



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 352 491**

② Número de solicitud: 200900497

⑤ Int. Cl.:
A61K 36/37 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
A01G 7/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **23.02.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.02.2011

⑦ Solicitante/s:
CENTRO ATLÁNTICO DEL MEDICAMENTO, S.A.
Plaza de Sixto Machado, 3
38009 Santa Cruz de Tenerife, Tenerife, ES

⑦ Inventor/es: **Zarate Méndez, Rafael y**
Gutiérrez Ravelo, Ángel Domingo

⑦ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑤ Título: **Método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos *in vitro* de explantes de plantas.**

⑤ Resumen:

Método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos *in vitro* de explantes de plantas. La presente invención se refiere a un método de cultivo *in vitro* de explantes de plantas germinadas a partir de semillas, y/o de explantes de plantas nativas preferentemente de *Maytenus canariensis* para incrementar la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos en suspensión de las líneas celulares extraídas de dichos explantes. Además la presente invención demuestra la influencia de los medios de cultivo así como el tratamiento con diferentes elicitores en el incremento en la producción *in vitro* de nor-triterpenos metilen-quinonas.

ES 2 352 491 A1

DESCRIPCIÓN

Método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos *in vitro* de explantes de plantas.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas, a partir de cultivos *in vitro* de plantas o partes de las mismas preferentemente de la familia *Celastraceae*. Por lo tanto, la presente invención puede englobarse dentro del campo de la ingeniería genética y la fisiología vegetal. Al ser los nor-triterpenos metilen-quinonas utilizados en el campo farmacéutico, la presente invención también se adscribe a este sector.

Estado de la técnica

Los triterpenos son moléculas sintetizadas por diferentes especies de plantas. Forman parte de una amplia y diversa familia de metabolitos secundarios conocidos como terpenoides. (Dewick PM, 2002). Los triterpenos formados por seis unidades de isoprenos que responden a la fórmula molecular $C_{30}H_{48}$, se les conoce con el nombre de triterpenoides.

Los triterpenos ejercen importantes actividades biológicas con un gran interés farmacológico y médico. Estas actividades comprenden por ejemplo:

- protección microvascular frente al incremento de la permeabilidad vascular en conejos, llevada a cabo por los triterpenos taraxasto-20-ene-3a-ol y taraxast-12, 20(30)-dien-3a-ol (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2007).
- propiedades antioxidantes, anti- y pro-inflamatorias y anticancerígenas atribuidas al ácido ursólico, un ácido carboxílico pentacíclico triterpenoide natural (Ikeda *et al.*, 2008).
- propiedades anti-fatiga (Zhang *et al.*, 2006).
- propiedades neuroprotectoras frente a la toxicidad inducida por glutamato en cultivos primarios de células corticales de rata, atribuidas a las saponinas triterpenoides (Son *et al.*, 2007).
- actividad anti-VIH de la dimetilsuccinil-betulina (Kashiwada *et al.*, 2001).
- actividad antituberculosa de los triterpenos obtenidos de *Lippia turbinata* (Waechter *et al.*, 2001).
- actividad anti-malárica del ácido betulínico (Bringmann *et al.*, 1997).

De particular interés en esta invención son los nor-triterpenos metilen-quinonas, particularmente la 22 β -hidroxitingenona y la tingenona, así como sus moléculas relacionadas de naturaleza triterpénica (triterpenos pentacíclicos con dobles enlaces presentes en el anillo B, 20-hidroxitingenona y diversos fenol triterpenos quinonas). Estos nor-triterpenos metilen-quinonas también poseen importantes propiedades medicinales:

- Interaccionan con el ADN e inhiben la polimerización de la tubulina, lo que les proporciona actividad antimicrobiana (Campanelli *et al.*, 1980; Morita *et al.*, 2008).
- Actividad antiprotozoica, frente a *Giardia intestinalis*, de la tingenona y la pristimerina, presentando unos valores de IC₅₀ de 0,11 μ M y 0,74 μ M respectivamente, comparados con la metronidazola, fármaco comúnmente utilizado para combatir dicha infección y que presenta un valor de IC₅₀ de 1,23 μ M (Mena-Rejón *et al.*, 2007).
- Actividad antitripanosómica de la tingenona frente al agente causante de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, inhibiendo el crecimiento de dicho parásito (Liao *et al.*, 2008).
- Inhibición del crecimiento de *Crithidia fasciculata*, por parte de la tingenona, aunque de una manera menos eficiente que en el caso de los otros microorganismos antes mencionados (Goijman *et al.*, 1985).
- Actividad insecticida de la tingenona, pristimerina y 20 α -hidroxitingenona frente a *Cydia pomonella* (Avila *et al.*, 2000).

Cabe destacar también que los principales nor-triterpenos metilen-quinonas de la presente invención, 22 β -hidroxitingenona y tingenona, presentan actividad antibiótica frente a bacterias Gram (+) (González *et al.*, 1997; 1998; Sotanaphun *et al.*, 1999), actividad citotóxica gracias a su capacidad de interaccionar con las moléculas de ADN y ARN (González *et al.*, 1993; 1997), actividad citotóxica *in vitro*, demostrada frente a líneas celulares cancerígenas, en particular, las líneas Hep-HG2 (línea celular de hepatocarcinoma humano), H-4-IIIe (línea celular de hematoma de rata) y SK-Mel-28 (línea celular de melanoma humano) (Setzer *et al.*, 1998; 2001; Lee *et al.*, 2004). Además, la 22 β -hidroxitingenona y la tingenona ejercen actividad anti-inflamatoria, gracias a su propiedad de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias del tipo IL-1 β , y actividad antioxidante, al ser capaces de secuestrar los radicales libres de oxígeno (Jeller *et al.*, 2004).

En la naturaleza, estos nor-triterpenos metilen-quinonas suelen obtenerse en pequeñas cantidades, principalmente, a partir de la corteza de raíces de árboles de la familia *Celastraceae* de aproximadamente 10-15 años de edad. Las concentraciones obtenidas de dichos metabolitos extraídos de la corteza de raíces de plantas, preferentemente *Muytenus canariensis*, son muy bajas, alrededor de 0,006% (w/w) para la tingenona, y 0,0005% (w/w) para la 22 β -hidroxitingenona, exhibiendo una proporción aproximada de 11:1 respectivamente (González *et al.*, 1996). En la corteza de raíces de *Hippocratea excelsa*, la concentración obtenida de tingenona fue aún menor que en el ejemplo anterior, 0,00036% (w/w), no obteniéndose concentración alguna de 22 β -hidroxitingenona (Mena-Rejón *et al.*, 2007). Otros estudios realizados en muestras de corteza de raíces de plantas de la familia *Hippocrateaceae*, como por ejemplo *Cheilochlinium agnatum*, han demostrado que las concentraciones obtenidas de este tipo de triterpenos varían desde los porcentajes antes citados hasta 0,0049% para la tingenona y 0,0018% para la 22 β -hidroxitingenona (Jeller *et al.*, 2004). Todos estos estudios evidencian la escasa concentración obtenida de estos metabolitos secundarios en la naturaleza.

Existen estudios en los que se han medido las concentraciones obtenidas de tingenona y 22 β -hidroxitingenona en cultivos *in vitro* de callos y de células en suspensión obtenidas de los mismos de *M. buchananii* obteniéndose unos rendimientos del 0,005% para ambos metabolitos (Kutney *et al.*, 1981). Del mismo modo, similares rendimientos, 0,0044% para tingenona y 0,041% para 22 β -hidroxitingenona, fueron descritos para cultivos de callos de *M. ilicifolia* (Filho *et al.*, 2004).

Las plantas son una importante fuente de alimentos y de suministro de materiales. Diferentes sustancias químicas, sintetizadas y acumuladas en las plantas, han servido a la humanidad como fármacos, perfumes, colores, colorantes, potenciadores del sabor, pegamentos, venenos, etc. La gran mayoría de los compuestos que proporcionan estas propiedades son los denominados metabolitos secundarios, siendo en su mayoría explotados por el ser humano debido a sus propiedades. Hay alrededor de 180.000-200.000 metabolitos secundarios conocidos, y aproximadamente 4.000 nuevas moléculas son descubiertas y aisladas cada año. Uno de los grupos más numerosos es el de los terpenoides, donde se conocen alrededor de 40.000-50.000 estructuras, seguido por el grupo de los alcaloides (Chapman y Hall, 2000). Se estima que alrededor del 40% de los actuales medicamentos en uso son de origen natural, ya sea como productos naturales tal cual (sin ningún tipo de manipulación química) o como derivados de los mismos. La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional o popular como medio para el tratamiento de las enfermedades (Farsworth *et al.*, 1985 y Newman *et al.*, 2000).

Las fuentes de producción de metabolitos secundarios son principalmente de origen natural, aunque con los avances en química orgánica e ingeniería genética, la síntesis de algunas de estas moléculas ha alcanzado y, en algunos casos, se ha convertido en explotación comercial. La sobreexplotación de las plantas y los árboles, los cambios ambientales, la contaminación, las prácticas agrícolas de cultivo, la climatología, etc., influyen en los rendimientos de producción de estos metabolitos por parte de las plantas. En este sentido, existe una creciente demanda para establecer técnicas de cultivos *in vitro* y sistemas que garanticen una producción y suministro continuo de metabolitos secundarios de interés para el hombre. Esta alternativa presenta ventajas tales como ser independiente del clima, prácticas agrícolas, plagas o condiciones regionales, y de esta manera asegurar y aumentar la producción de metabolitos secundarios de interés (Tabata, 2006). Sin embargo, el uso industrial de células y cultivos de tejidos para la producción de compuestos sintetizados por los vegetales implica la optimización de los sistemas y condiciones de cultivo, así como un eficiente incremento en los productos obtenidos (Wink *et al.*, 2005). Esta optimización podría ser lograda mediante la selección de líneas celulares altamente productivas, mediante alteraciones de los nutrientes y las condiciones de cultivo, mediante la inducción de la diferenciación de los cultivos vegetales para estimular el metabolismo secundario, mediante el uso de estrategias específicas, tales como el empleo de precursores biosintéticos, elicitors bióticos o abióticos, así como la aplicación de condiciones de estrés que aumenten el metabolismo secundario, además de la ingeniería genética aplicada a las rutas metabólicas y/o a la manipulación de los sistemas de la planta.

