentos durante el cultivo. Además, las adiciones pueden ser discontinuas o escalonadas en cuanto al momento del contacto inicial y la duración de tal provisión puede variar según los diferentes componentes. Los componentes pueden proporcionarse en una pluralidad de partes. Uno o más componentes pueden suministrarse como parte de disoluciones puestas en contacto por separado con el cultivo celular o porciones del mismo. Las porciones del cultivo en suspensión pueden retirarse en cualquier momento o periódicamente y usarse para crioconservación, propagación celular adicional, producción y/o recuperación. Tales porciones que contienen células pueden exponerse además a nutrientes u otros componentes según se desee. Se describen procedimientos de subcultivo a modo de ejemplo en el presente documento.

65 Puede añadirse medio que contiene nutrientes u otros componentes para reponer una porción o todo el volumen retirado. Las porciones de tal material retirado pueden volver a añadirse al cultivo original, por ejemplo, pueden retirarse células y medio, puede usarse una porción de las células o medio para la recuperación del producto y las

células o medio restantes pueden devolverse. La tasa de suministro de componentes al cultivo o los niveles de diversos componentes en el cultivo pueden controlarse para producir y recuperar ventajosamente el producto. Pueden exponerse porciones separadas del cultivo a los componentes en cualquiera de los modos anteriores y luego combinarse en proporciones determinadas que son ventajosas para la producción. También el contenido celular del cultivo puede ajustarse para producir ventajosamente producto o propagar células. El ajuste del contenido celular puede combinarse ventajosamente con estrategias para ponerse en contacto con nutrientes u otros componentes.

La reposición del medio fresco para las células sometidas a biosíntesis activa también puede potenciar la producción proporcionando nutrientes esenciales que se han agotado. Por ejemplo, Miyasaka *et al.* fueron capaces de estimular células en fase estacionaria de *Salvia miltiorhiza* para producir los metabolitos diterpénicos criptotanshinona y ferruginol simplemente añadiendo sacarosa al medio [Miyasaka *et al.*, "Regulation of Ferruginol and Cryptotanshinone Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Salvia miltiorrhiza*", *Phytochemistry* 25: 637-640 (1986)]. Presumiblemente, la biosíntesis había cesado debido a la limitación de carbono en la fase estacionaria.

El uso de un protocolo de intercambio periódico de medio para el presente método de cultivo puede proporcionar beneficios similares.

Se contempla que la cantidad de medio intercambiado, la frecuencia de intercambio y la composición del medio que se repone pueden variar según diversas realizaciones de la invención. La capacidad de estimular la biosíntesis mediante intercambio de medio tiene importantes implicaciones para el diseño y funcionamiento de un proceso comercial eficiente en el modo continuo, semicontinuo o de alimentación discontinua. En un funcionamiento de "alimentación discontinua", se suministran componentes del medio particulares tales como nutrientes o bien periódicamente o bien de manera continua. En un caso, una porción sustancial, pero no la totalidad del contenido de un cultivo discontinuo se sustituye por medio fresco para la producción y el crecimiento celular continuos; este modo de proceso se asemeja a un funcionamiento de "extracción y llenado repetidos" y se denomina "proceso semicontinuo". Como alternativa, el proceso es "continuo", es decir, se suministra de manera continua medio fresco y el medio efluente se retira de manera continua o repetitiva.

El término "cultivo en suspensión", tal como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células, preferiblemente células estructuralmente indiferenciadas, dispersadas en un medio nutriente líquido. Debido a esta técnica de cultivo, las células no se adhieren al soporte sólido o al recipiente de cultivo. Se entiende fácilmente que los cultivos en suspensión comprenden células en diversas fases de agregación. Se encuentra una gama de tamaños de agregados en las suspensiones oscilando los tamaños entre decenas de micrómetros de diámetro (células individuales o pocas células agregadas) y agregados de muchos milímetros de diámetro, que consisten en muchos miles de células. Los cultivos en suspensión que comprenden tales agregados están abarcados por el método de la presente invención.

Para transferir células a un cultivo en suspensión, por ejemplo, se retiran de un callo y se transfieren a recipientes de cultivo estériles que contienen medio nutriente. El cultivo en suspensión puede iniciarse, por ejemplo, usando un medio nutriente que tuvo éxito en la generación previa de, por ejemplo, un cultivo de callo desmenuzable, preferiblemente sin agentes gelificantes. Sin embargo, se aprecia que los medios optimizados para cultivo en suspensión pueden diferir del óptimo para callos de la misma línea celular. El experto puede determinar medios adecuados sin más dilación.

Alternativa o adicionalmente, el cultivo de células vegetales también puede derivarse de una colección crioconservada de células.

