



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 150**

51 Int. Cl.:
C12P 17/02 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03021426 .6**
96 Fecha de presentación : **22.02.1993**
97 Número de publicación de la solicitud: **1378574**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Mejora de la producción de taxol y de texanos mediante cultivos celulares de especies de taxus.**

30 Prioridad: **20.02.1992 US 839144**
24.04.1992 US 874344

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2011

73 Titular/es: **Python Holdings, L.L.C.**
2711 Centerville Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US

72 Inventor/es: **Prince, Christopher L.;**
Schubmehl, Barry F.;
Kane, Eugene J.;
Roach, Braden;
Bringi, Venkataraman y
Kadkade, Prakash G.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 150 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mejora de la producción de taxol y de taxanos mediante cultivos celulares de especies de *Taxus*

Antecedentes de la invención**A. Campo de la invención**

- 5 La presente invención está dirigida a procedimientos para mejorar la producción y recuperación de taxol y taxanos mediante cultivos celulares de *Taxus chinensis*.

B. Técnica relacionada**El problema del suministro de taxol y soluciones posibles**

- 10 El taxol es un alcaloide diterpenoideo aislado originalmente de la corteza del tejo del pacífico, *Taxus brevifolia* (Wani y col. 1971).

- 15 El interés por el taxol empezó cuando el *National Cancer Institute* (NCI), en un programa de selección a gran escala, encontró que los extractos de corteza sin elaborar mostraban actividades antitumorales. Desde entonces, los ensayos clínicos han confirmado que el taxol es extremadamente eficaz frente a cánceres de ovario resistentes al tratamiento y frente a cánceres de mama y de otros tipos. El taxol se ha considerado como un gran paso adelante en quimioterapia debido a su mecanismo fundamentalmente diferente de citotoxicidad, es decir, inhibiendo la despolimerización de los microtúbulos (véase Rowinsky y col. 1990).

- 20 La variable más desalentadora en la ecuación del taxol hasta el momento es su suministro. Se necesitan de tres a seis tejos del Pacífico de 100 años para tratar a un paciente, debido a que los rendimientos medios de taxol son menores del 0,01% de corteza seca y de agujas (Witherup y col. 1990). Para producir la cantidad de taxol que es necesaria para el tratamiento y realizar las pruebas sería necesaria la destrucción de decenas de miles de tejos. Hasta ahora, el suministro mundial ha venido de la recolección de estas coníferas achaparradas y de lento crecimiento que pueblan los ancianos bosques del noroeste del Pacífico. Desafortunadamente, el tejo está prácticamente extinguido debido a la tala. Los ecologistas han tenido éxito en su oposición a cualquier sacrificio a gran escala del árbol, que crece en los bosques ancianos que dan cobijo al búho moteado del Norte en peligro de extinción y a otras especies salvajes. Ante la reducción del número de tejos del Pacífico, la investigación médica está poniendo sus esperanzas para el taxol futuro en nuevas fuentes alternativas de suministro. Las tres fuentes que han sido consideradas son la síntesis química, la semisíntesis y el cultivo de células vegetales.

- 30 El taxol es una molécula química grande y estructuralmente compleja por lo que se elude de lejos una síntesis química total. Por tanto, la síntesis a gran escala a partir de compuestos químicos sencillos disponibles no será probablemente una opción asequible en los próximos años.

- 35 Una opción posible para una producción a gran escala es la semisíntesis, es decir el acoplamiento químico de una cadena lateral al precursor de taxol producido mediante cultivo agrícola, la baccatina. Se han hecho progresos significativos en la síntesis de la cadena lateral (Denis y col. 1991). También se han desarrollado procedimientos para unir la cadena lateral a la baccatina (Denis y col. 1990, Patente de EE. UU. N° 4.924.011; Holton 1991, patente de EE. UU. N° 5.015.744). Sin embargo, el suministro agrícola de baccatina a partir de las agujas de las plantaciones de *Taxus* no es nimio en ningún caso, y está siendo actualmente reevaluado a la vista del hecho de que las primeras publicaciones (Denis y col., 1988, 0,1% del peso) eran más optimistas sobre el contenido de baccatina que las más recientes (Witherup y col., 1990, 0,03% del peso seco). En resumen, la capacidad de la síntesis y la semisíntesis química para suministrar taxol para su uso quimioterapéutico a nivel mundial no está asegurada. Existen fuertes razones para la exploración y desarrollo de sistemas de producción alternativos.

- 40 La presente invención está relacionada con el desarrollo de un proceso basado en el cultivo de células vegetales para el suministro de taxol y de otros taxanos.

Cultivos tisulares como fuente de productos químicos derivados de plantas

- 45 La capacidad de las células vegetales para dividirse, crecer y producir metabolitos secundarios bajo diversos regímenes de cultivos diferentes ha sido ampliamente demostrada por varios grupos. En la actualidad, dos compuestos, shikonina (un colorante rojo antiinflamatorio) y ginsengosida (un tónico utilizado en la medicina oriental) se producen mediante procesos de cultivo tisular en Japón. Se ha informado de muchos otros procesos próximos a su comercialización, como vanilina, berberina y ácido rosmarínico (véase Payne y col. 1991).

- 50 Las ventajas de un proceso de cultivo de células vegetales para el taxol son muchas: (i) un proceso de cultivo celular asegura un suministro de producto ilimitado, continuo y uniforme y no está sujeto a plagas, desastres naturales y fluctuaciones estacionales; (ii) los cultivos celulares pueden cultivarse en biorreactores grandes y pueden ser inducidos a producir taxol en exceso manipulando las condiciones ambientales; (iii) los cultivos celulares producen un espectro más simple de compuestos en comparación con la corteza o las agujas, simplificando

considerablemente la separación y la purificación, (iv) un proceso de cultivo celular puede adaptarse rápidamente a cambios rápidos a demanda mejor que los procesos agrícolas, (v) además del suministro de taxol, un proceso de cultivo celular también podría producir precursores de taxano como baccatina que podría convertirse semisintéticamente en taxol y en otros derivados activos.

- 5 Puesto que los cultivos asépticos y a gran escala de células vegetales son sustancialmente caros, un proceso de cultivo celular se hace comercialmente importante solo cuando estos costes son superados por un rápido crecimiento celular y una alta productividad del metabolito. Cada especie vegetal y metabolito diana es diferente y son necesarias estrategias diferentes para cada sistema en particular. Esta invención se centra en estrategias creativas y especializadas para la obtención de cultivos de células vegetales de rápido crecimiento y alta
10 productividad para la producción de taxol y taxano.

Problemas con los cultivos tisulares de plantas leñosas y coníferas

Una encuesta histórica de la bibliografía sugiere que mientras las plantas herbáceas han sido manipuladas de forma relativamente fácil en cultivo, se han obtenido sólo con dificultad cultivos de plantas leñosas y coníferas.

- 15 El crecimiento de cultivos de gimnospermas y coníferas que producen un metabolito secundario ha sido generalmente bajo. Por ejemplo, Berlin y White (1988) encontraron que los cultivos de *Thuja occidentalis* aumentaban su biomasa en solo aproximadamente el 30% en 18 días. Van Uden y col. (1990) notificaron un aumento de biomasa del 20-50% en 21 días para suspensiones de *Callitris drummondii*. Westgate y col. (1991) notificaron un tiempo de duplicación de aproximadamente 10 días para suspensiones de la gimnosperma
20 *Cephalotaxux harringtonia*. Como resumió Bornman (1983), se ha dirigido una tremenda cantidad de esfuerzo hacia el desarrollo de un medio para las suspensiones de abeto falso (*Picea abies*). Este trabajo colectivo mostró que las suspensiones de gimnospermas pueden, de hecho, crecer rápido, pero no pueden aplicarse como generalización y estas formulaciones de los medios para líneas celulares diferentes deben optimizarse independientemente.

- 25 Una encuesta de productividad de metabolitos secundarios entre cultivos de gimnospermas también apunta hacia la dificultad de inducir una biosíntesis rápida en comparación con especies herbáceas. Por ejemplo, los cultivos de *Cephalotaxux harringtonia* producían alcaloides terpenos a un nivel de sólo el 1% al 3% del que se encuentra en la planta parental (Delfel y Rothfus 1977). Incluso después de la provocación eficaz, Heinstejn (1985) fue sólo capaz de aproximarse a los niveles producidos en la planta original (aproximadamente el 0,04% del peso seco total de alcaloides). Van Uden y col. (1990) fueron capaces de inducir cultivos en suspensión de la conífera *Callitris drummondii* para producir podofilotoxina, pero sólo a niveles de una décima parte del producido por las agujas. La
30 capacidad de *Thuja occidentalis* para producir niveles significativos de monoterpenos (10-20 mg/l) y el diterpenoide dehidroferuginol (2-8 mg/l) ha sido demostrada de forma convincente por Berlin y col. (1988). Sin embargo, estos resultados se obtuvieron con un cultivo de crecimiento lento (30% de aumento de biomasa en 18 días) y baja densidad celular (de 5 a 7 gramos de peso seco por litro).

Cultivo celular para la producción de taxol: esfuerzos previos

- 35 Las dificultades para conseguir un crecimiento rápido y una alta productividad encontrada en las suspensiones de gimnospermas se han reflejado en las tres publicaciones hasta el momento sobre la producción de taxol. Jaziri y col. (1991) iniciaron recientemente cultivos de callos de *Taxus baccata*, pero fueron incapaces de detectar ningún taxol usando su ensayo de inmunoabsorción. Wickremesinhe y Arteca (1991) notificaron la presencia del 0,009% del peso seco de taxol en cultivos de callos de *Taxus media* (cv. *hicksii*), aunque no identificaron los detalles sobre tiempos de
40 duplicación, densidades celulares y la escala de tiempo con la que se producía el taxol.

- En la patente de EE. UU. Nº 5.019.504 (Christen y col., 1991) se describe la producción y recuperación de taxano y compuestos similares a taxanos por cultivos celulares de *Taxus brevifolia*. Estos investigadores notificaron la producción de taxol a nivel de 1 a 3 mg/ml en un marco temporal de dos a cuatro semanas. También notificaron un aumento de masa celular de "5-10 veces en 3-4 semanas", lo que se corresponde con un tiempo de duplicación de
45 aproximadamente 7 a 12 días.

Los aumentos en las tasas de crecimiento, tasas de biosíntesis de taxol y productividades volumétricas son claramente necesarios antes de que un proceso de cultivo tisular para la producción de taxol pueda suministrar la demanda anual proyectada de decenas de toneladas de kilogramos de taxol al año.

Resumen de la invención

- 50 Los inventores han descubierto que el taxol y los compuestos similares a taxol, o taxanos, pueden ser producido con un muy alto rendimiento a partir de *Taxus chinensis*. En particular, los inventores encuentran que la especie *Taxus chinensis* es capaz de un crecimiento rápido y de producir niveles extremadamente altos de taxol y taxanos en un periodo de tiempo corto.

- Mejorando la invención descrita por Christen y col. (1991), los inventores han descubierto en este documento que
55 los cultivos celulares de *Taxus chinensis* pueden iniciarse rápidamente y de forma eficaz, y crecen con éxito en

medios nutritivos artificiales y que se producen en el cultivo celular los mismos alcaloides taxanos quimioterapéuticamente activos que en la planta intacta.

Adicionalmente, mediante los procedimientos de esta invención es posible obtener taxol en un periodo de tiempo mucho más corto que el notificado previamente. Con la especie *Taxus chinensis*, los inventores han sido capaces de manipular células para que produzcan taxol en cantidades que excedan de lejos las cantidades obtenidas a partir de cultivos tisulares de la otra especie de *Taxus*. Además, la tasa de crecimiento de los cultivos celulares de *Taxus chinensis* es significativamente mayor, de 3 a 6 veces, que la de *Taxus brevifolia* descrito por Christen y col. (1991).

Entre los objetos de la presente invención se incluyen el inicio rápido y eficaz de los cultivos celulares de *Taxus chinensis*.

Entre los objetos de esta invención se incluye la formulación de condiciones ambientales especiales para promover el crecimiento rápido, densidades celulares altas y viabilidades celulares altas. Las características de crecimiento notificadas en este estudio superan resultados previos en un factor significativo.

Entre los objetos de esta invención se incluye la capacidad para inducir tasas altas y prolongadas de biosíntesis y secreción de taxol y taxano mediante: (a) manipulación cuidadosa de las concentraciones de nutrientes ("formulación del medio de producción"), (b) uso de luz, (c) uso de protocolos de cambio periódico del medio, (d) uso de inductores.

Entre los objetos de esta invención se incluye la capacidad de manipular el perfil de taxanos producido alterando las formulaciones de los medios y las condiciones ambientales. En particular, se indujo a las células a producir taxol como el producto taxano predominante. Además, se suprime la producción del producto derivado cefalomanina, proporcionando así una solución biológica elegante a un problema de separación y purificación adicionales caras e importantes.

Entre los objetos de esta invención se incluye la capacidad de producir diversos taxanos distintos a taxol que pueden mostrar por sí solos actividad farmacológica o pueden ser modificados y convertidos en compuestos con actividad farmacológica.

Entre los objetos de esta invención se incluye la capacidad para inducir cultivos celulares de *Taxus chinensis* para producir taxol (0,32% del peso seco) a niveles que exceden de lejos los producidos en plantas silvestres (0,003 a 0,03% del peso seco, Xu y Liu 1991).

