

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 108**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006** **E 06757522 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 1951863**

54 Título: **Estabilidad de la producción masiva de metabolitos secundarios mediante cultivos sincronizados de células vegetales**

30 Prioridad:

31.10.2005 KR 20050103445

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

18.09.2015

73 Titular/es:

**UNHWA CORPORATION (33.3%)
452-32 Jang-dong, Deokjin-gu
Jeonju-si, Jeollabuk-do, KR;
JIN, YOUNG WOO (33.3%) y
LEE, EUN KYONG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**JIN, YOUNG WOO y
LEE, EUN KYONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 108 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

Estabilidad de la producción masiva de metabolitos secundarios mediante cultivos sincronizados de células vegetales

5

Campo técnico

Las plantas se han usado de forma muy importante no solo como suministro de alimentos, sino también como fuente de muchas sustancias químicas entre las que se incluyen agentes farmacéuticos, fragancias, colorantes, sustancias químicas agrícolas y tintes etc. Los compuestos activos biológicos producidos por plantas son principalmente metabolitos secundarios. Existe un gran interés en los metabolitos secundarios tales como alcaloides, alérgenos, aminoácidos, antraquinonas, agentes contra la leucemia, agentes antimicrobianos, agentes antitumorales, agentes antivíricos, enzimas, flavonoides, insecticidas, opiáceos, perfumes, pigmentos, vitaminas, y polisacáridos, etc., puesto que la mayoría de ellos actúan como sustancias activas fisiológicamente. De acuerdo con Zhong (2002), existen aproximadamente 100.000 metabolitos vegetales secundarios conocidos y más del 25 % de las medicinas que se utilizan de forma práctica son sustancias derivadas de plantas. Cada año se descubren continuamente nuevos metabolitos secundarios.

10

15

En el método obtener dichos metabolitos, existen muchos problemas, tales como una difícil síntesis química a pesar de recientes desarrollos asombrosos de la química orgánica, la demolición de la naturaleza debido a la explotación y la contaminación ambiental y los cambios en el contenido de metabolitos y aumento en los costes de producción dependiendo de las condiciones de cultivo, como la estación, la región y el clima. Por tanto, existen continuos intentos de producir metabolitos secundarios mediante la técnica de cultivo *in vitro* que tiene la ventaja de mantener las condiciones ambientales externas adecuadas y una producción a gran escala incluso en un sitio pequeño.

20

25

Antecedente de la técnica

De acuerdo con la patente coreana 0130100, la producción de sustancias biológicamente activas mediante cultivo de células vegetales tiene más ventajas que la extracción directa de la planta. Se considera que el cultivo de células vegetales es un método óptimo de producción continua que no se ve afectado por el medio ambiente y para resolver problemas pendientes como la destrucción ecológica. Nail y Roberts (2004), sin embargo, se ha indicado la velocidad de crecimiento lenta y la baja productividad del cultivo de células vegetales en la producción de metabolitos secundarios. Para resolver este problema, existen estudio para optimizar los medios, condiciones de cultivo, procesos y consecución de mayor productividad etc. (Zhong 2002). En la patente internacional W093/17121 se usaron varios medios para cultivar varios *Taxus* para conseguir un aumento en la tasa de crecimiento celular y productividad de paclitaxel. Basándose en los resultados de los experimentos, se indicaron condiciones para conseguir la producción masiva de paclitaxel. A pesar de las mejoras en la producción de los valiosos metabolitos secundarios, la variabilidad sigue siendo un problema importante de la producción de paclitaxel a partir de *Taxus* así como otras sustancias valiosas procedentes de numerosos sistemas vegetales.

30

35

40

La producción de metabolitos secundarios mediante cultivos de células vegetales a gran escala solo es comercialmente posible si se consigue un mantenimiento estable del crecimiento celular rápido y una elevada producción de metabolitos durante el cultivo a largo plazo. La capacidad de las líneas celulares para producir diferentes metabolitos no es estable, lo que hace que las líneas celulares pierdan su productividad inicial mediante subcultivos; es evidente que el éxito y el fracaso dependen de como resolvamos estos problemas.

45

En un cultivo de células vegetales, aunque las células proceden de una planta, la productividad de un metabolito en cada línea celular es diferente e inestable. Por tanto, establecer las líneas celulares que tienen elevada productividad y estabilidad genética es lo más importante de todo.

50

Líneas celulares derivadas de células únicas y células múltiples.

Las líneas celulares vegetales derivadas de células únicas tienen menor variabilidad que las líneas celulares derivadas de múltiples células; esto da como resultado mayor productividad. En anteriores invenciones se usaron tallos, raíces, semillas, agujas y hojas como los mejores explantes para la inducción de líneas celulares. Estos tallos, raíces, semillas, agujas y hojas son tejidos compuestos por células con diferentes funciones y morfología. Los callos, las líneas celulares derivadas de estos tejidos no son de un tipo. Por tanto, existen limitaciones a los intentos de reducir la variación de la producción de los callos derivados de estos tejidos compuestos por múltiples células.

55

60

Agregación celular

Una de las características distintivas del cultivo de células vegetales es la agregación de las células. De acuerdo con la patente 0364478, el diámetro de la célula vegetal es de 30-300 μm que es aproximadamente 30 veces

65

más grande que la célula animal. Puesto que las paredes de las células vegetales tienen tendencia a adherirse entre sí, no es posible obtener una suspensión que contenga solamente células individuales dispersas. La proporción y el tamaño de los agregados celulares varían de acuerdo con la variedad de la planta y el medio en el que crece el cultivo. Nail y Roberts indicaron que la agregación celular conduce a una diferencia en el entorno local entre el interior y el exterior de las células, que puede dar como resultado una heterogeneidad del cultivo y finalmente produce cambios en el crecimiento y en el metabolismo.

El fin del cultivo en suspensión es obtener células individuales puras. Para conseguir este objetivo, se usaron la filtración, la maceración, y el cultivo de protoplastos usando enzimas. Sin embargo, la filtración y la maceración no proporcionan células individuales puras completas. La técnica del cultivo de protoplastos, que elimina la pared celular, es el método más fiable para generar células individuales, pero la enzima utilizada en el cultivo de los protoplastos produce daños o roturas en la pared celular que producen cambios en la fisiología de la célula. Además, los metabolitos secundarios hidrófobos tales como paclitaxel se pueden almacenar en la pared celular, por lo que los cambios en la pared celular tienen una relación intensa con la productividad.

Asimismo, la agregación celular ha sido siempre un obstáculo importante para conseguir una medición precisa del crecimiento celular mediante ensayos de recuento y bioquímicos aplicados a las células individuales. De acuerdo con Nail y Roberts (2004), si fuera posible el cultivo de una sola célula, está proporcionaría fácilmente información más rápidamente acerca del comportamiento de las unidades celulares en el cultivo, tales como la biosíntesis, almacenamiento, y degradación etc. de metabolitos secundarios.

