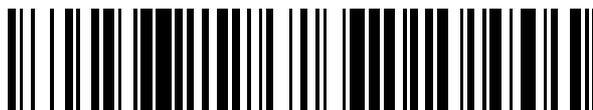


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 769**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

A61K 36/47 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2016 PCT/EP2016/055989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16150860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2016 E 16713341 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3270686**

54 Título: **Producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona mediante cultivos en suspensión de células vegetales de Euphorbiaceae**

30 Prioridad:

20.03.2015 EP 15160160

23.02.2016 EP 16156907

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

03.07.2020

73 Titular/es:

PHYTON HOLDINGS, LLC (100.0%)

3909 Hulen St.

Fort Worth, TX 76107, US

72 Inventor/es:

GORR, GILBERT;

ULLISCH, DAVID ALEXANDER;

SANKAR-THOMAS, YANTREE DEVI;

SELGE, THOMAS;

LEIBOLD, THOMAS y

HECKENMÜLLER, HARALD

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 770 769 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona mediante cultivos en suspensión de células vegetales de *Euphorbiaceae*

5 La presente invención se define por las reivindicaciones. Por consiguiente, se refiere a un método de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona; y (b) recuperar el ingenol, el uno o más ésteres de ingenol y/o el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a). También se describe en el presente documento un cultivo de células vegetales en suspensión, en el que las células se obtienen a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae*, y en el que las células vegetales producen ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona. Además, también se describe en el presente documento una biomasa de células vegetales que comprende células vegetales obtenidas a partir del cultivo celular en suspensión descrito en el presente documento, y que comprende ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona. También se describen en el presente documento células crioconservadas del cultivo de células vegetales en suspensión descrito en el presente documento, así como un método de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona basado en estas células crioconservadas.

20 En esta memoria descriptiva, se cita un número de documentos incluyendo solicitudes de patente y manuales del fabricante.

25 Las plantas contienen una amplia gama de compuestos químicos, incluyendo metabolitos primarios y secundarios. En muchos casos, tales metabolitos secundarios han sido investigados para determinar actividad farmacéutica. El ejemplo más destacado es el antineoplásico paclitaxel, que es expresado por miembros del género *Taxus* y que ha mostrado que destruye de manera eficaz células humanas altamente proliferantes, es decir células que muestran el crecimiento celular rápido que es característico de muchos tumores. Durante muchos años, se han comercializado productos que contienen paclitaxel como principio activo farmacéutico.

30 Otro grupo de compuestos que ha sido investigado para determinar su actividad en líneas celulares de mamífero, incluyendo numerosas líneas celulares de cáncer, son los compuestos, que se producen de manera natural, ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona. Aunque es probable que su actividad en células de mamífero, incluyendo células humanas, *in vitro* e *in vivo* no se base en un único modo de acción, una actividad importante compartida por los miembros químicos más destacados de este grupo de compuestos es la regulación, en particular la activación, de la proteína cinasa C. El interés en ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona ha aumentado en los últimos años debido a sus importantes actividades biológicas, principalmente sus actividades anticancerígenas o antivirales.

40 Mientras que el ingenol se usa principalmente como precursor para obtener derivados de ingenol biológicamente activos usados en la práctica clínica por medio de diferentes métodos químicos, el éster de ingenol, ingenol-3-angelato, así como tiglian-3-ona, 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona, proporcionan una actividad biológica significativa. El ingenol-3-angelato es el compuesto más destacado aprobado para uso terapéutico, es decir, para el tratamiento de queratosis actínica (Leo Pharma: Picato®). Además, el ingenol-3-angelato se considera potencialmente activo con respecto al tratamiento de tumores sólidos. Se ha descrito que la 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona es potencialmente adecuada en el tratamiento de cánceres de piel incluyendo melanomas, carcinomas de células escamosas (SCC) y carcinomas de células basales (BCC), cánceres de cabeza y cuello, cánceres de mama, cánceres de próstata y otros tumores en los que puede guiarse la inyección mediante obtención de imágenes.

50 Actualmente, el ingenol, los ésteres de ingenol y los derivados de tiglian-3-ona principalmente provienen directamente de la planta. Las plantas usadas como fuentes son miembros de la familia *Euphorbiaceae* reconocida en etnomedicina [Mwine y van Damme 2011; Journal of Medicinal Plants Research: 5, 652-662]. El ingenol y los ésteres de ingenol se han identificado, por ejemplo, en muchos miembros del género *Euphorbia*, por ejemplo, en semillas de la especie *Euphorbia lathyris* y en la savia lechosa de la especie *Euphorbia peplus*. El ingenol-3-angelato, por ejemplo, se ha identificado en *Euphorbia peplus*, *Euphorbia lathyris*, *Euphorbia antiquorum*, *Euphorbia helioscopia*, *Euphorbia paralias*, *Euphorbia drummondii*, *Euphorbia hirta* y *Euphorbia epithymoides*. Sin embargo, desafortunadamente las cantidades de ingenol-3-angelato presentes en *Euphorbia peplus* son muy bajas, con alrededor de 1,1 mg por kg de material vegetal [Hohmann *et al.* 2000; Planta Medica: 66, 291-294].