Una vez iniciado, un cultivo en suspensión puede cultivarse adicionalmente, o bien (i) separando las células sustancialmente del medio (normalmente por filtración) y luego reintroduciendo una porción en un medio que contiene nutrientes, o bien (ii) transfiriendo un volumen de caldo de cultivo (células y medio) a un medio que contiene nutrientes, o (iii) permitiendo que las células se sedimenten seguido por la eliminación de cualquier porción de medio ya presente y reintroduciendo medio que contiene nutrientes. Cuando las células y los medios se transfieren volumétricamente, la razón del volumen transferido con respecto al volumen final puede ser preferiblemente de desde aproximadamente el 1% hasta sustancialmente todo el volumen, más preferiblemente de desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 50% e incluso más preferiblemente desde el 10% hasta aproximadamente el 20%. En el caso de que se transfiera todo el volumen, pueden suministrarse nutrientes frescos en forma concentrada, lo que da como resultado solo un pequeño aumento de volumen. El cultivo puede dividirse por tanto en porciones, que pueden emplearse además individualmente para o bien hacer crecer las células adicionalmente, para producir tapsigarginas o bien ambos. Cada porción puede cultivarse, pero no necesariamente, en las mismas condiciones que la otra o como el cultivo original. La duración del crecimiento puede extenderse complementando un medio parcialmente agotado con nutrientes.

Las células que han crecido según el método de la presente invención producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, tal como se definió anteriormente.

El término "uno o más" tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, en el término "una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina" se refiere exactamente a una, pero también a más de una, tal como

por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete y así sucesivamente. Además, el término “uno o más” no define el número real de un tipo de molécula presente, sino que se refiere al número de moléculas distintas de la clase mencionada. Por ejemplo, el término “una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina” se refiere exactamente a una lactona sesquiterpénica, tal como por ejemplo la lactona sesquiterpénica preferida tapsigargina, pero también a más de una, tal como, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc. diferentes lactonas sesquiterpénicas de dicha familia.

En la segunda etapa del método de la presente invención, se recupera(n) la(s) lactona(s) sesquiterpénica (s) de la familia de tapsigargina que se ha(n) producido por las células cultivadas. Las tapsigarginas pueden recuperarse de todo el cultivo o de cualquier porción de cultivo, y pueden recuperarse en cualquier momento durante el cultivo o después de la finalización del periodo de cultivo. Se apreciará que todas las tapsigarginas producidas pueden recuperarse o, preferiblemente, que se recuperan una o más tapsigarginas particulares de interés, tal como por ejemplo solo tapsigarginas hexaoxigenadas, solo tapsigarginas pentaóxigenadas o incluso solo el compuesto individual tapsigargina.

El material celular puede liofilizarse antes del procedimiento de extracción. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica con el fin de preparar material celular o material en suspensión para el método de extracción apropiado. Las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina pueden recuperarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, extracción usando un disolvente polar no acuoso, extracción usando un medio ácido, extracción usando un medio básico, recuperación por absorción de resina donde la resina está o bien dentro o bien fuera del recipiente de cultivo.

En la técnica se conocen bien métodos de aislamiento de las moléculas producidas y comprenden sin limitación etapas de método tales como extracción de células liofilizadas o suspensiones celulares acuosas usando disolventes orgánicos como por ejemplo acetato de etilo, acetona o tolueno, seguido por una separación cromatográfica posterior usando, por ejemplo, cromatografía de líquidos (CL), CL de fase inversa o cromatografía líquido/líquido. Cuando la única lactona sesquiterpénica que va a recuperarse es el compuesto tapsigargina, se prefiere que se recupere usando secuencias de purificación tal como describen por ejemplo Ollivier A *et al.* 2013 [Ollivier, A. 2013; J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.; 926: 6-20] o Rasmussen *et al.* 1978 [Rasmussen U. *et al.* 1978; Acta Pharm Suec.; 15(2);133-40]

Preferiblemente, la recuperación se realiza tal como se describe en los ejemplos adjuntos, es decir, liofilizando la biomasa obtenida en el cultivo celular y homogeneizando la biomasa liofilizada con un disolvente en un molino de perlas, seguido por centrifugación para obtener un extracto en bruto y purificación de los componentes del extracto en bruto tal como se describe en Ollivier A *et al.* 2013 [Ollivier, A. 2013; J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.; 926: 6-20].

Usando células que han crecido en un cultivo en suspensión, ahora es posible la producción en masa de tapsigarginas, por ejemplo, mediante técnicas de cultivo celular semicontinuo o continuo. Según el mejor conocimiento del inventor, actualmente no está disponible un enfoque de cultivo de células vegetales de este tipo para la producción en masa de tapsigarginas. La falta de tales métodos representa actualmente una amenaza para la existencia de plantas del género *Thapsia*, que actualmente son la única fuente viable para el aislamiento de tapsigarginas en grandes cantidades [SB Christensen *et al.* 2009, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry; 9: 276-294]. Esto se debe a que los métodos de síntesis de producción de estos compuestos no están disponibles desde un punto de vista económico, ya que la síntesis requiere al menos 42 etapas.

En una realización preferida del método de la invención, la una o más de las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperada en la etapa (b) comprende un núcleo de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -hexaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido.

