

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 579**

21 Número de solicitud: 202231084

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.12.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.08.2024

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (50.0%)**

Edificio Torre de Control.

Crta. San Vicente del Raspeig, s/n

03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES y

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)

72 Inventor/es:

MATUS PICERO, José Tomás;

BRU MARTINEZ, Roque;

MARTINEZ ESTESO, María José;

MARTINEZ MARQUEZ, Ascensión;

SAMPER HERRERO, Antonio Vicente y

MONTESINOS AZORIN, Juan José

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTILBENOS POR CULTIVOS CELULARES DE UNA PLANTA
DEL GÉNERO *MORUS***

57 Resumen:

Método de obtención de estilbenos por cultivos celulares de una planta del género *Morus*.

La presente invención se refiere a un método de obtención de estilbenos que comprende la adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*, capaces de sintetizar este compuesto y la acumulación extracelular del mismo.

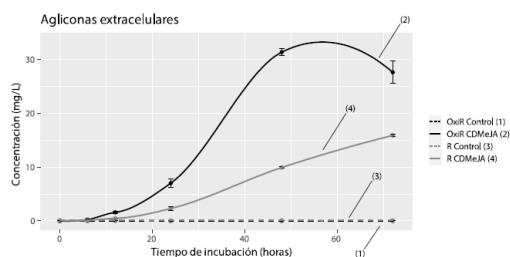


FIG. 1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTILBENOS POR CULTIVOS CELULARES DE UNA PLANTA DEL GÉNERO *MORUS*

5

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la promover la producción de estilbenos por parte de un cultivo celular de una planta del género *Morus*, capaz de sintetizar estos compuestos y la acumulación extracelular de los mismos.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

15 Los estilbenoides son compuestos fenólicos biológicamente activos con un amplio espectro de actividad antibiótica y farmacológica. La producción de este grupo de compuestos se restringe a un pequeño número de especies vegetales distantes filogenéticamente, incluyendo la vid (*Vitis* sp.), la morera (*Morus* sp.) o el cacahuete (*Arachis hypogaea*), entre
20 otros, como mecanismo adaptativo en respuesta a un estrés, como la irradiación de rayos ultravioleta, una infección microbiana, la exposición a metales pesados o tratamientos con ozono. Dentro de este grupo de compuestos cabe destacar el t-resveratrol (tR; trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), el t-piceatanol (tP; 3,3',4',5-tetrahidroxiestilbeno) y el t-oxiresveratrol (tOR; trans-2,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno), unos de los principales constituyentes de los estilbenoides producidos en respuesta al estrés. Los correspondientes isómeros cis- se
25 suelen encontrar en extractos de plantas que producen t-resveratrol y productos derivados. Su presencia puede deberse a la lenta fotoisomerización del isómero trans por irradiación con luz ultravioleta, aunque podría tener un origen biológico, todavía desconocido.

30 En la vid y el cacahuete encontramos tR y tP, mientras que en morera se ha descrito tR y tOR, lo cual indica que la síntesis de estilbenos es especie-dependiente.

En base a estudios epidemiológicos y de laboratorio sobre humanos, animales, células animales en cultivo y ensayos enzimáticos, se ha puesto de manifiesto que los

estilbenoides en general, y el tOR en particular, tienen efectos favorables para la salud, lo que hace deseable su inclusión en la dieta humana y animal. El tR y los extractos de plantas que lo contienen se muestran efectivos en la prevención y terapia de la arteroesclerosis, como agentes antiinflamatorios y como agentes anti-hiperoxidativos. Por su parte, se han descrito actividades farmacológicas del tOR como anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector, antibiótico y antiviral, además de exhibir una potente actividad como inhibidor de la tirosinasa que le proporciona propiedades cosméticas.

Tenido en cuenta el papel beneficioso del tOR y otros estilbenos sobre la salud humana y animal, es importante poder disponer de una fuente biológica adecuada que permita su obtención. Con esta finalidad se han llevado a cabo diversos estudios.

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

En la solicitud internacional WO 9718715 se describe cómo plantas enteras de vid son tratadas con cloruro de aluminio, que actúa como agente elicitor de la síntesis de resveratrol, para aumentar el contenido en resveratrol de la planta y los productos derivados de ella, como la uva, el mosto y el vino. La estimulación de la síntesis de estilbenos ha sido explorada con una diversidad de compuestos de tipo 'elicitor'. Por ejemplo, se ha estudiado cómo suspensiones de células vegetales procedentes de plantas producen resveratrol al ser elicitadas con trozos de paredes celulares de hongos, induciendo la síntesis de resveratrol y su acumulación en el medio de cultivo y también dentro de las células (Liswidowati, et al. 1991. "*Induction of stilbene synthase by Botrytis cinerea in cultured grapevine cells*" Planta 183:307-314).