Desdiferenciación

La línea celular desdiferenciada, que es el callo, muestra gran variabilidad en la producción de metabolitos secundarios debido a la variación somatoclinal. Los callos derivados de tejidos permanentes tales como hojas, tallos, raíces y semillas que están compuestos por células con funciones y morfología diferentes suelen mostrar cambios muy importantes incluso en microentornos ligeramente distintos debido al meristemo secundario formado mediante desdiferenciación. Debido a esta sensibilidad, Hirasuna et al.(1996) investigaron para identificar las condiciones de cultivo celular, especialmente la densidad celular inicial, el intervalo de subcultivo y la temperatura, para mantenerlos tan precisamente como fuera posible.

Escalado

Para producir metabolitos secundarios mediante cultivo de células vegetales para su comercialización es fundamental el escalado. Se ha aplicado tecnología de biorreactores para la producción masiva tras publicarse numerosos artículos y patentes que informaban acerca de la producción de metabolitos con éxito mediante cultivo celular a escala de laboratorio. De acuerdo con la patente 0290004, la aplicación de la tecnología de biorreactores para la producción masiva proporciona un ambiente de cultivo muy diferente del de un matraz a escala de laboratorio, lo que da como resultado una disminución en la velocidad de crecimiento y la productividad y cambios en los metabolitos. Cuando se aplica un biorreactor a la producción masiva, los cambios en la velocidad de crecimiento, productividad y metabolitos se han convertido en problemas para la comercialización de sustancias biológicamente activas mediante cultivo celular. En el escalado de los cultivos de células vegetales, se prefiere un biorreactor que reciba el aire mediante impulsión exterior o el biorreactor con un mezclador, teniendo en cuenta la eficiencia del mezclado y la aireación. Sin embargo, la viabilidad celular disminuye bruscamente en el biorreactor porque las células vegetales se debilitan por la cizalla. Por tanto, es necesario un método para reducir la cizalla. La causa de la sensibilidad a la cizalla de las células vegetales se explica por su gran tamaño, pared celular rígida, agregación y grandes vacuolas (Yokoi, et al., 1993). Para resolver estos problemas en el biorreactor, se investigó en el pasado un biorreactor que permitía la generación de cizalla controlando la velocidad de agitación y modificando el tipo de mezclador. Sin embargo, siguió proporcionando resultados negativos porque las líneas celulares no podían superar las diferencias del microentorno.

Crioconservación

La crioconservación permite el mantenimiento celular a largo plazo por cese de la mayoría del metabolismo celular a temperatura extremadamente baja. Esto significa la recuperación de las células sin variaciones genéticas, de sus propiedades y de la biosíntesis tras la crioconservación. Mediante el uso de la crioconservación, se puede eliminar la pérdida de células debida a contaminaciones y se puede minimizar la variación genética en líneas celulares continuas. En cGMP, la preservación de las líneas celulares durante un periodo de tiempo prolongado es obligatorio para conseguir un suministro estable de materias primas. Generalmente, las células animales cultivadas pueden experimentar crioconservación durante varios años, pero una técnica de crioconservación similar representa un desafío mucho mayor en células vegetales cultivadas. Las células vegetales cultivadas son heterogéneas y muestran diversidad en su fisiología y en su morfología. Por tanto, la suspensión de células vegetales requiere muchos procesos de crioconservación y una crioconservación inadecuada podría ocasionar variabilidad.

Factores de acondicionamiento

Kim y col. (2000) demostraron que la división celular se puede estimular si se añade parte del medio de cultivos en división activa a los cultivos que pierden capacidad de división celular. En la producción de antocianina mediante cultivo en suspensión de rosa, la productividad aumentó cuando se añadió parte del medio de cultivo en suspensión de fresa al cultivo en suspensión de rosa. De este modo, los factores producidos y secretados por las células cultivadas que estimulan el crecimiento celular o la producción de metabolitos secundarios se denominan factores de acondicionamiento. Sin embargo, estos factores de acondicionamiento no se han identificado concretamente y hay solamente una comprensión parcial de los factores de acondicionamiento que actúan como señales químicas del crecimiento celular y la producción de metabolitos. Asimismo, existen muy pocos informes acerca de las potentes sustancias, tales como fosfatos y calmodium que podrían considerarse como factores de acondicionamiento. Los factores de acondicionamiento se pueden suministrar a partir de medio acondicionado o con células auxiliares.

Cultivo en perfusión

Entre los métodos de cultivo celular, existe un cultivo discontinuo que implica la inoculación de la célula y del medio juntos al principio sin añadir más suplementos de nutrientes. Asimismo, existe un cultivo en continuo que implica el suplemento del nuevo medio a medida que se retira simultáneamente el medio agotado que contiene metabolitos, a una velocidad consistente durante el periodo de cultivo, para evitar el agotamiento de los nutrientes.

El cultivo discontinuo es difícil a escala comercial debido a su baja productividad. Entre los métodos de cultivo celular en continuo, el cultivo en perfusión está recibiendo actualmente mucha atención. En el cultivo en perfusión, las células se mantienen en el biorreactor, y se suministra medio nuevo a medida que se retira el medio nuevo que contiene metabolitos.

De acuerdo con Zhang et al. (2000), la elicitación es una de las formas más eficaces para promover la producción de metabolitos secundarios en cultivo celular. La elicitación estimula la síntesis de metabolitos secundarios, pero induce inhibición del crecimiento celular y la rápida disminución de la viabilidad celular. De este modo, la síntesis de metabolitos secundarios por elicitación solo se podría mantener durante un corto periodo de tiempo y está muy limitada. Como Wang et al. (2001) presentaron, el cultivo en perfusión es una estrategia para minimizar estos efectos negativos de la elicitación y sirve para maximizar la productividad.

Wang et al., (2001) y Wu & Lin (2003) notificaron lo siguiente. Los metabolitos secundarios que se producen por elicitación se almacenan dentro de la célula (vacuola o pared celular) o se liberan al exterior celular (medio). Durante el proceso de cultivo, los metabolitos secundarios liberados desde la célula y retirados del medio podrían proporcionar una purificación más sencilla y podrían disminuir la retroinhibición de la síntesis y la degradación y conversión de los productos. Por tanto, al recuperar el medio agotado y suministrar medio nuevo, la secreción interna y externa de los metabolitos podría ampliar la viabilidad y la biosíntesis de las células. Y podría aumentar notablemente la productividad.

El almacenamiento y la secreción de metabolitos secundarios mostraron grandes diferencias dependiendo de las líneas celulares. La línea celular *Taxus media* (Wickremesinhe y Arteca 1994) no excretó nada. En consecuencia, se requiere establecer una línea de células que tenga una capacidad de secreción notable.

Cultivo de procambium o de cambium

El procambium o el cambium son meristemos laterales que están ubicados en la cara lateral de la planta. En las gimnospermas y en las dicotiledóneas leñosas, existe un crecimiento hipertrófico debido a la actividad continua del procambium o del cambium; como resultado, existen plantas gigantes que tienen más de 11.000 años de anillos de crecimiento. En genética, los meristemos se pueden clasificar como meristemos primarios y meristemos secundarios. El meristemo primario representa el meristemo que se forma durante la embriogénesis y participa en el crecimiento de la planta tras la germinación de la semilla. El meristemo secundario representa el meristemo formado por dediferenciación del tejido permanente de la planta. El cambium es un meristemo primario con continuidad meristemática derivado del procambium sin intervención del tejido permanente.