Tal como se detalló anteriormente, las lactonas sesquiterpénicas producidas por las respectivas células vegetales pueden ser idénticas, es decir, representan sólo un tipo molecular de lactona sesquiterpénica, o pueden ser una mezcla de diferentes tipos moleculares de lactonas sesquiterpénicas. También tal como se detalló anteriormente, todas estas lactonas sesquiterpénicas producidas de la familia de tapsigargina pueden recuperarse, o sólo compuestos preferidos de este grupo.

Por tanto, según esta realización preferida, se abarca que (i) una de las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperada en la etapa (b) según el método de la invención comprende un núcleo de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -hexaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido, (ii) una pluralidad pero no todas las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperadas en la etapa (b) según el método de la invención comprenden un núcleo de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -hexaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido o (iii) todas las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperadas en la etapa (b) según el método de la invención comprenden un núcleo de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -hexaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido.

En una realización más preferida del método de la invención, la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina

que comprende un núcleo de  $2\beta,3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -hexaoxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido es tapsigargina.

La tapsigargina es la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina más comúnmente usada y su estructura se muestra en la figura 1. Preferiblemente, la tapsigargina es la única lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina recuperada de las células vegetales según el método de la invención.

En otra realización preferida del método de la invención, la una o más de la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina recuperada en la etapa (b) comprende un núcleo de  $3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -pentaóxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido.

Las mismas consideraciones que con respecto a las tapsigarginas hexaoxigenadas también se aplican a las tapsigarginas pentaóxigenadas, es decir, según esta realización preferida, se abarca que (i) una de las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperada en la etapa (b) según el método de la invención comprende un núcleo de  $3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -pentaóxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido, (ii) una pluralidad pero no todas las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperadas en la etapa (b) según el método de la invención comprenden un núcleo de  $3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -pentaóxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido o (iii) todas las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperadas en la etapa (b) según el método de la invención comprenden un núcleo de  $3\alpha,7\beta,8\alpha,10\beta,11\alpha$ -pentaóxigenado- $6\beta,12$ -guaianólido.

A partir de lo anterior es evidente que también puede recuperarse una mezcla de tapsigarginas hexaoxigenadas y tapsigarginas pentaóxigenadas.

Según la invención, las células vegetales son células no embriogénicas, en las que las células no embriogénicas se seleccionan del grupo de células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas.

Según la presente invención, el término "células no embriogénicas" se refiere a células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas. Las células no embriogénicas pueden distinguirse de las células embriogénicas por la presencia de (a) vacuola(s), mientras que las células embriogénicas son altamente citoplásmicas y no vacuoladas.

Los medios y métodos para obtener células no embriogénicas para su uso en el método de la invención se conocen bien en la técnica. Los ejemplos no limitantes para la obtención de células no embriogénicas incluyen, por ejemplo, su derivación a partir de un callo desmenuzable. Para proporcionar un ejemplo, puede emplearse un inóculo de un callo desmenuzable de este tipo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 g/25 ml para preparar cultivos en suspensión no embriogénicos para su uso en el método según la presente invención. Según la presente invención, las células vegetales permanecen no embriogénicas durante el cultivo en suspensión.

El término "material de callo desmenuzable" se refiere a una masa celular sustancialmente indiferenciada cultivada sobre medio solidificado. Los métodos para la formación de material de callo desmenuzable y la propagación de callos se conocen generalmente en la técnica. Los métodos no limitantes para obtener un callo incluyen, por ejemplo, esterilización de superficie del material de fuente vegetal, por ejemplo, lavando a fondo con agua limpia, usando un desinfectante tal como hipoclorito, usando agentes humectantes tales como Tween o Triton, usando antibióticos y/o usando agentes antifúngicos. La formación de callos puede iniciarse a partir de cualquier parte viable de la planta (también denominada en el presente documento "explante vegetal"), preferiblemente a partir del tejido radicular de la planta. El material de fuente vegetal puede ser una parte intacta de la planta, o una porción de la misma. Normalmente, el material de fuente vegetal se coloca en la superficie del medio solidificado y se incuba en un entorno estéril durante aproximadamente 1-12 semanas, hasta que una masa de células indiferenciadas (el material de callo desmenuzable) crece en la proximidad del material de fuente vegetal. Después de establecer el material de callo desmenuzable, las células se cultivan en un medio nutriente según el método de la invención.

Las condiciones de cultivo para la propagación de callos desmenuzables, incluyendo componentes del medio, intervalos de pH, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, macrosales y microsales, vitaminas y reguladores del crecimiento se conocen bien en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 97/44476. En una realización preferida, la propagación de callos desmenuzables comprende el uso de un agente gelificante. Los agentes gelificantes incluyen, por ejemplo, agar, hidrogeles, gelatina y Gelrite®. Puede usarse carbón vegetal para eliminar desechos y compuestos orgánicos no deseados. En otra realización preferida, la propagación de callos desmenuzables comprende la iniciación de material de callos desmenuzables en medio libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. En una realización preferida adicional, la propagación de callos desmenuzables comprende el cultivo de callos desmenuzables en medio libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. El medio de iniciación y propagación de callos desmenuzables para todas las realizaciones de la presente invención puede ser, por ejemplo, un medio sólido o un medio semisólido. Preferiblemente, el medio de iniciación y propagación de callos desmenuzables para todas las realizaciones de la presente invención es un medio sólido.