Descripción de las figuras

Figura 1. Aumento de biomasa en un cultivo en suspensión de la línea K-1 de *Taxus chinensis* durante un ciclo de crecimiento en lote típico en medio A. Las barras de error representan la desviación típica determinada a partir de matraces duplicados.

Figura 2. Efecto del cambio de medio los días 9 y 12 sobre la productibilidad de taxol (A) y taxano total (B) en un experimento de 15 días. Los valores en cada recuadro representan el intervalo de tiempo (días) durante el cual se ha producido el producto. La porción oscurecida de los recuadros intracelulares representa el taxol o taxanos totales que se presentan en el inóculo de células al inicio del experimento. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. La suspensión de la línea celular K-1 de *Taxus chinensis* se usó con medio A según se elabora en la Tabla 2.

Figura 3. Características espectrales de una lámpara Gro-Lux standard (GTE Sylvania, Danvers, MA) usada en el ejemplo 7.3.

Figura 4. Producción de taxano en la suspensión de células K-1 de *Taxus chinensis*. Se muestra la porción del cromatograma de 10 a 40 minutos. Los espectros con dispositivos de fotodiodos de los picos de taxano seleccionados muestran un espectro de absorción UV de taxano característico, con un pico a 227 nm.

Figura 5. Producción de taxol y taxano después de un cultivo prolongado en medio C por la línea celular K-1 de *Taxus chinensis*. En el panel superior se tabulan los datos de los taxanos conocidos y desconocidos, mientras que en el panel inferior se muestra el aumento en la producción de taxol y taxano en el periodo de tiempo de 25 a 42 días.

Figura 6. Confirmación por EM/EM de taxol en el sobrenadante del cultivo celular. En el Panel A se muestra el espectro de masas APCI de electrospray del taxol auténtico y el panel B muestra el espectro de iones producto del pico parental (m/z 871 = taxol + NH_4^+). El panel C representa el espectro de masas APCI electrospray de un extracto del cultivo celular sin procesar y muestra m/z 854 y 871 característicos de taxol. El panel D muestra el espectro producto correspondiente de m/z 871 y proporciona indicios inequívocos de la presencia de taxol en el sobrenadante del cultivo celular.

Descripción detallada de la invención

Las plantas han sido durante mucho tiempo fuentes importantes de compuestos farmacéuticos y especialidades químicas. Estos productos se han obtenidos típicamente mediante extracción de los materiales vegetales recogidos o mediante síntesis química. El taxol ha sido uno de los agentes anticancerígenos potenciales más importantes surgido recientemente a partir de la selección de productos naturales.

Según se usa en el presente documento, las expresiones taxol y compuestos similares a taxol, o taxanos, se usan indistintamente para describir un compuesto con un anillo de taxano. Estos compuestos pueden poseer por sí mismos actividad antineoplásica, o pueden modificarse para obtener compuestos bioactivos.

Según se usa en el presente documento, el término "callo" se usa para describir una masa de células vegetales cultivadas que está estructuralmente indiferenciada y se cultiva en un medio solidificado. Según se usa en este documento, la expresión "cultivo en suspensión" se usa para describir células estructuralmente indiferenciadas que se dispersan en un medio nutritivo líquido. Se entiende que los cultivos en suspensión comprenden células en diversos estadios de agregación. En las suspensiones se encuentran una variedad de tamaños de agregados descritos en esta invención, con tamaños que oscilan desde decenas de micrómetros de diámetro (células individuales o pocas células agregadas) a agregados de muchos milímetros de diámetro, compuesto de muchos cientos de células.

El material vegetal útil en esta invención se obtuvo de *Taxus chinensis*. En particular, los inventores han identificado a la especie *Taxus chinensis* como capaz de producir cantidades significativas de taxol y taxanos en un corto periodo de tiempo de cultivo, con los compuestos deseados secretados continuamente al medio.

Los inventores han encontrado que el contenido específico en taxol varía con la especie vegetal y dentro de las especies de plantas de fuente tisular y árboles específicos. La selección de una fuente de alto rendimiento para la producción de taxol es una primera etapa importante para proporcionar cantidades suficientes de taxol para uso terapéutico.

Inicio de líneas celulares de *Taxus*

El material vegetal de *Taxus* puede recogerse en toda Norteamérica así como en otros continentes. El cultivo se inicia seleccionando el tejido de *Taxus* apropiado para el crecimiento. Puede seleccionarse tejido de cualquier parte de la parte para inducir el callo, incluyendo corteza, cámbium, agujas, tallos, semillas, conos y raíces. Sin embargo, para un rendimiento óptimo de taxol, se prefieren las agujas y regiones meristemáticas de partes de la planta. Más preferidos son las agujas de nuevo crecimiento (p. ej. de uno a tres meses) que generalmente pueden identificarse por su color verde más claro. La expresión "nuevo crecimiento" pretende ampliamente significar producción de agujas en la planta dentro de esta estación de crecimiento del año.

Para prevenir la contaminación del cultivo, se deberá esterilizar la superficie del tejido antes de introducirlo en el medio de cultivo. Cualquier técnica de esterilización convencional, como el tratamiento con "Chlorox" (una marca comercial para blanqueo de Chlorox Company). Además, pueden usarse agentes antimicrobianos como cefoxitina, benlato, cloxacilina, ampicilina, sulfato de gentamicina y fosfomicina para la esterilización de la superficie del material vegetal.

Crecimiento del callo

Típicamente, los cultivos celulares muestran variabilidad en la morfología del crecimiento, productividad, perfiles del producto y otras características. Puesto que las líneas celulares individuales varían en sus preferencias por los constituyentes del medio de cultivo, pueden usarse muchos medios de cultivo diferentes para la inducción y proliferación de los callos.

La composición apropiada del medio varía con la especie que se está cultivando. Los medios preferidos para las diferentes especies se enumeran en la Tabla 3. Por ejemplo, aunque pueden usarse otros, los dos medios nutritivos de crecimiento preferidos para *Taxus chinensis* son A y D. Estos medios contienen preferiblemente los componentes enumerados en la Tabla 2. Por ejemplo, cuando se usa el medio A, se incorporan hormonas o reguladores de crecimiento al medio en una cantidad de 1 ppb a 10 ppm y, preferiblemente, de 2 ppb a 1 ppm. Cuando se usa el medio D, las hormonas o reguladores de crecimiento se incorporan a niveles que oscilan de 1 ppb a 10 ppm y, preferiblemente, de 2 ppb a 2 ppm. Las cantidades de otros componentes del medio pueden incorporarse a niveles que oscilan de una décima parte de la concentración a tres veces las concentraciones indicadas en la Tabla 2, pero preferiblemente se incorporan a los niveles mostrados en la Tabla 2.

Crecimiento en suspensión

Los cultivos en suspensión de *Taxus* son capaces de proporcionar tasas de crecimiento rápidas y altas densidades celulares como en otros cultivos de células vegetales. Sin embargo, las condiciones óptimas varían de una línea

celular a otro, y por consiguiente, deben considerarse procedimientos que llevan hacia la optimización rápida de cualquier línea celular determinada.

5 Los cultivos iniciales de la especie de *Taxus* se subcultivan mediante transferencia a los medios enumerados en la Tabla 3, que contienen macro y micronutrientes, sales orgánicas y hormonas de crecimiento. Las cantidades están generalmente dentro de los siguientes intervalos: empezando con una concentración una décima parte de la concentración hasta tres veces la concentración de cada componente del medio mostrado en la Tabla 2. Los niveles preferidos son los enumerados en la Tabla 2.

10 Los cultivos líquidos están expuestos al aire y, preferiblemente, se agitan o mueven suavemente de otra forma para introducir aire en el medio, o el aire puede introducirse mediante un tubo dentro de los recipientes de cultivo. Los cultivos se mantienen en condiciones de crecimiento apropiadas a una temperatura entre 20° y 26°C. El pH puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 y, preferiblemente, entre 4 y 6. El cultivo puede crecer en condiciones de luz que oscilan de la oscuridad total a la iluminación total (banda estrecha y/o espectro amplio) durante varios periodos de tiempo. Debido a que la producción total de taxol es más alta en los cultivos expuestos a la luz, esto es lo preferido. Las condiciones típicas de intensidad lumínica oscilan entre aproximadamente 100 y 15 aproximadamente 3.000 pies candela de potencia.

Los cultivos en suspensión se mantienen de 1 a 8 semanas desde el momento de subcultivo, tras lo cual disminuye el crecimiento del cultivo. Los cultivos se recogen mediante la retirada del medio de cultivo por ejemplo, por filtración. El cultivo recogido se pesa y seca, por ejemplo, mediante liofilización, se muele hasta obtener un polvo fino y el taxol puede extraerse usando técnicas convencionales de extracción con solvente.

20 Los tiempos de duplicación se han medido controlando el aumento de la biomasa dependiente del tiempo, así como simplemente controlando el índice de crecimiento durante un subcultivo de rutina. Se han alcanzado densidades en peso seco máximas de 15-24 gramos por litro. Las características del crecimiento de suspensiones de diversas especies de *Taxus* se elaboran en el Ejemplo 4.

Procedimientos analíticos

25 Los procedimientos para la extracción y recuperación de taxol y taxanos a partir de células y del medio siguen técnicas convencionales y se describen en detalle en el Ejemplo 5. La técnica del inmunoensayo (ELISA) seguían en gran medida los protocolos suministrados por Hawaii Biotechnology en el kit comercializado. Los procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución se modificaron ligeramente a partir de los protocolos existentes según se elabora en el Ejemplo 5. En las condiciones utilizadas en esta invención, se consiguió una clara resolución de los 30 picos de taxano lo que dio lugar a una detección y cuantificación precisas. Debido a la posibilidad de la elución conjunta de componentes no taxanos, se comprobó la pureza del espectro de cada posible pico de taxano mediante dispositivos de fotodiodos antes de la integración de las áreas del pico. Los tiempos de retención de los patrones de taxano se enumeran en el Ejemplo 5 y en la Figura 4 se incluye una muestra de cromatograma.

Condiciones del medio de producción

35 Según se usa en el presente documento, la expresión "medio nutritivo" se usa para describir un medio que es adecuado para el cultivo de callos de células vegetales y para cultivos en suspensión. La expresión "medio nutritivo" es general e incluye tanto "medio de crecimiento" como "medio de producción". La expresión "medio de cultivo" se usa para describir un medio nutritivo que favorece el crecimiento rápido de células cultivadas. La expresión "medio de producción" se refiere a un medio nutritivo que favorece la biosíntesis de taxol y taxano en células cultivadas. Se 40 entiende que el crecimiento puede darse en un medio de producción y que la producción puede tener lugar en un medio de cultivo.

Determinadas clases de aditivos en el medio nutritivo se refieren mediante nombres especiales en esta invención y se definen aquí. Según se usa en este documento, la expresión "agentes antioscurecimiento" se refiere a componentes que se añaden al medio nutritivo para prevenir la formación de pigmentos durante el cultivo celular. 45 Entre estos pigmentos se incluyen compuestos fenólicos y relacionados que en general se observa tienen un efecto nocivo sobre el crecimiento, viabilidad y formación de producto. Según se usa en este documento, la expresión "precursores biosintéticos" se usa para describir compuestos añadidos al medio nutritivo que son metabolizados e incorporados por las células en forma de taxol y taxanos. Según se usa en este documento, la expresión "inhibidores metabólicos" se usa para describir compuestos añadidos al medio nutritivo que interfieren con rutas biosintéticas 50 específicas. Por ejemplo, puede usarse un inhibidor metabólico para potenciar la biosíntesis de taxol bloqueando una ruta diferente de la que compete al taxol para un precursor biosintético más temprano. Según se usa en este documento, el término estimulador o activador se usa para describir compuestos añadidos al medio nutritivo que estimulan o activan las rutas biosintéticas específicas, por ejemplo, aquellas que conducen a la biosíntesis del taxol. Se entiende que el mecanismo de acción de los aditivos descritos en el presente documento puede no 55 comprenderse por completo.

Si la formación del metabolito secundario en un cultivo en suspensión tiene lugar concurrentemente con el crecimiento, el metabolito se clasifica de asociado al crecimiento, y una formulación de medio sencilla puede ser suficiente para conseguir un buen crecimiento y alto nivel de producción. En muchos otros sistemas se ha

encontrado que no se produce de forma concurrente un crecimiento rápido ni una alta formación de producto. En estos casos, las fases de crecimiento y producción están separadas y se desarrolla independientemente un medio para cada fase (revisar en Payne y col. 1991). En el caso de producción de taxol y taxano en *Taxus chinensis*, se han separado el crecimiento y la formación rápida de producto y se han desarrollado medios independiente para cada uno. Los medios de producción desarrollados aquí no sólo aumentan la formación total de taxol y taxano, sino también la biosíntesis celular directa dirigida hacia la producción de taxol. Además, la producción de productos derivados que interfieren como cefalomanina, es mínima en comparación con el tejido cortical. Los medios de producción desarrollados aquí también promueven una viabilidad celular y biosíntesis prolongadas y, además, causan niveles significativos de productos que se secretan en el medio extracelular. Estas características son extremadamente importantes en el funcionamiento de un proceso a escala comercial eficaz para la producción de taxol.