60 Para resolver problemas de suministro de ingenol-3-angelato, se han desarrollado recientemente enfoques semisintéticos usando ingenol extraído de semillas de *Euphorbia lathyris* como precursor [Liang *et al.* 2012; Synlett: 23, 2647-2652 y documento WO2013/050365]. Además, Jorgensen *et al.* 2013 describieron un procedimiento químico sintético de 14 etapas de preparación de ingenol-3-angelato [Jörgensen *et al.* 2013; Science: 341, 878-882]. Aunque exitoso, ambos de estos enfoques tienen limitaciones: el rendimiento para la síntesis total de ingenol-3-angelato es inferior al 1% y el rendimiento de ingenol-3-angelato procesado de manera semisintética a partir de

ingenol aislado de 1 kg de polvo de semilla de *Euphorbia lathyris* es sólo de hasta 190 mg.

Los derivados de tiglian-3-ona también han sido identificados en miembros de la familia *Euphorbiaceae* y actualmente se obtienen mediante su aislamiento a partir de plantas o partes vegetales del género *Fontainea* o *Hylandia*. El aislamiento de derivados de tiglian-3-ona a partir de semillas, corteza o flores de las especies vegetales *Fontainea picrosperma*, *Fontainea venosa* o *Hylandia dockrillii* es el empleado de manera más común. La 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (EBC-46, denominada anteriormente EBI-46; también denominada 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona en la bibliografía), por ejemplo, se ha aislado a partir de semillas de la especie *Fontainea picrosperma* de *Euphorbiaceae*. La extracción de material vegetal y la purificación de este compuesto proporciona sólo aproximadamente un 0,1% (1g/kg de material vegetal). Incluso de manera más importante, las especies que expresan 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona sólo crecen en Australia en un número limitado de ubicaciones de la selva tropical, limitando de ese modo el posible suministro de este compuesto biológicamente activo. En particular, la síntesis química de 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona no ha sido descrita hasta ahora.

Un enfoque para superar las limitaciones de suministro descritas anteriormente podría ser la provisión de cultivos *in vitro*, para la reproducción de los materiales de origen vegetal valiosos y, como consecuencia, los metabolitos secundarios producidos por dichos materiales vegetales. En particular, los cultivos celulares en suspensión *in vitro* son, debido a su fácil modificación a escala, alternativas prometedoras para suministrar ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona en grandes cantidades de una manera adecuada e independiente del entorno natural.

Cultivos *in vitro*, incluyendo cultivos en suspensión, han sido descritos para una variedad de miembros de la familia *Euphorbiaceae*. Por ejemplo, se han descrito cultivos de callo (callus) de *Euphorbia peplus* por Aljibouri *et al.* [Aljibouri *et al.* 2014; Journal of Biotechnology Research Center (edición especial): 8, 66-71; Aljibouri *et al.* 2015; ISBN: 978-3-659-75695-5] así como por Tideman y Hawker [Tideman y Hawker 1982; Annals of Botany: 49, 273-279]. Sin embargo, la expresión *de novo* de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona en estos cultivos *in vitro*, o bien en cultivos de callo o bien en cultivos en suspensión, no se ha mostrado por ninguno de estos grupos. Por ejemplo, Yamamoto [Yamamoto; 1991; Biotechnology in Agriculture and Forestry: 15, 247-257; en: Medicinal and Aromatic Plants III (ed. por Y.P.S. Bajaj); Springer-Verlag Berlin Heidelberg] investigó la *Euphorbia* spp y describió en mucho detalle la expresión y la producción de antocianina en *Euphorbia millii*. Sin embargo, los únicos otros metabolitos secundarios encontrados que se producían en cultivos celulares de *Euphorbia* fueron ácidos grasos, fitoesteres, triterpenos y antocianinas, pero no ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Incluso más, Adolf *et al.* [Adolf *et al.* 1984; Planta Medica: 50, 259-261] describen cultivos de callo obtenidos a partir de *Euphorbia lathyris* y muestran la expresión de ésteres de diterpeno del tipo latirano en estos cultivos de callo. Sin embargo, aunque se mostró la presencia de ésteres de diterpeno del tipo ingenano en los materiales de partida, ya no estaban presentes en los cultivos de callo finales, sugiriendo de ese modo que la expresión de ingenol y ésteres de ingenol se pierde en condiciones de cultivo *in vitro*. Por tanto, aún no se ha establecido con éxito un sistema de cultivo celular de especies vegetales de la familia *Euphorbiaceae* que exprese ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona *in vitro*.