Pueden usarse técnicas de subcultivo conocidas en la técnica para la transferencia periódica en serie de porciones de callo desmenuzable a una fuente fresca de nutrientes. Preferiblemente, la frecuencia de transferencia de callos es de

entre 4 y 6 semanas.

Tal como se comentó anteriormente en el presente documento, la presente invención proporciona por primera vez un método adecuado para la producción en masa de tapsigarginas. Aunque se han descrito intentos de la técnica anterior de producir tapsigarginas a partir de cultivos celulares (véase Jäger *et al.* 1993 citado anteriormente), no ofrecían el formato ventajoso de producción de tapsigargina a partir de un cultivo en suspensión. Sin querer restringirse a la teoría, los presentes inventores observan que en la técnica anterior se usaron células obtenidas a partir de callos que se indujeron de manera que da como resultado embriogénesis del material vegetal, lo que puede tener un impacto negativo sobre la producción de tapsigarginas por células obtenidas de dicho material vegetal.

Según lo anterior, el método comprende además en una realización preferida adicional que antes de la etapa (a), se lleve a cabo una etapa adicional (a-0), comprendiendo dicha etapa cultivar explantes de la planta de *Thapsia* en medio, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable. El medio para la iniciación del callo desmenuzable para todas las realizaciones de la presente invención puede ser, por ejemplo, un medio sólido o un medio semisólido. Preferiblemente, el medio para la iniciación del callo desmenuzable para todas las realizaciones de la presente invención es un medio sólido.

Las definiciones y realizaciones preferidas proporcionadas en el presente documento se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar.

La presente divulgación proporciona un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; en el que las condiciones de cultivo celular comprenden condiciones de agitación, preferiblemente a 130 rpm, en la oscuridad a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C y en el que los cultivos celulares se subcultivan a intervalos regulares, preferiblemente cada 14 días; y

b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

El medio nutriente puede estar libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (también denominado en el presente documento 2,4-D) es una auxina sintética, es decir, una hormona vegetal, que se emplea comúnmente en la investigación de plantas como suplemento en medios de cultivo de células vegetales, donde, por ejemplo, se usa como regulador del crecimiento para la inducción y el mantenimiento de material de callo y para el cultivo de suspensiones hasta que se vuelven embriogénicas.

Con el fin de evitar la embriogénesis, los cultivos en suspensión se hacen crecer por tanto en medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético según esta realización preferida. En otra realización preferida, los cultivos en suspensión se mantienen en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Según la presente invención, el mantenimiento de cultivos en suspensión se caracteriza por que las células son viables pero no están creciendo significativamente. En una realización preferida adicional, los cultivos en suspensión se propagan en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, se han descrito intentos de la técnica anterior de producir tapsigarginas a partir de cultivos celulares (véase Jäger *et al.* 1993 citado anteriormente), pero no mostraron ninguna producción de tapsigargina a partir de un cultivo en suspensión. De nuevo sin querer restringirse a la teoría, los presentes inventores observan que, en la técnica anterior, se usaron células que se obtuvieron mediante técnicas de cultivo que empleaban la hormona vegetal 2,4-D que da como resultado embriogénesis del material vegetal, lo que puede tener un impacto negativo sobre la producción de tapsigarginas por células obtenidas de dicho material vegetal. Se ha discutido y reconocido el impacto positivo de 2,4-D sobre el inicio de la embriogénesis. La adición de 2,4-D a los medios de cultivo y la embriogénesis así iniciada pueden explicar por qué estos autores identificaron solamente tapsigarginas pentaoxygenadas y estas sólo en fases embrionarias diferenciadas adicionalmente, es decir, fase cotiledonaria, brotes y raíces que han crecido sobre medios sólidos.

En consecuencia, se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales no embriogénicas del género *Thapsia* en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; y

(b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

También se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina,

comprendiendo el método las etapas de:

5 (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; en el que las condiciones de cultivo celular comprenden condiciones de agitación, preferiblemente a 130 rpm, en la oscuridad a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C y en el que los cultivos celulares se subcultivan a intervalos regulares, preferiblemente cada 14 días; y

10 (b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

También se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

15 (a-0) cultivar explantes de plantas de *Thapsia* sobre medio, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable

(a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* obtenidas en la etapa (a-0) en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; y

20 (b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

También se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a-0) cultivar explantes de plantas de *Thapsia* en medio libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable

30 (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* obtenidas en la etapa (a-0) en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; y

(b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

35 También se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

(a-0) cultivar explantes de plantas de *Thapsia* en medio libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable

40 (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* obtenidas en la etapa (a-0) en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; y

45 (b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

También se describe un método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:

50 (a-0) cultivar explantes de plantas de *Thapsia* en medio libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable

55 (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* obtenidas en la etapa (a-0) en un medio nutriente libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina; en el que las condiciones de cultivo celular comprenden condiciones de agitación, preferiblemente a 130 rpm, en la oscuridad a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C y en el que los cultivos celulares se subcultivan a intervalos regulares, preferiblemente cada 14 días; y

60 (b) recuperar las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).