El crecimiento de este meristemo primario es indeterminado y puede continuar si se dan las condiciones para ello. Por tanto, se ha utilizado el cultivo del procambium o del cambium para una propagación masiva rápida de las células.

En estudios anteriores, los explantes de cambium, se prepararon de la siguiente forma: tras despegar el córtex, se practican dos cortes longitudinales en el tallo leñoso de aproximadamente 1 mm de profundidad para alcanzar el xilema a intervalos de 5 mm. Estos explantes se denominan 'cambium', que están constituidos por parte del floema, cambium y una oblea de xilema (Jouira et al., 1998).

Es razonable decir que dichas células que son inducidas por el método anteriormente mencionado no es el único origen del cambium, sino que puede proceder de múltiples tejidos, que se pueden distinguir académicamente por su anatomía como floema, cambium y xilema. De esta manera, los autores pueden indicar que el método anteriormente mencionado no es la técnica ideal para separar solamente el cambium cuidadosamente de los diferentes tejidos que constituyen los tallos. Está en solicitud un método creativo para separar solamente el procambium o el cambium de los diferentes tejidos de los tallos.

Divulgación

10 Problema técnico

El objetivo de la presente invención es generar el método para producir un clon monocelular mediante la separación y el cultivo solamente del procambium o del cambium de una rama o de un tallo. Para concretar, el fin de la presente invención es resolver la variación en el cultivo de células vegetales y generar un método de producción estable para sustancias vegetales biológicamente activas mediante la separación del procambium o del cambium meramente por combinación de los métodos de separación de células y de química fisiológica con el método de separación físico anterior que utiliza el escalpelo.

Otro objetivo de la presente invención es separar y cultivar solamente el procambium o el cambium de ramitas de *Taxus* y generar el método para la producción del paclitaxel.

De acuerdo con ello, la presente invención presenta métodos para aislar una línea celular del cambium de una planta, células aisladas derivadas del cambium de una planta, un método para producir sustancias biológicamente activas derivadas de plantas usando las células y un método para preservar una línea celular vegetal como se define en las reivindicaciones.

Solución técnica

Para conseguir los fines anteriores, la presente invención permite a los inventores obtener un clon monocelular por separación y cultivo del procambium o del cambium de una rama o tallo de *Taxus* y proporciona el método de conseguir una proliferación celular estable y la producción de paclitaxel. Específicamente, el método de conseguir una proliferación celular estable y la producción de paclitaxel por obtención de un clon celular único incluye:

- 1) Preparación de los materiales vegetales y separación del procambium o del cambium;
- 2) Inducción de un clon celular único a partir del procambium o del cambium separado;
- 3) Establecer un cultivo a largo plazo;
- 4) Establecer un cultivo celular en suspensión;
- 5) Escalado;
- 6) Producción de paclitaxel por obtención mediante el estimulante, factor de acondicionamiento y cultivo en perfusión;
- 7) Uso de crioconservación para establecer un banco de células.

Efectos ventajosos

De acuerdo con los métodos de la presente invención, es posible cultivar un clon monocelular que tenga la continuidad meristemática del meristemo primario sin pasar por la desdiferenciación mediante la separación con precisión solamente del procambium o del cambium procedente de varios tejidos de ramas o tallos de plantas leñosas. La línea celular de la presente invención permite una producción estable de sustancias biológicamente activas debido a un menor cambio en la velocidad de crecimiento celular y modelo de crecimiento durante el cultivo a largo plazo. Es también óptimo para la producción masiva a escala comercial porque es menos sensible a la cizalla en el biorreactor en comparación con las líneas celulares derivadas de las técnicas anteriores debido a la menor agregación y múltiple vacuolas,

La activación de los metabolitos se puede estimular por suministro de factores de acondicionamiento a esta línea celular y la vitalidad celular y la biosíntesis se pueden extender ya que las células liberan una cantidad considerable de producción al medio extracelular mediante el cultivo en perfusión. La elevada velocidad de recuperación tras la crioconservación debida a la homogeneidad y la capacidad de división de esta línea celular permiten el establecimiento de un banco de células. Mediante la presente invención, se confirma la relación estrecha entre la homogeneidad de los cultivos y la variación de los metabolitos secundarios, y el método de la presente invención podría desarrollar la estrategia de comercialización porque controla y reduce la variabilidad de la producción de diferentes sustancias biológicamente activas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es la parte que se separa durante la inducción del clon monocelular a partir del procambium o del

cambium.

La Figura 2 es la velocidad de crecimiento expresada por la producción de biomasa total de tres cultivos celulares diferentes derivados del procambium o del cambium, embrión y aguja.

La Figura 3 es la imagen de la agregación celular de los cultivos derivados de dos tejidos diferentes (embrión o aguja y cambium).

La Figura 4 es el efecto de elicitación sobre la producción de paclitaxel durante el cultivo en suspensión de *Taxus*.

La Figura 5 es el efecto de los factores de acondicionamiento sobre la producción de paclitaxel durante el cultivo en suspensión de *Taxus*.

Modos de la invención

Se explican a continuación ejemplos prácticos de la invención. El método de inducción y proliferación del clon monocelular procedente del procambium o del cambium no solamente se utiliza en el sistema de producción de paclitaxel, sino que también se puede utilizar en todos los sistemas de producción de metabolitos secundarios de plantas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, pero no como limitación.

Ejemplo práctico 1 Preparación de los materiales vegetales y aislamiento del procambium o del cambium

Se recogieron semillas, agujas, ramas de tejo común. Tras recoger los materiales, se introdujeron en una solución de 100 mg/l de antioxidante, ácido ascórbico (ácido L-ascórbico, DUCHEFA, Países Bajos) inmediatamente y se transfirieron y preservaron. Se esterilizó su superficie teniendo en cuenta la morfología y características fisiológicas de los materiales.

(1) Semillas: Tras esterilizar las semillas con etanol al 70 % durante un minuto, se sumergieron en una solución de Clorox al 1 % durante 48 horas y se lavaron 3 o 4 veces con agua estéril. A continuación, el embrión se separó de la semilla en solución al 0,5 % de PVP (polivinilpirrolidona, DUCHEFA, Países Bajos) y 50 mg/l de ácido ascórbico (ácido L-ascórbico, DUCHEFA, Países Bajos), y 70 mg/l de ácido cítrico (DUCHEFA, Países Bajos) y se cultivó en medio de inducción del callo.