Aunque pueden usarse otros, en la Tabla 5 se enumeran los medios de producción preferidos para las diversas especies. Por ejemplo, aunque pueden usarse otros, los medios de producción preferidos para *Taxus chinensis* son B y C. Estos medios contienen preferiblemente los componentes enumerados en la Tabla 2. Estos medios contienen preferiblemente sales inorgánicas y orgánicas mayores y menores y hormonas de crecimiento o reguladores de crecimiento. Las cantidades generalmente están en los intervalos siguientes empezando con una décima parte a tres veces la concentración de cada componente del medio indicado en la Tabla 2. Sin embargo, los niveles preferidos son los enumerados en la Tabla 2.

Cuando se usa el medio B, los reguladores de crecimiento se incorporan al medio en una cantidad entre 0,1 ppm y 20 ppm y, preferiblemente, entre 1 ppm y 10 ppm. Cuando se utiliza el medio C, los reguladores de crecimiento se incorporan preferiblemente a niveles que oscilan de 0,1 ppm a 5 ppm.

Se entiende que pueden hacerse modificaciones en este medio, como una sustitución de otras composiciones de sales convencionales (como compuestos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, precursores, activadores e inhibidores), adición o deleción de diversos componentes, reguladores de crecimiento o alteración de las proporciones.

Además de los nutrientes no volátiles disueltos, los compuestos gaseosos, principalmente oxígeno, dióxido de carbono y etileno (una hormona vegetal) tienen una función crítica sobre el crecimiento y la formación de producto. Son importantes dos parámetros. Las concentraciones de gas disueltas que favorecen el crecimiento y la formación de taxol son obviamente importantes ya que establecen las condiciones de funcionamiento del reactor. Además, es necesario incorporar las tasas de combustión o producción dentro del diseño del reactor, de modo que pueden mantenerse las concentraciones óptimas especificadas.

Además de su importancia en la respiración, el oxígeno también puede afectar drásticamente a la velocidad de biosíntesis secundaria. Una constante de saturación alta para una fase que necesita oxígeno en una ruta secundaria de biosíntesis puede requerir que las células se sometan a niveles elevados de oxígeno en el reactor. Se ha documentado la importancia de la suplementación de CO₂ para mantener tasas de crecimiento altas. El etileno, una hormona vegetal, tiene un papel pleiotrópico en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, incluyen el metabolismo secundario (p. ej., véase Payne y col., 1991).

Inductores

Para mejorar el rendimiento de taxol y otros taxanos relacionados en cultivos celulares, los inventores han llevado a cabo diversas estrategias. Una de las estrategias que se han utilizado para aumentar la productividad es el uso de los denominados inductores. Según se usa en este documento, el término inductores se usa para compuestos de origen biológico y no biológico que dan lugar a un aumento de la producción de un metabolito secundario cuando se aplican a plantas o cultivos de células vegetales (Eilert 1987; Ebel 1984 y Darvill y col. 1984). Muchos compuestos diferentes pueden actuar como inductores, dependiendo de su naturaleza de origen y su modo de acción con el metabolismo celular. En estos estudios, los inventores han usado dos tipos principales de inductores: 1) Los inductores bióticos que normalmente comprenden extractos o filtrados de la pared celular de un grupo seleccionados de hongos, bacterias y levaduras y también sus fracciones purificadas. 2) Inductores abióticos entre los que se han incluido agentes de estrés químico así como algunos compuestos de origen biológico (véase los inductores listados en la Tabla 1).

Christen y col. (1991) informaron del uso de inductores fúngicos y compuestos seleccionados para la producción de taxol mediante suspensiones de *Taxus brevifolia*; sin embargo, no se ha especificado el aumento en el nivel de acumulación de taxol debido a los tratamientos con el inductor.

En general, ambos tipos de inductores eran eficaces, aunque el grado al cual tiene lugar la inducción (acumulación de taxano en los cultivos celulares así como su secreción al medio) difería de un inductor a otro y de una especie a otra. El mayor aumento de producción se obtuvo con glutamato de quitosano, liquenano, ácido ferúlico y ácido benzóico. El quitosano y el liquenano son polisacáridos complejos derivados de las paredes celulares microbianas. Cuando se usa quitosano sólo, este es insoluble en el medio y es tóxico causando un daño celular permanente. El glutamato de quitosano, por otro lado, se disuelve fácilmente en el medio y no afecta a la viabilidad celular. Los

ácidos ferúlico y benzóico son compuestos químicos sintéticos de origen biológico y generalmente se usan como antioxidantes en sistemas biológicos.

5 Los inductores interactúan con los gases disueltos en muchas formas. Los requisitos de oxígeno pueden cambiar tras la inducción. El aumento en las tasas de respiración así como la respuesta de la herida normalmente se observa en los cultivos de células vegetales. Lo más importante, los inductores pueden mediar su acción vía etileno. En estos casos, puede ser deseable sustituir una preparación de inductor microbiano con etileno, y quizás prevenir la toxicidad asociada con otros compuestos microbianos en la preparación del inductor.

10 Pueden utilizarse los inductores y los agentes de estrés metabólico según esta invención para maximizar la producción de taxol y la secreción al cultivo tisular evaluando la especificidad y concentración, el espacio temporal y la duración del inductor, como una función de la edad del cultivo y de la composición del medio.

Cambio rápido del medio para aumentar la productividad

Según se documenta en el Ejemplo 7.3, la eliminación del medio agotado y la reposición de medio recién preparado cada 3 días contribuían a un potenciamiento significativo de la producción total de taxano y taxol, así como a un aumento en las cantidades de producto extracelular.

15 Los efectos estimuladores del cambio de medio pueden ser debidos a la eliminación del producto *in situ*, lo que podría prevenir una inhibición por retroalimentación y la degradación del producto. Estos efectos positivos de renovación del producto *in situ* sobre la producción del metabolito secundario y la secreción en cultivos en suspensión han sido documentados por, entre otros, Robins y Rhodes (1986) y Asada y Shuler (1989). La retirada periódica del medio agotado incorpora las ventajas anteriores y, adicionalmente, puede servir para desreprimir la biosíntesis secundaria retirando otros compuestos inhibidores no taxanos (como compuestos fenólicos) del medio.

20 La reposición de medio recién preparado a las células sometidas a biosíntesis activa también puede potenciar la producción proporcionando nutrientes esenciales que se han agotado. Por ejemplo, Miyasaka y col. (1986) fueron capaces de estimular a células de *Salvia miltiorhiza* en fase estacionaria para producir los metabolitos de diterpeno, criptotánahinona y ferruginol añadiendo sacarosa al medio. Presumiblemente, la biosíntesis había cesado debido a la limitación de carbono en la fase estacionaria. El protocolo de cambio periódico del medio usado en el presente trabajo podría ser beneficioso como resultado de cualquiera de los factores anteriores.

Se entiende que la cantidad de medio cambiado, la frecuencia de cambio y la composición del medio que puede ser sustituido pueden variar.

30 La capacidad para estimular la biosíntesis y la secreción mediante intercambio periódico de medio tiene implicaciones importantes para el diseño y funcionamiento de un proceso comercial eficaz en un modo continuo, semicontinuo o discontinuo alimentado.

Luz

35 En el caso de plantas superiores, la luz es un factor potente en el metabolismo secundario tanto en la planta intacta como en cultivos celulares. Son importantes tanto la intensidad como la longitud de onda de la luz (Seibert y Kadkade 1980). Por ejemplo, la biosíntesis de flavonoide y antrocianina normalmente está favorecida por la luz continua de alta intensidad, mientras que los cultivos en oscuridad pueden ser preferibles para otros metabolitos. El aumento en el reverdecimiento o la capacidad fotosintética de las células cultivadas también puede aumentar la formación de producto o el espectro del producto. Los estudios de los inventores implicaban el uso de banda ancha y también como fuentes de luz de banda estrecha específica. Como se muestra en el Ejemplo 7.3, la exposición a la luz puede inducir un aumento de la acumulación de taxol así como la secreción al medio. El efecto estimulador de la luz sobre la producción de taxol sugiere la existencia de mecanismos de control exclusivos para la biosíntesis de taxanos. La naturaleza del fotorreceptor y las características bioquímicas de la estimulación inducida por la luz aún no están claras.

Modos de operación del proceso

45 El modo de operación para un proceso de cultivo de células vegetales se refiere a la forma en que se añaden o retiran los nutrientes, células y productos con respecto al tiempo (Payne y col. 1991). Cuando un proceso en lote se divide en dos fases secuenciales, una fase de crecimiento y otra de producción, cambiando el medio entre las dos fases, el modo de operación se denomina "proceso en lote en dos fases".

50 En una operación de "cultivo discontinuo alimentado", se suministran aditivos y nutrientes especiales al medio periódica o continuamente a lo largo del curso de un cultivo en lote en una etapa o en dos etapas.

Cuando se recoge una porción importante, pero no todo, del contenido de un cultivo en lote, con la adición de medio recién preparado para el crecimiento celular y la producción continua, el proceso recuerda a una operación de "sacar y rellenar repetidamente" y se denomina un "proceso semicontinuo".

Cuando se administra continuamente medio recién preparado y se elimina continuamente el medio eluyente, el proceso se denomina "continuo". Si las células se retiran continuamente con el medio eluyente, el proceso continuo se denomina en "quimioestado",

- 5 Se entiende que estos modos de operación del proceso diversos son compatibles con el sistema de producción de taxol descrito en este documento.

Ejemplo

Los ejemplos siguientes describen además los materiales y procedimientos utilizados en la realización de la invención. Los ejemplos pretenden ser ilustrativos.

Ejemplo 1:

10 Inicio del callo

Las muestras de material vegetal de *Taxus* se recogieron a partir de varias plantas silvestres y cultivadas. Las muestras fueron procesadas tras su llegada al laboratorio o se conservaron a 4°C hasta que pudieron usarse.

- 15 El material se lavó primero en una solución de jabón diluída, se enjuagó en agua y se esterilizó la superficie en un solución de Chlorox (hipoclorito al 1%, pH 7) durante 10 minutos. En condiciones estériles, el material se enjuagó a continuación 3 veces con agua estéril. A continuación, las agujas se cortaron en una solución de polivinilpirrolidona (PVP) al 1% con ácido ascórbico a 100 mg/l. Las agujas se colocaron con el extremo cortado en Medio E (véase la Tabla 2). Se cultivaron de treinta a cuarenta explantes por placa de medio. Las placas que contenían los explantes se incubaron a 24±1°C en la oscuridad. Las placas se siguieron diariamente ante la aparición de microorganismos contaminantes y, cuando estos aparecían, se retiraban las agujas no contaminadas y se colocaban en una placa recién preparada de medio E. Se observó una formación de callo sustancial y el callo se separó a partir del explante de 20 días y se colocó en los diversos medios de proliferación de callos enumerados en la Tabla 3. Por ejemplo, los callos de *Taxus chinensis* se transfirieron al Medio D (véase la Tabla 2). Este procedimiento de inicio era muy eficaz, dando lugar a una tasa de contaminación baja y frecuencia alta de inducción del callo de más del 90% de los explantes iniciados.

25 Ejemplo 2:

Proliferación del callo

- Una vez que los callos se retiraron del explante se cultivaron a 24±1°C en la oscuridad. Las partes sanas del callo se transfirieron a medio recién preparado cada 10 días y se encontró que esta frecuencia de transferencia era extremadamente importante para la prevención del oscurecimiento y para el mantenimiento prolongado del callo. Los medios de crecimiento y mantenimiento preferidos para los callos de diversas especies se resumen en la Tabla 3.

Ejemplo 3:

Inicio de la suspensión

- 35 Se inoculó en condiciones asépticas 1 g de peso fresco de material del callo en un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenía 25 ml de medio líquido apropiado para cada especie (véase la Tabla 3). Por ejemplo, se usó el Medio D para *Taxus chinensis*. El matraz se cubrió con un tapón de espuma de silicona (Bellco, NJ) y se colocó en un agitador giratorio a 120 rpm a 24±1°C en la oscuridad. Los cultivos en suspensión se formaron en aproximadamente 3 a 10 días. Inicialmente, el medio se cambiaba mediante succión filtrando el contenido del matraz a través de un embudo tipo buchner que contenía un filtro de papel miracloth (Calbiochem) y toda la biomasa se resuspendió en medio recién preparado. Tras el crecimiento celular, se transfirieron generalmente 1-2 g (peso fresco) de células a un nuevo matraz de 125 ml que contenía 25 ml de medio recién preparado y se subcultivaron a partir de aquí semanalmente.

Ejemplo 4:

Crecimiento de las células suspendidas

- 45 Las tasas de crecimiento típicas y las densidades celulares conseguidas en los cultivos en suspensión de especies representativas se enumeran en la Tabla 4.

Como ejemplo detallado, el aumento de la biomasa (peso fresco y seco) con el tiempo de la línea K-1 de *Taxus chinensis* se muestra en la Figura 1. La tasa de crecimiento máximo se midió tomando la pendiente en los puntos de aumento más rápido de la biomasa en las curvas de crecimiento. Los cultivos celulares de *Taxus chinensis* crecieron a un tiempo máximo de duplicación de 2,5 días. Esta tasa de crecimiento es significativamente mayor que la notificada para los cultivos en suspensión de especies de *Taxus*. Por ejemplo, Christen y col. (1991) notificaron un

aumento de 5 a 10 veces en la biomasa después de 3 a 4 semanas de cultivo, que se traduce en un tiempo medio de duplicación para las suspensiones de *Taxus brevifolia* de 7 a 12 días.