El método de producción *in vitro* de nor-triterpenos metilen-quinonas de la presente invención es particularmente útil y eficaz para garantizar una gran producción de dichos metabolitos que en la naturaleza aparecen en muy bajas concentraciones. Por lo tanto, el método de la presente invención proporciona un mecanismo de producción en masa de dichos compuestos.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema del suministro de las moléculas llamadas nor-triterpenos metilen-quinonas, ofreciendo un alto rendimiento en su producción, que supera en 120 veces las concentraciones obtenidas de forma natural y en cortos periodos de tiempo, así como un suministro continuo, gracias al establecimiento de un método de producción de dichos compuestos a partir de cultivos *in vitro* de callos, agregados celulares y explantes de plantas, preferentemente *Maytenus canariensis*, optimizando la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas. Más específicamente el objeto de la presente invención es:

a) proporcionar un método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas, particularmente, tingenona y 22 β -hidroxitingenona y otros triterpenos, como triterpenos pentacíclicos con dobles enlaces presentes en el anillo B, 20-hidroxitingenona y diversos fenol triterpenos quinonas. Para proporcionar un alto rendimiento en la producción de estos compuestos se emplearon cultivos de células vegetales y/o tejidos (agregados de células, callos, tallos, raíces),

derivados de explantes de plantas adultas crecidas en la naturaleza o de explantes derivados de cultivos *in vitro* de semillas de plantas, preferentemente *M. canariensis*.

b) ofrecer una metodología para inducir la síntesis y altos rendimientos en la producción de dichos nor-triterpenos metilen-quinona mediante la modificación de las condiciones de los cultivos *in vitro* antes mencionados (luz, temperatura, agitación, medios de cultivo, etc.) para un óptimo rendimiento en la producción de los nor-triterpenos metilen-quinonas.

c) estimulación: de los cultivos *in vitro* arriba mencionados, para la mejora de los rendimientos de producción de los nor-triterpenos metilen-quinonas.

A efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

- Callos: grupo de células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa en algunas especies.
- Estimulador: sustancia química o biológica capaz de inducir cambios fisiológicos y bioquímicos en el organismo o sistema diana vivo. En el contexto de la presente invención, el término elicitor se refiere a compuestos y factores que activan la síntesis y la acumulación de nor-triterpenos metilen-quinonas y compuestos relacionados.
- Alto rendimiento: en la presente invención se define alto rendimiento en la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas cuando se consigue un aumento en su producción de 50 a 370 veces mayor que el obtenido de manera natural o con otros sistemas de cultivo *in vitro* descritos en la literatura.
- Agregados celulares: conjunto de células que no llegan a formar un tejido u órgano pero que funcionan como un organismo pluricelular.
- Explante: tejido extraído de un organismo y transferido para su crecimiento a un medio artificial de nutrientes.

Descripción de las figuras

Figura 1. Variación en peso fresco de cultivos de agregados celulares de *Maytenus canariensis* crecidos en suspensión en medio MS-6 y sometidas a dos regímenes diferentes de luz durante su cultivo, por un lado un régimen de oscuridad (○) y por otro un régimen de luz con un fotoperíodo de 16 h a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y una irradiación de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría (▽). En el eje de ordenadas se representa el peso fresco expresado en gramos y en el eje de abscisas se representa el tiempo expresado en días.

Figura 2. Variación en la concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas a lo largo del tiempo analizada en un cultivo *in vitro* de células de la línea celular 3COT perteneciente a *Maytenus canariensis*, cultivadas en medio de cultivo MS3 y sometidas a dos regímenes diferentes de luminosidad, oscuridad (A) y luz (B). Las barras negras representan la tingenona y las barras blancas la 22β -hidroxitingenona. En el eje de ordenadas se representa la concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas expresada en $\mu\text{g}/\text{g}$ peso seco y en el eje de abscisas se representa el tiempo expresado en días.

Figura 3. Variación en la concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas a lo largo del tiempo analizada en un cultivo *in vitro* de células de la línea celular 1LD perteneciente a *Maytenus canariensis*, cultivadas en medio de cultivo MS6 y sometidas a dos regímenes diferentes de luminosidad, oscuridad (A) y luz (B). Las barras negras representan la tingenona y las barras blancas la 22β -hidroxitingenona. En el eje de ordenadas se representa la concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas expresada en $\mu\text{g}/\text{g}$ peso seco y en el eje de abscisas se representa el tiempo expresado en días.

Figura 4. Espectro de UV realizado mediante HPLC de los principales nor-triterpenos metilen-quinonas, tingenona (A) y 22β -hidroxitingenona (B), presentes en las muestras de cultivos de agregados celulares de *M. canariensis* analizadas en el eje de ordenadas se representa la absorbancia y en el eje de abscisas se representa la longitud de onda expresada en nm.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos *in vitro* de células o tejidos vegetales (agregados celulares, callos, raíces) de plantas germinadas *in vitro* a partir de semillas preferentemente de *M. canariensis*. Más concretamente, la presente invención comprende el establecimiento de cultivos *in vitro* de diferentes explantes de plantas germinados *in vitro* o de explantes de plantas adultas preferentemente de *M. canariensis*, así como un método de producción en masa de los compuestos antes mencionados, mediante modificaciones de las condiciones de cultivo, medios de cultivo, así como la aplicación de elicitores químicos, que se describirán más adelante.

ES 2 352 491 A1

Para el establecimiento de los cultivos de plantas *in vitro* descritos en la presente invención, se emplearon como fuente de explantes las hojas, cotiledones, tallos, raíces, etc., de plantas jóvenes de la familia *Celastraceae*, en particular las especies del género *Maytenus* obtenidas después de la germinación de sus semillas. También pueden ser empleadas como fuentes de explantes partes de árboles adultos de la misma especie que crezcan en la naturaleza.

Para el crecimiento de los cultivos *in vitro* descritos en la presente invención se utilizaron matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes aunque cualquier otro sistema apropiado también es posible, como por ejemplo, biorreactores, placas Petri, etc. Los medios de cultivo empleados son el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), ambos comúnmente utilizados para el cultivo de células vegetales. Se entiende que variantes de estos medios, así como otros medios de cultivo adecuados para el desarrollo de la presente invención también puede ser empleados, junto con las condiciones de cultivo mencionadas en este documento, luz, temperatura, agitación, etc.

El material vegetal útil para el desarrollo de la presente invención puede ser obtenido de cualquier especie de planta conocida aunque se prefieren las del género *Maytenus*. En particular, en la presente invención se ha utilizado la especie *M. canariensis*, capaz de producir grandes cantidades de nor-triterpenos metilen-quinonas, principalmente tingenona y 22 β -hidroxitingenona, después de un tiempo de cultivo relativamente corto.

Así el objeto de la presente invención se refiere a un método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas mediante cultivo *in vitro* de plantas que comprende los siguientes pasos:

- a) Esterilización e inducción del crecimiento *in vitro* de semillas y/o explantes derivados de plantas nativas.
- b) Cultivo *in vitro* de plantas derivadas de la germinación de las semillas y/o explantes.
- c) Inducción de la formación de:
 - c1) callos en plantas cultivadas *in vitro*, en medios de cultivo apropiados
 - c2) raíces en cabellera en explantes o en plantas cultivadas *in vitro*, mediante la infección guiada con bacterias *A. rhizogenes*, en medios de cultivo apropiados.
- d) Cultivo *in vitro* en suspensión de las líneas celulares y/o agregados celulares, derivados del crecimiento de los callos o las raíces en cabellera del paso c) en medios de cultivo apropiados.
- e) Estimulación de los cultivos celulares y/o agregados celulares en suspensión del paso d).
- f) Extracción de nor-triterpenos metilen-quinonas presente tanto en los medios de cultivo líquidos como en los propios cultivos celulares del paso d).
- g) Medida de la concentración de los nor-triterpenos metilen-quinonas del apartado f).

En una realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los medios de cultivo utilizados comprenden una fuente de carbono, específicamente sacarosa, fructosa y/o glucosa en una proporción del 1-10% (w/v).

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los medios de cultivo mencionados anteriormente son B5 y MS y además están suplementados con 2,4-D, NAA y BAP.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los nor-triterpenos metilen-quinonas se seleccionan entre: triterpenos pentacíclicos con dobles enlaces presentes en el anillo B, 20-hidroxitingenona y diversos fenol triterpenos quinonas.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los nor-triterpenos metilen-quinonas son preferentemente tingenona y 22 β -hidroxitingenona. En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque comprende el tratamiento de los cultivos de raíces en cabellera del paso c.2) con antioxidantes y antibióticos, siendo preferentemente los antioxidantes utilizados PVPP o PVP o DTT y los antibióticos tetraciclina y cefotaxima.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las líneas celulares derivadas de los cultivos de callos del paso d) son preferentemente 1LD y 3COT.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los estimuladores utilizados en el paso g) se seleccionan entre: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium* sp., extracto de levadura, ácido salicílico, ácido acetil salicílico, etanol, quitosano y metil jasmonato. Utilizándose preferentemente metil jasmonato a una concentración que varía entre 0,1-2,0 mM, preferentemente 0,1 y 0,5 mM.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el tiempo de tratamiento de los cultivos *in vitro* del paso g) con los estimuladores varía de 4-72 h, preferentemente 6 y 24 h.

ES 2 352 491 A1

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los explantes utilizados proceden de hojas y cotiledones.

5 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las plantas son de la familia *Hippocrateaceae* o *Celastraceae* y, en el caso de esta última las plantas pertenecen preferentemente a la especie *Maytenus canariensis*.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

10 Ejemplo 1

Esterilización de la superficie de las semillas de M. canariensis y germinación de nuevas plantas

15 El protocolo descrito para la esterilización de las semillas de *M. canariensis* es similar al reportado por Gutiérrez-Nicolás, *et al.* (2008). Después de la recogida y secado de los frutos de plantas *M. canariensis*, se recogieron sus semillas y se guardaron a temperatura ambiente. En el momento de su uso se procedió a la esterilización de las mismas mediante una breve inmersión de las semillas en una solución acuosa al 70% en etanol durante 30 segundos, seguido por varios tratamientos para esterilizar la superficie de las semillas:

20 1) Introducir las semillas en una solución acuosa de hipoclorito de sodio (v/v) al 7% durante 15 minutos y a continuación, cuatro lavados con agua destilada estéril, a fin de eliminar cualquier exceso de cloro.