(2) Agujas y ramas: Tras 24 horas de tratamiento con la solución que contenía Benomilo al 1 % (Dongbu Hannong Chemical, Corea) + 1 % de Daconilo (Dongbu Hannong Chemical, Corea) + 1 % de sulfato de estreptomina (DUCHEFA, Países Bajos) + solución al 0,1 % de Cefotaxima sódica (DUCHEFA, Países Bajos), las agujas y las ramas se enjuagaron con agua de grifo durante 30 segundos para eliminar las sustancias químicas remanentes y compuestos fenólicos. Tras esterilizarlos con etanol al 70 % (DC Chemical, Corea) durante un minuto, peróxido de hidrógeno al 30 % (LG Chemical, Corea) durante 15 minutos, solución de Clorox al 1 % durante 15 minutos, solución de Clorox al 3 % durante 5 minutos en orden, se lavaron 3 o 4 veces con agua destilada. Para evitar la oxidación, se cortaron ambos extremos de la aguja en la solución de PVP al 5 %, 50 mg/l de ácido ascórbico y 70 mg/l de ácido cítrico y se cultivaron en medio de inducción del callo.

(3) Preparación del procambium o del cambium a partir del tallo o la rama: Sujetando el xilema, que es la región central del tallo o la rama con las pinzas, se despegaron los tejidos del floema, el córtex y la epidermis incluyendo el procambium o del cambium. Este tejido despegado que contenía el procambium o del cambium se extendió en el medio; se dejó que el procambium o del cambium tocara la superficie del medio.

<Ejemplo práctico 2> Inducción de un clon monocelular a partir del procambium o del cambium separado

Transcurridos de 4 a 7 días de cultivo, se observó división celular del procambium o del cambium y, el día 15º de cultivo, comenzó a formarse el callo a partir de la capa formada por el floema y el córtex y la epidermis que eran la parte superior del procambium o del cambium. En el día 30º de cultivo, el procambium o del cambium comenzó a separarse de la capa superior del tejido que contenía el floema y el córtex y la epidermis; una vez que estas dos capas se hubieran separado naturalmente, se cultivaron individualmente en diferentes placas de Petri (Figura 1).

Para los fines de inducción de células y callo, se puede utilizar medio universalmente conocido para cultivo de células y tejidos vegetales, por ejemplo mB5 (medio B5 de Gamberg modificado), MS (medio Murashige & Skoog), WPM (Lloyd & McCown), y SM (medio Schenk & Hildebrand), y LP (Quoirin & Lepiovre). Es posible la aplicación de todos estos medios. Se pueden suplementar varios aditivos y algunos componentes del medio se pueden reducir o eliminar según necesidad. Entre ellos, el medio más apropiado fue mB5. El contenido de mB5 se describe en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Tabla 1. Medio de inducción y mantenimiento de línea celular en *Taxus spp.*

	Composición	Contenido (mg/l)
Sales inorgánicas	KNO ₃	2500
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134

	MgSO ₄ · 7H ₂ O	121,56
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	10
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	113,23
	KI	0,75
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	130,44
	H ₃ BO ₃	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	
	FeNaEDTA	36,7
Vitaminas	Mioinositol	200
	Tiamina-HCl	20
	Ácido nicotínico	2
	Piridoxina-HCl	2
	ácido L-ascórbico	50
	Ácido cítrico	75
Aminoácido	ácido L-aspartico	133
	L-arginina	175
	Glicina,	75
	Prolina	115
Hormonas	a-Naftaleno ácido acético	2
Sacarosa		10.000
Carbón activo		100
Gelrita		2.000

Se hicieron crecer cultivos en el medio suplementado con un regulador del crecimiento vegetal, auxina (1-3 mg/l) en la oscuridad a 25±1 °C.

- 5 El procambium o del cambium estaba compuesto de células homogéneas, de forma que su división celular era uniforme y la proliferación se produjo en forma de placa. Por otra parte, el tejido que contenía el floema y el córtex y la epidermis proliferó de forma irregular porque había una discrepancia en la división celular debida a la composición de muchos tipos de células. Se produjo una autodivisión en la capa entre el procambium o el cambium y los tejidos que contenían el floema y el córtex y la epidermis (Figura 1). El procambium o el cambium era homogéneo mientras que el tejido que contenía el floema y el córtex y la epidermis era heterogéneo, de forma que la autodivisión de la capa parece ser resultado de la velocidad de división diferente.

- 15 En el día 15º de cultivo, se formaron callos en los explantes del embrión y la aguja compuestos por células heterogéneas mediante diferenciación, y estos callos proliferaron con formas irregulares debido a la diferente velocidad de división de las distintas células, exactamente igual que el tejido que contenía el floema y el córtex y la epidermis. (Figura 1).

<Ejemplo práctico 3> Establecimiento del cultivo a largo plazo

- 20 Entre los callos, los callos friables de color blanco con buena velocidad de crecimiento se subcultivaron sobre medio nuevo cada 21 días. La velocidad de crecimiento de los cultivos derivados del embrión y la aguja fue muy inestables, y a menudo mostraron una tendencia al pardeamiento. Por el contrario, la velocidad de crecimiento de los cultivos derivados del procambium o del cambium era rápida y no se produjo cambio de color en los cultivos. Por tanto, era posible seleccionar las células estables.

- 25 Tras seis meses de cultivo, la mayoría de cultivos derivados del embrión y la aguja tenían color amarillo o marrón claro y formaron agregados. Los cultivos derivados del procambium o del cambium tenían un color blanco-amarillo y se mantuvieron como células individuales o pequeños agregados celulares. La velocidad de crecimiento de los cultivos que se volvieron de color marrón y formaron agregados se ralentizó, y los cultivos murieron eventualmente debido a la sustancia química fenol que excretaban.

- 35 De acuerdo con este inventor, el mantenimiento y la proliferación masiva de los cultivos derivados del embrión y la aguja era difícil transcurridos 6 meses, sin embargo, los cultivos derivados del procambium o del cambium se mantuvieron de forma estable durante más de 20 meses de cultivo a largo plazo sin ninguna variación en la velocidad de crecimiento celular, patrón de crecimiento y nivel de agregación (Figura 2). En otras palabras, apareció variabilidad en el patrón de crecimiento dependiendo de la homogeneidad y heterogeneidad de los materiales vegetales iniciales.

<Ejemplo práctico 4> Establecimiento del cultivo celular en suspensión

- 40 Los cultivos derivados del embrión y la aguja, y los derivados del procambium o del cambium, se cultivaron

individualmente en un matraz que contenía el medio líquido (Tabla 2).

Tabla 2

5 **Tabla 2. Medio de suspensión en *Taxus spp.***

	Composición	Contenido (mg/l)
Sales inorgánicas	Ca(NO ₃) ₂	471,26
	NH ₄ NO ₃	400
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	180,54
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	72,5
	K ₂ SO ₄	990
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
	H ₃ BO ₃	6,2
	KH ₂ PO ₄	170
	FeNaEDTA	36,7
Vitaminas	Mioinositol	200
	Tiamina-HCl	20
	Ácido nicotínico	2
	Piridoxina-HCl	2
	ácido L-ascórbico	50
	Ácido cítrico	75
Aminoácido	ácido L-aspártico	133
	L-arginina	175
	Glicina,	75
	Prolina	115
Hormonas	a-Naftaleno ácido acético	2
Sacarosa		30.000

Se cultivaron en un agitador rotatorio a 100 rpm en la oscuridad a 25±1 °C. Con el intervalo de dos semanas de subcultivo, se dejó que los cultivos mantuvieran una alta vitalidad continuamente como fase de crecimiento exponencial.