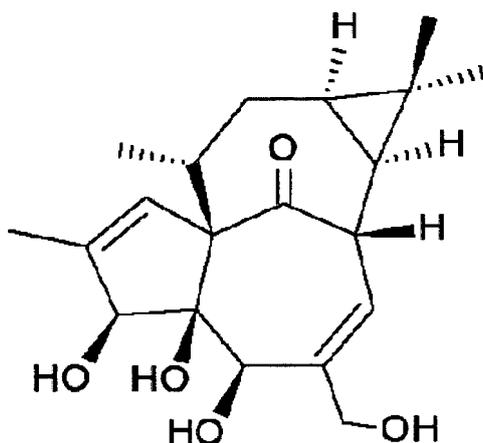
Por consiguiente, a pesar del hecho de que se ha invertido un gran esfuerzo en métodos que permiten la producción económica y simple de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, todavía existe la necesidad de enfoques mejorados adecuados para su producción a gran escala. Además, aunque existe una gran demanda, en particular para ingenol-3-angelato, tal como lo destacan los esfuerzos para desarrollar métodos de producción semisintéticos y sintéticos, cultivos de células vegetales para producir específicamente ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona no han sido considerados en absoluto en la bibliografía. Incluso más, en aquellos casos en los que se analizaron cultivos de células vegetales para la expresión de metabolitos secundarios, no se ha detectado o descrito la expresión de ingenanos, incluyendo ingenol y/o ésteres de ingenol.

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

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona; y (b) recuperar el ingenol, el uno o más ésteres de ingenol y/o el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

El ingenol y los ésteres de ingenol, según la presente invención, son compuestos químicos que poseen una estructura principal de ingenano.

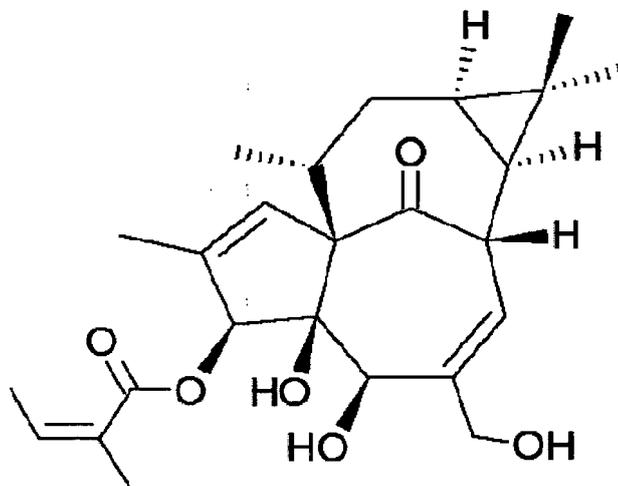
El ingenol ((1aR,2S,5R,5aR,6S,8aS,9R,10aR)-1a,2,5,5a,6,9,10,10a-octahidro-5,5a,6-trihidroxi-4-(hidroximetil)-1,1,7,9-tetrametil-1H-2,8a-metanociclopenta[a]ciclopropa[e]ciclododecen-11-ona; n.º CAS: 30220-46-3) es bien conocido en la técnica. Estructuralmente, se refiere a los ingenanos y se muestra a continuación en la fórmula I:



Fórmula I.

El término “ésteres de ingenol”, tal como se usa en el presente documento, también se refiere estructuralmente a ingenanos. Preferiblemente, los ésteres de ingenol se seleccionan del grupo que consiste en ingenol-3-angelato, 20-desoxi-ingenol-3-angelato y 20-O-acetil-ingenol-3-angelato.

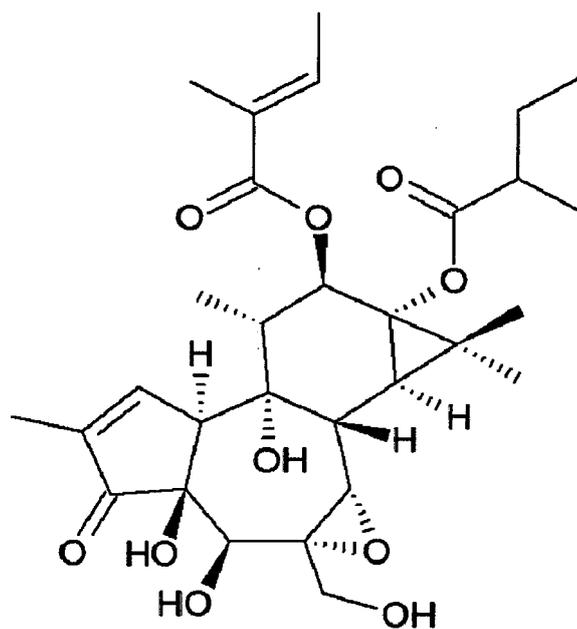
Un éster de ingenol particularmente preferido según la presente invención es ingenol-3-angelato (n.º CAS: 75567-37-2), también conocido con el nombre mebutato de ingenol o éster (1aR,2S,5R,5aS,6S,8aS,9R,10aR)-5, 5a-dihidroxi-4-(hidroximetil)-1,1,7,9-tetrametil-11-oxo-1a,2,5,5a,6,9,10,10a-octahidro-1H-2,8a-metanociclopenta-[a]ciclopropa[e]ciclododecen-6-ílico del ácido 2-metil-2(Z)-butenoico. El ingenol-3-angelato se muestra a continuación en la fórmula II:



Fórmula II.