25 2) Introducir las semillas en una solución acuosa de HgCl_2 (w/v) al 1% durante 15 o 25 minutos, seguido de un tratamiento con H_2O_2 al 20% (v/v) durante 5 min, y finalmente se lavan cuatro veces con agua destilada estéril, a fin de eliminar cualquier exceso de cloro.

30 Posteriormente las semillas fueron sometidas a un tratamiento para estimular su germinación. Este tratamiento consistió en la inmersión de las semillas en H_2SO_4 a una concentración de 18,76 M (95-98% de pureza) durante 15 minutos, y posteriormente se lavaron con agua destilada. Un determinado número de semillas se colocaron en placas Petri con medio sólido MS suplementado con sacarosa y a un pH:5,8. Estas placas se introdujeron en una cámara de cultivos a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, 16-h fotoperíodo y con una irradiación de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría, para favorecer la germinación. Las plantas resultantes se transfirieron junto con el mismo medio de cultivo sólido a recipientes ("vasos") de cultivo de vidrio (6 cm de diámetro x 10 cm de altura) manteniéndose las mismas condiciones de cultivo para favorecer el crecimiento de las nuevas plantas y, por tanto, la obtención de una fuente de plantas jóvenes en crecimiento.

35 Cuando el material vegetal utilizado para la germinación de nuevas plantas no son semillas, sino que se trata de explantes de árboles maduros (hojas, tallo, cotiledones, etc), la esterilización de la superficie se realiza de manera similar al caso anterior. En primer lugar se lava el material en agua jabonosa y posteriormente se introduce en etanol durante 30-50 segundos, seguido por inmersiones en una solución acuosa de lejía al 7-15% de hipoclorito de sodio (v/v) durante 15-25 min con agitación esporádica y suave, finalmente se lavan con agua destilada estéril con el fin de eliminar cualquier exceso de cloro.

45 Ejemplo 2

Cultivo de callos

50 Para el cultivo de los callos se emplearon trozos de 2 cm de tamaño de explantes (hojas, tallos, cotiledones, raíces) de árboles maduros de *M. canariensis* o de las plantas (3-4 meses de edad) cultivadas *in vitro* a partir de la germinación de las semillas de *M. canariensis*.

55 Tanto los explantes de árboles adultos como los de las plantas cultivadas *in vitro* se cultivaron en medios de cultivo sólidos (con agar a una concentración de 0,7%) utilizados generalmente para el cultivo de células vegetales. Estos medios de cultivo son: medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) y medio de cultivo de Gamborg (B5) (Tabla 1). En la presente invención se realizaron modificaciones en la composición de dichos medios de cultivo, para evaluar la influencia del medio de cultivo en la concentración de nor-triterpenos metilen-quinona obtenidos. Así en los diferentes experimentos realizados, se cultivaron las células en presencia de dichos medios de cultivo tal cual, sin ninguna modificación, pero también se utilizaron con la mitad de la concentración de sales que normalmente poseen, y también se utilizaron dichos medios suplementados con diferentes reguladores del crecimiento (Tabla 2).

65 Las condiciones de cultivo de los callos son las mismas que las mencionadas anteriormente, las placas de cultivo se introdujeron en una cámara de cultivos a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, 16-h fotoperíodo y con una irradiación de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría.

ES 2 352 491 A1

TABLA 1

Composición basal de sales de los medios de cultivo utilizados en la presente invención

Medio de cultivo B5	Concentración (mg/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	370,0
CaCl ₂ 2H ₂ O	440,0
KNO ₃	1.900,0
NH ₄ NO ₃	1.650,0
KH ₂ PO ₄	170,0
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ 4H ₂ O	16,8
KI	0,83
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ EDTA	37,08
Glicina	100,0
Mio-inositol	100,0
Tiamina	0,1
Acido Nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5

ES 2 352 491 A1

Medio de cultivo MS	Concentración (mg/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.500,0
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.500,0
KNO ₃	2.500,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.340,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.500,0
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ 4H ₂ O	10,0
KI	0,75
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,0
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	3,0
Na ₂ EDTA	37,3
Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O	0,25
Mio-inositol	100,0
Tiamina	10,0
Acido Nicotínico	1,0
Piridoxina	1,0

ES 2 352 491 A1

TABLA 2

Lista de reguladores del crecimiento añadidos a los medios de cultivo empleados para el crecimiento de los cultivos in vitro de callos de M. canariensis

Medio de cultivo	Regulador del crecimiento (mg/L)		
1-MS	2,4-D (1,0)		
2-MS	2,4-D (2,0)		
3-MS	2,4-D (4,0)		
½ MS-1	2,4-D (1,0)		
½ MS-2	2,4-D (2,0)		
½ MS-3	2,4-D (4,0)		
MS-1	2,4-D (4,0)	NAA (2,0)	BAP (0,0)
MS-2	2,4-D (6,0)	NAA (3,0)	BAP (0,0)
MS-3	2,4-D (4,0)	NAA (2,0)	BAP (1,0)
MS-4	2,4-D (6,0)	NAA (3,0)	BAP (1,0)
MS-5	2,4-D (0,0)	NAA (2,0)	BAP (4,0)
MS-6	2,4-D (2,0)	NAA (0,0)	BAP (4,0)
1-B5	2,4-D (1,0)		
2-B5	2,4-D (2,0)		
3-B5	2,4-D (4,0)		
½ B5-1	2,4-D (1,0)		
½ B5-2	2,4-D (2,0)		
½ B5-3	2,4-D (4,0)		
B5-1	2,4-D (4,0)	NAA (2,0)	BAP (0,0)
B5-2	2,4-D (6,0)	NAA (2,0)	BAP (0,0)
B5-3	2,4-D (4,0)	NAA (3,0)	BAP (1,0)
B5-4	2,4-D (6,0)	NAA (3,0)	BAP (1,0)
B5-5	2,4-D (0,0)	NAA (2,0)	BAP (4,0)
B5-6	2,4-D (2,0)	NAA (0,0)	BAP (4,0)

2,4,-D: ácido di-clorofenoxi-acético; NAA: ácido naftalenoacético; BAP: 6-bencil-amino-purina

ES 2 352 491 A1

5 Cuando se utilizaron explantes de hojas o cotiledones se produjo una inducción del crecimiento *in vitro* de los callos del orden del 40-55% después de 50-55 días de cultivo. En cambio, cuando los explantes se obtuvieron de tallos no se produjo inducción del crecimiento de los callos. Los callos resultantes obtenidos constituyen el material básico empleado para la obtención de cultivos celulares en suspensión. Para ello se cortaron los callos en crecimiento y se transfirieron a diferentes medios de cultivo líquidos (Tablas 1 y 2) para el establecimiento de cultivos *in vitro* continuos de células en suspensión. El material original de los callos cortado para iniciar los cultivos celulares en suspensión fue devuelto al medio de cultivo inicial para continuar su crecimiento y así conseguir un suministro cuasi-continuo de callos.

10 Ejemplo 3

Cultivos de agregados celulares en suspensión

15 Como se ha mencionado anteriormente, los cultivos celulares en suspensión derivan de las células y/o fragmentos de callos obtenidos de los cultivos originales de callos provenientes de explantes de hojas y/o cotiledones de árboles adultos o de plantas jóvenes cultivadas *in vitro* en los medios de cultivo líquidos que se muestran en las Tablas 1 y 2. Las células o fragmentos de callos escindidos (1-1,5 g) de dichos cultivos se recogieron asépticamente y se sembraron en matraces Erlenmeyer que contenían los medios de cultivo que se muestran en las Tablas 1 y 2. Estos Erlenmeyer se sellaron con papel de aluminio, se colocaron en un agitador orbital (95 rpm) y se introdujeron en una cámara de cultivos bajo condiciones de luz u oscuridad (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-h de fotoperíodo y una irradiación de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría).

25 El establecimiento inicial de cultivos en suspensión en dichos medios fue lento, ya que las células y/o los fragmentos de callos tienden a formar agregados. Para evitar la formación de dichos agregados, se pegaron en el fondo de los Erlenmeyer dos cristales (2x2 cm), para que mediante la agitación a la que eran sometidos estos cultivos, se produjese el golpeo o choque de las células con las piezas de vidrio obligándolas a descomponerse en pequeños agregados. Las células se mantuvieron en estos Erlenmeyer durante 2-3 periodos de subcultivo (45-55 días de duración cada uno) y, a continuación, los pequeños agregados de células se traspasaron a Erlenmeyer normales que contenían los medios de cultivo mencionados en las Tablas 1 y 2.

35 Las distintas líneas celulares establecidas y originadas de los diferentes tipos de explantes y diferentes medios de cultivo empleados, se mantuvieron en continuo crecimiento mediante la inoculación de aproximadamente 1-1,2 g de los agregados celulares a los medios de cultivo líquidos. Los matraces de cultivo se colocaron en un agitador orbital (95 rpm) en condiciones de luz u oscuridad y en idénticas condiciones de fotoperíodo y temperatura mencionadas anteriormente, durante un periodo de 90-95 días dependiendo de la línea celular. Se realizaron muestreos regulares en dichos cultivos celulares con el fin de determinar la biosíntesis y la concentración de los nor-triterpenos metilenoquinonas de la presente invención, así como para determinar la cinética de crecimiento del cultivo y otros parámetros, tales como cambios de pH, niveles proteicos, etc.

40 Otros tipos de recipientes y/o biorreactores apropiados para el crecimiento de este tipo de cultivos, también pueden ser utilizados en la presente invención.

45 Ejemplo 4

Cultivos de raíces en cabellera

50 Los cultivos de raíces en cabellera se indujeron mediante la infección guiada con diferentes cepas de bacterias *Agrobacterium rhizogenes* en explantes (hojas, cotiledones y fragmentos de tallo) de plantas adultas *M. canariensis* o directamente en plantas jóvenes obtenidas mediante cultivos *in vitro* de semillas de *M. canariensis* de acuerdo al procedimiento descrito en la presente invención.

55 Para la infección de los explantes (2-3 cm de largos) se sumergieron los mismos durante 3-4 min en una solución de *A. rhizogenes*. Pasado ese tiempo se traspasaron a placas Petri que contenían diferentes medios de cultivo sólidos (Tabla 3) donde continuó su crecimiento y se estudió la inducción de las raíces en cabellera. Se llevó a cabo la adición de antioxidantes a los medios de cultivo para reducir la oxidación y necrosis de los explantes provocada por la infección bacteriana. Entre estos antioxidantes se encuentran: poli-vinil-poli-pirrolidona (PVPP), poli-vinil-pirrolidona (PVP) y di-trio-treitol (DTT).