Se midió el nivel de agregación, que es la causa principal de variación en la productividad celular. La cuantificación de agregados celulares se midió con el microscopio biológico (CX31, Olympus, Japón). El resultado del experimento anteriormente descrito se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Tabla 3. Tipo de agregados celulares en los cultivos a largo plazo de *Taxus*

Agregados de células grandes	Agregados de células moderados	Agregados de células pequeños	Población de células individuales	Origen del explante
60 %	30 %	7 %	3 %	embrión,
0	0	9 %	91 %	aguja, cambium
Agregados de células grandes, de tamaño mayor de 1,5 x 10 ³ µm;				
Agregados de células moderados; 1 x 10 ³ µm;				
Agregados de células pequeños, 4 x 10 ² µm < tamaño < 1 x 10 ³ µm				

En el caso de la suspensión de cultivos derivados del embrión y la aguja, aproximadamente un 60 % tuvieron un tamaño de agregación celular mayor de 1,5 mm, pero en la suspensión de cultivos derivados del procambium o

del cambium, el 90 % de las células se cultivaron como células individuales.

<Ejemplo práctico 5> Escalado

- 5 Los cultivos derivados del embrión y la aguja, y los derivados del procambium o del cambium se cultivaron en un biorreactor de 3 l de tipo *Airlift* (Sung-Won SciTech, Corea) en la oscuridad a 25 ± 1 °C.

10 En el caso de los cultivos derivados del embrión y la aguja, hubo una gran variabilidad en el tamaño y la forma de las células, en comparación con el matraz de cultivo. El diámetro de la agregación celular aumentó a 2-3 mm, lo que inhibió el flujo en el interior del biorreactor y desarrolló una región sin mezclado en el biorreactor. Las células formaron un anillo de crecimiento adherido a la pared interna del biorreactor. Las células situadas en el centro del anillo de crecimiento murieron a los 20 días porque el medio no estaba bien suplementado. Eventualmente, las células muertas excretaron sustancias tóxicas, y estas sustancias disminuyeron la viabilidad de todas las células del biorreactor. Por el contrario, una menor agregación de los cultivos derivados del procambium o del cambium ocasionó una circulación del aire suave dentro del biorreactor; por lo que fue posible disminuir la cantidad de aire suministrada de 200 ml a 150 ml por minuto, y la cantidad de burbujas que aparecen en la superficie del medio disminuir notablemente.

20 El tiempo de duplicación en los cultivos derivados del embrión y la aguja en el matraz era de doce días, pero se prolongó a 21 días en el biorreactor. Esto se debe a la formación del anillo de crecimiento y la rápida disminución de la viabilidad celular debido a la sensibilidad a la cizalladura debido a la agregación celular y a la pared celular rígida. El tiempo de duplicación para los cultivos derivados del procambium o del cambium fue de 4 a 5 días y no hubo diferencias entre el matraz y el biorreactor, en su lugar se acortó en el biorreactor (Tabla 4). Los cultivos derivados del procambium o del cambium formaron un anillo de crecimiento muy pequeño en el biorreactor, que se disolvió fácilmente agitando el medio simplemente con una varilla. Además, no se produjo disminución en la viabilidad celular debido a una menor sensibilidad a la cizalla debido a la menor agregación celular y múltiples vacuolas.

30 Tabla 4

Tabla 4. Relación entre los patrones de tiempo de duplicación y origen del explante en cultivos celulares de *T. cuspidata* en el matraz y en el biorreactor

Origen del explante	Tiempo de duplicación (días)	
	matraz	biorreactor
embrión	11,5	21
aguja,	12	21
cambium	5	4

- 35 <Ejemplo práctico 6> Estimulador

40 El estimulador controla la señal molecular en células vegetales, y se utiliza ampliamente para aumentar la productividad de metabolitos secundarios. Después del tratamiento con jasmonato de metilo como estimulador y otros diez tipos de estimuladores, los autores observaron que el jasmonato tuvo un efecto positivo sobre la producción de paclitaxel. Fue posible obtener una productividad de metabolitos relativamente elevada mediante la combinación de jasmonato de metilo y otros estimuladores. Especialmente, la producción de paclitaxel fue muy eficaz con los tratamientos con jasmonato de metilo, quitosano y fenilalanina (Figura 4).

<Ejemplo práctico 7> Factores de acondicionamiento

45 Los metabolitos secundarios derivados de plantas se producen cuando las células crecen o cuando las células han dejado de crecer. Por tanto, los cultivos en dos etapas son adecuados para la producción de metabolitos como paclitaxel cuya etapa de crecimiento celular y la etapa de producción de metabolito están separadas. En la primera etapa, las células proliferaron a gran escala optimizando el crecimiento celular y, en la segunda etapa, la condición del cultivo se alteró para optimizar la producción de metabolitos.

50 Las líneas celulares con elevada productividad de metabolitos secundarios crecen más lentamente y mueren más rápido que las líneas celulares de baja productividad. Por tanto, la proliferación masiva es difícil y la producción masiva de metabolitos es imposible.

55 En la presente invención, las líneas celulares con capacidad de proliferación baja y elevada producción no se utilizaron en la proliferación a gran escala, sino en su lugar se utilizaron como células auxiliares que tienen los factores de acondicionamiento para la producción de metabolitos secundarios. Los inventores observaron que la

producción de paclitaxel después de añadir las células auxiliares. En la Figura 5 se resumen los resultados.

<Ejemplo práctico 8> Cultivo en perfusión

- 5 En el día 14 del cultivo, los cultivos derivados del embrión y la aguja, y los derivados del procambium o del cambium, se trataron con el estimulador. Desde el punto de vista del estímulo, el medio agotado se recuperó en condiciones asépticas con pipeta cada 5 días, y se suministró la misma cantidad de medio nuevo, simultáneamente. La producción de paclitaxel en la célula y el medio se observó después de 45 días de cultivo a largo plazo. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

10

Tabla 5

Tabla 5. Producción de paclitaxel y liberación de células de *T. cuspidata* en varias explantes de varios orígenes y procesos

15

Materiales y procesos	Rendimiento de taxol (mg/kg)			Liberación de taxol (%)
	En la célula	En el medio	Total (días)	
embrión	12,97	0,03	13 (28)	0,2
aguja	10,92	0,08	11 (28)	0,7
cambium	76,4	21,6	98 (28)	22
cambium	0	0	0 (45)	-
cultivo en perfusión de cambium	69	195	264 (45)	74

Renovación del medio incorporado a los cultivos celulares, 5 días después del estímulo, que se llevó a cabo añadiendo 50 mg/l de quitosano, fenilalanina 0,1 mM y 100 µm de jasmonato de metilo a cultivos de 14 días de edad. El experimento se repitió con renovación de medio cada 5 días.