El término “derivados de tiglian-3-ona” (tiglian-3-ona se denomina alternativamente en la técnica “tigliaen-3-ona” o “tiglien-3-ona”), tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los diterpenos tetracyclicos desoxi- y adicionalmente hidroxilados, saturados, mono u oligoinsaturados, y sus ésteres correspondientes, que contienen la estructura principal de tigliano, una funcionalidad cetona en la posición 3 del resto de tigliano y un elemento epóxido en la posición 6,7 de la estructura principal de tigliano. Preferiblemente, el derivado de tiglian-3-ona se selecciona del grupo que consiste en 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (EBC-46 o EBI-46); 12,13-di-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-tigliaen-3-ona (EBI-47); 12-(dodeca-2,4,6-trienoil)-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (EBI-59); 12-(deca-2,4-dienoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (EBI-61); 12,13-di-(2-metilbutanoil)-1,2-2H-1,2,6,7-diepoxi-6-carboxi-4,5,9,12,13-pentahidroxi-tigliaen-3-ona y 12,13-di-(2-metilbutanoil)- 5,20-di-acetoil-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-tigliaen-3-ona; cada uno de los cuales describe, por ejemplo, en el documento WO07070985.

Un derivado de tiglian-3-ona particularmente preferido según la presente invención es 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona EBC-46), que se muestra en la fórmula III a continuación:



Fórmula III.

El método de la presente invención comprende las etapas (a) y (b) descritas en lo sucesivo. El término “comprende”, tal como se usa en el presente documento, indica que etapas y/o componentes adicionales pueden estar incluidos, además de las etapas y/o los componentes específicamente enumerados. Sin embargo, este término también abarca que el contenido reivindicado consiste en exactamente las etapas y/o los componentes enumerados.

La etapa (a) del método de la presente invención abarca que las células vegetales son cultivadas en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión.

Las células vegetales, según la presente invención, son células obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae*. Plantas de la familia *Euphorbiaceae* incluyen, sin limitación, plantas del género *Elaeophorbia*, *Euphorbia*, *Fontainea*, *Hylandia*. Ejemplos no limitantes de especies de estos géneros se proporcionan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: géneros y especies a modo de ejemplo de la familia *Euphorbiaceae*

Género	Ejemplos de especies
<i>Elaeophorbia</i>	<i>Elaeophorbia drupifera</i>
<i>Elaeophorbia</i>	<i>Elaeophorbia grandiflora</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia acurensis</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia antiquorum</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia biglandulosa</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia canariensis</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia cooperi</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia cornigera</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia cotinifolia</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia deightonii</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia desmondi</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia drupifera</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia ebracteolata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia esula</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia fischeriana</i>

(continuación)	
Género	Ejemplos de especies
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia grandiflora</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia helioscopia</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia hermentiana</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia iberica</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia ingens</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia jolkini</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia kamerunica</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia kansui</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia lathyris</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia leuconeura</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia matabelensis</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia megalantha</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia millii</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia myrsinites</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia nematocypha</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia nubica</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia palustris</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia paralias</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia peplus</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia petiolata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia pilosa</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia quadrialata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia quinquecostata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia resinifera</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia royleana</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia segueiriana</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia serrata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia sieboldiana</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia tirucalli</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia triangularis</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia trigona</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia virgata</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia epithymoides</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea australis</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea borealis</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea fugax</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea oraria</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea pancheri</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea picrosperma</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea rostrata</i>
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea subpapuana</i>

(continuación)	
Género	Ejemplos de especies
<i>Fontainea</i>	<i>Fontainea venosa</i>
<i>Hylandia</i>	<i>Hylandia dockrillii</i>

Según la presente invención, las células vegetales pueden ser de una única planta, o, alternativamente, de más de una planta. En el último caso, las células pueden obtenerse de varias plantas de la misma cepa, o de varias plantas de la misma variedad, de varias plantas de la misma subespecie, de varias plantas de la misma especie o de varias plantas del mismo género. Las células también pueden obtenerse a partir de varias plantas diferentes que pertenecen todas a la familia *Euphorbiaceae*. Preferiblemente, sin embargo, las células son de una especie, más preferiblemente de una subespecie, incluso más preferiblemente de una variedad y lo más preferiblemente de una cepa.

El tejido vegetal usado para iniciar el cultivo celular puede ser cualquier tejido vegetal. Ejemplos no limitantes de tejidos para obtener células para el cultivo incluyen partes vegetales tales como, por ejemplo, raíces, hojas, tallos, meristemos y semillas. Preferiblemente, el material de partida se selecciona de raíces, hojas y tallos. Más preferiblemente, el material de partida se selecciona de raíces, hojas y tallos de plántulas jóvenes cultivadas *in vitro*. Los medios y métodos para detectar la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona en el material respectivo se conocen bien en la técnica y se comentan en más detalle a continuación en el presente documento.