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

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

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

En otros estudios se probó la posibilidad de estimular la producción de resveratrol mediante el uso de metiljasmonato (MeJA). El metiljasmonato es un derivado activo del ácido jasmónico, que junto con éste, se encuentra dentro de los compuestos que actúan como reguladores de las respuestas de defensa en plantas sometidas a estrés. En este sentido uno de los ensayos más relevantes se cita a continuación:

- El uso combinado de ciclodextrina modificada (doblemente metilada en las posiciones 2 y 6 de cada uno de los restos de glucosilo de la molécula o aleatoriamente metilada, o hidroxipropilada) y jasmonato de metilo, da lugar a un efecto sinérgico de producción extracelular de t-resveratrol en cultivos celulares de células de vid. Así, los niveles de t-resveratrol obtenidos por el tratamiento combinado son muy superiores a la suma de los niveles alcanzados en los tratamientos simples con ciclodextrina modificada o con jasmonato de metilo (Lijavetzky et al. (2008) *Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures*. BMC Res Notes 1:132).

Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que el metil-jasmonato induce la acumulación de la forma glicosilada del resveratrol o piceida en el cultivo de células de vid de forma intracelular, no afectando de forma significativa a la acumulación de las formas libres intra o extracelulares. Asimismo, los estudios realizados hasta la fecha demuestran que el tratamiento combinado de estos elicitores produce un efecto sinérgico en el cultivo

de células de vid de forma extracelular.

Sin embargo, hay mucho menos conocimiento de la forma de producir oxiresveratrol.

- 5 Los cultivos celulares y cultivos de raíces de morera (*Morus alba*) han sido estudiados como una fuente del estilbeno mulberrosido A, que es una forma doblemente glicosilada del oxiresveratrol. La mayor parte del compuesto es intracelular (>95%) y tratamiento con diversos elicitores por separado incluyendo extracto de levadura, metil jasmonato y ácido salicílico, causaron un incremento de 2 a 3 veces de la abundancia intracelular. (Komaikul
10 et al. (2015) *Enhanced mulberroside A production from cell suspension and root cultures of Morus alba using elicitation*, Nat Prod Commun 10:1253-1256).

- Por otra parte, también se ha investigado la producción de oxiresveratrol a partir de la bioconversión enzimática de mulberrosido A obtenido de raíz de *Morus alba* mediante un
15 laborioso proceso de extracción y purificación de mulberrosido A, tratamiento enzimático y posterior purificación del oxiresveratrol liberado (J.-K. Kim et al. (2010) *Biotransformation of mulberroside A from Morus alba results in enhancement of tyrosinase inhibition*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37:631–637).

- 20 Por último, la patente ES2328002 se refiere al uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol por parte de células capaces de sintetizar este compuesto y la acumulación extracelular del mismo. No obstante, a diferencia de la presente invención, no se obtiene oxiresveratrol y además el cultivo celular es de vid.

- 25 Con el conocimiento actual la producción de oxiresveratrol por medios biotecnológicos requiere la implementación de dos procesos. Por un lado, la producción de mulberrosido A intracelular utilizando preferiblemente cultivos celulares de *Morus alba* frente a cultivo de raíces, elicitados preferiblemente con ácido salicílico, seguido de la extracción y
30 purificación. Y, por otro lado, la bioconversión del mulberrosido A en oxiresveratrol por tratamiento enzimático.

Se hace necesario, a la luz de lo anteriormente expuesto, disponer de un método de obtención de oxiresveratrol más eficiente y a ser posible en un solo proceso.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se aplica el tratamiento individual y combinado con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente y con metil-jasmonato, a fin de promover la producción de estilbenos en células de plantas del género *Morus*, como la especie *Morus alba*.

El término “estilbeno” en la presente memoria comprende los compuestos t-resveratrol (tR; trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) y el t-oxiresveratrol (tOR; trans-2,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno), y los correspondientes isómeros cis.

Tomando en consideración el estado de la técnica anteriormente descrito, del tratamiento de las suspensiones celulares de *Morus alba* con elicitores cabría esperar la acumulación aumentada del estilbeno mulberrosido A y de un tratamiento combinado con dos elicitores un incremento sumatorio del mismo. Cabría esperar del uso de ciclodextrinas y metil-jasmonato la acumulación extracelular de resveratrol y que dicha acumulación global de resveratrol en el cultivo consistiera en la suma de las cantidades y formas que se acumulan con los tratamientos individuales.

De forma sorprendente e inesperada, el uso conjunto de ciclodextrinas y metil-jasmonato en cultivos de células de una planta del género *Morus*, descrito en la presente invención:

- a. Da lugar a la producción de dos estilbenos no anticipados por el estado de la técnica que son resveratrol y oxiresveratrol, especialmente oxiresveratrol.
- b. El efecto se da en el tratamiento individual con ciclodextrina pero no en el tratamiento individual con metil-jasmonato.
- c. Tiene un efecto sinérgico sobre la producción de resveratrol y de oxiresveratrol, porque las concentraciones acumuladas de ambos son superiores en el tratamiento combinado que en la suma de los tratamientos individuales.
- d. La acumulación del resveratrol y del oxiresveratrol se realiza de forma extracelular mayoritariamente; este hecho resulta ventajoso, al ser mucho más sencilla la extracción y purificación de estos compuestos si se acumula en el medio de cultivo en vez de intracelularmente (no es necesaria la lisis y posterior eliminación de los restos celulares).
- e. Se generan de forma mayoritaria las formas trans de ambos compuestos (forma de interés frente al cis-resveratrol).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de estilbenos que comprende la adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*.

5

De forma preferida, el estilbeno es resveratrol u oxiresveratrol preferentemente, oxiresveratrol.