Dependiendo de las líneas celulares, la liberación de paclitaxel desde la célula al medio fue diferente. La capacidad de liberación de los cultivos derivados del procambium o del cambium fue superior a los cultivos de las técnicas anteriores. Además, la aplicación del cultivo en perfusión facilitó la liberación de los metabolitos secundarios al medio. La mejora en la liberación extracelular de los metabolitos secundarios mediante el clon monocelular derivado del procambium o del cambium por intercambio periódico con el medio tuvo gran importancia, porque permite la recirculación continua de la biomasa y una purificación sencilla.

En otras palabras, el intercambio periódico de medio en el cultivo de un clon monocelular derivado del procambium o del cambium se puede considerar un método estable para producir metabolitos valiosos en el cultivo a largo plazo, ya que evita la inhibición por retroalimentación de los metabolitos acumulados en la célula, la degradación y la conversión de los metabolitos en el medio.

<Ejemplo práctico 9> Crioconservación

En el día 6º o 7º de cultivo, las células en suspensión se cultivaron en el medio que contenía manitol 0,16 M durante tres días a temperatura ambiente y después se mantuvo a 4°C durante 3 horas. Las células se recogieron y se introdujeron en un criovial de 4 ml que tenía medio que contenía etilenglicol al 40 % (Sigma, EE.UU.) y sorbitol al 30 % (DUCHEFA, Países Bajos) y se cultivó durante 3 minutos a 4 °C.

Las células en suspensión tratadas con crioconservantes se congelaron una vez que las células se humedecieron con nitrógeno líquido. Para la descongelación, las células cultivadas en el nitrógeno líquido durante más de 10 minutos se descongelaron en el baño de agua a 40 °C durante 1-2 minutos. Para el recrecimiento de las células, las células crioconservadas se transfirieron a medio de crecimiento semisólido (Tabla 1) que contenía sorbitol 0,5 M y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se cultivaron sobre el medio de crecimiento semisólido que contenía sorbitol 0,1 M durante 24 horas. Y a continuación, las células se cultivaron sobre el medio de crecimiento semisólido sin durante 24 horas, dos veces. Se evaluó la viabilidad celular.

<Ejemplo práctico 10> Análisis del contenido de paclitaxel

Tras separar las células del medio de las muestras recuperadas, se analizó el contenido de paclitaxel. La masa de células se midió tras secar las células completamente en un desecador de vacío (Sam Shin Glass, Corea). Se mezclaron aproximadamente 100 mg (peso seco) de células con 4 ml de solución (1:1 v/v) de metanol (Sigma, EE.UU.) y cloruro de metilo (Sigma, EE.UU.) y se extrajeron mediante un limpiador ultrasónico (Branson, EE.UU.) tres veces en un intervalo de una hora a temperatura ambiente. Las células se secaron completamente

y se extrajeron varias veces usando 4 ml de cloruro de metilo. La capa de disolvente orgánico separada se secó a vacío y el residuo se disolvió en 1 ml de metanol. El extracto disuelto se agitó igualmente un limpiador ultrasónico. Después, tras la centrifugación, se retiró el aglomerado (8.000 g X 5 min).

- 5 El medio (1-5 ml) separado de la célula se combinó con el mismo volumen de cloruro de metilo y se extrajo 3 veces tras una agitación completa. Después de evaporar a vacío y secar completamente, se disolvió en 0,5 ml de metanol de nuevo.

- 10 HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento, Shiseido, Japón) se usó para el análisis del contenido, y los productos Sigma se usaron como sustancias patrón del paclitaxel. El envase Capcell (C18, MGII, 5 µm, 3,0 mm x 250 mm, Shiseido, Japón) se mantuvo a 40 °C usando el horno, y agua y acetonitrilo (Burdick & Jackson, EE.UU. 50:50. v/v) se combinaron para la fase móvil y se añadieron gota a gota regularmente a la velocidad de 0,5 ml/min. Se usó el detector UV-VIS (227 nm, Shiseido, Japón).

15 **Aplicabilidad industrial**

- 20 En la presente invención, la adquisición de un clon monocelular, un meristemo primero que tiene continuidad meristemática del meristemo sin desdiferenciación, mediante la separación del procambium o del cambium simplemente a partir de la rama o el tallo dio como resultado una mayor productividad debido al menor tiempo de duplicación que las líneas celulares de las técnicas anteriores. También permitió una productividad estable debido a menos cambios en el crecimiento celular y en el patrón de crecimiento durante el cultivo a largo plazo, y fue posible el escalado debido a la menor agregación y múltiples vacuolas de las líneas celulares. Estas líneas celulares permitieron la recuperación tras la crioconservación sin ninguna variación genética.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una línea celular de una planta, en el que la línea celular aislada de la planta se caracteriza por que (i) procede de un cambium de la planta, (ii) es homogénea, (iii) no ha experimentado desdiferenciación para formar el callo, comprendiendo el método:
5
- (a) recoger un tejido que contiene el cambium de la planta;
(b) cultivar el tejido que contiene el cambium, induciendo de esta forma una capa proliferada del cambium a partir del cambium; y
10 (c) recoger las células que tienen continuidad meristemática del meristemo primario sin pasar por la desdiferenciación para obtener el callo aislando la capa de cambium.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tejido de la etapa (a) está esterilizado.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende aislar la capa de cambium de una capa de callo que procede de un tejido que se ha obtenido de la planta pero que no contiene cambium y que ha proliferado de forma irregular.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende cultivar el tejido en un medio que contiene auxina.
20
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio contiene 1-3 mg/l de auxina.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la planta es del género *Taxus*.
25
7. Células aisladas derivadas del cambium de una planta, comprendiendo las células aisladas las siguientes características:
(a) más del 90 % de células en suspensión existen como células individuales;
30 (b) tienen morfológicamente múltiples vacuolas;
(c) crecen más rápido que la línea celular derivada de regiones salvo el cambium del mismo origen vegetal, y se cultivan de forma estable durante un tiempo prolongado;
(d) tienen baja sensibilidad al estrés de cizalla en un biorreactor; y
(e) están indiferenciadas de forma innata.
35
8. Las células aisladas de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células se obtienen de una capa que se ha derivado del tejido de una planta, comprendiendo el tejido un cambium de la planta y la capa que ha proliferado a partir del cambium del tejido y no que ha proliferado desde un callo originado en la planta.
- 40 9. Las células aisladas de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la planta es del género *Taxus*.
10. Las células aisladas procedentes de un cambium de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las células aisladas tienen la capacidad de liberar 270-720 veces más paclitaxel que las células derivadas de un tejido que se ha obtenido del género *Taxus* pero que no contiene un cambium.
45
11. Un método para producir sustancias biológicamente activas derivadas de plantas, comprendiendo el método las etapas de:
(a) producir las sustancias activas por cultivo de las células aisladas de la reivindicación 7 en un medio; y
50 (b) recoger las sustancias activas.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cultivo de la etapa (a) comprende recuperar un medio que se ha utilizado para cultivar dicho cultivo de células aisladas y después suministrar medio nuevo.
- 55 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la planta es del género *Taxus*, y el principio activo es paclitaxel.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medio contiene al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste de jasmonato de metilo, fenilalanina y quitosano.
60
15. Un método para conservar una línea celular vegetal, comprendiendo el método crioconservar las células aisladas de la reivindicación 7.