Las células obtenidas a partir de estas partes pueden ser de cualquier tipo de células, tales como, por ejemplo, células indiferenciadas, células desdiferenciadas, células meristemáticas, células embriogénicas, células no embrionarias o mezclas de las mismas. Las células para el cultivo también pueden obtenerse por medio de la etapa intermedia de formación de un callo a partir de tales partes vegetales, preferiblemente un callo friable, tal como se comenta en más detalle a continuación en el presente documento. Las células vegetales pueden obtenerse directamente a partir de una planta o de un callo o pueden ser células crioconservadas que se obtuvieron a partir de una planta o de un callo o de un cultivo en suspensión en un momento anterior.

Según la presente invención, se emplea un medio acuoso de nutrientes tamponado o no tamponado. El término "medio de nutrientes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un medio que es adecuado para el cultivo de cultivos de células vegetales en suspensión. Los medios de nutrientes están bien establecidos en la técnica y pueden basarse, por ejemplo, en sales basales de Murashige y Skoog (MS), sales basales de Schenk y Hildebrandt (SH) o una composición de compuestos según Gamborg (B5).

El término "medio de nutrientes" abarca tanto "medio de crecimiento" como "medio de producción". El término "medio de crecimiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un medio de nutrientes que favorece el crecimiento de células cultivadas. En una realización preferida, el medio de crecimiento proporciona un aumento de crecimiento de al menos el 50% en una semana. El aumento de crecimiento puede determinarse basándose, por ejemplo, en el peso seco o fresco. Preferiblemente, el aumento de crecimiento se determina basándose en el peso fresco. Un "medio de producción", según la presente invención, es un medio de nutrientes que favorece la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Se apreciará que también puede producirse una determinada cantidad de crecimiento en un medio de producción y que puede tener lugar una determinada cantidad de producción en un medio de crecimiento. Sin embargo, según la presente invención, el crecimiento se favorece sobre la producción en el medio de crecimiento empleado, mientras que la producción se favorece sobre el crecimiento en el medio de producción empleado. Según la presente invención, el método de la invención puede incluir una o más etapas de cultivo de las células en un medio de crecimiento y/o una o más etapas de cultivo de las células en un medio de producción.

Ejemplos de medios de producción incluyen, pero no se limitan a, medios que comprenden una base salina (por ejemplo, MS o SH), más opcionalmente macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores del crecimiento de plantas, aminoácidos, elicitores y/o una fuente de carbono, preferiblemente sacarosa. El medio de producción también puede comprender fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico. Cantidades preferidas de sacarosa a emplear están entre el 0,01% (p/v) y el 10% (p/v), más preferiblemente entre el 0,05 y el 6% (p/v), tal como, por ejemplo, entre el 0,25% (p/v) y el 4% (p/v). La sacarosa puede obtenerse de, por ejemplo, Sigma Aldrich, Carl Roth y/o VWR. Cantidades preferidas de nitrógeno a emplear están entre el 0,05% (p/v) y el 10% (p/v), más preferiblemente entre el 0,1% (p/v) y el 5% (p/v), tal como, por ejemplo, entre el 0,25% (p/v) y el 2% (p/v). El nitrógeno puede obtenerse a partir de nitrato, amonio y aminoácidos, o una mezcla de los mismos. Las fuentes de nitrógeno pueden obtenerse de, por ejemplo, Sigma Aldrich, Carl Roth y/o VWR.

Los nutrientes esenciales en medios de cultivo de células o tejidos vegetales incluyen macronutrientes y micronutrientes. Para la morfogénesis y crecimiento satisfactorio, las células y los tejidos vegetales consumen macronutrientes tales como nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) en grandes cantidades. El contenido de macronutrientes típico en tejidos vegetales es de aproximadamente el 0,2% a

aproximadamente el 4% en relación al peso de materia seca. Por el contrario, los micronutrientes son consumidos en cantidades bajas y están presentes, normalmente, por debajo del 0,02% (en relación al peso de materia seca) en tejidos vegetales. Los micronutrientes incluyen hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cloro (Cl) así como otros micronutrientes bien conocidos en la técnica.

Las vitaminas incluyen cualquier vitamina natural o sintética utilizada por las células tales como tiamina, ácido nicotínico y piridoxina. Estas pueden ser usadas por separado o en cualquier combinación. Las vitaminas pueden ser usadas preferiblemente a concentraciones entre 10 µg/l y 100 mg/l, más preferiblemente entre 50 µg/l y 10 mg/l y lo más preferiblemente a aproximadamente 0,5 mg/l para el ácido nicotínico o clorhidrato de piridoxina y 0,1 mg/l para el clorhidrato de tiamina.