65 La presente divulgación también se refiere a un cultivo celular en suspensión que comprende células vegetales del género *Thapsia*, en el que las células vegetales son capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina. Preferiblemente, estos cultivos celulares en suspensión se cultivan/producen/proporcionan/pueden producirse según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento.

Las definiciones y la realización preferida proporcionadas anteriormente en el presente documento con respecto al método de la invención se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar también a este cultivo celular en suspensión de la presente divulgación.

- 5 Según el mejor conocimiento de los inventores, no está disponible ningún cultivo celular en suspensión de células vegetales del género *Thapsia* en la técnica que sea capaz de producir lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina. Basándose en el método de la presente invención, un cultivo celular en suspensión de este tipo podría proporcionarse por primera vez y es adecuado para la producción en masa de una o más tapsigarginas.
- 10 La presente divulgación se refiere además a una biomasa de células vegetales que comprende células vegetales del género *Thapsia* obtenidas u obtenibles a partir del cultivo celular en suspensión de la presente divulgación, en la que la biomasa de células vegetales comprende células vegetales del género *Thapsia* y en la que las células vegetales son capaces de producir una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina y en la que las células vegetales son células no embriogénicas.
- 15 De nuevo, todas las definiciones y la realización preferida proporcionadas anteriormente en el presente documento con respecto al método de la invención se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar también a esta biomasa de células vegetales de la presente divulgación.
- 20 El término "biomasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere al material biológico que constituye la masa celular del cultivo en suspensión. En otras palabras, cuando las células del cultivo celular en suspensión se separan del medio líquido, se obtiene la biomasa. Preferiblemente, la biomasa, tal como se usa según la presente divulgación, comprende una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina.
- 25 La biomasa de la presente divulgación representa una valiosa fuente de tapsigarginas. La biomasa puede ser una biomasa recién obtenida o puede ser una biomasa que se ha almacenado, por ejemplo, en forma de una muestra congelada o un polvo liofilizado.
- 30 Se apreciará que todas las etapas del método descritas en el presente documento se llevan a cabo en el orden descrito, es decir, la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b). Cuando se incluye una etapa adicional (a-0), esta etapa se lleva a cabo en primer lugar, antes de la etapa (a). En otras palabras, los métodos reivindicados comprenden (o consisten en) una primera etapa (a) y una etapa posterior (b) o, alternativamente, una primera etapa (a-0), una etapa posterior (a) y la tercera etapa (b) posterior a la etapa (a).
- 35 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones.
- 40 En cuanto a las realizaciones caracterizadas en esta memoria descriptiva, en particular en las reivindicaciones, se pretende que cada realización mencionada en una reivindicación dependiente se combine con cada realización de cada reivindicación (independiente o dependiente) de la que depende dicha reivindicación dependiente. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación independiente 1 que menciona 3 alternativas A, B y C, una reivindicación dependiente 2 que menciona 3 alternativas D, E y F y una reivindicación 3 que depende de las reivindicaciones 1 y 2 y que menciona 3 alternativas G, H e I, ha de entenderse que la memoria descriptiva da a conocer inequívocamente realizaciones correspondientes a las combinaciones A, D, G; A, D, H; A, D, I; A, E, G; A, E, H; A, E, I; A, F, G; A, F, H; A, F, I; B, D, G; B, D, H; B, D, I; B, E, G; B, E, H; B, E, I; B, F, G; B, F, H; B, F, I; C, D, G; C, D, H; C, D, I; C, E, G; C, E, H; C, E, I; C, F, G; C, F, H; C, F, I, a menos que se mencione expresamente lo contrario.
- 45 De manera similar, y también en aquellos casos en los que las reivindicaciones independientes y/o dependientes no mencionan alternativas, se entiende que, si las reivindicaciones dependientes se remiten a una pluralidad de reivindicaciones anteriores, cualquier combinación de materia cubierta de ese modo se considera que se da a conocer explícitamente. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación independiente 1, una reivindicación dependiente 2 que se remite a la reivindicación 1 y una reivindicación dependiente 3 que se remite a las reivindicaciones 2 y 1, se deduce que la combinación de la materia según las reivindicaciones 3 y 1 se da a conocer de manera clara e inequívoca como también la combinación de la materia según las reivindicaciones 3, 2 y 1. En el caso de que esté presente una reivindicación dependiente 4 adicional que se refiere a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, se deduce que la combinación de la materia objeto según las reivindicaciones 4 y 1, según las reivindicaciones 4, 2 y 1, según las reivindicaciones 4, 3 y 1, así como según las reivindicaciones 4, 3, 2 y 1 se da a conocer de manera clara e inequívoca.
- 50 Las consideraciones anteriores se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar a todas las reivindicaciones adjuntas. Para dar un ejemplo no limitativo, la combinación de las reivindicaciones 9, 8 y 1 se contempla de manera clara e inequívoca en vista de la estructura de reivindicaciones. Lo mismo se aplica, por ejemplo, a la combinación de las reivindicaciones 9, 8, 7 y 1, etc.
- 60 Los ejemplos ilustran la invención:
- 65