5 La capacidad para cultivar células a una densidad alta es importante en la productividad volumétrica de un proceso de cultivo celular. Mientras que los cultivos de *Taxus brevifolia* alcanzaban una densidad celular de menos de 1 g de peso seco por litro (calculado a partir de los datos presentados por Christen y col. (1991)), las suspensiones de *Taxus chinensis* eran capaces de alcanzar densidades de hasta 8 a 20 g de peso seco por litro tras 18 días de crecimiento. La viabilidad de las células se determinó mediante la tinción de las células con una solución de diacetato de fluoresceína al 0,05% en acetona (Widholm, 1972) y contando el número de células con fluorescencia verde tras la excitación con luz azul en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IMT-2, Japón). La viabilidad celular era superior al 90% a lo largo de la fase de crecimiento.

10 La capacidad para cultivar las células en condiciones de crecimiento rápido a densidades celulares altas mientras se mantiene una alta viabilidad es un requisito previo importante para el funcionamiento económico de un proceso de cultivo de células vegetales para la producción de taxol y compuestos similares al taxol.

Ejemplo 5

15 Análisis de taxol y taxanos

5.1. Procedimientos de ELISA

20 El análisis de ELISA para taxol (Hawaii Biotech) se usó para la selección a gran escala de líneas celulares. Este procedimiento proporciona alta sensibilidad (0,1 ng/ml), sin embargo, puesto que se usa un anticuerpo policlonal, se observa reactividad cruzada con otros taxanos. La HPLC preparatoria (escala analítica) con recogida de fracciones mostró reactividad cruzada con 10-deacetiltaxol, 7-xilosil-10-deacetiltaxol, cefalomanina, 10-deacetil-7-epitaxol, 7-epitaxol, así como otros taxanos no identificados. A pesar de esta reactividad cruzada, se encontró que este procedimiento era extremadamente útil para la detección de la producción de taxano y permitía seleccionar rápidamente grandes cantidades de líneas celulares. Los extractos celulares que mostraron una producción significativa de taxanos se analizaron entonces en detalle usando el procedimiento de HPLC señalado a continuación.

5.2. Extracción de taxol y taxanos relacionados

30 La extracción de taxanos a partir de sobrenadantes se realizó mediante dos procedimientos, dependiendo de las concentraciones presentes en los medios. Cuando se presentaban en los medios líquidos cantidades suficientes de taxanos, las muestras se preparaban de forma muy rápida y eficaz. Los medios (2 ml) se secaron por completo (al vacío) y se añadió una cantidad determinada de metanol (0,5-2,0 ml). Esta mezcla se agitó mediante ultrasonidos hasta que se consiguió la completa disolución o dispersión de la muestra. Se eliminaron los sólidos mediante centrifugación antes del análisis por HPLC. Se obtuvieron recuperaciones cuantitativas a niveles de 1 mg/ml con niveles de detección buenos por debajo de 0,1 mg/ml.

35 Cuando la concentración de taxanos en los sobrenadantes del cultivo era baja, el medio se extrajo tres veces con un volumen igual de una mezcla de cloruro de metileno y alcohol isopropílico (AIP) (9:1 en volumen). La capa orgánica se redujo hasta sequedad y se reconstituyó en un volumen determinado de metanol (50-250 ml). Con la extracción múltiple se recuperaba típicamente el 90-95% del taxol, cefalomanina y baccatina III a niveles de 0,6 mg/l.

40 Los materiales celulares se extrajeron mediante congelación de las células recién recogidas (-5°C), seguido del secado al vacío y extracción soxhlet con metanol durante 50 ciclos. Se recuperaba generalmente del 70 al 80% de los taxanos con una descomposición determinada del 10-15%. La extracción de los medios sólidos y de los callos se consiguió de forma idéntica al de las células, sin embargo, también se realizó siempre una partición en cloruro de metileno/AIP frente a agua del extracto final de metanol.

5.3. Procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución

45 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica se realizó en una columna de difenilo cargada con alto contenido de carbono (Supelco, 5 mM, 4,6 mm x 25 cm) con un sistema de mezcla de gradiente de alta presión binario LDC Analytical compuesto de bombas CM3500/CM3200, un autocargador de volumen variable CM4100 y un fotodetector de dispositivos de fotodiodos SM5000 dotado de interfaz para un ordenador personal Total Peripherals 486. La temperatura de la columna se reguló a 35°C con un horno de columna Eldex CH150. El análisis de HPLC cuantitativo de taxanos se logró usando un esquema de elución de gradiente binario como sigue:

Tiempo	% de eluyente A	% de eluyente B	Flujo
0	75	25	1ml/min
40	35	65	*
42	25	75	*
47	25	75	*
50	75	25	*

Eluyente A = KH_2PO_4 0,015 mM llevado a pH 3,5 con ácido tricluoroacético Eluyente B = acetonitrilo

5 Los procedimientos cromatográficos utilizados recuerdan a los diversos procedimientos publicados (Witherup y col. 1989) con las excepciones en las que se ha usado un tampón fosfato que contenía ácido trifluoroacético y que se emplea un gradiente más largo. Estas diferencias mejoran significativamente la resolución de taxol y otros taxanos de la mezcla. A continuación se muestran los tiempos de retención relativos observados para los taxanos. El taxol eluye entre los 31 y 33 minutos dependiendo de la columna y del hardware usado.

Compuesto	Tiempo de retención relativo
10-deacetilbaccatina III	0,38
baccatina III	0,56
7-xilosil-10-deacetiltaxol C	0,80
10-deacetiltaxol C	0,87
cefalomanina	0,94
10-deacetil-7-epitaxol C	0,98
taxol C	1,00
7-epitaxol	1,12

10 Los tiempos de retención del taxol, cefalomanina y baccatina III se determinaron usando muestras auténticas obtenidas del *National Cancer Institute*. Los tiempos de retención de los otros taxanos enumerados a continuación se compararon con patrones analíticos proporcionados por Hauser Chemical Boulder CO. La identificación de taxanos conocidos se basó en las comparaciones del tiempo de retención y del espectro ultravioleta. La cuantificación del taxol, cefalomanina y baccatina III se basó en los factores de respuesta determinados a partir de materiales auténticos. La cuantificación de 10-deacetilbaccatina III se realizó usando el factor de respuesta determinado para baccatina III. La cuantificación de los derivados de taxol restantes se basó de forma conservadora en los factores de respuesta determinados para el taxol.

15 Cada uno de los patrones (10 ml) se inyectó típicamente (inicialmente después de 3 o 4 muestras) y se integraron las áreas de cada uno de los tres componentes. Los factores de respuesta para cada uno de los componentes se obtuvieron mediante análisis lineal de mínimos cuadrados de los datos. Se inyectaron 10 ml de cada muestra y se calculó la cantidad por inyección en base a la regresión estándar de los datos. Estos resultados se convirtieron en cantidad por litro o en porcentaje del peso seco. En la figura 4 se muestra un cromatograma típico de una muestra de sobrenadante.

5.4. Conformación EM/EM del taxol

25 La identidad del taxol en los sobrenadantes de cultivos celulares se ha confirmado usando un procedimiento EM/EM (como se muestra en la Figura 6) en la que se asocia una inyección de flujo con la ionización química a presión atmosférica por electrospray. Los detalles de los procedimientos utilizados para la adquisición de los datos presentados en la Figura 6 fueron los siguientes: Espectrómetro de masas: Triple/cuádruple Sciex API 3 con una fuente de ionización a presión atmosférica. Se usó nitrógeno como gas cortina y se usó argón como el gas de colisión para el espectro CID. Interfaz: La interfaz de electrospray que produce iones mediante ionización por

evaporación de iones (Electrospray). Se uso aire cero como el gas nebulizador. Bomba LC: Bomba de jeringa doble ABI 104 funcionando a 5 µl/minuto. Solventes: Acetonitrilo/H₂O 50/50 NH₄OAc 2 mM + ácido fórmico al 0,1%. Volumen de inyección: 5 µl, tomando todo el espectro mediante análisis de inyección de flujo. Este procedimiento proporcionó confirmación inequívoca de la presencia de taxol en las muestras de cultivos celulares y también proporcionó cuantificación con una excelente consonancia con los resultados de HPLC.

Ejemplo 6:

Producción de taxol por diversas especies

El taxol producido por los cultivos celulares de diversas especies de *Taxus* se resume en la Tabla 5. El callo se cultivó durante 20 días en la oscuridad sobre el medio solidificado indicado para cada especie. Las células y los medios se secaron y extrajeron con metanol juntos, y se probaron en ELISA o HPLC según se indica. Los resultados obtenidos con los cultivos de *Taxus chinensis* se elaboraron adicionalmente en los Ejemplos 7 y 8.

Ejemplo 7:

7.1 Producción en medio de cultivo

La producción de taxol y taxanos relacionados comenzaba durante los 2 primeros días de transferencia al medio de cultivo A. La concentración máxima de taxol se observó el día 15, a 8,81 µg/matraz, lo que se correspondía con 0,44 mg/litro de taxol. De este, el 46,1% estaba presente en el medio extracelular. A día 15, la concentración de taxano total era de 72,87 µg/matraz, o 3,6 mg/litro, de los que el 58,6% estaba presente en el medio extracelular. La viabilidad de las células fue siempre superior al 90% según se determinó mediante tinción con fluorescencia (ejemplo 4), lo que sugería que la presencia de taxol y taxanos extracelulares era debida a la secreción y no a la lisis celular. La capacidad de las células para secretar taxol y taxanos será un aspecto importante de la producción continua.

7.2 Cambio del medio para potenciar la productividad

Se obtuvieron mejoras significativas en la productividad de taxol y taxano total mediante la succión en condiciones asépticas del medio de cultivo A el día 9, su sustitución con medio recién preparado y la repetición del proceso el día 12. El experimento se terminó el día 15 y los resultados se muestran en la Figura 2. En la Tabla 6 se resumen los importantes aumentos de productividad debidos al cambio del medio. Las cantidades totales de taxol y taxanos producidos eran aproximadamente 4-6 veces mayores con el cambio de medio en comparación con los controles sin tratamiento. Lo más importante, se recogieron aproximadamente 4,9 veces más taxol y aproximadamente 5,9 veces más taxanos totales en el medio extracelular en comparación con los controles de tratamiento sin cambio de medio.

La capacidad para potenciar notablemente las productividades de taxol y taxano total y además producir acumulación extracelular del producto es importante para el funcionamiento de un proceso continuo y eficaz con biomasa reutilizada y purificación posterior simplificada.

7.3. Efecto de la luz sobre la producción de taxina en el medio de cultivo

Es sabido que la luz tiene una función importante no sólo en la fotosíntesis sino también en diversos aspectos del metabolismo secundario en cultivos de células vegetales (Seibert y Kadkade 1980). Mientras que los experimentos descritos en los Ejemplos 4, 7.1 y 7.2 se realizaron en oscuridad, se describe aquí la respuesta de los cultivos de *Taxus chinensis* a la luz.

Se inoculó un gramo de peso fresco de células de 7 días de la línea K-1 de *Taxus chinensis* en 25 ml de medio de cultivo A (véase la Tabla 2) en matraces Erlenmeyer de 125 ml y se incubaron a 24 ± 1°C en un agitador giratorio a 120 rpm. Los matraces duplicados se colocaron en la oscuridad y bajo una lámpara GroLux Standard a una distancia de aproximadamente 1 metro. Las características del espectro de la lámpara se muestran en la Figura 3. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

La exposición de los cultivos a la luz no afectaba a los niveles de taxano total y al grado de acumulación extracelular. Sin embargo, los perfiles de taxano estaban significativamente alterados en los dos tratamientos. Por ejemplo, las células cultivadas con luz producían 2,8 veces más taxol que las células en la oscuridad. La proporción de taxol extracelular también era significativamente superior que en el tratamiento en oscuridad (76% frente a 56%). El uso del tratamiento con luz, especialmente de calidad espectral específica, podría ser extremadamente útil en un proceso de cultivo celular para la producción de taxol.

Ejemplo 8:**Inductores**

El término inductores se usa para compuestos de origen biológico (o biótico) y no biológico (o abiótico) que producen un aumento del metabolismo secundario cuando se añaden a los cultivos de células vegetales.

5 Aunque se han encontrado varios inductores útiles, se describe aquí en detalle un ejemplo ilustrativo representativo, en concreto, el uso de glutamato de quitosano. Aunque previamente se ha descrito al quitosano como un inductor en algunos sistemas de cultivos de células vegetales, las reacciones tóxicas acompañantes como el oscurecimiento y la pérdida de viabilidad han hecho que su uso sea poco factible (Beaumont y Knorr 1987). De hecho estas reacciones adversas tóxicas son un inconveniente frecuente de muchos inductores recogidos en la literatura. El uso de
10 quitosanos químicamente modificados como el glutamato de quitosano para inducir específicamente la biosíntesis de taxol y taxano mientras se sortean los efectos adversos tóxicos es una estrategia novedosa.