De forma más particular, el método comprende:

- a) adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*.
- b) incubación del medio de cultivo celular resultante del paso a).
- c) separación del resveratrol y oxiresveratrol obtenidos en el paso b), del medio de cultivo.

- 15 Una realización preferida de esta invención además comprende la purificación del resveratrol y oxiresveratrol obtenido.

La concentración de metil-jasmonato es de entre 5 y 450 micromoles/por litro de medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de metil-jasmonato es de entre 50 y 150 micromoles/L medio de cultivo y aún más preferiblemente de entre 75 y 125 micromoles/L medio de cultivo.

Las ciclodextrinas se eligen del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) o ciclodextrina hidroxipropilada (CDHA). Tal como se utiliza en esta descripción, el término "ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA)" se refiere a un malto-oligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ y cuyos grupos hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o derivatizados en posiciones aleatorias mediante metilación, portando dichas posiciones grupos químicos tipo metoxi ($\text{CH}_3\text{-O-}$). Tal como se utiliza en esta descripción, el término "ciclodextrina hidroxipropilada (BCDHA)" se refiere a un malto-oligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ y cuyos grupos hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o derivatizados en posiciones aleatorias mediante hidroxipropilación, portando dichas posiciones grupos químicos tipo 2-hidroxipropoxi ($\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{-O-}$).

En una realización particular, dicha BCDMA contiene de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina, identificada como CAVASOL® W7 M (Wacker, Alemania), que posee un peso molecular medio de 1.310. En otra realización particular, dicha BCDHA contiene de 4 a 6 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina, identificada como CAVASOL® W7 HP(Wacker, Alemania), que posee un peso molecular medio de 1.177.

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

En una realización preferida de la invención, las células productoras de resveratrol y oxiresveratrol proceden de la especie *Morus sp.* Entre las especies del género *Morus* se encuentran, por ejemplo: *Morus alba*, *Morus australis*, *Morus celtidifolia*, *Morus insignis*, *Morus mesozygia*, *Morus microphylla*, *Morus notabilis*, *Morus nigra*, *Morus rubra*, *Morus atropurpurea*, *Morus cathayana*, *Morus laevigata*, *Morus liboensis*, *Morus mongólica*, *Morus multicaulis*, *Morus rotundiloba*, *Morus serrata*, *Morus tillaefolia*, *Morus trilobata* y *Morus wittiorum*.

En una más preferida, las células productoras de resveratrol y oxiresveratrol proceden de la especie *Morus alba*.

Se entiende por células potencialmente productoras de resveratrol y oxiresveratrol, cualquier línea celular de una planta del género *Morus* capaz de producir estos compuestos bien de forma natural o tras modificación genética.

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

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*, que comprende metil-jasmonato y ciclodextrinas

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un medio de cultivo que comprende metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol y oxiresveratrol en células de una planta del género *Morus* productoras del mismo.

Finalmente, un último aspecto de la invención es el uso combinado de metil-jasmonato y

ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol y/u oxiresveratrol en células de una planta del género *Morus* productoras del mismo.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cinética de acumulación extracelular de las formas aglicona (no glicosilada) t-resveratrol (R) y t-oxiresveratrol (OxiR) en miligramos por litro de medio extracelular, en cultivo celular de *Morus alba* clon rojo elicidadas con la combinación BCDMA y MeJA (CDMeJA) frente a control sin tratamiento. Los valores representados son la media de 4 réplicas del experimento y las barras de error son la desviación estándar. MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA; BCDMA: tratamiento con 62.5g/l de CDMA.

- 1 - OxiR control
- 2 - OxiR CDMeJA
- 3 - R control
- 4 - R CDMeJA

Figura 2. Cinética de acumulación intracelular de las formas glicosiladas piceida (piceid) y mulberrosido A (MulA) en microgramos por gramo de peso fresco de células, en cultivo celular de *Morus alba* clon rojo elicidadas con la combinación BCDMA y MeJA (CDMeJA) frente a control sin tratamiento. Los valores representados son la media de 4 réplicas del experimento y las barras de error son la desviación estándar. MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA; BCDMA: tratamiento con 62.5g/l de CDMA.

Figura 3. Cinética de acumulación intracelular de las formas aglicona (no glicosilada) t-resveratrol (R) y t-oxiresveratrol (OxiR) en microgramos por gramo de peso fresco de células, en cultivo celular de *Morus alba* clon rojo elicidadas con la combinación BCDMA y MeJA (CDMeJA) frente a control sin tratamiento. Los valores representados son la media de 4 réplicas del experimento y las barras de error son la desviación estándar. MeJA:

tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA; BCDMA: tratamiento con 62.5g/l de CDMA.

EXPOSICION DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

5

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

10

Preparación y mantenimiento de material vegetal

Líneas celulares de *Morus alba*, clones fruto blanco y fruto rojo

15

Las líneas celulares de *Morus alba* fueron establecidas a partir de explantes de tallos jóvenes por el Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas de la Universidad de Alicante en 2014 mediante técnicas estándar de cultivo vegetal *in vitro*, obteniéndose callos de dos líneas, una procedente de especímenes de fruto blanco, y otra de especímenes de fruto rojo.