Ejemplo 1: Esterilización de superficie de material vegetal intacto

Se lavaron a fondo raíces de *Thapsia garganica* con agua del grifo. Las raíces se cortaron en pequeños cubos (explantos de plantas) de aprox. 3 x 3 cm. Los explantes de plantas se lavaron a fondo con detergente y en agua corriente durante aproximadamente de 10 a 15 minutos. Se llevó a cabo la esterilización de superficie de los explantes de manera aséptica sumergiendo los explantes en una disolución de alcohol isopropílico (IPA) al 70% (v/v) que contenía 2-3 gotas de Tween 20 durante 1 minuto (agitada suavemente durante este tiempo). Después de eso, los explantes de plantas se trataron en una disolución de NaOCl (2,8 g/100 ml de hipoclorito de sodio) durante de 15 a 30 minutos. Posteriormente se enjuagaron brevemente los explantes con agua destilada estéril de 3 a 4 veces para eliminar todas las trazas de los agentes esterilizantes. Después de la desinfección de la superficie, los explantes se mantuvieron en placas de Petri cubiertas en la cabina de flujo laminar hasta que estuvieron listos para su procesamiento para evitar la deshidratación. Antes de que los explantes se colocaran sobre el medio de cultivo sólido, los extremos cortados de los explantes se retiraron con un bisturí estéril y los explantes se cortaron en trozos más pequeños de un tamaño apropiado (0,5-1 cm).

Ejemplo 2: Inducción de callos embriogénicos en medio sólido que contiene 2,4-D

Los explantes de plantas se pusieron sobre un medio basal sólido modificado de Musharige y Skoog (sal basal de MS de fuerza media, sacarosa al 3%, BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos se incubaron entonces en la oscuridad en una incubadora mantenida a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Después de 6-8 semanas se obtuvo material de callo primario. Los explantes cultivados en medio de MS suplementado con 2,4-D se convirtieron en un callo embriogénico que se desarrolló adicionalmente en diferentes fases de embriones somáticos con el tiempo de cultivo creciente. La frecuencia de transferencia de los callos embriogénicos dependía de la tasa de crecimiento y osciló entre 4-8 semanas.

Ejemplo 3: Inducción de callos desmenuzables en medio sólido libre de 2,4-D

Se pusieron explantes de plantas sobre dos medios basales sólidos modificados diferentes de Gamborg (sal basal B5 de fuerza completa, sacarosa al 2%, picloram 5 mM y BAP 0,01 mM o dicamba 1 mg/l y TDZ 0,22 mg/l). Los cultivos se incubaron entonces en la oscuridad en una incubadora mantenida a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Después de 6-8 semanas se obtuvo material de callo primario. Se estableció material de callo desmenuzable a partir de los explantes cultivados en ambos medios B5 modificados sin 2,4-D después de 4-6 semanas. La frecuencia de transferencia de los callos desmenuzables dependía de la tasa de crecimiento y osciló entre 4-6 semanas.

Ejemplo 4: Iniciación de cultivos en suspensión de *Thapsia garganica*

Para la iniciación de cultivos en suspensión, se transfirió material de callo desmenuzable (aproximadamente 40-60 g/l) al medio líquido modificado B5 libre de 2,4-D tal como se describió anteriormente. Los cultivos en suspensión crecieron en agregados celulares más grandes y se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de cultivo de 50 ml en un agitador rotatorio a 130 rpm en la oscuridad. La temperatura de cultivo era de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pueden aplicarse modificaciones adicionales de los medios, tales como una mayor concentración inicial de sacarosa o una mayor razón de nitrato con respecto a amonio para recibir líneas celulares suspendidas más finas.

Ejemplo 5: Mantenimiento de cultivos en suspensión de *Thapsia garganica*

Para el mantenimiento de las suspensiones, se transfirió biomasa filtrada a vacío (40-60 g/l) a 50 ml de medio líquido fresco modificado B5 libre de 2,4-D tal como se describió anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en un agitador rotatorio a 130 rpm en la oscuridad y se subcultivaron cada 14 días. La temperatura de cultivo era de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos los cultivos establecidos se mantuvieron durante al menos 3 meses.