Las suspensiones de la línea K-1 de *Taxus chinensis* crecida en medio D durante 7 a 8 días se filtraron por succión en condiciones asépticas usando un embudo de Buchner estéril con un filtro de papel miracloth (Calbiochem). Se transfirieron en condiciones asépticas 2 g de células de peso fresco a 25 ml de medio C (véase la Tabla 2) en un
15 matraz Erlenmeyer de 125 ml. Se preparó en el momento una solución de glutamato de quitosano al 0,05% y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de cartucho de 0,22 micrómetros. Se añadieron 825 µl de esta solución al matriz al inicio del experimento, lo que se correspondía con un nivel de 165 mg de inductor por gramo de células en peso seco. Los matraces se incubaron a 24±1° C en un agitador giratorio a 110 rpm en la oscuridad. Se tomaron muestras de los matraces de forma destructiva el día 15 y se registraron las observaciones sobre el
20 crecimiento, color de las células y del medio y viabilidad de las células. Las muestras liofilizadas se extrajeron con metanol para obtener taxol y taxanos como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron mediante HPLC. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.

El tratamiento con el inductor daba lugar a una mejora modesta en la producción de taxano total por célula (0,53% frente al 0,42% de taxanos en peso seco) con respecto a los controles no tratados. La naturaleza no tóxica del inductor se hace evidente a partir de las altas viabilidades (75-80%) observadas en ambos tratamientos. De hecho, se observó de forma reproducible un aumento del peso seco en el tratamiento con el inductor en comparación con los controles (14,2 g/l frente a 10,1 g/l de peso seco). Las densidades celulares más altas produjeron un valor mayor de 1,8 veces de taxanos totales en el tratamiento con inductor, es decir 75,8 mg/l frente a 42,4 mg/l para el control.

El tratamiento inductor daba lugar a un aumento en la biosíntesis de taxol, tanto por célula (0,098% frente a 0,054% de taxol en peso seco, aumento de 1,8 veces) como en una comparación de valor (13,9 mg/l frente a 5,4 mg/l, aumento de 2,6 veces). El grado de secreción era mayor para el tratamiento con inductor en comparación con el control (85% frente al 72% de producto extracelular).

El tratamiento con inductor descrito en este documento da lugar a un aumento en la producción de taxol, un perfil de producto más favorable, aumento de la secreción de productor y retención de una viabilidad celular alta. Estas características de producción representan una mejora significativa en un proceso de cultivo celular para la producción de taxol.

Ejemplo 9:**Desarrollo del medio de producción**

En un esfuerzo por aumentar las productividades de taxol por encima de los niveles descritos en el ejemplo 6, se manipularon los niveles de nutrientes para formular medios especiales de producción. Las suspensiones de la línea K-1 de *Taxus chinensis* crecida en medio D durante 7 a 8 días se filtraron por succión en condiciones asépticas usando un embudo de Buchner estéril con un filtro de papel miracloth (Calbiochem). Se transfirieron en condiciones asépticas 500 mg de peso fresco de células a 5 ml de medios de producción B y C (véase la Tabla 2). Los recipientes se incubaron durante periodos de tiempo variables de 18, 25 y 42 días a 24±1° C en un agitador giratorio a 110 rpm en la oscuridad. Se tomaron muestras de los matraces de forma destructiva el día 15 y se registraron las observaciones sobre el crecimiento, color de las células y del medio y viabilidad de las células. Las muestras liofilizadas se extrajeron con metanol para obtener taxol y taxanos como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron mediante HPLC.

9.1. Resultados de los cultivos de 18 días

50 Los cultivos celulares de *Taxus chinensis* respondieron a la alteración de las composiciones del medio produciendo niveles significativos de taxanos y taxol. Estos datos se resumen en la Tabla 9 y en la Figura 4 se muestra un cromatograma de muestra. En el medio B se produjeron 99,8 mg/litro de taxanos totales con 24,1 mg/litro de taxol puro. En el medio C, se produjeron 110 mg/litro de taxanos totales, con 21,3 mg/litro de taxol. En base al peso seco,

las células produjeron el 0,18% de peso seco de taxol en el medio B y el 0,065% de peso seco de taxol en el medio C.

9.2. Cultivo prolongado

5 La producción de taxol y de taxano tras el cultivo prolongado de células de *Taxus chinensis* (línea K-1) durante 25 y 42 días se estudió en el medio C, cuyos resultados se resumen en la Figura 5. Pueden resumirse las siguientes observaciones significativas:

10 (i) Los cultivos en suspensión de *Taxus* son capaces de producir niveles significativos de taxol y de otros taxanos. La acumulación más alta se observó a los 42 días, con el 0,32% de peso seco de taxol y el 0,62% de peso seco de taxanos totales; que se corresponden con valores de 153 mg/l de taxol y 295 mg/l de taxanos totales en función del volumen final del medio. El análisis de esta muestra mediante espectrometría de masas en tándem confirmó la presencia de taxol como se muestra en la Figura 6. La cuantificación mediante EM/EM mostró una excelente consonancia con la HPLC.

15 (ii) La tasa de biosíntesis de taxol entre los días 25 y 42 era aproximadamente de 7,6 mg de taxol por litro y día asumiendo una producción lineal en el periodo de 17 días. Esta tasa es significativamente superior a la tasa de producción en los primeros 25 días. La tasa de biosíntesis de taxano total entre los días 25 y 42 era de 12,3 mg por litro y día.

(iii) Las formulaciones del medio de producción pueden inducir un aumento de hasta 45 veces en el contenido específico de taxol en comparación con las condiciones de crecimiento rápido, como las descritas en el Ejemplo 7.

20 (iv) El producto puede manipularse de este modo dirigiendo la biosíntesis hacia el producto final de taxol deseado, al tiempo que se minimiza la producción de taxanos no deseados. Por ejemplo, el día 25, el taxol constituye el 28% de los taxanos totales y el día 42, el taxol constituye el 52% de los taxanos totales en contraste con el medio de cultivo (véase el ejemplo 7.1), en el que el taxol constituye sólo el 12,2% de los taxanos totales. Esta capacidad para manipular los perfiles del producto tendrá repercusiones importantes para la purificación posterior y para los aspectos reglamentarios relacionados con la pureza del producto. Por ejemplo, la capacidad para suprimir la producción del subproducto de taxano, cefalomanina podrían simplificar en gran medida la purificación posterior en comparación con la purificación de taxol a partir del tejido cortical.

25 (v) Se ha inducido a cultivos celulares de *Taxus* a secretar cantidades significativas de taxol (87% el día 42) y de otros taxanos. El hecho de que la presencia de taxol y taxanos extracelulares es debida a la secreción en lugar de a la lisis celular es corroborado por diversas observaciones independientes: (a) se producía biosíntesis continuada entre los días 25 y 42, lo que sugería que estas células eran viables y activas. Observaciones independientes han mostrado que se observaba una viabilidad >70% después de 18 días en el medio de producción, (b) se secretaron porcentajes diferentes de taxanos diferentes. Si las células se hubieran lisado, cabría esperar que el porcentaje en el medio fuera similar para los diferentes taxanos.

30 (vi) Es especialmente digno de mención la capacidad de esta línea celular de *Taxus* para crecer y producir taxol a tasas altas en un entorno extracelular que sea rico en el producto.

(vii) La línea celular de *Taxus* con la cual se han obtenido estos resultados es capaz también de mostrar crecimiento rápido a densidades celulares altas y expresaba las productividades notificadas tras 20 generaciones de condiciones de crecimiento rápido, avalando su estabilidad y potencial comercial.

35 Los niveles de taxol y taxanos producidos por las líneas celulares de *Taxus chinensis* en las condiciones descritas en este documento son más altos que los resultados publicados previamente en un factor de 35 a 150 veces. Por ejemplo, Christen y col. (1991) notificaron la producción de 1 a 3 mg/litro de taxol en cultivos en suspensión de *Taxus brevifolia* tras 2 a 4 semanas de cultivo. Wickeramesinhe y Artea (1991) notificaron la producción de taxol al 0,009% de peso seco en cultivos celulares de *Taxus media*.

40 En resumen, nuestros datos muestran que con el inicio y selección cuidadosas de cultivos de *Taxus chinensis* y con condiciones de medio de crecimiento especialmente formuladas, puede inducirse un rápido crecimiento de las células a densidades celulares altas. Cuando estas células se transfieren a condiciones de medio de producción, las células son capaces de biosintetizar y secretar niveles significativos de taxol y de otros taxanos durante periodos prolongados manteniendo viabilidades altas. La incorporación de un cambio periódico del medio, luz e inductores con el medio de producción da lugar a aumentos sinérgicos adicionales de productividad. Estas propiedades son requisitos previos críticos para un proceso comercial eficaz para la producción de taxol y taxano usando tecnología de cultivo tisular.

BIBLIOGRAFIA

- M. Asada y M.L. Shuler. 1989. Stimulation of Ajmalicine Production and Excretion from *Catharanthus roseus*: Effects of adsorption in situ, Elicitors, and Alginate Immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 475-481.
- 5 M. D. Beaumont y D. Knorr. 1987. Effects of immobilizing agents and Procedures on Viability of Cultured Celery (*Apium graveolens*) Cells. *Biotechnol. Lett.* 9, 377-382.
- J. Berlin y L. Witte. 1988. Formation of Mono- and Diterpenoids by Cultured Cells of *Thuja Occidentalis*. *Phytochemistry.* 27, 127-132.
- C.H. Bornman. 1983. Possibilities and Constraints in the Regeneration of Trees from Cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. *Physiol. Plant.* 57, 5-16.
- 10 A.A. Christen, D.M. Gibson y J. Bland. 1991. Production of Taxol or Taxol-Like Compounds in Cell Culture. Patente de EE.UU. N° 5019504.
- A.G. Darvill y P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275.
- 15 N.E. Delfel y J.A. Rothfus. 1977. Antitumor Alkaloids in Callus Cultures of *Cephalotaxus harringtonia*. *Phytochemistry.* 16, 1595-1598.
- J.N. Denis, A. Correa y A.E. Greene. 1991. Direct Highly Efficient Synthesis from S-Dextro Phenylglycine of the Taxol and Taxotere Side Chains. *J. Org. Chem.*, 56, 6939-6942.
- J. Denis, A.E. Greene, D. Guenard y F. Gueritte-Voegelein. 1990. Process for Preparing Taxol. Patente de EE.UU. N° 4924011.
- 20 J.N. Denis, A.E. Greene, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, L. Mangatal y P. Potier. 1988. Highly Efficient Practical Approach to Natural Taxol. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5917-5919.
- J. Ebel. 1984. Induction of Phytoalexin Synthesis in Plants Following Microbial Infection or Treatment with Elicitors. *Bioregulators: Chemistry and Uses.* 257-271
- 25 U. Eilert. 1987. Elicitation: Methodology and Aspects of Application. En "Cell Culture and Somatic Genetics of Plants," Vol. 4, F. Constabel e I.K. Vasil (eds.) Academic Press, Nueva York, pág. 153-196.
- P.F. Heinstein. 1985. Future Approaches to the Formation of Secondary Natural Products in Plant Cell Suspension Cultures. *Journal of Natural Products.* 48, 1-9.
- R.A. Holton. 1991. Method for Preparation of Taxol Using an Oxazinone. Patente de EE.UU. N° 5015744.
- 30 M. Jaziri, B.M. Diallo, M.H. Vanhaelen, R.J. Vanhaelen-Fastre, A. Zhiri, A.G. Becu y J. Homes. 1991. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection and the Semi-Quantitative Determination of Taxane Diterpenoids Related to Taxol in *Taxus* sp. and Tissue Cultures. *J. Pharm. Belg.*, 46, 93-99.
- H. Miyasaka, M. Nasu, T. Yamamoto, Y. Endo y K. Yoneda. 1986. Regulation of Ferruginol and Cryptotanshinone Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Salvia Miltiorrhiza*. *Phytochemistry.* 25, 637-640.
- 35 G.F. Payne, V. Bringi, C. Prince y M.L. Shuler. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser Publishers, Munich.
- R.J. Robins y M.J.C. Rhodes. 1986. The Stimulation of Anthraquinone Production by *Cinchona ledgeriana* Cultures with Polymeric Adsorbents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 35-41.
- E.K. Rowinsky, L.A. Cazenave y R.C. Donehower. 1990. Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1247-1259.
- 40 M. Seibert y P.G. Kade. 1980. Light. En 'Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals'. E.J. Staba (ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, pág. 123-141.
- W. van Uden, N. Pras y T.M. Malingre. 1990. The Accumulation of Podophyllotoxin-B-D-glycoside by Cell Suspension Cultures Derived from the Conifer *Callitris drummondii*. *Plant Cell Reports.* 9, 257-260.
- 45 M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon y M.T. McPhail. 1971. Plant Antitumor Agents. VI. Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325-2327.

- P.J. Westgate, A.H. Emery, P.M. Hasegawa y P.F. Heinstei. 1991. Growth of *Cephalotaxus harringtonia* Plant Cell Cultures. *Appl. Microbial Biotechnol.* 34, 798-803.
- E.R.M. Wickeramesinhe y R.N. Arteca. 1991. Habituated Callus Cultures of *Taxus media* cultivar *Hicksii* as a Source fo Taxol (Resumen). *Plant Physiol.*, 96, (Suplemento) pág. 97.
- 5 J.M. Widholm. 1972. The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant Cells. *Stain Technol.*, 47, 189-194.
- K.M. Witherup, S.A. Look, M.W. Stasko, T.G. McCloud, H.J. Issaq y G.M. Muschik. 1989. HPLC Separation of Taxol and Related Compounds from *Taxus brevifolia*. *J. Liq. Chrom.*, 12, 2117-2132.
- 10 K.M. Witherup, S.A. Look, M.W. Stasko, T.J. Ghiorzi, G.M. Muschik. 1990. *Taxus* spp. Needles Contain Amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and Isolation. *Journal of Natural Products.* 53, 1249-1255.
- L.X. Xu y A.R. Liu. 1991. Determination of Taxol in *Taxus chinensis* by HPLC Method. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 26, 537-540.