20

Los callos se mantuvieron a 25°C en oscuridad, en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, con medio MS completo suplementado con las vitaminas de Morel (Morel, G. 1970. “*Le problème de la transformation tumorale chez les végétaux*”. *Physiologie Végétale*, 8:189-204), hidrolizado de caseína (0.25 g/l), sacarosa (30 g/l) como fuente carbonada y ácido alfa-naftalenacético (0.2 mg/l) y kinetina (1 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. Los callos se mantuvieron por subcultivo periódico en el mismo medio y condiciones.

25

30

Las suspensiones celulares se iniciaron a partir de callos friables obtenidos, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del mismo medio MS sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm, a 25°C en oscuridad.

Elicitación de las células

En cada experiencia de elicitación se tomaron, en condiciones de esterilidad, entre 20 y

200 g de peso fresco de células que habían sido previamente lavadas con medio fresco y filtradas. Estas células se transfirieron a un matraz de entre 250 y 2000 ml de capacidad y se resuspendieron mediante la adición de entre 100 y 1000 ml de medio fresco estéril suplementado:

- 5 ○ solo con una β-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) CAVASOL W7 M TL o hidroxipropilada aleatoriamente (BCDHA) CAVASOL W7 HP TL, a una concentración comprendida entre 6.5 y 130 g/L, o
- con la ciclodextrina (BCDMA o BCDHA) y con metil-jasmonato (CAS 1211-29-6) a una concentración comprendida entre 5 y 450 micromolar.

10

El metil-jasmonato 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.

15

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

Muestreo y preparación de muestras para análisis

20

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

25

Análisis de mulberrosido A, piceida, trans-resveratrol y trans-oxiresveratrol en el medio extracelular e intracelular

30

Medio extracelular: Una alícuota de 1mL del medio extracelular recuperado se extrajo por líquido-líquido con 0.5mL de acetato de etilo. La fase orgánica se recuperó, se evaporó a temperatura inferior a 40°C y se resuspendió en 0.5mL de metanol al 80% y se filtró a través de un filtro Anopore de 0.2µm. Las muestras se analizaron por HPLC-masas en un analizador de triple cuadrupolo operado en modo MRM de acuerdo con las condiciones establecidas en la literatura (Hurtado-Gaitan et al. (2017) *A Focused Multiple Reaction Monitoring (MRM) Quantitative Method for Bioactive Grapevine Stilbenes by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple-Quadrupole Mass Spectrometry*

(UHPLC-QqQ). Molecules 22(3):418). Las transiciones monitorizadas fueron 229 como precursor y 91, 107.1, 135, 165 como fragmentos para resveratrol, y 245 como precursor y 107.1, 161 como fragmentos para oxiresveratrol.

- 5 Medio intracelular: Las células se cosechan por filtración a vacío. Por 3 gramos de células frescas se añaden 7 mL de metanol puro y se maceran con agitación suave durante 24 horas. El sobrenadante se recupera por centrifugación a 4000 x g y decantación y se concentra 10 veces por centrifugación a vacío (ej. Speedvac) y temperatura ambiente. Las muestras se filtran a través de 0,2 micras como antes y se analizan por HPLC-masas en modo MRM como antes. Las transiciones para monitorizar resveratrol y oxiresveratrol son las indicadas anteriormente. Además, se monitorizaron 391 como precursor y 229, 91, 107.1, 135, 165 como fragmentos para piceida, y 569 como precursor y 245, 269 y 407 como fragmentos para mulberrósido A.
- 15 Los tiempos de retención y la respuesta del detector a la concentración del mismo como área bajo el pico (curva de calibrado para cuantificación) se determinó usando patrones de compuestos puros comerciales. Los tiempos de retención fueron 0.4, 0.9, 1.25 y 1.8 min, y la respuesta $y=147.1x+179$, $y=3127.4x+795$, $y=2852.5x+745$, $y=3028.5x-1192$ para mulberrosido A, piceida, oxiresveratrol y resveratrol, respectivamente, siendo "x" la concentración del patrón en mg/L.

EJEMPLO 1:

Observación del efecto de elicitors BCDMA, metil-jasmonato y efecto sinérgico del uso combinado de BCDMA y metil-jasmonato

25

Suspensiones de *Morus alba* clones *blanco* y *rojo* de densidad 20% en peso (gramos de células/gramos totales de solución de cultivo de células), se trataron:

- a. con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) a concentración de 62.5 g/litro,
- 30 b. con metil-jasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l
- c. con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) a concentración de 62.5 g/litro y metil-jasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l
- d. control sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente ni metil-jasmonato.

- 35 Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 100 ml conteniendo 40g de cultivo. Al cabo de 120 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por

separado y se determinó la cantidad total de t-resveratrol y t-oxiresveratrol en el medio extracelular y en las células.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla A. Cuando el cultivo se elicit solo con MeJA la acumulación es similar o ligeramente superior a la obtenida en los controles. Al tratar con BCDMA, hay una acumulación extracelular de tR y de tOR por unidad de biomasa mucho mayor que en controles o en tratados con MeJA (30-60 veces tR y 600-800 veces tOR en línea roja; 60-140 veces tR y 30-60 veces tOR en línea blanca). Cuando el cultivo se elicit con la combinación de BCDMA y MeJA, se consigue un incremento adicional de aproximadamente 3 veces en la acumulación extracelular de tR y de tOR comparado con la suma de los niveles acumulados en tratamientos simples con MeJA o BCDMA ($[\text{MBCDMA} + \text{MeJA}] / [\text{MBCDA}] + [\text{MeJA}]$). Por tanto, se observa el efecto sinérgico de la elicitación conjunta BCDMA y MeJA, tanto en el clon blanco como rojo.