60 Después de tres días de mantenimiento de dichos cultivos en los medios mencionados, se cambió el medio de cultivo y se empleó uno con antibiótico (tetraciclina, 100 mg/L) para eliminar la infección bacteriana. Se mantuvo el cultivo en dicho medio durante un periodo de 30-40 días. Los explantes que continuaban infectados pasado este tiempo se traspasaron a otro medio de cultivo que contenía otro antibiótico (cefotaxima, 100 mg/L) para terminar de eliminar la infección bacteriana y establecer un cultivo libre de bacterias.

TABLA 3

Medios de cultivo sólidos utilizados para continuar el crecimiento y la inducción de las raíces en cabellera en los explantes infectados con Agrobacterium rhizogenes

Medio de cultivo	Antioxidante	Antibiótico (mg/L)	Antibiótico (mg/L)
MS	PVPP o PVP (1%)	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
MS	PVPP o PVP (1.5%)	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
MS	PVPP o PVP (1%) + DTT	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
MS	PVPP o PVP (1.5%) DTT	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
B5	PVPP o PVP (1%)	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
B5	PVPP o PVP (1.5%)	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
B5	PVPP o PVP (1%) + DTT	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)
B5	PVPP o PVP (1.5%) + DTT	Tetraciclina (100)	Cefotaxima (100)

Otra realización de la presente invención se refiere a la infección realizada directamente inoculando en el tejido de plantas jóvenes (3-4 meses) crecidas *in vitro* mediante el procedimiento descrito en la presente invención, cultivos concentrados de bacterias *A. rhizogenes*. Para ello se empleó una aguja estéril impregnada con el cultivo bacteriano y, a continuación, se realizaron repetidas inoculaciones con dicha aguja en la zona internodal de los tallos de las plantas jóvenes arriba mencionadas. Posteriormente, dichas plantas siguieron su crecimiento en el mismo medio de cultivo hasta que se produjo la inducción y el crecimiento de las raíces en cabellera en las mismas. En este procedimiento no se utilizaron antioxidantes y el tratamiento con los antibióticos se realizó después de que las raíces en cabellera hubieron emergido desde los nodos de infección de las plantas, cosa que se produjo alrededor de los 35-45 días después de la infección. Estas raíces en cabellera se cortaron para cultivarse durante aproximadamente 40-45 días en medios de cultivo sólidos y/o líquidos que contenían antibióticos. Durante este tiempo se realizaron sucesivos cambios de medios de cultivo para asegurar la completa eliminación de la infección bacteriana.

Los explantes de plantas adultas también pueden infectarse con *A. rhizogenes* siguiendo el procedimiento descrito arriba para la infección de las plantas jóvenes cultivadas *in vitro*, es decir, dichos explantes pueden ser infectados con una aguja contaminada con *A. rhizogenes*. A los tres días de la infección, los explantes contaminados se trasladan a diferentes medios de cultivo sólidos (Tabla 3) para seguir con su crecimiento y posteriormente expuestos a los antioxidantes y antibióticos antes mencionados para eliminar la contaminación bacteriana.

Una vez eliminada la infección bacteriana de los cultivos de las raíces en cabellera, éstas se trasladan a los medios sólidos y/o líquidos (Tabla 4) para continuar su crecimiento.

Subcultivos regulares (1,5-2,0 g peso fresco) de los cultivos origen se realizaban aproximadamente a los 30-40 días de manera regular, con el fin de mantener un crecimiento continuo de estos cultivos. Estos cultivos se mantenían en matraces Erlenmeyer sellados con papel de aluminio, en agitación y a las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas a lo largo de la presente invención.

Otros tipos de recipientes de cultivo y biorreactores son también aplicables para el crecimiento de este tipo de cultivos. Se realizan muestreos regulares a fin de determinar la biosíntesis y la acumulación de los principales nor-triterpenos metilen-quinonas mencionados en la presente invención.

TABLA 4

Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de raíces en cabellera en la especie *M. canariensis*

Medio de cultivo	Fuente de Carbono (1-4%)
MS	Sacarosa y/o glucosa
B5	Sacarosa y/o glucosa
DCR	Sacarosa y/o glucosa
WPM	Sacarosa y/o glucosa
½ MS	Sacarosa y/o glucosa
½ B5	Sacarosa y/o glucosa
½ DCR	Sacarosa y/o glucosa
½ WPM	Sacarosa y/o glucosa

½: medio de cultivo con la mitad de la concentración de las sales que lo forman.

Ejemplo 5

Estimulación de los cultivos in vitro para la potenciación de la producción de metabolitos secundarios

Con el fin de mejorar la producción de los nor-triterpenos metilen-quinonas y compuestos relacionados, en los cultivos *in vitro* descritos en la presente invención se ha llevado a cabo el tratamiento de dichos cultivo con estimuladores (Boitel-Conti *et al.*, 2000). Los elicitores son sustancias químicas o biológicas capaces de inducir cambios fisiológicos y bioquímicos en el organismo o sistema diana vivo. Esto incluye estimuladores abióticos, tales como iones metálicos y compuestos inorgánicos, y estimuladores bióticos derivados de hongos, bacterias, virus o herbívoros, componentes de la pared celular de las plantas, así como los productos químicos liberados por las plantas cuando son atacadas por patógenos o herbívoros (Zhao *et al.*, 2005). En el contexto de la presente invención, el término estimulador se refiere a compuestos y factores que activan la síntesis y la acumulación de dichos triterpenos.

Diferentes compuestos pueden funcionar como estimuladores, dependiendo de su origen y del mecanismo de acción en los sistemas fisiológicos y/o bioquímicos del organismo. Un factor importante en la adición de los estimuladores es la concentración de los mismos utilizada y el protocolo de administración seguido. En la presente invención se describen diferentes realizaciones en las que los estimuladores pueden aplicarse continuamente a los cultivos a modo de "pulsos" o "gotas" o durante la fase del desarrollo de los cultivo. Las concentraciones utilizadas de los mismos varían entre 0,1 y 2 mM, dejándose actuar en el cultivo durante periodos de tiempo entre 4-72 horas con el fin de averiguar cuales eran las condiciones en las que se conseguía una inducción óptima en el rendimiento de la producción de los nor-triterpenos metilen-quinonas. Los estimuladores utilizados se muestran en la Tabla 5.

ES 2 352 491 A1

TABLA 5

Lista de estimuladores empleados para la estimulación de la síntesis de nor-triterpenos metilen-quinonas en cultivos in vitro de M. canariensis

5

10

15

20

25

30

Estimulador
<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Phytophthora parasitica</i>
<i>Pythium</i> sp.
Extracto de Levadura
Acido Salicílico
Acido Acetil Salicílico
Metil jasmonato
Etanol
Quitosano

35

El efecto del tratamiento con los estimuladores en la síntesis de nor-triterpenos metilen-quinonas, se estudió tanto en los cultivos de las células en suspensión, como en el propio medio de cultivo en el que crecían.

Ejemplo 6

40

Extracción de nor-triterpenos metilen-quinonas y compuestos relacionados en cultivos in vitro de Maytenus canariensis

45

Para la extracción de los nor-triterpenos metilen-quinonas de los cultivos *in vitro*, en primer lugar se procedió a la separación del cultivo celular, propiamente dicho del medio de cultivo, mediante filtración en vacío. Posteriormente el cultivo celular aislado se pesó y se liofilizó durante 24 h. La materia seca fue homogeneizada en nitrógeno líquido y el material vegetal de dicha mezcla fue extraído con una mezcla de hexano y éter dietílico (1:1 v/v) durante 5 horas en agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se filtra y las células quedan libres de desechos orgánicos. Dicha mezcla se seca empleando un rotavapor sobre un baño de agua a 40°C. Por último, la muestra se resuspendió en 1,0-2,0 ml de acetonitrilo (grado HPLC), se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μm o se centrifugaron a 13000 rpm y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

50

55

Para la extracción de los nor-triterpenos metilen-quinonas del medio de cultivo se realizó mediante el método líquido-líquido utilizando iguales volúmenes de diclorometano. El agua contenida fue eliminada mediante la adición de sulfato sódico anhidro seguido de filtración y evaporación por secado. Por último, se tomó la muestra y se resuspendió en 1,0-2,0 ml de acetonitrilo (grado HPLC), se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μm o se centrifugaron a 13000 rpm y se almacena a -20°C hasta su análisis.

Ejemplo 7

60

Análisis y cuantificación de los nor-triterpenos metilen-quinonas presentes en cultivos in vitro de Maytenus canariensis mediante HPLC

65

Para la determinación cuantitativa de los nor-triterpenos metilen-quinonas en las muestras aisladas de los cultivos celulares y del medio de cultivo arriba descrito, se utilizó el sistema HPLC. El detector de UV de dicho sistema fue establecido a una longitud de onda de 420 nm, y el rango de digitalización del espectro UV para cada pico detectado variaba desde 200 a 600 nm (Figura 4). La fase móvil isocrática fue una mezcla desgasificada de acetonitrilo-agua HPLC (80:20). La muestra inyectada fue de 10-20 μL y el análisis se realizó a un flujo de 2,1 mL/min durante 12-

14 min. Muestras de tingenona y 22 β -hidroxitingenona purificadas se utilizaron para ayudar a la identificación de las muestras de acuerdo a sus tiempos de retención y espectros UV (Figura 4). Con estos dos compuestos, se realizó una curva de calibrado que fue empleada para la cuantificación final de los nor-triterpenos metilen-quinonas presentes en las muestras de análisis.

5

Ejemplo 8

10 *Inducción de la formación de callos a partir de explantes de plantas jóvenes cultivadas in vitro de Maytenus canariensis*

Para inducir la formación de callos se utilizaron explantes de hojas, tallos y cotiledones de plantas jóvenes (3-4 meses de edad) cultivadas *in vitro* y obtenidas después de la germinación de semillas de *M. canariensis* siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

15

Los explantes fueron cultivadas en diferentes medios sólidos (agar 0,7%) (Tabla 2) en placas Petri colocadas en una cámara de cultivo a una temperatura de 25 \pm 2°C, 16-h fotoperíodo e irradiadas con luz blanca fría (35 μ mol/m⁻²/s⁻¹), durante 8 semanas para permitir la completa inducción del crecimiento del callos. En la mayoría de los casos dicha inducción del crecimiento se produjo aproximadamente a los 50-60 días de cultivo de los explantes de las hojas y de los cotiledones, mientras que en el caso de los explantes de tallos apenas se produjo la inducción del crecimiento de los callos.