Tabla 1.a. Lista de inductores utilizados en la inducción de cultivos celulares de *Taxus* spp.

I. Inductores bióticos (microorganismos)

- *Botrytis cinerea*
- *Phytophthora megasperma*
- *Pinellas stripticum*
- *Oligosporus* sp.
- *Pythium mamialatum*
- *Pythium sylvaticum*
- *Verticillium dahliae*
- *Verticillium* sp.
- *Penicillium minioluteum*
- *Phytophthora lateralis*
- *Cytospora cincta*
- *Cytospora leucostoma*
- *Alternaria brassicicola*
- *Alternaria solani*
- *Alternaria cucumerina*
- *Botrytis squamosa*
- *Cachliobolus heterostrophus*
- *Colletotrichum trifolii*
- *Colletotrichum orbiculum*
- *Colletotrichum graminicola*
- *Colletotrichum gloeosporioides*
- *Cylindrocladium floridanum*
- *Fusarium crookwellense*
- *Fusarium heterosporium*

- Fusarium oxysporum f. sp. Conglutinans
- Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici
- Fusarium oxysporum f. sp. Pisi
- Gibberella zeae
- Gaeumannomyces graminis var. Triticum
- Geotrichum sp.
- Leptosphaeria torrae
- Nectria haematococca MPVI
- Mycosphaerella pinodes
- Ophiostoma ulmi
- Phoma lingam
- Phoma pinodella
- Phytophthora infestans
- Pythium aristosporum
- Pythium graminicola
- Pythium ultimum
- Rhizoctonia solani
- Sclerotinia sp-
- S. nodorum D-45
- Trametes versicolor
- Ustilago maydis
- Venturia inequalis

II. Inductores bióticos (fracciones o productos microbianos)

- | | |
|-----------------------|----------------|
| • Quitosano | • Cellulicina |
| • Liquefano | • Multifect XL |
| • Glucomanano | • Multifect CL |
| • Pleurano | • Resinasa |
| • Glucano | • Pulpzyme |
| • Carboximetilglucano | • SP431 |
| • Hidroximetilglucano | • Pectinol |
| • Sulfoetilglucano | • Rapidasa |
| • Manano | • Klerzyme |
| • Xilano | • Quitinasa |
| • Manobiosa | |
| • Manotriosa | |

- Manopentosa
- Manotetrosa

III. Inductores abióticos (agentes de estrés químico así como algunos compuestos bioquímicos naturales)

- | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| • Ácido araquidónico | • Sulfato de vanadilo | • Fenpropemorf |
| • Ácido elaidico | • Uniconazol | • Procloraz |
| • AMP cíclico | • Paclobutrazol | • Naftifina |
| • AMP cíclico dibutirilo | • Espermina | • EDU |
| • Jasmonato de metilo | • Espermidina | • HTA |
| • Cis-jasmona | • Putrescina | • MPTA |
| • Miconazol | • Cadaverina | • Glutación |
| • Ácido ferúlico | • Sulfato de protamina | • EGTA |
| • AMO 1618 | • SKF-7997 | • Gliberelinas |
| • Tritón X-100 | • MER 29 | • Ácido Abscísico |
| • Ácido benzoico | • Ancimidol | • 1,3-difenil urea |
| • Ácido salicílico | • Triadimefona | • Diazolindenil urea |
| • Galato de propilo | • Fosfano D | • Floroglucinol |
| • Sesamol | • Tiourea | • Alginato sódico |
| • Cloruro de clorocolina | • Sulfato de dextrano | • Carrageno |
| • 3,4-diclorofenoxi trietil (amina) | • Glutamato de hidroquinona quitosano | |
| • Ácido cloroetilfosfónico | | |
| • Ácido dietilditiocarbámico | | |
| • Ácido nordihidroguairético | | |
| • Ditiotreitol | | |
| • Metabisulfito sódico | | |
| • Metabisulfito de potasio | | |
| • d-amino-DL-fenilalanina | | |

Tabla 1.b. Lista de precursores, inhibidores y estimulantes o activadores usados en la regulación, de la biosíntesis de taxol y taxanos en cultivos celulares de *T. spp.*

Precusores	Inhibidores	Estimulantes o activadores
Fenilalanina	Cloruro de clorocolina	AMP cíclico
Lisina	Uniconazol	AMP cíclico dibutirilo
Tirosina	Paclobutrazol	Jasmonato de metilo
Triptófano	SKF-7997	Cis-jasmona
Metionina	MER 29	Ácido cloroetilfosfónico
Tiramina	Ancimidol	Espermina
Acetato sódico	Triadimefona	Espermidina
Acetato de potasio	Fosfona D	Putrescina
Acetato de amonio	Fenpropemorf	Cadaverina
Ácido mevalónico	Procloraz	MPTA
Acetato de farnesilo	Naptifina	DCPTA
Acetato de geranilo	Miconazol	DIPTA
Acetato de geranilgeraniol	Nitrato de plata	ACC
Triptamina	Norbonadieno	HTA
Mentol	AMO 1618	Brasinoesteroides
α -Pino	Alar	BHA
Ácido trans-cinámico	Ácido 4-amino-5-hexinoico	BHT
Cambreno A	Feniletanolamina	OTA
Verticileno	Fenetilamina	
Verticilol	Glifosfato	
Camfor	Dihidrocicloeucaalenol	
(cont.)		
Quercetina	Sulfóxido de metionina	
Ácido levulínico	B-hidroxifenilalanina	
Ácido abiético	5-Metil-DL-triptófano	
Borneol	α -Fluorofenilalanina	
	Clorhidrato de 5-2-aminoetil-L-cisteína	

Tabla 2: componentes (mg/l) de los medios catalíticos de fitona usados para el cultivo de los cultivos de *Taxus*

ES 2 361 150 T3

COMPONENTE QUÍMICO	A mg/l	B mg/l	C mg/l	D mg/l	E mg/l	F mg/l	G mg/l	H mg/l
Nitrato de amonio	-	-	-	-	-	400,0	500	400,0
Sulfato de amonio	134,0	-	33,5	134,0	67,0	-	134,0	
Ácido bórico	3,0	1,5	0,75	3,0	1,5	0,75	6,2	1,5
Cloruro cálcico (anhidro)	113,24	-	28,31	113,24	56,62	72,5	113,24	72,5
Cloruro cálcico 2H ₂ O	-	20,0	50,0	-	-	-	-	-
Nitrato cálcico 4H ₂ O	-	206,4	-	-	-	386,0	-	366,0
Cloruro de cobalto 6H ₂ O	0,025	-	0,006	0,025	0,0125	-	0,025	-
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0,025	0,01	0,006	0,025	0,0125	0,25	0,025	0,25
NO ₂ EDTA 2H ₂ O	37,3	-	9,32	37,3	16,65	37,3	37,3	37,3
Sulfato férrico	-	2,5	-	-	-	-	-	-
Sulfato ferroso 7H ₂ O	27,8	-	6,95	27,6	13,9	27,8	27,8	27,8
Sulfato de magnesio anhidro	122,09	366,2	30,5	122,09	61,04	160,7	122,00	180,7
Sulfato de manganeso H ₂ O	10,0	23,768	22,5	10,0	5,0	22,3	10,0	22,3
Trióxido de molibdeno	-	0,001	-	-	-	-	-	-
Ácido molíbdico (sal sódica) 2H ₂ O	0,25	-	0,062	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25
Cloruro de potasio	-	65,0	-	-	-	-	-	-
Yoduro de potasio	0,75	0,75	0,175	0,75	0,375	-	0,75	-
Nitrato de potasio	2.500,0	80,0	625,0	2.500,0	1.250,0	-	2.500,0	-
Fosfato de potasio (monobásico)	-	-	10,0	-	-	170,0	-	170,0
Sulfato de potasio	-	-	-	-	-	990,0	-	990,0
Fosfato sódico (monobásico anhidro)	130,5	16,5	32,62	130,5	65,25	-	130,5	-
Sulfato sódico	-	200,0	-	-	-	-	-	-
Sulfato de cinc 7H ₂ O	2,0	3,0	0,5	2,0	1,0	8,6	2,0	8,8
Myo.Inoellid	100,0	100,0	125,0	100,0	50,0	100,0	100,0	100,0
Ácido nicotínico	1,0	-	0,75	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
Piridoxina HCl	1,0	-	0,25	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
Tianina HCl	10,0	*5,0	3,5	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0
• Glutamina	292,8	146,4	-	292,8	292,8	1.756,8	-	292,8

ES 2 361 150 T3

• Triptófano	-	-	-	-	-	-	-	-
• Fenilalanina	-	30,0	-	-	-	-	-	-
• Lisina	-	20,0	-	-	-	-	-	-
Metionina	-	-	-	-	-	-	-	-
• Acetato sódico	-	10,0	10,0	-	-	-	-	-
Sacarosa	10.000,0	50.000,0	40.000,0	10.000,0	10.000,0	10.000,0	20.000,0	10.000,0
N ₆ Benciladonina	0,002	2,0	2,0	0,002	0,002	-	-	-
Ácido B-naftaleno acético	0,931	10,0	-	-	-	-	1,862	-
• Ácido ascórbico	50,0	100,0	50,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Plodoram	-	-	-	1,2	2,4	1,2	-	1,2
Caseína hidrolizada	-	-	500,0	-	-	-	1.000,0	-
6/y, Dimetirililamino/Purina	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Kinetina	-	-	-	-	-	-	-	0,02
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

*Filtrado estéril en el medio autoclavado

Tabla 3. Condiciones preferidas para la proliferación del callo de diversas especies de *Taxus*. Los componentes de los medios basales se enumeran en la Tabla 2

Especie	Medio basal (Tabla 2)	Reguladores de crecimiento*			
		Auxina		Citoquinina	
		Tipo	Conc (M)	Tipo	Conc (M)
<i>T. brevifolia</i>	F	P	5×10^{-6}	2iP	10^{-7}
	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. canadensis</i>	H	P	5×10^{-6}	K	10^{-7}
	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
(cont.)					
<i>T. chinensis</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
	A	N	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. globosa</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. floridana</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. baccata</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. cuspidata</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. media</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}
<i>T. wallichiana</i>	D	P	5×10^{-6}	BA	10^{-8}

*Abreviaturas: Picloram (P), ácido naftaleno acético (N), Benciladenina (BA), Dimetil alilamino purina (2iP), Kinetina (K)

Tabla 4. Características típicas del crecimiento de los cultivos en suspensión de *Taxus* sp.

Especie	Tiempo de duplicación del peso seco	Tiempo de duplicación del peso fresco	Densidad de peso seco	Densidad de peso fresco
<i>T. brevifolia</i>	2,0 días	3,5 días	20 g/l	400 g/l
<i>T. baccata</i>	20	6,0	15	220
<i>T. chinensis</i>	25	4,5	20	286
<i>T. canadensis</i>	nd*	8,5	13	260

* no determinado todavía

Tabla 5. Producción de taxol en diversas especies de *Taxus*.

Especie	Contenido en taxol (% del peso seco)	Medio (véanse las Tablas 2 y 3)	Análisis
<i>T. brevifolia</i>	0,006	F	ELISA
<i>T. canadensis</i>	0,004	H	ELISA
<i>T. baccata</i>	0,0014	D	HPLC
<i>T. globosa</i>	0,0003	G	ELISA

<i>T. cuspidata</i>	0,0025	G	HPLC
<i>T. floridana</i>	0,001	G	ELISA
<i>T. media</i>	0,02	F	ELISA
<i>T. chinensis</i>	0,18	B	HPLC

Tabla 6. Mejora en la productividad debido al tratamiento de cambio de medio. Los valores se expresan como veces de mejora sobre los niveles alcanzados en un intervalo de cultivo discontinuo de 15 días. La línea celular K-1 de *Taxus chinensis* se cultivó en medio A en oscuridad.

	<u>Niveles totales*</u>	<u>Niveles extracelulares</u>
Taxol	4,6	4,89
Taxanos totales	4,55	5,94

*Niveles total en células y medio combinados

5

Tabla 7. Efecto de la luz standard GroLux sobre el contenido en taxol y taxano en cultivos de 10 días de la línea K-1 de *Taxus chinensis* en medio A. Las cantidades mostradas se expresan en µg extraídas de 20 ml de suspensión. El crecimiento celular era idéntico en ambos tratamientos (164 mg de peso seco por matraz).

	Luz	Oscuridad
Taxol total: células y medio:	8,8 µg	3,13 µg
Taxol extracelular:	76,40%	56,20%
Taxanos totales en células y medio:	61,55 µg	62,17 µg
Taxanos extracelulares:	89%	84%

10

Tabla 8. Comparación del tratamiento con glutamato de quitosano en suspensiones no inducidas de la línea K-1 de *Taxus chinensis* después de 15 días de cultivo en medio C. Los niveles de taxano notificados son de células y medio combinados. El % extra se refiere al porcentaje de producto extracelular.