TABLA A: Producción de t-resveratrol y t-oxiresveratrol por unidad de volumen de cultivo de *Morus alba* tras 120 horas de incubación. Los datos corresponden a la media y desviación estándar (DesEst) de 3 réplicas.

	t-Oxi-resveratrol (mg/L)			
	M. alba Roja	De sEst	M. alba Roja	De sEst
control	0.04	0.01	0.05	0.01
MeJA	0.05	0.01	0.24	0.11
BCDMA	31.92	3.85	14.98	5.35
BCDMA + MeJA	123.98	21.50	81.29	39.90

	t-Oxi-resveratrol (mg/L)			
	M. alba Roja	De sEst	M. alba Roja	De sEst
control	0.31	0.05	0.26	0.00
MeJA	0.60	0.15	0.56	0.02
BCDMA	18.51	2.95	36.12	8.61
BCDMA + MeJA	24.02	0.68	78.66	2.21

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

MeJA: tratamiento con metil-jasmonato 100 micromolar.

EJEMPLO 2: Determinación de la cinética de acumulación de t-Resveratrol, t-oxiresveratrol y sus formas glicosiladas piceida y mulberrosido A, respectivamente tras elicitación de células de *Morus alba* clon rojo, con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) y metil-jasmonato (MeJA).

Las suspensiones celulares de *Morus alba* clon rojo se trataron

- a. con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) a concentración de 62.5 g/litro y metil-jasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l
- b. control sin beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente ni metil-jasmonato.

Periódicamente se extrajeron muestras y se recogieron las células y el medio por separado, y se determinó la cantidad total de t-resveratrol, t-oxiresveratrol, piceida y mulberrosido A en el medio extracelular y en extractos celulares. Los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado en matraces de 100mL conteniendo 40g de cultivo. El resultado del experimento se muestra en las Figuras 1, 2 y 3.

De estos resultados se desprende que las formas glicosiladas que se encuentran dentro de las células no sufren cambios significativos a lo largo del tiempo por efecto de la elicitación, mientras que las agliconas, tanto intracelulares como extracelulares exhiben un patrón acumulativo con el tiempo. Este cambio es más intenso para oxiresveratrol que para resveratrol en el caso de la estirpe celular clon rojo.

EJEMPLO 3: Comparación de la capacidad de las ciclodextrinas BCDMA y BCDHA combinadas con metil-jasmonato (MeJA) para elicitar la producción de resveratrol y oxiresveratrol por de células de *Morus alba* clon blanco.

Las células de *Morus alba* clon blanco se incubaron durante 96 horas en el medio de cultivo suplementado con ciclodextrina y metil jasmonato en 2 tratamientos:

- a. con beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) a concentración de 62.5 g/litro y metil-jasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l
- b. con beta-ciclodextrina hidroxipropilada aleatoriamente (BCDHA) a concentración de 58.8 g/litro y metil-jasmonato (MeJA) a concentración de 100 micromoles/l

El experimento se hizo por triplicado. Transcurrido el tiempo el medio líquido se separó de las células y se usó para determinar el contenido en oxiresveratrol y resveratrol por metodología MRM.

TABLA B: Producción de t-resveratrol (R) y t-oxiresveratrol (OxiR) por unidad de volumen de cultivo de *Morus alba clon blanco* tras 96 horas de incubación en el medio de cultivo suplementado con metil jasmonato y BCDMA ó metil jasmonato y BCDHA. Los datos corresponden a la media y desviación estándar (DesEst) de 3 réplicas.

5

	OxiR (mg/L)	DesEst	DesEst (mg/L)	DesEst
BCDMA	70.2	14.2	78.3	26.8
BCDHA	64.5	17.2	114.4	18.3

De estos resultados se desprende que la ciclodextrina hidroxipropilada (BCDHA) tiene capacidad, al igual que BCDMA, de elicitar la producción de resveratrol y oxiresveratrol por cultivos celulares de *Morus*. Las diferencias observadas en los niveles de producción tanto de resveratrol como de oxiresveratrol con una u otra ciclodextrina no son significativas.

10

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de estilbenos que comprende la adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*.
5
2. Método de obtención de estilbenos según la reivindicación 1, en el que los estilbenos son resveratrol y oxiresveratrol.
3. Método de obtención de estilbenos según la reivindicación 1, en el que el estilbeno es oxiresveratrol.
10
4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
 - a) adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células de una planta del género *Morus*,
 - 15 b) incubación del medio de cultivo celular del paso a),
 - c) separación de los estilbenos obtenidos en el paso b), del medio de cultivo.
5. Método según la reivindicación 4, que además comprende:
 - d) purificación del resveratrol y del oxiresveratrol separado en el paso c)
 - 20
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la concentración de metil-jasmonato es de entre 5 y 450 micromoles/litro de medio de cultivo.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la concentración de metil-jasmonato es de entre 50 y 150 micromoles/litro medio de cultivo.
25
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde las ciclodextrinas se seleccionan del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente o ciclodextrina hidroxipropilada aleatoriamente.
30
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 6,5 y 130 g/L medio de cultivo.
10. Método según la reivindicación 9 donde la concentración de ciclodextrinas es de 10 y
35 100 g/L medio de cultivo.