Se conoce bien en la técnica que la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales en suspensión se ve influenciada por los reguladores del crecimiento de plantas. Los reguladores del crecimiento de plantas incluyen una amplia variedad de sustancias conocidas en la técnica incluyendo, sin limitación, auxina y/o citoquinina/compuestos similares a citoquinina, por ejemplo, ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA), picloram, dicamba, bencilaminopurina (BAP), cinetina, zeatina, tidiazurón, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido indolacético (IAA). Al cambiar, por ejemplo, la relación de auxina con respecto a citoquinina/compuestos similares a citoquinina en el medio de nutrientes, puede potenciarse la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. El efecto de reguladores individuales del crecimiento de plantas sobre la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona en un cultivo celular en suspensión particular según la presente invención puede confirmarse experimentalmente sin más problemas. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona producidos en presencia y ausencia, o en presencia de dos o más concentraciones diferentes, de un regulador del crecimiento de plantas particular para obtener información sobre una posible influencia de este regulador del crecimiento de plantas sobre la tasa de producción de estos compuestos en estas condiciones de cultivo celular particulares. Las cantidades preferidas de reguladores del crecimiento de plantas incluyen concentraciones de aproximadamente 0,001 µmol/l a aproximadamente 2 mmol/l, preferiblemente de aproximadamente 0,01 µmol/l a aproximadamente 1 mmol/l.

Los aminoácidos incluyen cualquier aminoácido natural o sintético utilizado por las células tales como glutamina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estos pueden ser usados por separado o en cualquier combinación. Los aminoácidos pueden ser usados preferiblemente a concentraciones entre 10 mg/l y 10 g/l, más preferiblemente entre 50 mg/l y 5 g/l.

Los elicitores incluyen, pero no se limitan a, ácido jasmónico, jasmonato de metilo, jasmonatos naturales o sintéticos, ácido tuberónico, ácido cucurbitico, coronatina, amidas de indanoilo tales como 6-etil-indanoil isoleucina, ácidos alcanoicos, ácido 12-oxofitodienoico, ácido salicílico, sistemina, volicitina y compuestos relacionados con cualquiera de estos elicitores, a modo de ejemplo. Los elicitores incluyen, además, sin limitación, oligosacáridos, por ejemplo, oligosacáridos de plantas, hongos o microbios; quitosano; quitina; glucanos; polisacáridos cíclicos; preparaciones que contiene material celular de bacterias, hongos, levaduras, plantas o insectos; material contenido en saliva o secreciones de insectos; inhibidores de la biosíntesis o la acción de etileno en plantas, especialmente compuestos o complejos que contienen plata, cobalto y aminoetoxivinilglicina. Elicitores especialmente útiles para la producción de ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona incluyen compuestos relacionados con el ácido jasmónico tales como jasmonatos, el ácido salicílico también es un elicitador útil. Según la presente invención, también son útiles metales pesados tales como cadmio, vanadio y plata en la formación de sales o complejos. La quitina, los quitosanos (especialmente glutamato de quitosano), los N-acetil oligosacáridos, los polisacáridos pécticos, los glicanos fúngicos (que contienen 5 o más azúcares), los glicoproteogalactanos fúngicos, los elicitores esfingolipídicos, los polisacáridos pécticos y el ácido araquidónico también son elicitores útiles según la presente invención. Cantidades típicas de elicitores para el cultivo celular se conocen en la técnica. Por ejemplo, cantidades preferidas de jasmonato de metilo están entre 0,1 y 3 µM, lo más preferiblemente 1 µM tal como se muestra en el ejemplo 11. Para dar otro ejemplo, cantidades preferidas de ácido salicílico están entre 1 y 200 µM, lo más preferiblemente 30 µM tal como se muestra en el ejemplo 10.

Un medio de producción particularmente preferido comprende una base salina (por ejemplo, MS o SH o B5), más sacarosa al 0,25%.

Los medios de crecimiento a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, medios que comprenden una base salina (por ejemplo, MS o SH o B5), más una fuente de carbono, preferiblemente sacarosa y opcionalmente macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores del crecimiento de plantas y/o aminoácidos. Cantidades preferidas de sacarosa a emplear están entre el 0,01% (p/v) y el 6% (p/v), más preferiblemente entre el 0,1% (p/v) y el 5% (p/v), tal como por ejemplo, entre el 1% (p/v) y el 3% (p/v) y lo más preferiblemente la cantidad es de aproximadamente el 2% (p/v). Cantidades preferidas de nitrógeno a emplear están entre el 0,01% (p/v) y el 10% (p/v), más preferiblemente entre el 0,05% (p/v) y el 5% (p/v) tal como, por ejemplo, entre el 0,2% (p/v) y el 1% (p/v) y lo más preferiblemente de aproximadamente el 0,28% (p/v). El nitrógeno puede obtenerse a partir de nitrato, amonio o aminoácidos, o una mezcla de los mismos. Cantidades preferidas de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores del crecimiento de las plantas y aminoácidos son tal como se detallan anteriormente. El medio de

crecimiento no contiene elicitores.

Un medio de crecimiento particularmente preferido comprende una base salina (por ejemplo, MS o SH o B5), más sacarosa al 2%.

5 Un medio de crecimiento incluso más preferido comprende una base salina (por ejemplo, MS o SH o B5), más sacarosa al 2% y una combinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,3 $\mu\text{mol/l}$ y bencilaminopurina 2,2 $\mu\text{mol/l}$.