20

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de inducción y crecimiento de los callos derivados de los cultivados de los explantes de hojas o cotiledones mencionados arriba, así como los medios de cultivo en los que se consiguieron los mayores porcentajes de inducción del crecimiento. La inducción del crecimiento del callos fue independiente del tipo de medio de cultivo utilizado y del tipo de explante utilizado, consiguiéndose similares porcentajes de inducción de los callos procedentes de explantes de hojas y de cotiledones.

25

Algunos medios de cultivo, en particular los que contienen como único regulador de crecimiento, 2,4-D a las concentraciones de 1,0 a 4,0 mg/L (Tabla 2), en lugar de inducir la formación de los callos, fomentaron la formación de múltiples raíces. Este hecho sucedió principalmente cuando se utilizaron los medios de cultivo B5 o MS que contenían 2 o 4 mg/L de 2,4-D.

30

TABLA 6

35 *Inducción y proliferación de los callos de M. canariensis cultivados en diferentes medios de cultivo*

Medio de cultivo	Inducción del crecimiento (%)	Proliferación del crecimiento (%)
MS-3	43,5 %	+++
MS-5	30,2 %	++
MS-6	51,3 %	+++
B5-1	15,6 %	++
B5-3	40,2 %	+++
B5-4	31,2 %	+++
B5-5	23,8 %	++

40

45

50

55

60

Ejemplo 9

65 *Inducción de la formación de raíces en cabellera en explantes de plantas cultivadas in vitro y/o en explantes de plantas adultas de la especie M. canariensis*

Para la inducción de la formación de raíces en cabellera en plantas jóvenes (3-4 meses de edad) obtenidas de cultivos *in vitro* de semillas o de explantes (hojas, tallos o cotiledones) de plantas adultas de la especie *M. canariensis*, se utilizó la técnica de la infección guiada con diferentes cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. Destacar que la inducción

65

de la formación de las raíces en cabellera sólo tuvo lugar cuando la infección fue realizada en la planta joven cultivada *in vitro* y no en los explantes de plantas adultas.

Antes de producir la infección, se mantuvieron en cultivo las bacterias durante 2 días hasta conseguir una densidad de cultivo de 2,0-2,5 y posteriormente se procedió a la infección guiada de las plantas jóvenes cultivadas *in vitro* y obtenidas mediante la germinación de semillas de *M. canariensis*. Para llevar a cabo la infección, se impregnó una aguja estéril con el cultivo bacteriano y mediante pinchazos repetitivos con dicho punzón sobre las zonas internodales del tallo de dichas plantas.

Después de 40-45 días, las raíces en cabellera emergidas desde las zonas de infección eran visibles. En la Tabla 7 se pueden observar los diferentes porcentajes de inducción de raíces en cabellera en función de la cepa de *A. rhizogenes* utilizada para la infección.

TABLA 7

Inducción de raíces en cabellera en M. canariensis mediante la infección guiada con diferentes cepas de Agrobacterium rhizogenes

Cepas de <i>A. rhizogenes</i>	Densidad óptica de cultivos bacterianos	Número de plantas infectadas	Inducción de raíces en cabellera
ATCC 15834	2,21	65	46,1 %
LBA 1334 pBin 19 GUS intron	2,87	10	90,0 %
LBA 9402	2,36	40	65,0 %

Ejemplo 10

Cultivos de agregados celulares de M. canariensis y medida de la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas

Las líneas celulares provenientes de los cultivos de callos descritos anteriormente, se cultivaron en diferentes medios de cultivo con distintas características, con el fin de evaluar el crecimiento del cultivo y la producción y rendimientos de los nor-triterpenos metilen-quinonas sintetizados por las mismas. Para ello, se recogió 1 g de los agregados celulares provenientes de los callos y que se mantienen en crecimiento y se traspasó a Erlenmeyers que contenían los medios de cultivo MS3 y MS6 (Tabla 2). Estos cultivos fueron sellados con papel de aluminio y colocado sobre un agitador orbital (95 rpm) en una cámara de cultivo, ya sea bajo condiciones de luz o de oscuridad (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-h fotoperíodo e irradiación con luz blanca fría de $35 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$).

Para cada uno de los tiempos estudiados se utilizaron tres cultivos en paralelo para evitar la variabilidad intermuestral, registrándose también los valores de pH de cada uno de los medios de cultivo.

Transcurrido el tiempo de estudio, se separó mediante filtración el medio nutritivo líquido de los agregados celulares. La extracción de los nor-triterpenos metilen-quinona de los agregados celulares se realizó tras secado de las muestras empleando un liofilizador, registrándose los valores de peso seco. El aumento de la biomasa obtenida se muestra como la variación de peso fresco recogido en cada cultivo (Figura 1). Se cogieron aproximadamente 100-125 mg de peso seco de cada muestra y se homogeneizaron. Para la extracción de los nor-triterpenos metilen-quinonas, de la muestra homogeneizada se usa una mezcla de hexano y éter dietílico (1:1, v/v), la cual se mantiene en agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtra, los desechos orgánicos de las células son eliminados y la fase líquida, secada en un evaporador rotatorio sobre un baño de agua caliente a 40°C . Por último, se resuspendieron las muestras en 1,0-2,0 ml de acetonitrilo (grado HPLC), posteriormente se filtraron a través de una membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ o se centrifugaron a 13000 rpm y fueron almacenadas a -20°C hasta que se proceda a su medida.

La extracción de los nor-triterpenos metilen-quinonas del medio de cultivo se realizó mediante el método llamado líquido-líquido, tres veces consecutivas, empleando volúmenes iguales de diclorometano y haciendo uso de un embudo. El agua contenida en la fase orgánica fue eliminada mediante la adición de sulfato sódico anhidro seguida por filtración y evaporación. Por último, se resuspendieron las muestras en 1,0-2,0 ml de acetonitrilo (grado HPLC), posteriormente se filtraron a través de una membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ o se centrifugaron a 13000 rpm y fueron almacenadas a -20°C hasta que se proceda a su medida.

ES 2 352 491 A1

Para la determinación cuantitativa de la concentración de los nor-triterpenos metilen-quinonas presentes en las muestras de cultivos celulares y medio de cultivo, mencionados anteriormente, se utilizó HPLC. Brevemente, el detector de UV de dicho sistema fue establecido a una longitud de onda de 420 nm, y el rango de digitalización del espectro UV para cada pico detectado variaba desde 200 a 600 nm (Figura 4). La fase móvil isocrática fue una mezcla desgasificada de acetonitrilo-agua HPLC (80:20). La muestra inyectada fue de 10-20 μL y el análisis se realizó a un flujo de 2,1 mL/min durante 12-14 min. Muestras de tingenona y 22 β -hidroxitingenona purificadas se utilizaron para ayudar a la identificación de las muestras de acuerdo a sus tiempos de retención y espectros UV (Figura 4). Con estos compuestos se realizó una curva de calibrado que fue empleada para la cuantificación final de los nor-triterpenos metilen-quinonas presentes en las muestras.

Se observó que la cantidad de dichos nor-triterpenos metilen-quinonas liberados al medio de cultivo líquido es muy baja con valores máximos para la tingenona de 33,23 y de 74,07 $\mu\text{g}/\text{matraz}$ de cultivo para la línea celular 3COT crecida en medio MS3 bajo condiciones de luz u oscuridad respectivamente. En el caso de la 22 β -hidroxitingenona las cantidades liberadas al medio líquido son aún más bajas, con valores máximos de 10,20 y 0,15 $\mu\text{g}/\text{matraz}$ de cultivo para la línea celular 3COT crecida en medio MS3 en condiciones de luz u oscuridad respectivamente.

Las cantidades de nor-triterpenos metilen-quinonas en las muestras extraídas de las células en cultivo fueron mucho mayores (Figura 2) que las liberadas al medio, mostrando valores máximos para la tingenona de 5 mg/g de peso seco en la línea celular 3COT crecida en medio MS3 bajo condiciones de oscuridad, un incremento de 84 veces más en comparación con las concentraciones obtenidas en las plantas nativas (Figura 2A). Del mismo modo, las cantidades máximas acumuladas para la misma línea celular en el mismo medio de cultivo pero en condiciones de luz fueron de 3,2 mg/g de peso seco, 53 veces más en comparación con lo obtenido en las mismas condiciones en las plantas nativas (Figura 2B). En cuanto a la 22 β -hidroxitingenona, al igual que ocurre en la planta nativa, este metabolito se acumula siempre en menores cantidades, en un ratio de 10:1 (tingenona vs 22 β -hidroxitingenona) con valores máximos de 1,25 mg/g de peso seco para la línea celular 3COT cultivada en medio MS3 bajo condiciones de luz, lo que equivale a un incremento de 250 veces más en comparación con las plantas nativas cultivadas en las mismas condiciones.

Se analizó también las concentraciones de nor-triterpenos metilen-quinonas de la presente invención en otra línea celular, 1LD crecida en medio MS6 bajo condiciones de oscuridad o luz (Figura 3). Como se muestra en esta figura, para esta línea celular, las condiciones de luz inhiben la acumulación de dichos compuestos (Figura 3A), mientras que las condiciones de oscuridad favorecen la acumulación de grandes cantidades de nor-triterpenos metilen-quinonas (Figura 3B). Bajo condiciones de oscuridad esta línea celular produce el mayor rendimiento en la producción de tingenona 13,5 mg/g de peso seco, que representa un incremento de 227 veces más que el producido en las plantas. De igual manera, se produjo un gran incremento en la concentración de 22 β -hidroxitingenona (1,86 mg/g de peso seco), incremento que representa 370 veces más comparado con la cantidad encontrada en las plantas nativas. Los ratios de producción de ambos nor-triterpenos metilen-quinonas estaban alrededor de 11:1 (tingenona vs-22 β -hidroxitingenona), similar al ratio que presentan las plantas nativas. Estos resultados ponen de manifiesto el interés de esta planta medicinal, y su potencial para la explotación biotecnológica.

Ejemplo 11

Estimulación de cultivos celulares de M. canariensis con metil jasmonato y medida de la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas

Los cultivos celulares de *M. canariensis* que crecen en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo líquido, fueron tratados a diferentes tiempos y concentraciones con el elicitador Metil Jasmonato (MeJ). Las concentraciones utilizadas de dicho estimulador fueron 0,1 mM y 0,5 mM, y los tiempos de tratamiento oscilaron entre 6 y 24 h.