	CONTROL			INDUCTOR		
	Densidad celular	10,1 g/l		Densidad celular	14,2 g/l	
	Viabilidad celular	70-80% viables		Viabilidad celular	75-80% viables	
Taxanos	% peso seco	mg/l	% Extra	% peso seco	mg/l	% Extra
Taxol	0,054	5,4	72,0	0,098	13,9	85,0
Baccatina III	0,057	5,8	69,9	0,055	7,8	76,6
7-xilosil-10-deacetiltaxol C	0,040	4,0	63,0	0,048	6,9	77,0
Cefalonanina	0,004	0,4	71,1	0,0	1,0	75,3
10-deacetilbaccatina III						
10-deacetiltaxol						

10-deacetil-7-epitaxol	0,054	5,4	74,2	0,076	10,8	85,7
7-epitaxol	0,009	0,9	74,6	0,009	1,3	86,2
Taxanos desconocidos	0,203	20,5	79,7	0,240	34,1	90,2
Taxanos totales:	0,421	42,4		0,533	75,8	

Tabla 9. Manipulación de los nutrientes del medio para potenciar la biosíntesis de taxano y taxol en la línea K-1 en suspensión de *Taxus chinensis*. Se inocularon 500 mg de células de peso fresco en 5 ml de medio y se incubaron en la oscuridad durante 18 días. Se notifican los taxanos totales producidos (en las células y medio combinado). Los componentes de los medios B y C se enumeran en la Tabla 2

Nivel de taxano	Medio B (mg/l)	Medio C (mg/l)
Baccatina III	4,3	3,9
7-xilosil-10-deacetiltaxol	8,3	129
Cefalomanina	1,1	Trazas
10-deacetil 7-epitaxol	4,6	5,4
Taxol	24,1	213
7-epi taxol	1,3	28
Otros taxanos no identificados*	56,1	63,7
Taxanos totales	99,8 mg/l	110 mg/l

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para potenciar los rendimientos y recuperaciones de taxol y taxanos totales a partir de cultivos celulares de *Taxus chinensis* que comprende:
- (a) cultivar células derivadas de tejidos de callos de *Taxus chinensis* en cultivos celulares en suspensión en un primer medio nutritivo que favorece el crecimiento rápido de las células cultivadas;
- 5 (b) producir taxol y otros taxanos en un segundo medio nutritivo que está separado y es independiente de dicho primer medio, en el que dicho segundo medio favorece la biosíntesis de taxol y taxano en las células en cultivo y en el que se producen taxol y otros taxanos a niveles superiores a 3 mg/l de taxol; y
- (c) recuperar dicho taxol y otros taxanos a partir de dichas células y/o dicho medio de producción de dicho cultivo celular.
- 10 2.. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho segundo medio comprende un inductor.
- 3.. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo medio comprende nitrato de plata.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo medio comprende fenilalanina.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que además comprende un cambio periódico del medio nutritivo.
- 15 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que además comprende la retirada periódica del taxol y taxano.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el procedimiento comprende un proceso de cultivo discontinuo en dos fases, un proceso de cultivo discontinuo alimentado, un proceso continuo o variaciones de los mismos.
- 20 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que uno o más medios nutritivos comprenden glutamina.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que uno o más medios nutritivos comprenden hormonas vegetales seleccionadas entre el grupo que consiste en por ácido indolbutírico, ácido indolacético, indol-3-acetil fenilalanina, picloram, dicamba, ácido beta-naftaleneacético, ácido beta-naftoxiacético,
- 25 ácidos clorofenoxiacéticos, N6-banciladenina, kitenina, dimetilalilamino-purina, tidiazorona, zeatina, sulfato de adenina y 2-cloro-4-piridil-N-fenil urea.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho segundo medio comprende un aumento del nivel de sacarosa en comparación con dicho primer medio.
- 30 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho nivel mayor de 3 mg/l de taxol se produce en 18 días o menos.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho nivel mayor de 3 mg/l de taxol se produce en 15 días o menos.