10 Un medio de crecimiento preferido adicional comprende una base salina (por ejemplo, MS o SH o B5), más sacarosa al 2%, una combinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,3 $\mu\text{mol/l}$ y bencilaminopurina 2,2 $\mu\text{mol/l}$ y una combinación de clorhidrato de tiamina 0,1 mg/l, ácido nicotínico 0,5 mg/l y clorhidrato de piridoxina 0,5 mg/l.

15 El medio de nutrientes se prepara normalmente para que contenga todos los componentes deseados antes de que se coloquen las células en el medio de nutrientes. Además, también pueden introducirse posteriormente compuestos o componentes complementarios adicionales en el cultivo después de que se hayan puesto en contacto por primera vez las células y el medio. Por ejemplo, estos componentes, tales como hidrato de carbono adicional, pueden suministrarse en una corriente de alimentación de manera discontinua o continua, según sea necesario.

20 También es deseable reducir o evitar el oscurecimiento oxidativo del cultivo celular ya que influye negativamente en la calidad del cultivo celular y la recuperación posterior. Con este fin, pueden añadirse los denominadas "agentes antioscurecimiento" al medio de nutrientes para prevenir la formación de pigmentos durante el cultivo celular. Estos pigmentos incluyen compuestos fenólicos y compuestos relacionados para los cuales se observa que tienen generalmente un efecto perjudicial sobre el crecimiento celular, la viabilidad y la formación de productos. Un ejemplo no limitante típico de un agente antioscurecimiento usado en los medios de nutrientes según esta invención es el ácido ascórbico. Los agentes antioscurecimiento se incorporan normalmente en el medio en un intervalo de concentración de 10 ppb a 1000 ppm. Alternativamente, o adicionalmente, pueden emplearse células no embriogénicas, ya que estas son menos susceptibles al oscurecimiento que las células embriogénicas. Según la presente invención, el término "células no embriogénicas" se refiere a células indiferenciadas, desdiferenciadas y meristemáticas. Las células no embriogénicas pueden distinguirse de las células embriogénicas por la presencia de (una) vacuola(s), mientras que las células embriogénicas son altamente citoplásmicas y sin vacuolas. Los medios y métodos para obtener células no embriogénicas para uso en el método de la invención se conocen bien en la técnica. Ejemplos no limitantes para obtener células no embriogénicas incluyen su derivación de un callo friable. Para proporcionar un ejemplo, puede emplearse un inóculo de un callo friable de este tipo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 g/25 ml para preparar cultivos en suspensión no embriogénicos para uso en el método según la presente invención.

35 Se apreciará que la tasa de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona no está determinada por una única etapa limitante, sino por una compleja interacción entre una pluralidad de factores limitantes. El alivio de uno cualquiera de los factores limitantes potenciará la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, aunque la magnitud de este potenciamiento dependerá de las condiciones de cultivo particulares, que determinan los efectos limitantes relativos de otras etapas de la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Tales condiciones de cultivo, que afectan a la interacción entre diversos factores limitantes, incluyen la composición genética de las células, la composición del medio de cultivo y la temperatura empleada en el cultivo.

45 Las condiciones de cultivo celular generales se conocen bien en la técnica. Los niveles de gases tales como oxígeno, dióxido de carbono y etileno pueden ser controlados para favorecer la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona o para favorecer la acumulación de biomasa. Los cultivos rutinarios en recipientes de cultivo a escala de laboratorio mantenidos en una atmósfera de aire, con cierres típicos tales como láminas, tapones o tapas, dan como resultado niveles de oxígeno disuelto por debajo de la saturación de aire y niveles de dióxido de carbono y etileno mayores que los presentes en aire atmosférico. Por tanto, de manera rutinaria, los niveles de dióxido de carbono en el espacio de cabeza del cultivo son, normalmente, mayores de aproximadamente el 0,03% v/v. Sin embargo, las concentraciones de dióxido de carbono y/o etileno pueden ser ajustadas o bien para favorecer la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona o bien, alternativamente, para favorecer la propagación celular.

50 En una realización, la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona se favorece ajustando el nivel de dióxido de carbono en el espacio de cabeza o la corriente de aireación para que sea de aproximadamente el 0,1% (aproximadamente 3 veces la atmosférica) a aproximadamente el 10%, preferiblemente de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 7%, en equilibrio con el líquido a la temperatura de funcionamiento. En otra realización, el etileno se encuentra en menos de aproximadamente 500 ppm y preferiblemente en menos de 200 ppm, tal como se mide en la fase gas, en equilibrio con la fase líquida, a la temperatura de funcionamiento. Los gases también pueden ser suministrados independientemente, por ejemplo, las fuentes de oxígeno y de dióxido de carbono pueden ser diferentes.