Después del tratamiento con MeJ se recogió el medio de cultivo y las células para medir la concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas presentes en ambos. Después de la separación del medio de cultivo de las células, como se ha descrito a lo largo de la presente invención, se procedió a la medida de la concentración de dichos compuestos mediante HPLC tal como se describe en esta invención.

Se observó que la concentración de los nor-triterpenos metilen-quinonas, liberados en el medio líquido cuando los cultivos habían sido tratados con MeJ fue mayor que la presente en los cultivos celulares no tratados con MeJ, en algunos casos se llegó a obtener una concentración de 20 a 30 veces mayor para la 22 β -hidroxitingenona, y de 50-60 veces mayor para la tingenona. No obstante, las concentraciones obtenidas de los nor-triterpenos metilen-quinonas sigue siendo mayor en los extractos celulares de cultivos tratados con MeJ que en el medio de cultivo donde se han cultivado dichos extractos (Tabla 8).

El uso de MeJ a la concentración de 0,1 mM fue más efectivo a la hora de incrementar la producción de tingenona cuando se dejaba actuar durante tiempos largos (24 h), en cambio, la concentración de 0,5 mM produce mayor incremento en la síntesis de tingenona cuando el MeJ se deja actuar durante tiempos cortos (6 h). En relación a la 22 β -hidroxitingenona, la mayor producción de este triterpeno se registró a una concentración de MeJ de 0,5 mM después de 6 h de tratamiento (Tabla 8).

TABLA 8

Concentración de nor-triterpenos metilen-quinonas después del tratamiento con MeJ de cultivos *in vitro* de células ILD de *M. canariensis* crecidas en medio MS6

MeJ	Triterpenos en células (µg/g peso seco)		Triterpenos liberados al medio líquido (µg/matraz)	
	Tingenona	22β- hidroxitingenona	Tingenona	22β- hidroxitingenona
0.1 mM (6h)	1926,19	335,85	296,26	16,82
0.5 mM (6h)	4253,35	1247,17	540,65	34,09
Control (6h)	1133,93	420,76	422,14	22,84
0.1 mM (24h)	3116,81	438,57	196,61	13,43
0.5 mM (24h)	2640,55	839,14	368,94	19,57
Control (24h)	2182,69	454,40	426,62	28,41

Bibliografía

- Avilla J, Teixido A, Velázquez C, Alvarenga N, Ferro E, Canela R (2000). *J. Agric. Food Chem.* 48: 88-92.
- Boitel-Conti M, Laberche JC, Lanoue A, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS (2000). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 131-137.
- Bringmann G, Saeb W, Assi LA, Francois G, Narayanan ASS, Peters K, Peters EM (1997). *Planta Med.* 63, 255-257.
- Campanelli AR, D'Alagni M, Marini-Bettolo GB (1980). *FEBS Lett.* 122: 256-260.
- Dewick PM (2002). Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2nd Edition. *John Wiley & Sons*, Ltd John Wiley & Sons, New York.
- Chapman and Hall/CRC (2000). Dictionary of Natural Products on CD-ROM (ISBN-13: 978-0412491504).
- Farsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z (1985). *Bull. WHO.* 63:965.
- Furbacher TR, Gunatilaka AAL (2001). *J. Nat. Prod.* 64: 1294-1296.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. (1968). *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Goijman SG, Turrens JF, Marini-Bettolo GB, Stoppani AOM (1985). *Experientia* 41: 646-648.
- González AG, Alvarenga NL, Ravelo AG, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Canela NJ, Moujir LM (1996). *Phytochemistry*, 43: 129-132
- González AG, Darias V, Boada J, Alonso G (1977). *Planta Med.* 32: 282-286.
- González AG, Ravelo AG, Bazzochii IL, Jiménez J, González CM, Luis JG, Ferrol EA, Gutiérrez A, Moujir L, de las Heras EG (1988). *IL Farmaco* 43:501-505.
- González AG, Jiménez IA, Ravelo AG, Bazzochi IL (1993). *Tetrahedron* 49:6637-6644.
- González AG, Jiménez IA, Ravelo AG, Coll J, González JA, Lloria J (1997) *Biochem. System Ecol.* 25: 513-519.

ES 2 352 491 A1

- **Gutiérrez-Nicolás F, Ravelo AG, Zárate R** (2008). *Biol. Plantarum* 52: 173-176.
- **Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H** (2008). *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 26-42.
- 5 • **Jeller AH, Siqueira-Silva DH, Morais-Liao L, da Silva-Bolzani V, Furlan M** (2004). *Phytochemistry* 65: 1977-1982.
- **Kashiwada Y, Chiyo J, Ikeshiro Y, Nagao T, Okabe H, Cosentino LM, Fowke K, Lee KH** (2001). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 183-185.
- 10 • **Kutney, J.P., M.H. Beale, P.J. Salisbury, K.L. Stuart, B.R. Worth, P.M. Townsley, W.T. Chalmers, K. Nilsson, and G.G. Jacoli** (1981). *Phytochemistry* 20:653-657. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus bachananii*.
- 15 • **Lee BW, Seo WD, Gal SW, Yang MS, Park KH** (2004). *Agric. Chem. Biotechnol.* 47: 77-80.
- **Liao LM, Silva GA, Monteiro MR, Albuquerque S.** (2008) *J. Bioscie.* 63: 207-210.
- 20 • **Mena-Rejón GJ, Pérez-Espadas AR, Moo-Puc RE, Cedillo-Rivera R, Bazzocchi IL, Jiménez-Díaz IA, Quijano L** (2007). *J. Nat. Prod.* 70: 863-865.
- **Morita H, Hirasawa Y, Muto A, Yoshida T, Sekita S, Shirota O** (2008). *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 18: 1050-1052.
- 25 • **Murashige T, Skoog F** (1962). *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- **Newman DJ, Cragg GM, Snader KM** (2000). *Nat. Prod. Rep.* 17: 215-234.
- **Pérez-Gutiérrez RM, Vargas-Solís R, García-Baez E, Mota-Flores JM** (2007). *J Nat. Med.* 61: 296-301.
- 30 • **Setzer WN, Setzer MC, Hopper AL, Moriarity DM, Lehrman GK, Niekamp KL, Morcomb SM, Bates RB, McClure KJ, Stessman CC, Haber WA** (1998). *Planta Med.* 64: 583-586.
- 35 • **Setzer WN, Holland MT, Bozeman CA, Rozmus GF, Setzer MC, Moriarity DM, Reeb S, Vogler B, Bates RB, Haber WA** (2001). *Planta Med.* 67: 65-69.
- **Son I-H, Park Y-H, Lee S-I, Yang H-D, Moon H-I** (2007). *Molecules* 12: 1147-1152.
- 40 • **Sotanaphun U, Lipipun V, Suttisri R, Bavovada R** (1999). *Planta Med.* 65: 450-452.
- **Tabata H** (2006). *Curr. Drug Targets* 7: 453-461.
- 45 • **Takaishi Y, Wariishi N, Tateishi H, Kawazoe K, Nakano K, Ono Y, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A** (1997). *Phytochemistry* 45: 969-974.
- **Waechter GA, Valcic S, Franzblau SG, Suarez E, Timmermann BN** (2001). *J. Nat. Prod.* 64: 37-41.
- 50 • **Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhövel J, Krohn O, Fuss E, Garden H, Mohagheghzadeh A, Wildi E, Ripplinger P.** (2005). *Plant Gen. Resour.*, 3, 90-100
- **Zhang Y, Yao X, Bao B, Zhang Y** (2006). *Phytotherapy Res.* 20: 872-876.
- **Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005). *Biotechnol. Adv.* 23: 283-333.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas mediante cultivo *in vitro* de plantas que comprende los siguientes pasos:
- a) Esterilización e inducción del crecimiento *in vitro* de semillas y/o explantes derivados de plantas nativas.
 - b) Cultivo *in vitro* de plantas derivadas de la germinación de las semillas y/o explantes.
 - 10 c) Inducción de la formación de:
 - c1) callos en plantas cultivadas *in vitro*, en medios de cultivo apropiados
 - 15 c2) raíces en cabellera en explantes o en plantas cultivadas *in vitro*, mediante la infección guiada con bacterias *A. rhizogenes*, en medios de cultivo apropiados.
 - d) Cultivo *in vitro* en suspensión de las líneas celulares y/o agregados celulares, derivados del crecimiento de los callos o las raíces en cabellera del paso c) en medios de cultivo apropiados.
 - 20 e) Estimulación de los cultivos celulares y/o agregados celulares en suspensión del paso d).
 - f) Extracción de nor-triterpenos metilen-quinonas presente tanto en los medios nutritivos líquidos como en los propios cultivos celulares del paso d).
 - 25 g) Medida de la concentración de los nor-triterpenos metilen-quinonas del apartado f).
- 30 2. Método según la reivindicación 1 dónde los medios de cultivo utilizados comprenden una fuente de carbono, específicamente sacarosa, fructosa y/o glucosa en una proporción del 1-10% (w/v).
3. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los medios de cultivo utilizados son B5 y MS.
- 35 4. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los medios de cultivo están suplementados con 2,4-D, NAA y BAP.
5. Método según la reivindicación 1 dónde los nor-triterpenos metilen-quinonas se seleccionan entre: triterpenos pentacíclicos con dobles enlaces presentes en el anillo B, 20-hidroxitingenona y diversos fenol triterpenos quinonas.
- 40 6. Método según la reivindicación 1 dónde los nor-triterpenos metilen-quinonas son preferentemente tingenona y 22 β -hidroxitingenona.
7. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende el tratamiento de los cultivos de raíces en cabellera del paso c.2) con antioxidantes y antibióticos.
- 45 8. Método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque los antioxidantes utilizados son: PVPP o PVP o DTT.
9. Método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque los antibióticos utilizados son tetraciclina y cefotaxima.
- 50 10. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las líneas celulares derivadas de los cultivos de callos del paso d) son preferentemente 1LD y 3COT.
11. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los estimuladores utilizados en el paso g) se seleccionan entre: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium* sp., extracto de levadura, ácido salicílico, ácido acetil salicílico, etanol, quitosano y metil jasmonato.
- 55 12. Método según la reivindicación 11 **caracterizado** porque el estimulador utilizado preferentemente es metil jasmonato a una concentración que varía entre 0,1-2 mM, preferentemente 0,1 y 0,5 mM.
- 60 13. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el tiempo de tratamiento con los estimuladores de los cultivos *in vitro* del paso g) varía de 4-72 h, preferentemente 6 y 24 h.
14. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los explantes utilizados proceden de hojas y cotiledones.
- 65 15. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las plantas son de la familia Hippocrateaceae o Celastraceae.