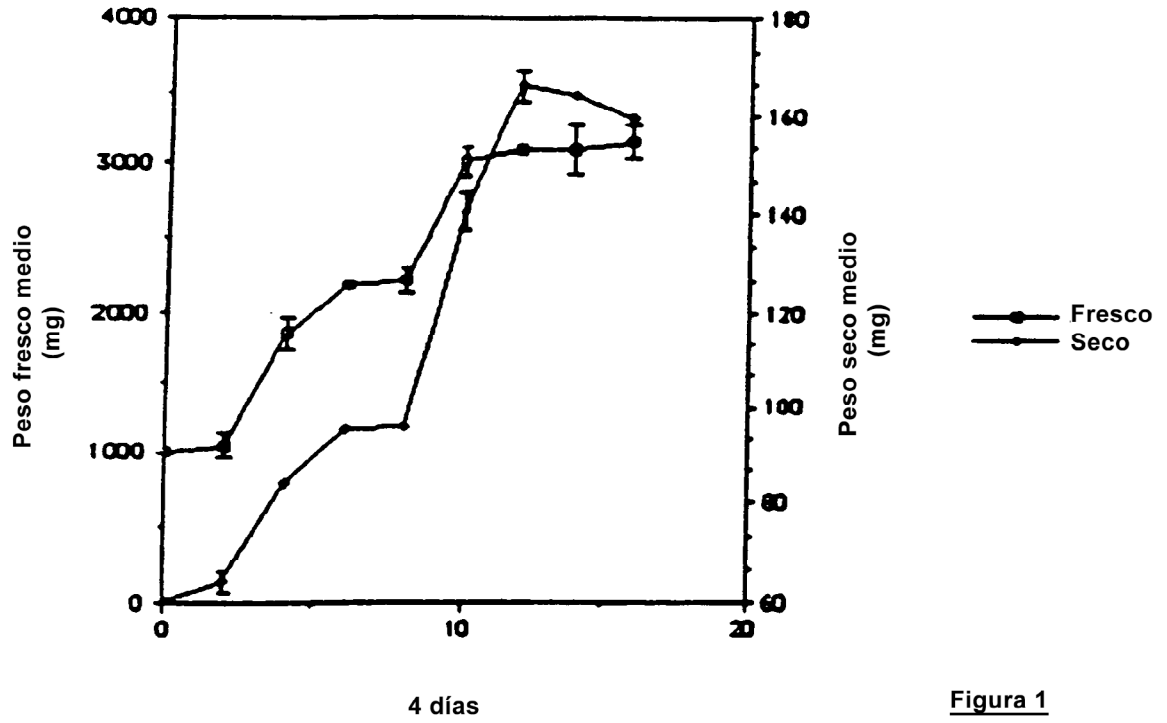


Figura 1

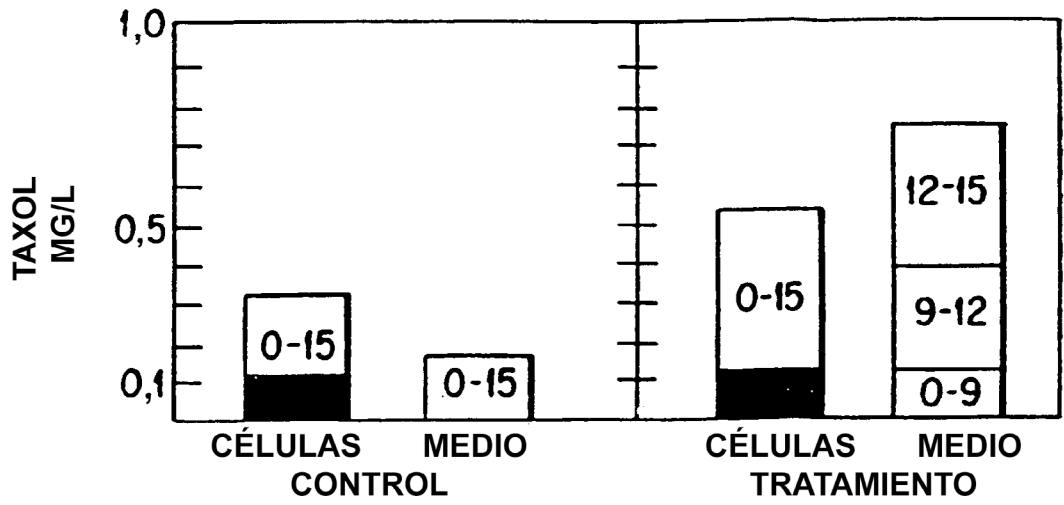


FIG. 2A

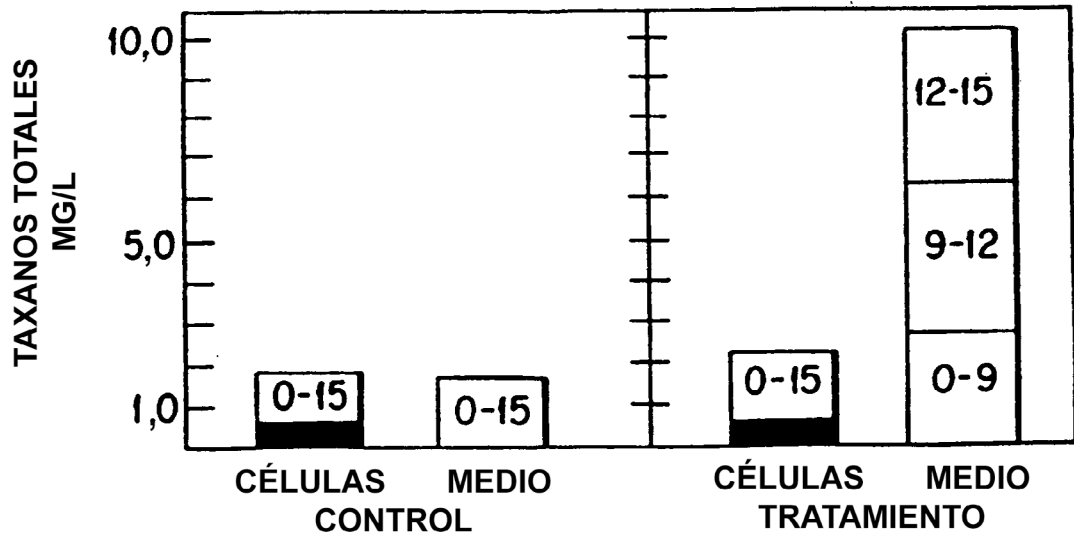


FIG. 2B

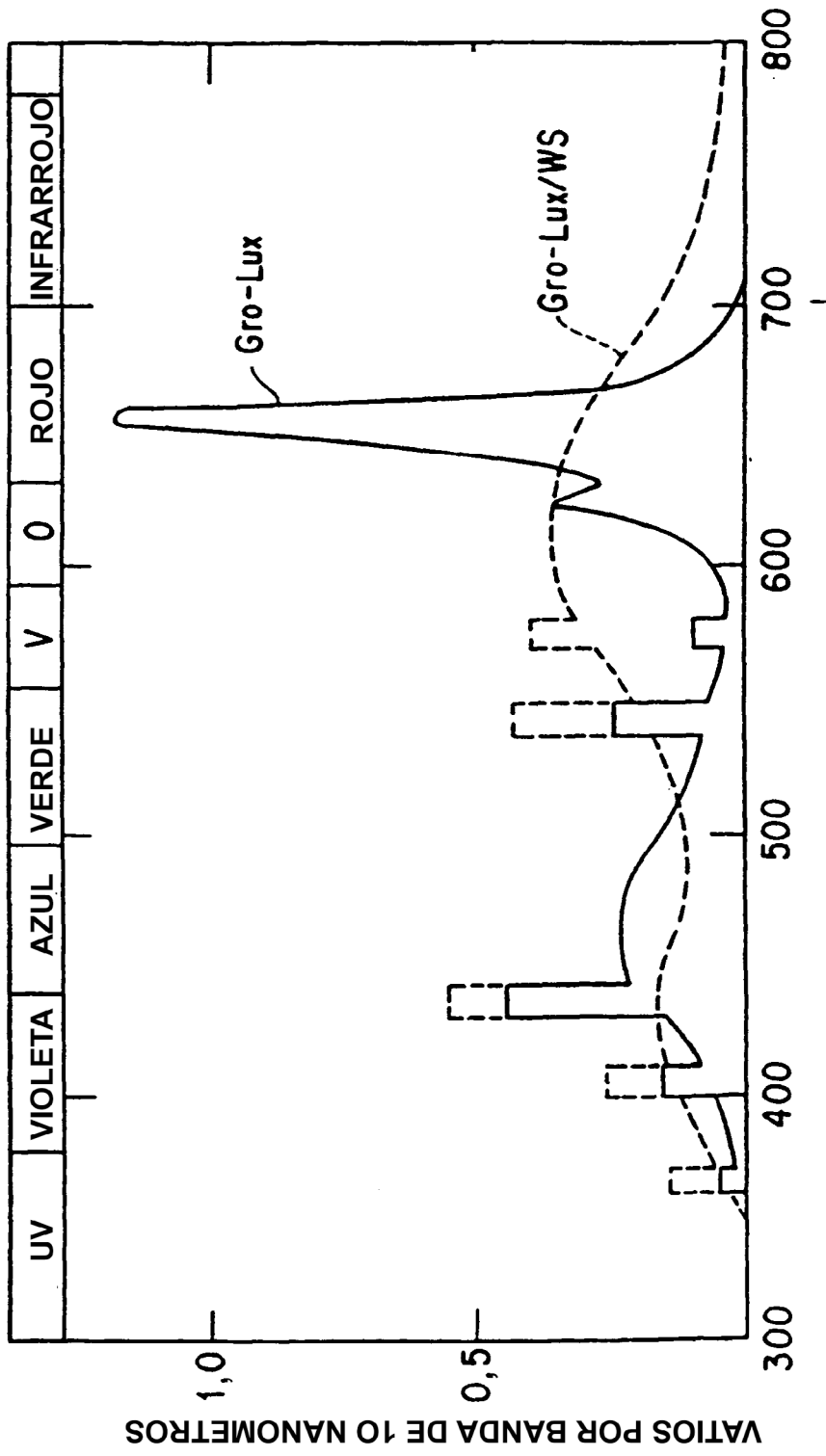


FIG. 3

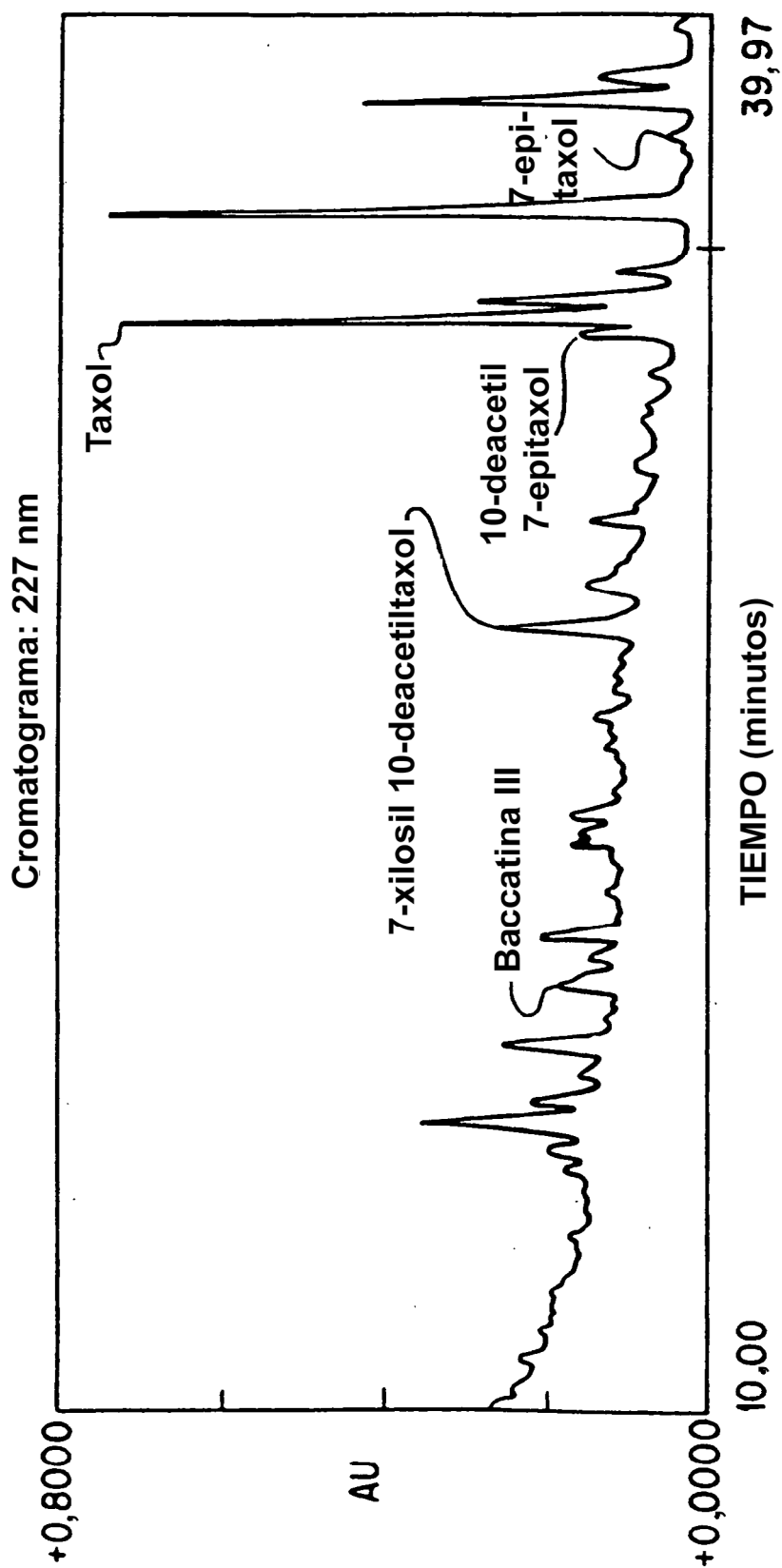


FIG. 4A

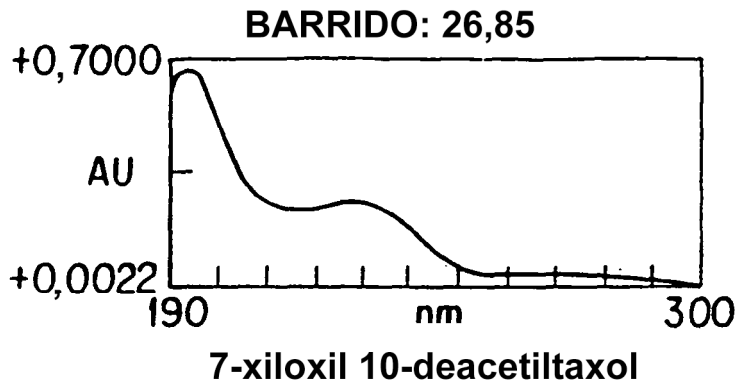


FIG. 4B

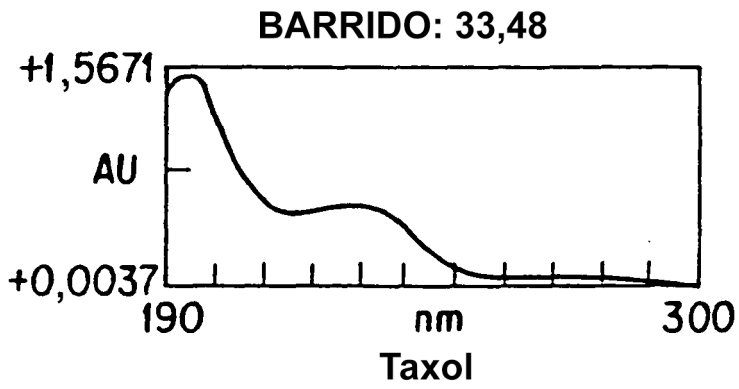


FIG. 4C

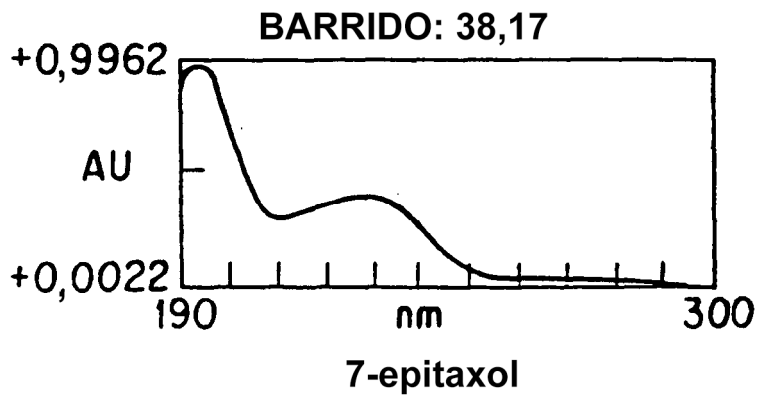


FIG. 4D

COMPUESTO	DÍA 25			DÍA 42		
	% P. S.	mg/l	% extracelular	% P. S.	mg/l	% extracelular
10-deacetilbaccatina III	0,0000	0,00		0,0000	0,00	
Bacattina III	0,0184	10,43	10,57	0,0420	19,83	14,72
7-xilosil-10-deacetiltaxol	0,0127	7,19	24,62	0,0283	13,38	45,81
10-deacetiltaxol	0,0122	6,95	17,37	0,0127	5,99	0,00
Cefalomanina	0,0000	0,00		0,0119	5,60	86,02
10-deacetil-7-epitaxol	0,0081	4,61	62,42	0,0275	12,99	72,59
Taxol	0,0427	24,25	78,95	0,3244	153,34	87,52
7-epitaxol	0,0122	6,92	84,61	0,0154	7,26	85,28
TOTAL desconocidos	0,0452	25,67		0,1625	76,83	
TOTAL taxanos	0,1515	86,84		0,6245	295,23	

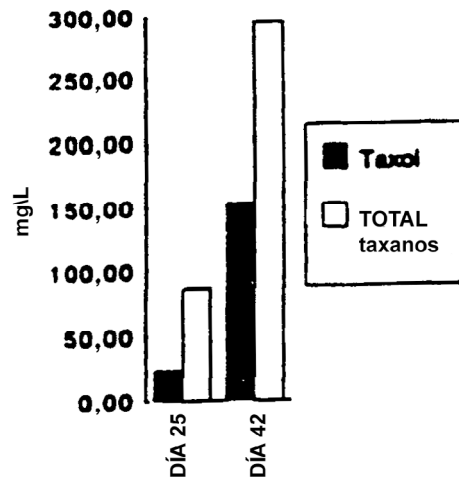


Figura 5

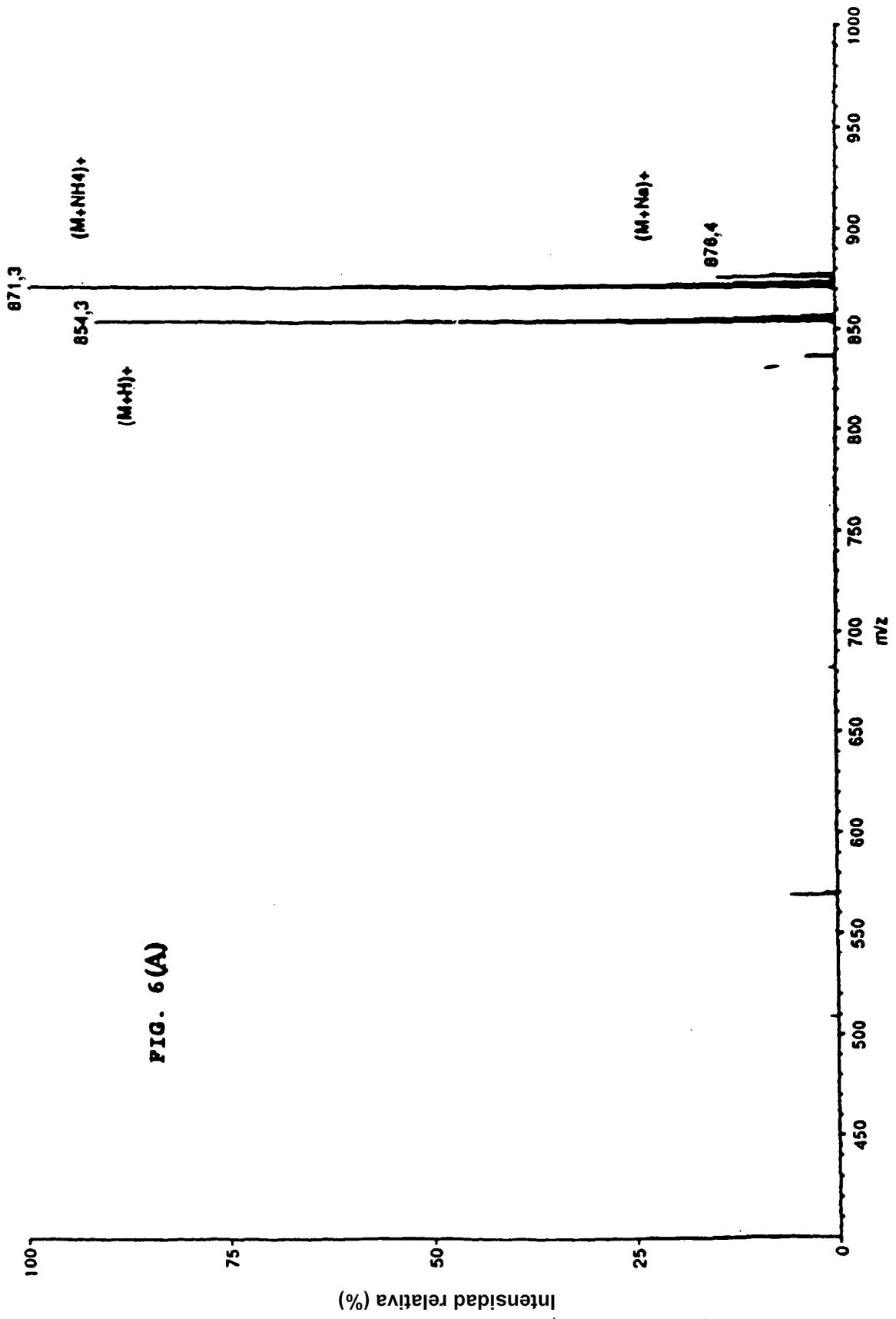


FIG. 6(A)