[Fig. 1]

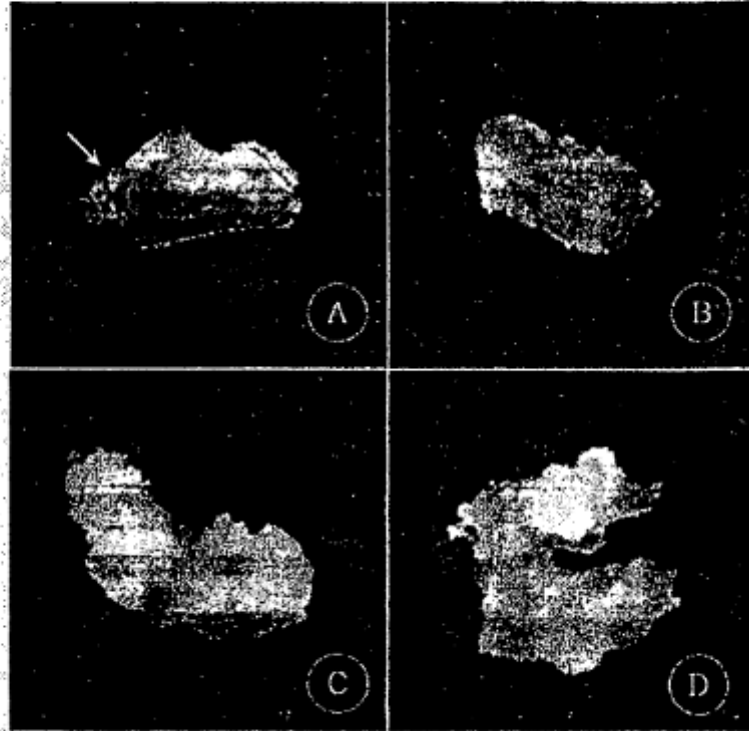
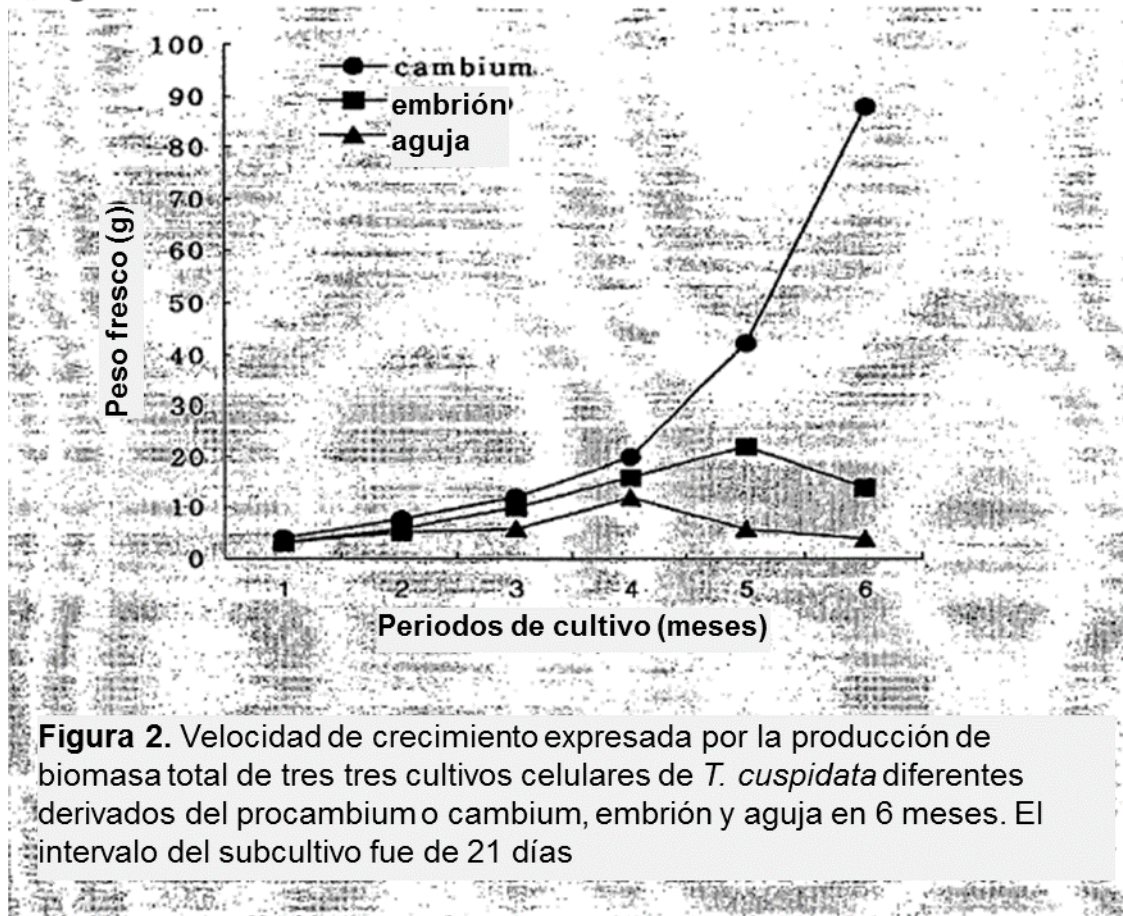


Figura 1. A. Macrografía del tallo tras 30 días de cultivo. El cambium (flecha) se separa de las células del callo derivadas de tejido que consiste en floema, córtex y epidermis. B Clon monocelular derivado del cambium tras 35 días de cultivo. C. Callo derivado de tejido que consiste en floema, córtex y epidermis tras 40 días de cultivo. A. Callo derivado de embrión o aguja después de 50 días de cultivo.