Ejemplo 6: Extracción de biomasa de *Thapsia garganica*

Se transfirió biomasa de *Thapsia garganica* (o bien material de callo o bien biomasa filtrada a vacío a partir de suspensiones) a nitrógeno líquido directamente después del muestreo para evitar el metabolismo celular intracelular. Para hacer un extracto, se pesaron muestras de biomasa liofilizada y se añadió 15 veces más disolvente. Como disolventes se usó EtoAC, acetona o etanol. Las células se homogeneizaron durante 90 segundos en un molino de perlas y posteriormente se centrifugó esta mezcla durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para el análisis adicional.

Ejemplo 7: Extracción de suspensión

Se liofilizó una muestra de cultivo en suspensión de *Thapsia garganica* y posteriormente se pesó. Se resuspendió el liofilizado en 15 veces el volumen del disolvente. Como disolventes se usó EtoAC, acetona o etanol. Se homogeneizó esta mezcla durante 90 segundos en un molino de perlas y posteriormente se centrifugó durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para el análisis adicional.

Ejemplo 8: Análisis de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina

Se usó el siguiente método para la detección de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina:

Columna:	C18, como por ejemplo Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm; 1,7 $\mu$						
Cromatógrafo:	UPLC, como por ejemplo Waters Acquity UPLC, con bomba binaria						
Disolvente:	A:	tampón acetato de amonio 10 mmol + ácido fórmico al 0,1%					
	B:	acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%					
Gradiente:	Tiempo (min):	0,00	1,50	1,51	4,00	4,10	5,00
	% de disolvente A:	20	20	5	5	20	20
	% de disolvente B:	80	80	95	95	80	80
Tiempo de ejecución:	de	5,00 min					
Volumen de inyección:	de	4 $\mu$ l					
Tiempo retención:	aproximadamente 1,18 min (tapsigargina)						
Detector:	Espectrómetro de masas, como por ejemplo Waters Quattro Premier						
Detección:	ESI+						
Identificación:	Tapsigargina m/z = 668,4 (M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup> / 551,4 (M - OAng) <sup>+</sup> / 491,4 (M - HOAc - OAng) <sup>+</sup>						
Condiciones:	Voltaje del capilar:	2,5 kV					
	Voltaje del cono:	18 V					
	Temperatura de la fuente:	150°C					
	Temp. de desolvatación:	400°C					
	Gas de desolvatación:	900 l/h					
	Gas de cono:	50 l/h					

- 5 Al aplicar estas condiciones a los extractos celulares descritos, por ejemplo, en el ejemplo 7, se identificó tapsigargina claramente en la muestra (véase la muestra de la figura 3) en comparación con un material de referencia (véase el patrón de la figura 3). Para el patrón y la muestra, se observó claramente la fragmentación del ion madre a m/z = 668 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> en iones hijo a m/z = 491 (gráfico superior en el patrón y la muestra) y m/z = 551 (gráfico inferior en el patrón y la muestra).

10

#### Ejemplo 9: Aislamiento de tapsigargina y otras lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina

- 15 Puede aislarse tapsigargina de suspensiones celulares de PCF usando métodos típicos conocidos en la técnica. La extracción inicial de células liofilizadas o suspensiones celulares acuosas usando disolventes orgánicos como, por ejemplo, acetato de etilo, acetona o tolueno, va seguida de una separación cromatográfica posterior usando, por ejemplo, fases estacionarias de fase normal o inversa. Para ejemplos de posibles secuencias de purificación, véase: Ollivier A, Grougnet R, Cachet X, Meriane D, Ardisson J, Boutefnouchet S, Deguin B. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013; 926; 16-20 o Rasmussen U, Brøgger Christensen S, Sandberg F. Acta Pharm Suec. 1978; 15(2);133-40.
- 20