ES 2 352 491 A1

16. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque las plantas de la familia Celastraceae pertenecen preferentemente a la especie *Maytenus canariensis*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

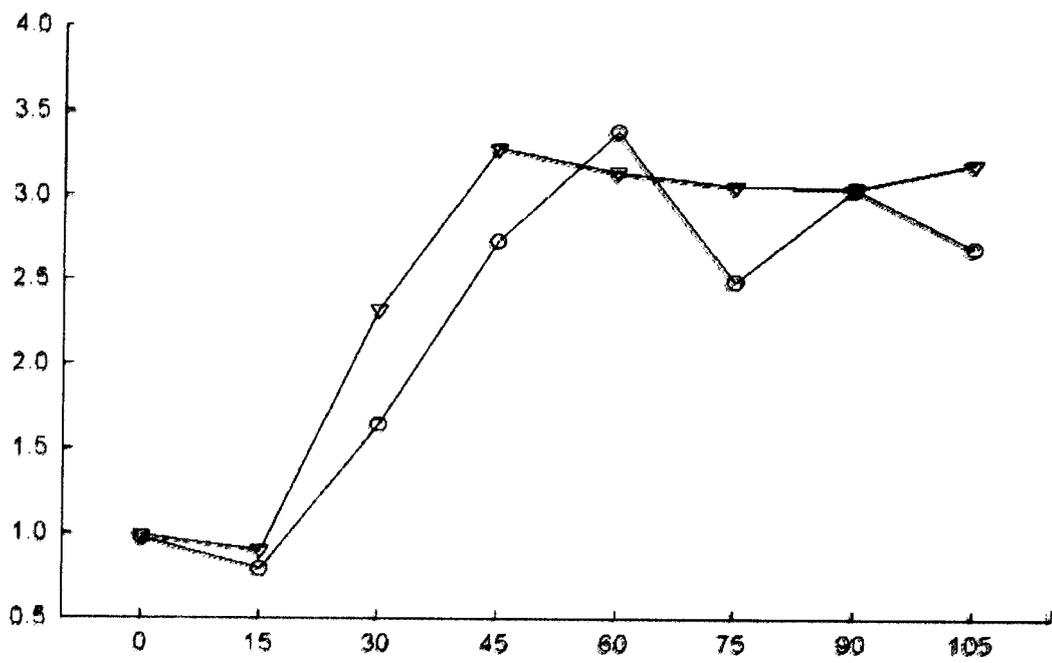
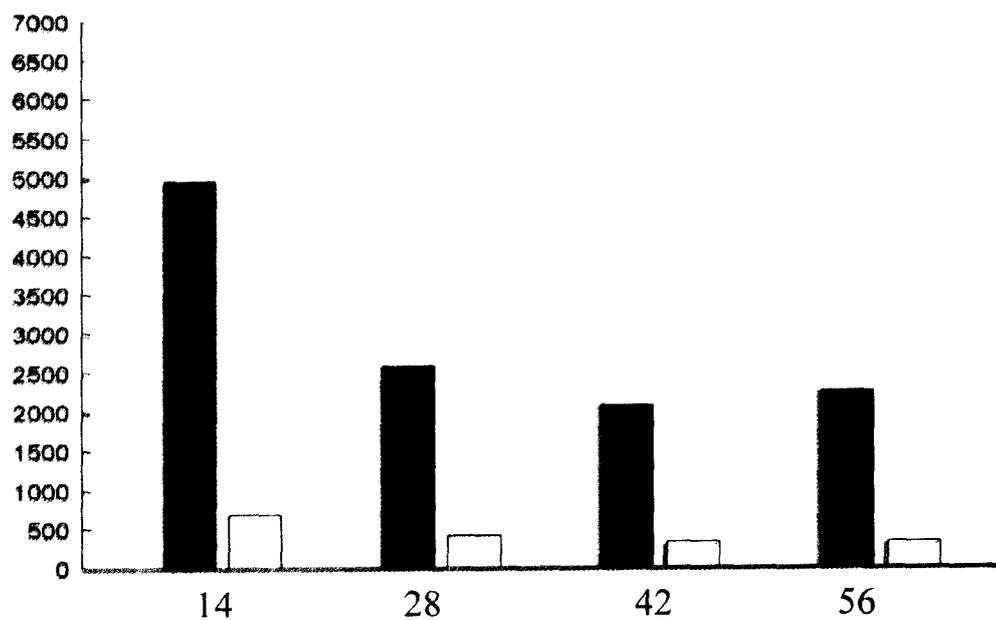


FIGURA 2

A)



B)

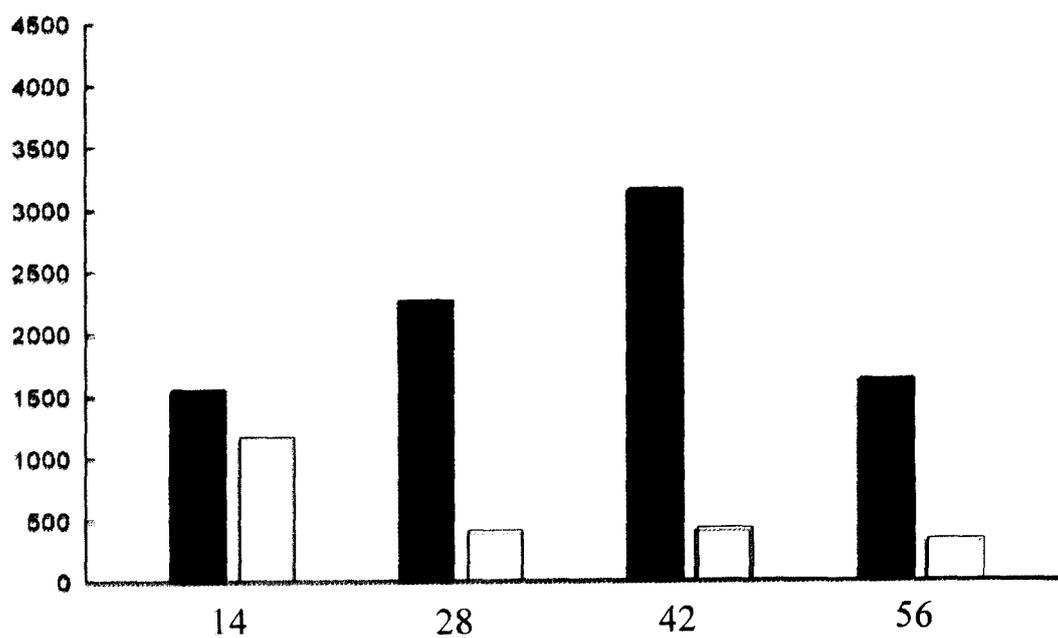
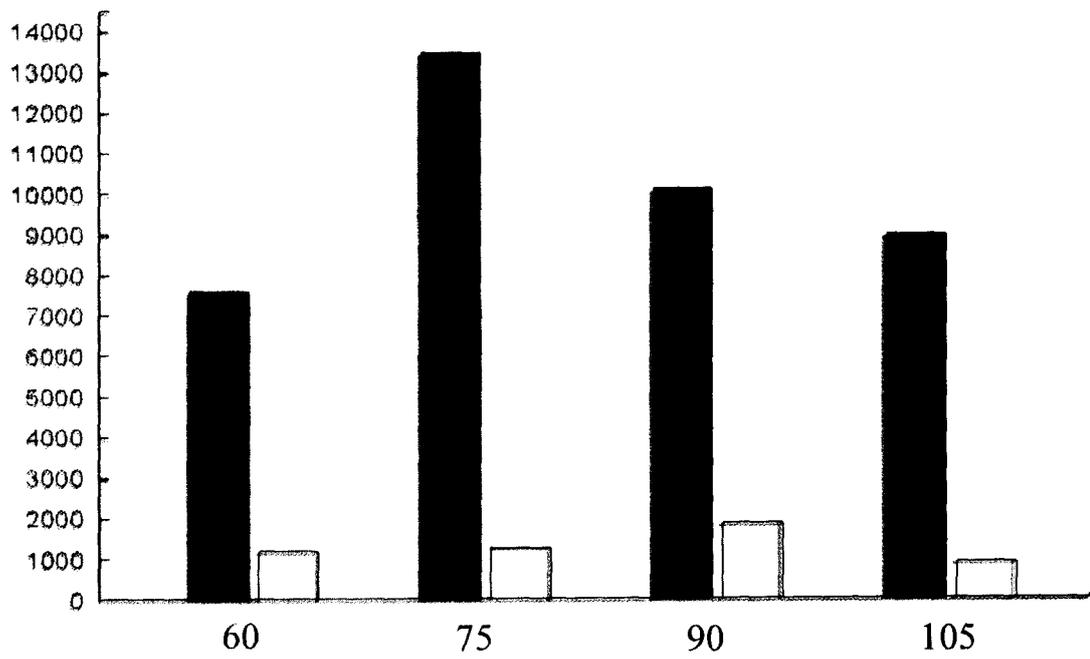


FIGURA 3

A)



B)