【Fig. 2】



【Fig. 3】

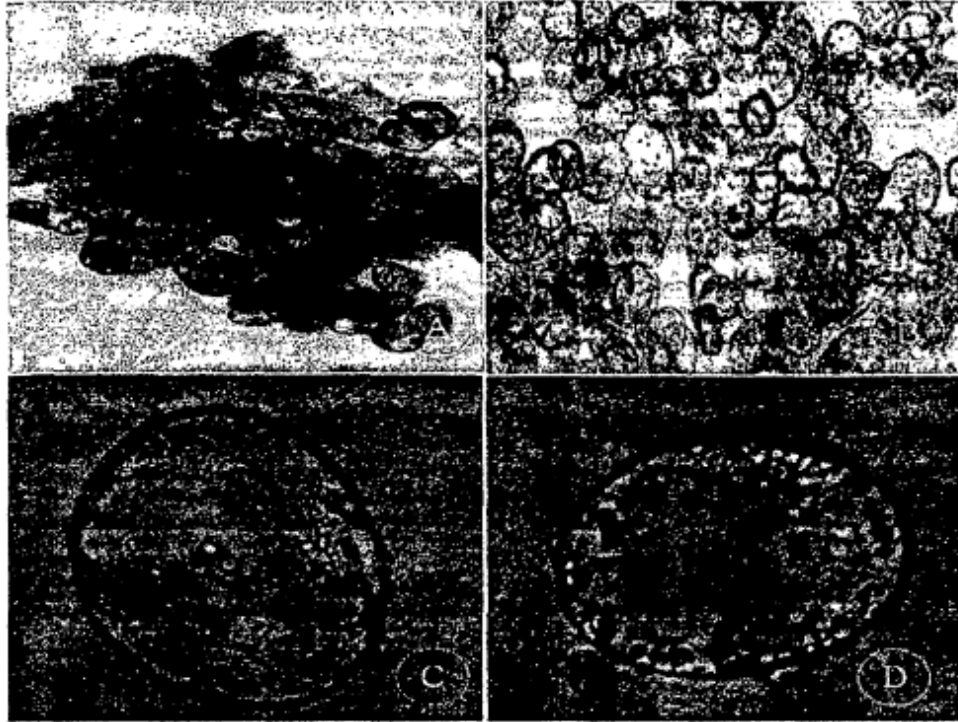


Figura 3. Tipo de agregados celulares de dos cultivos celulares diferentes de *T. cuspidata* derivados de embrión o aguja (A, C) y cambium (B, D) Agregado celulares grandes, tamaño superior a $1,5 \times 10^2 \mu\text{m}$; B población monocelular; D, célula que presenta una elevada densidad de vacuolas.

【Fig. 4】

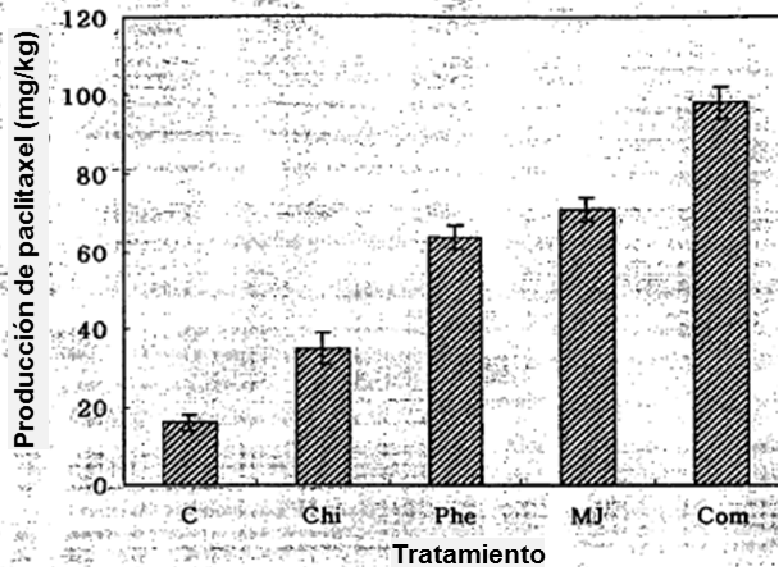


Figura 4. Efectos de los estímulos y sus combinaciones sobre la producción de paclitaxel en cultivos en suspensión de *T. cuspidata* (clon monocelular del cambium). Los factores de acondicionamiento se incorporaron a los cultivos en el día cero. Símbolos. C, control; Chi, quitosano 50 mg/l, Phe, fenilalanina 0,1 mM; MJ, jasmonato de metilo 100 μ M; Com (cultivos estimuladores combinados), la combinación de quitosano 50 mg/l, fenilalanina 0,1 mM y jasmonato de metilo 100 μ M.

【Fig. 5】

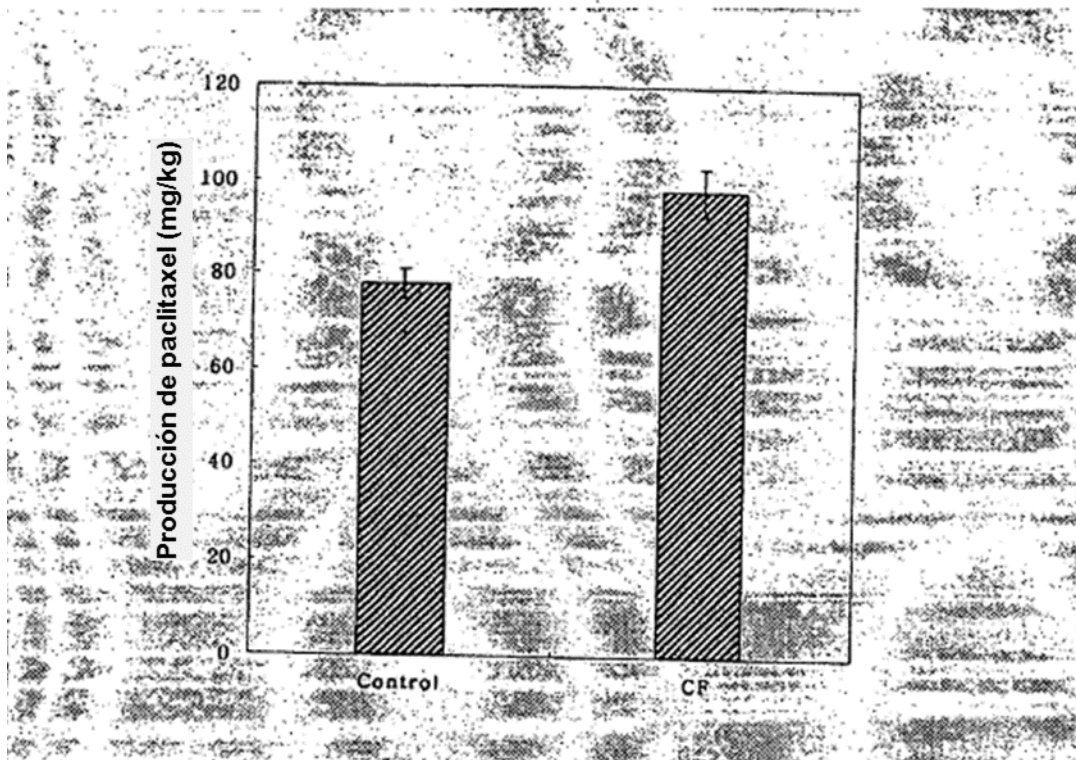


Figura 5. Comparación de los efectos de los factores de acondicionamiento sobre la producción de paclitaxel en cultivos en suspensión de *T. cuspidata* (clon monocelular del cambium). Los estimuladores (quitosano 50 mg/l, Phe, fenilalanina 0,1 mM; MJ, jasmonato de metilo 100 μ M) se incorporaron a cultivos de 14 días de edad. Símbolo: CF, factores de acondicionamiento.