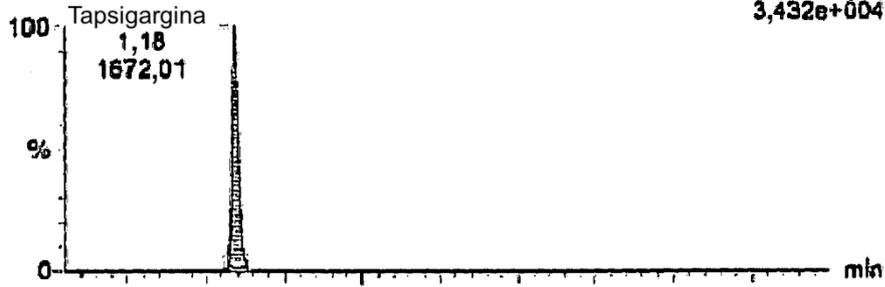
**REIVINDICACIONES**

1. Método de producción de lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, comprendiendo el método las etapas de:
- 5
- (a) cultivar células vegetales del género *Thapsia* en un medio nutriente en un cultivo celular en suspensión, en el que las células vegetales son células no embriogénicas y en el que las células producen una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina, y en el que las células no embriogénicas se seleccionan del grupo de células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas; y
- 10
- (b) recuperar una o más lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina producidas en (a).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la una o más de las lactonas sesquiterpénicas de la familia de tapsigargina recuperadas en la etapa (b) comprenden un núcleo de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -hexaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido.
- 15
3. Método según la reivindicación 2, en el que la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina es tapsigargina.
- 20
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la una o más de la lactona sesquiterpénica de la familia de tapsigargina recuperada en la etapa (b) comprende un núcleo de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11 $\alpha$ -pentaoxigenado-6 $\beta$ ,12-guaianólido.
- 25
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células vegetales se seleccionan del grupo que consiste en células de *Thapsia garganica*, células de *Thapsia gymnesica* y células de *Thapsia villosa*.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además antes de la etapa (a) una etapa adicional de:
- 30
- (a-0) cultivar explantes de plantas de *Thapsia* sobre medio, obteniendo de ese modo material de callo desmenuzable.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio nutriente en la etapa (a) es un medio de crecimiento capaz de inducir un aumento de crecimiento de al menos el 50% en una semana.
- 35
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medio nutriente está libre de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

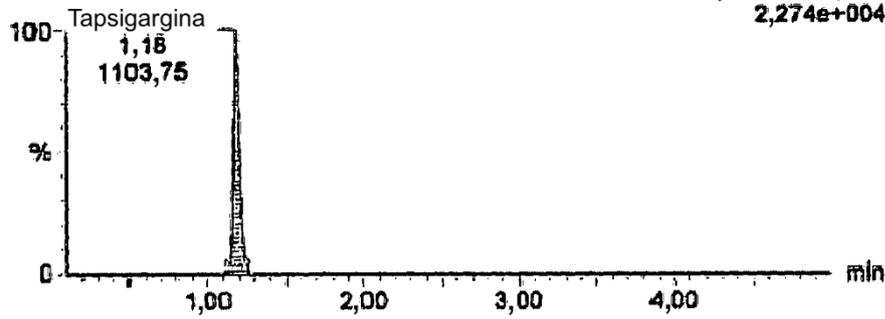


Patrón:

13\_11\_29 Des. est. de tapsi. **2,36myg 1** Alisado(Mn,1x3) F1:MRM de 2 canales, **ES+**  
**668,349 > 491,363**  
**3,432e+004**

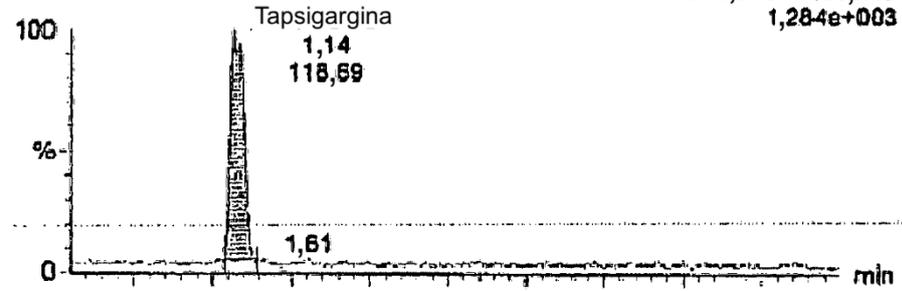


13\_11\_29 Des. est. de tapsi. **2,36myg .1.** Alisado(Mn,1x3) F1:MRM de 2 canales, **ES+**  
**668,349 > 551,357**  
**2,274e+004**



Muestra:

13\_11\_29 Thagar 005-1 Alisado(Mn,1x3) F1:MRM de 2 canales, **ES+**  
**EtoAC** **668,349 > 491,363**  
**1,284e+003**



13\_11\_29 Thagar 005-1 Alisado(Mn,1x3) F1:MRM de 2 canales, **ES+**  
**EtoAC** **668,349 > 551,357**  
**8,973e+002**

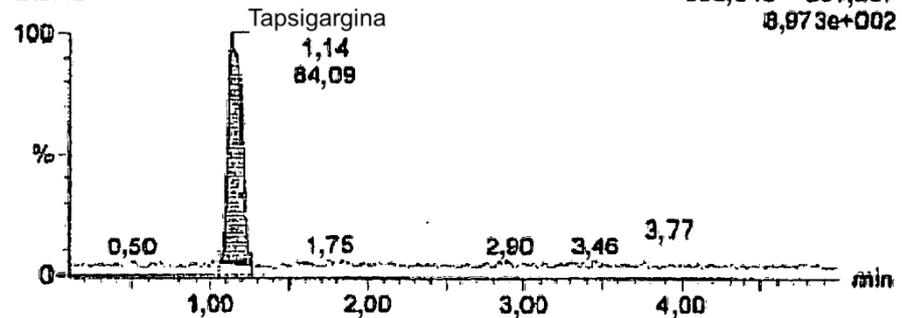


Figura 3