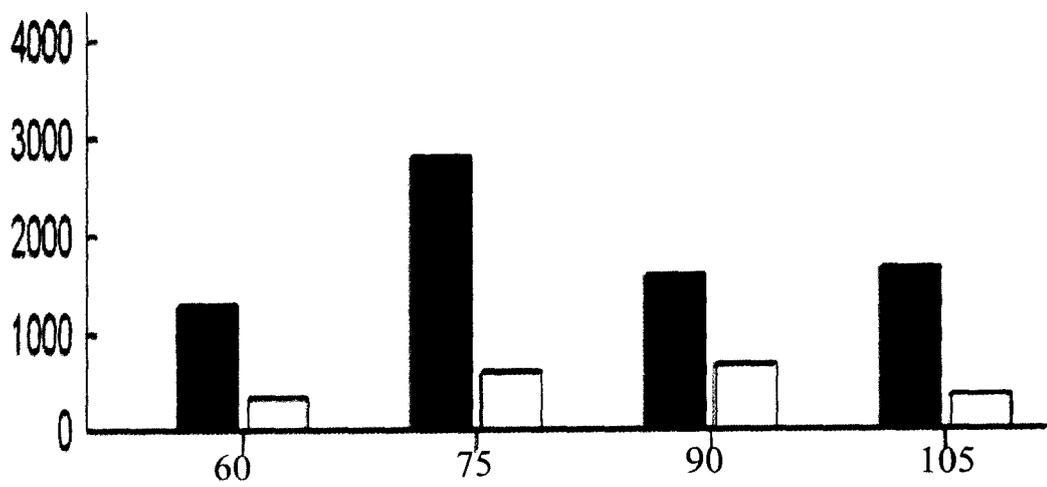
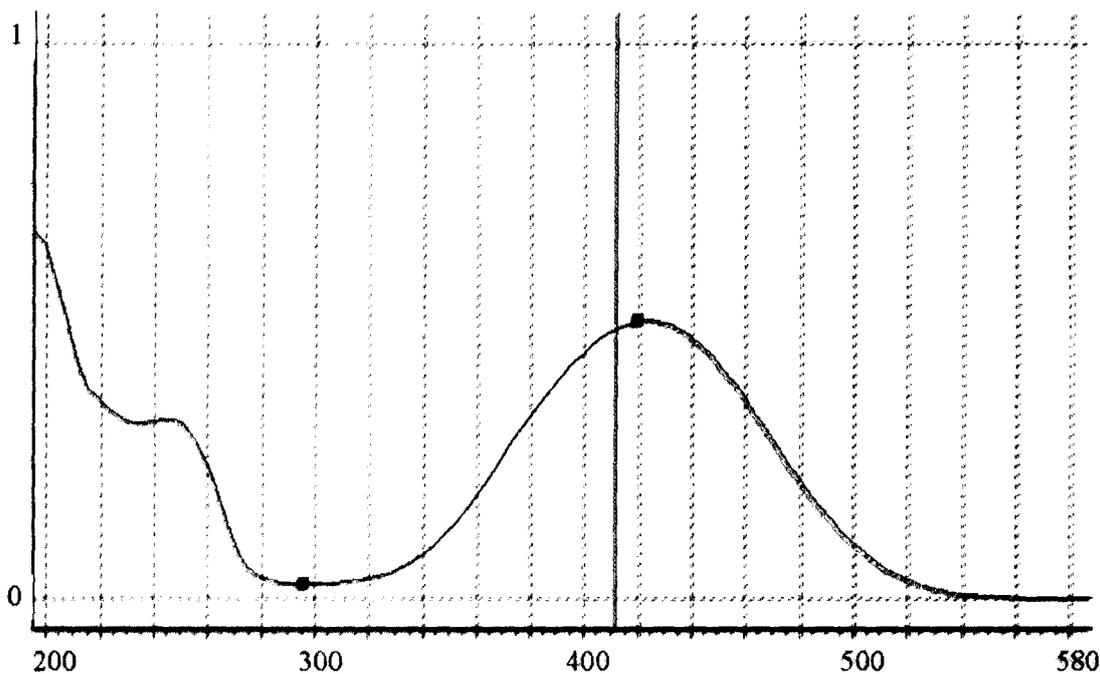
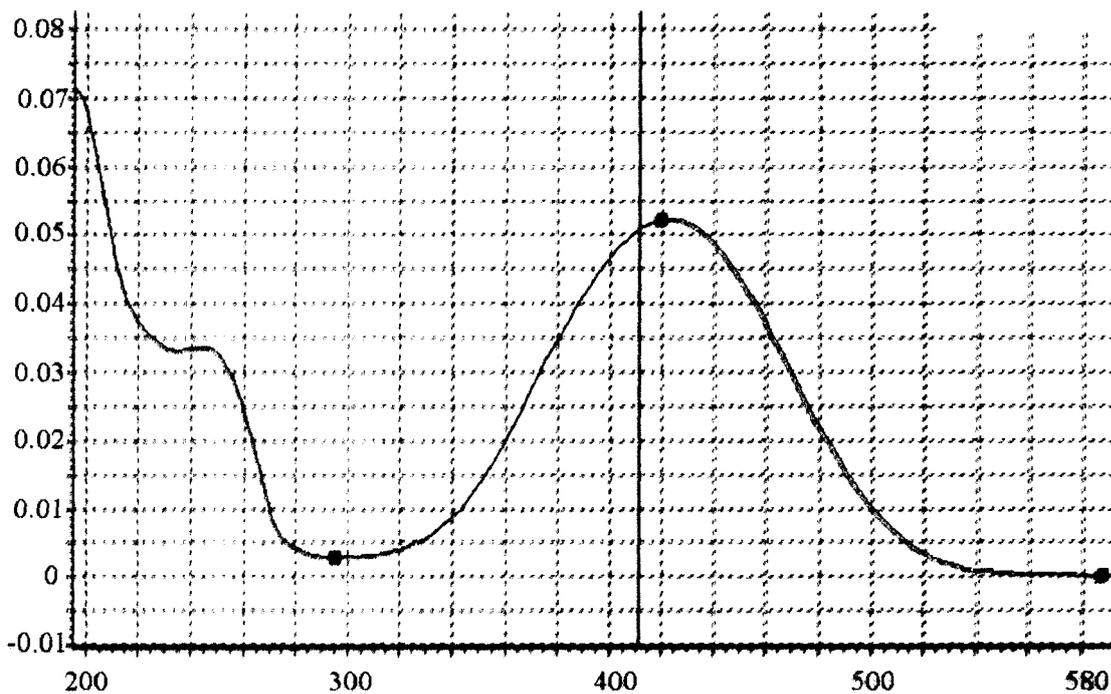


FIGURA 4

A)



B)





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200900497

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.02.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	F. GUTIERREZ NICOLAS, A.G. RAVELO y R. ZARATE "Seed germination and in vitro propagation of <i>Maytenus canariensis</i> through regeneration of adventitious shoots from axillary and apical buds" BIOLOGIA PLANTARUM, vol 52, 2008, páginas 173-176, resumen, página 174.	1-16
A	HAMID ELHAG, JABER S. MOSSA y MAHMOUD M. EL-OLEMY "Antimicrobial and cytotoxic activity of the extracts of khat callus cultures", PERSPECTIVES ON NEW CROPS AND NEW USES, 1999, J. JANICK (ed) ASHS Press, Alexandria, VA., páginas 463-466, página 465.	1-16
A	JAMES P. KUTNEY et al. "Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of <i>Maytenus buchananii</i> " PHYTOCHEMISTRY, vol. 20, no. 4, 1981, páginas 653-657. Resumen, páginas 653 y 656.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.01.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K36/37 (01.01.2006)

A01H4/00 (01.01.2006)

A01G7/06 (01.01.2006)

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

A61K, A01H, A01G

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	F. GUTIERREZ NICOLAS, A.G. RAVELO Y R. ZARATE "Seed germination and in vitro propagation of <i>Maytenus canariensis</i> through regeneration of adventitious shoots from axillary and apical buds" BIOLOGIA PLANTARUM, vol 52, 2008, páginas 173-176.resumen, página 174.	2008
D02	HAMID ELHAG, JABER S. MOSSA Y MAHMOUD M. EL-OLEMY "Antimicrobial and cytotoxic activity of the extracts of khat callus cultures", PERSPECTIVES ON NEW CROPS AND NEW USES, 1999, J. JANICK (ed) ASHS Press, Alexandria, VA., páginas 463-466 ,página 465	1999
D03	JAMES P. KUTNEY ET AL "Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of <i>Maytenus buchananii</i> " PHYTOCHEMISTRY, vol. 20, no. 4, 1981, páginas 653-657. Resumen, páginas 653 y 656.	1981

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

La presente solicitud de patente tal y como ha sido redactada hace referencia a un método de producción de nor-triterpenos metilen-quinonas (reivindicación 1) a partir de cultivo in vitro de plantas. Se refiere concretamente, a un método de cultivo *in vitro* de explantes de plantas germinadas a partir de semilla y/o de explantes de plantas nativas para incrementar la producción de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos en suspensión de las líneas celulares extraídas de dichos explantes. Los medios de cultivo utilizados comprenden una fuente de carbono (reivindicación 2) y dichos medios de cultivo son B5 y MS (reivindicación 3), y se encuentran suplementados con 2,4-D, NAA y BAP (reivindicación 4). Los nor-triterpenos metilen-quinonas son tingenona y 22 beta-hidroxitingenona (reivindicaciones 5 y 6). Se utilizan también antioxidantes y antibióticos para el tratamiento de los cultivos (reivindicaciones 7, 8 y 9). Por otro lado, las líneas celulares derivadas de los cultivos de callos son ILD y 3SCOT (reivindicación 10). Se emplean, además, estimuladores para la estimulación de los cultivos celulares (reivindicaciones 11, 12 y 13). Y por último, los explantes utilizados proceden de hojas y cotiledones de la familia Hippocrateaceae o Celastraceae, de ésta última concretamente de la especie *Maytenus canariensis* (reivindicaciones 14, 15 y 16).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a un método para la germinación de semillas y propagación in vitro de *Maytenus canariensis* a través de la regeneración de brotes espontáneos. La regeneración se llevó a cabo empleando yemas axilares y apicales tomados de plantas de 2 a 2 meses y medio de edad que fueron obtenidas de la geminación *in vitro* de semillas en un medio de cultivo suplementado con bencilaminopurina, quinetina y ácido naphthalenacético (NAA) (véase resumen, y página 173).

El documento D02 se refiere a la actividad antimicrobial y citotóxica de los extractos de cultivo de callos Khat (*Catha adulis* Forssk, Celastraceae). La inducción de los mejores callos y crecimiento ocurrió en el medio MSB5 suplementado con 3,0 mg/l ó NAA ó IBA. Se aislaron de los cultivos de callos Khat los compuestos 22beta-hidroxitingenona y tingenona (véase páginas 563 y 465).

El documento D03 trata del aislamiento y caracterización de productos naturales a partir de cultivos de tejidos de plantas de *Maytenus buchananii*. Los explantes de *Maytenus buchananii* se indujeron para formar un callo y posteriormente se cultivaron en suspensión en una amplia variedad de medios. Los productos naturales que se aislaron a gran escala fueron, entre otros, tingenona y 22beta-hidroxitingenona (véase resumen y páginas 653 y 656).

Ninguno de los documentos considerados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-16, además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-16 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP, arts. 6 y 8.