11. Método según la reivindicación 10 donde la concentración de ciclodextrinas es de entre 50 y 75 g/L medio de cultivo.

5 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde las células productoras proceden de la especie *Morus sp.*

13. Método según la reivindicación 12, donde la especie del género *Morus* está seleccionada entre: *Morus alba*, *Morus australis*, *Morus celtidifolia*, *Morus insignis*, *Morus mesozygia*, *Morus microphylla*, *Morus nigra*, *Morus rubra*, *Morus atropurpurea*, *Morus cathayana*, *Morus laevigata*, *Morus liboensis*, *Morus mongólica*, *Morus multicaulis*, *Morus notabilis*, *Morus rotundiloba*, *Morus serrata*, *Morus tillaefolia*, *Morus trilobata* y *Morus wittiorum*.

10

14. Método según la reivindicación 12, donde las células productoras proceden de la especie *Morus alba*.

15

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el tiempo de incubación es de entre 4 y 288 horas.

16. Medio de cultivo que comprende células de una planta del género *Morus*, metil-jasmonato y ciclodextrinas.

20

17. Uso del medio de cultivo de la reivindicación 16 para promover la producción de resveratrol u/y oxiresveratrol.

25 18. Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para promover la producción de resveratrol u/y oxiresveratrol en células de una planta del género *Morus* productoras del mismo.

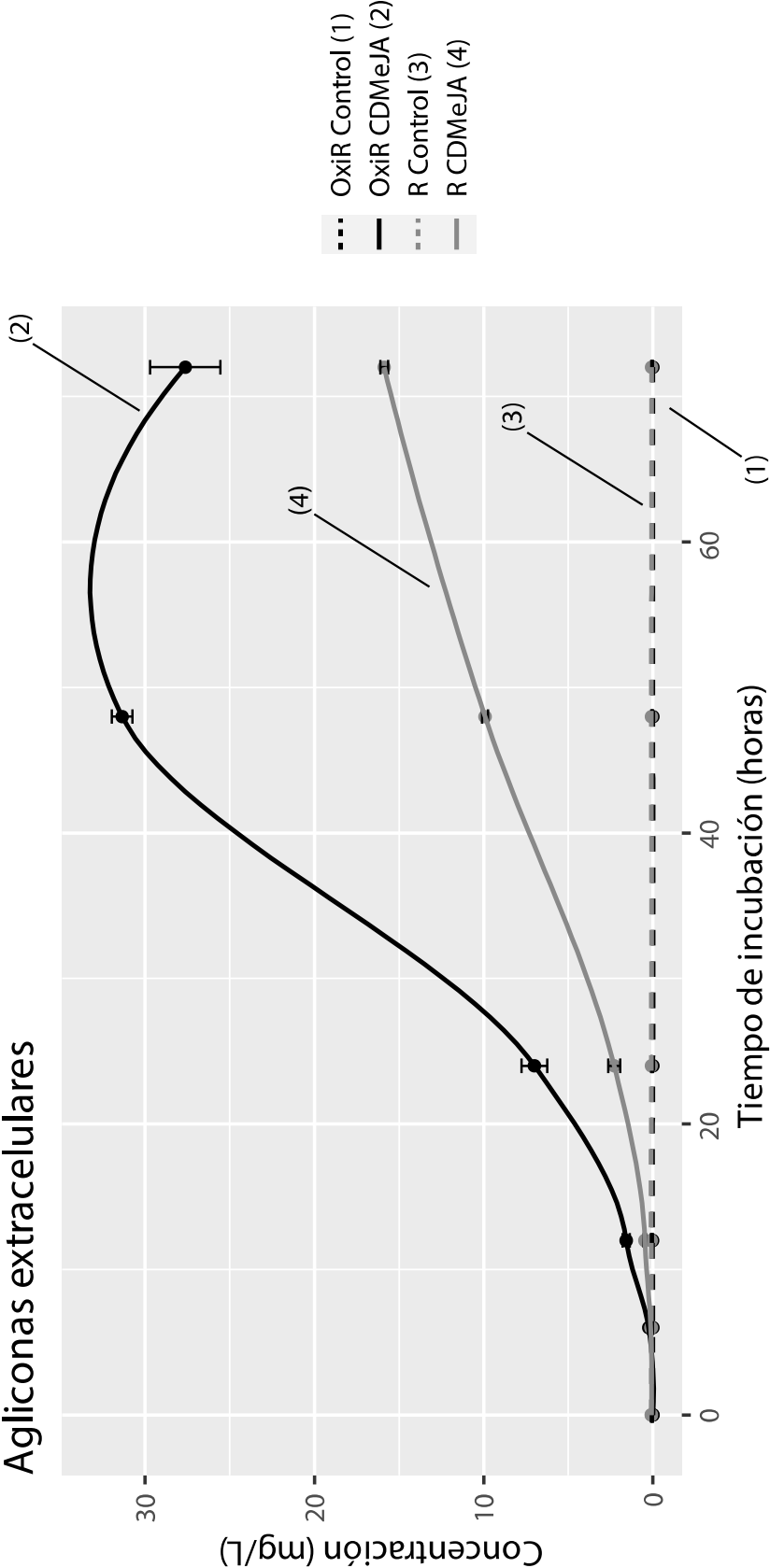


FIG.1

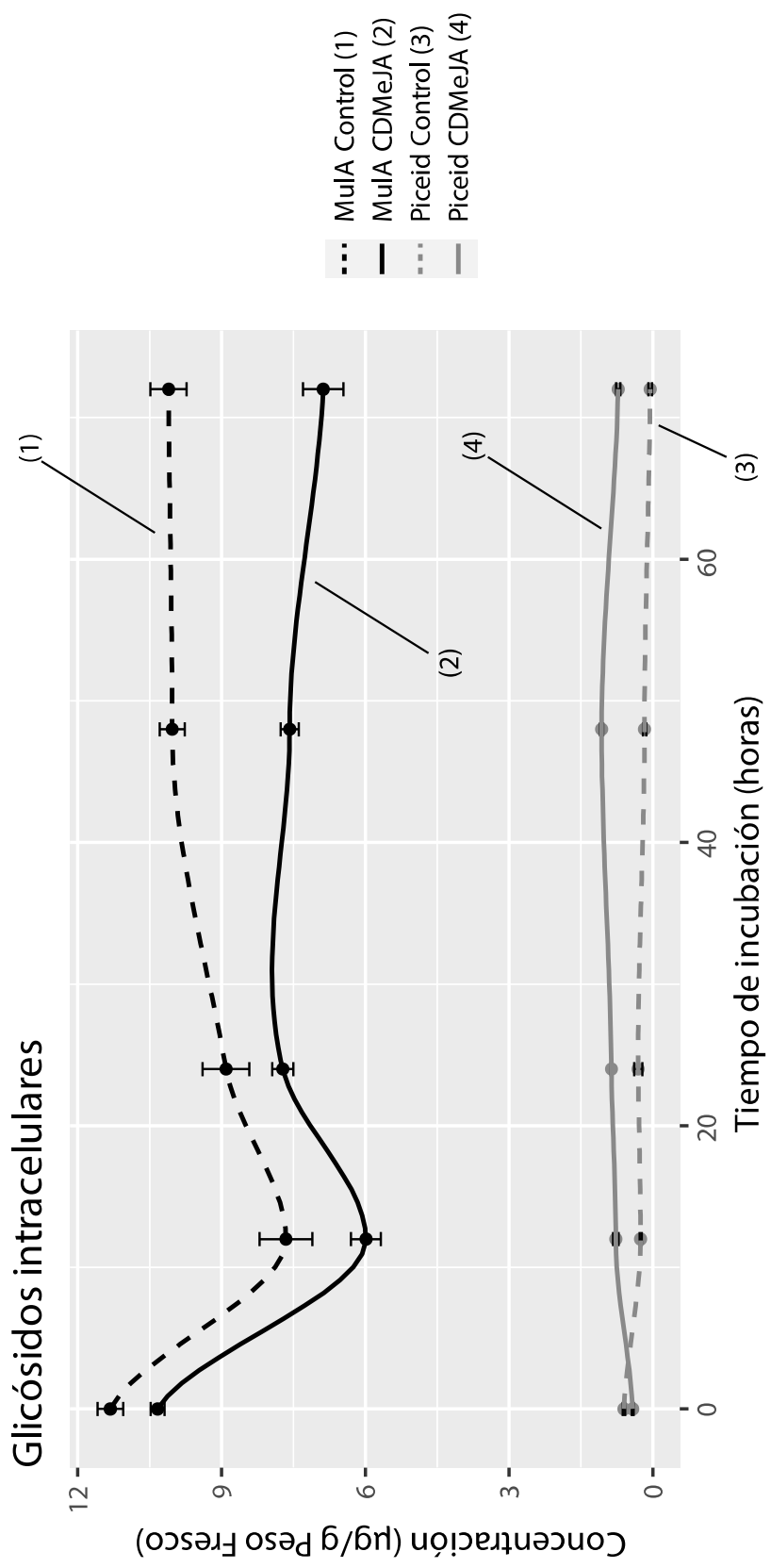


FIG.2

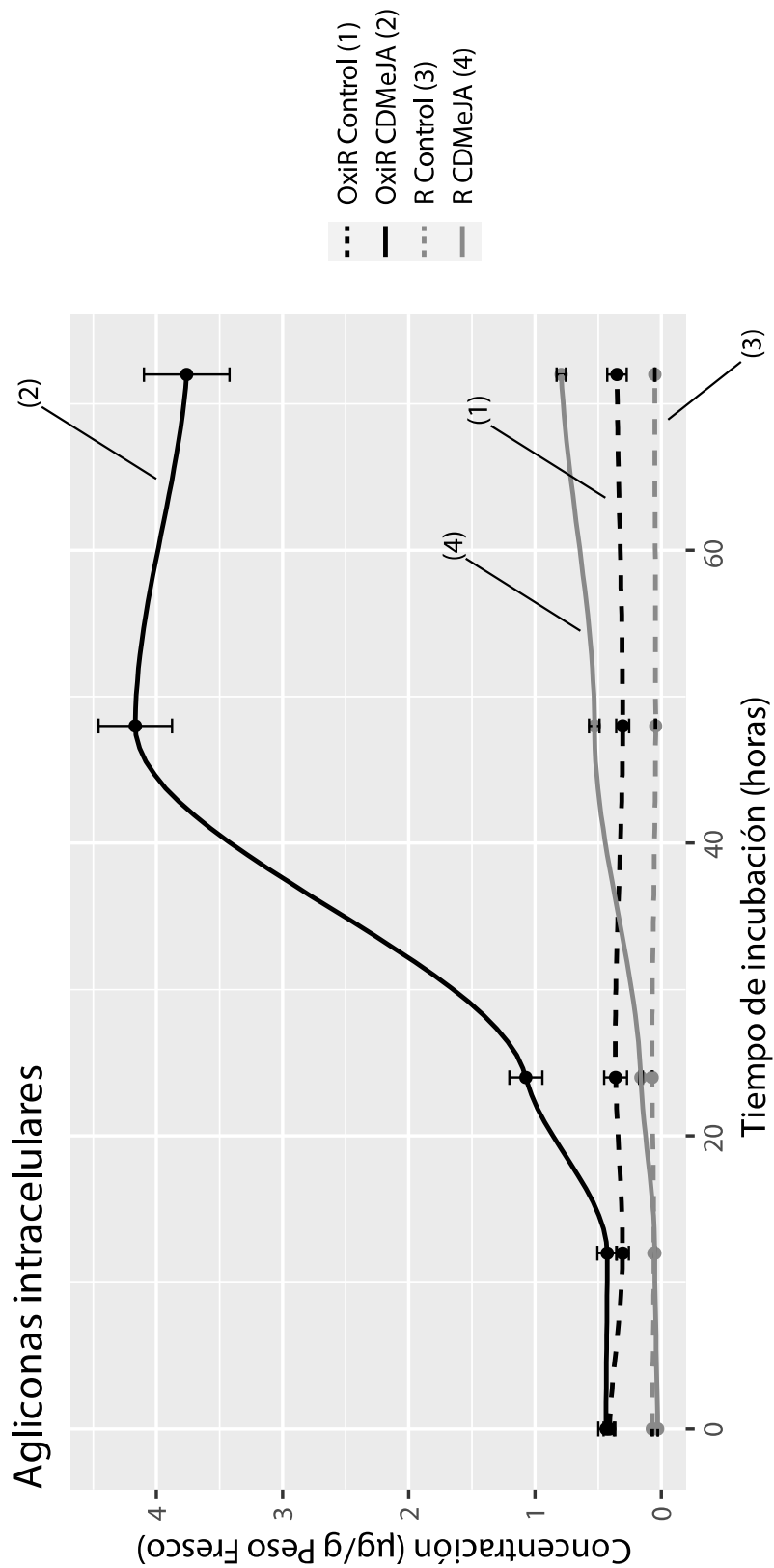


FIG.3



- ②① N.º solicitud: 202231084
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KOMAIKUL J et al.: "Improvement of stilbenoid production by 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin in white mulberry (<i>Morus alba</i> L.) callus cultures.". Natural Product Research England, Oct 2019, Vol. 33, Nº 19, Páginas 2762 - 2769, ISSN 1478-6427 (Electronic), doi:10.1080/14786419.2018.1499643 pubmed:30470133, todo el documento; en particular: resumen, apartados 2.2. "Elicitation effect of HCD" y 4. "Conclusions".	1-18
Y	INYAI C et al.: "Alginate immobilization of <i>Morus alba</i> L. cell suspension cultures improved the accumulation and secretion of stilbenoids". BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, 03/10/2018, Vol. 42, Nº 1, Páginas 131 - 141, ISSN 1615-7591, doi:10.1007/s00449-018-2021-1, todo el documento; en particular: resumen; introducción y los siguientes apartados: "Effect of elicitors on stilbenoid production of immobilized cell cultures", "Effect of elicitors on resveratrol production", "Effect of elicitors on oxyresveratrol accumulation" y "Conclusions".	1-18
A	INYAI C et al.: "Improvement of stilbene production by mulberry <i>Morus alba</i> root culture via precursor feeding and co-elicitation", Bioprocess and Biosystems Engineering Germany 31/03/2021, Vol. 44, Nº 4, Páginas 653 - 660, ISSN 1615-7605 (Electronic), doi:10.1007/s00449-020-02474-7, todo el documento; en particular: resumen y apartado "Effect of precursor feeding on stilbene accumulation in MA root culture".	1-18
A	ES 2328002 A1 (UNIV ALICANTE et al.) 05/11/2009, todo el documento; en particular, reivindicación 1.	1-18
A	LIJAVETZKY D et al.: "Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures", BMC Research Notes, 22/12/2008, Vol. 1, Nº 1, Páginas 132, ISSN 1756-0500, doi:10.1186/1756-0500-1-132, todo el documento; en particular: resumen y página 2, apartado: "CD and MeJA synergistically induce resveratrol production".	1-18

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
12.05.2023

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/00 (2006.01)

C12N5/04 (2006.01)

C12P7/22 (2006.01)

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

C12N, C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, TXTE, NPL, CA, SCISEARCH, KOSMET, INTERNET