65 Los gases disueltos pueden ser controlados variando uno o más de: la velocidad de agitación, la composición del

gas de aireación, el caudal de suministro del gas de aireación, la velocidad de ventilación del gas de aireación y la presión total en el recipiente de cultivo. Las velocidades de agitación pueden ser controladas a de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 por minuto (rotaciones u oscilaciones de agitadores o circulaciones de fluido). El caudal de suministro de gas puede ser cualquier caudal que sea apropiado para lograr una concentración de gases disueltos que sea adecuada u óptima para la acumulación de biomasa celular o el mantenimiento o la formación del producto. Preferiblemente, este caudal es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 volúmenes de gas por volumen de caldo de cultivo por minuto y puede ser suministrado directamente en el líquido de cultivo, o en una porción de líquido separada que se mezcla posteriormente con el resto del cultivo, o en el espacio de cabeza del cultivo, o en un dispositivo para poner en contacto las especies de gas con el medio de cultivo. En una realización, las concentraciones de oxígeno disuelto son controladas a de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 200%, preferiblemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 150%, de saturación de aire a la temperatura de funcionamiento. Por supuesto, es posible que, por diversos motivos operativos, por ejemplo, la reducción temporal en la aireación, el nivel de oxígeno disuelto pudiera ser tan bajo como cero durante periodos de tiempo que oscilan entre unos pocos minutos y varias horas. Combinaciones útiles específicas de oxígeno, dióxido de carbono y etileno, fuera de estos intervalos, pueden descubrirse a través de experimentación rutinaria y se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Preferiblemente, se ajusta una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C, más preferiblemente la temperatura se ajusta a un valor entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 28°C, incluso más preferiblemente a un valor entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 27°C, y lo más preferiblemente se ajusta a aproximadamente 25°C.

También se prefiere que las condiciones de cultivo celular comprendan condiciones de agitación, preferiblemente a de aproximadamente 50 rpm a aproximadamente 300 rpm tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 80 rpm y aproximadamente 200 rpm, preferiblemente entre aproximadamente 100 rpm y aproximadamente 150 rpm y lo más preferiblemente la frecuencia de agitación es de aproximadamente 130 rpm.

En cuanto a la escala del matraz de agitación, son más preferidas condiciones de cultivo celular que comprenden condiciones de agitación a una frecuencia de agitación de aproximadamente 130 rpm, en oscuridad y a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C.

El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, abarca los valores enumerados de manera explícita, así como pequeñas desviaciones de los mismos. Dicho de otro modo, una velocidad de agitación de "aproximadamente 130 rpm" incluye, pero no tiene que ser exactamente la cantidad enumerada de 130 rpm sino que puede diferir en varias rpm, incluyendo de ese modo por ejemplo 131 rpm, 132 rpm, 129 rpm o 128 rpm. El experto en la técnica sabe que tales valores son valores relativos que no requieren una precisión completa siempre que los valores correspondan aproximadamente a los valores enumerados. Por consiguiente, una desviación del valor enumerado de por ejemplo aproximadamente el 15%, más preferiblemente de aproximadamente el 10%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 5% es abarcada por el término "aproximadamente". Estas desviaciones de aproximadamente el 15%, más preferiblemente de aproximadamente el 10% y lo más preferiblemente de aproximadamente el 5% son válidas para todas las realizaciones que pertenecen a esta invención en las que se usa el término "aproximadamente".

Se prefiere, además, que los cultivos celulares se subcultiven a intervalos regulares. Por ejemplo, para el mantenimiento del cultivo celular se prefiere que los cultivos se subcultiven cada 6 a 8 días. Por otro lado, para la recogida de biomasa, se deja que los cultivos crezcan durante aproximadamente 12 a 16 días antes de la recogida. También se prefiere que el cultivo celular se lleve a cabo en condiciones estériles.

Un objetivo de la invención es obtener cantidades comercialmente significativas del producto final con biorreactores aireados. Otro objetivo es proporcionar métodos para aumentar el rendimiento volumétrico.

Mientras que el escalado del cultivo en biorreactores se realiza mediante la transferencia de biomasa de un biorreactor a otro, la transferencia inicial de biomasa en el entorno del biorreactor se realiza mediante la inoculación con biomasa viable propagada en matraces de agitación. La inoculación inicial de un biorreactor se realiza en condiciones estériles, por ejemplo, mediante el uso de matraces de inoculación esterilizados - que pueden ser conectados en condiciones estériles al biorreactor - que se llenan en un entorno estéril con biomasa de *Euphorbiaceae* viable cultivada previamente en condiciones estériles en matraces de agitación. Concentraciones preferidas de biomasa de *Euphorbiaceae* viable para la inoculación oscilan entre aproximadamente 5 g de peso fresco/l y aproximadamente 100 g de peso fresco/l, cantidades incluso más preferidas de biomasa de *Euphorbiaceae* viable para la inoculación oscilan entre aproximadamente 10 g de peso fresco/l y aproximadamente 60 g de peso fresco/l, y las cantidades más preferidas de biomasa de *Euphorbiaceae* viable para la inoculación oscilan entre aproximadamente 20 g de peso fresco/l y aproximadamente 40 g de peso fresco/l. Con este fin, pueden usarse diferentes clases de biorreactores. El biorreactor más común para una amplia gama de suspensiones de células vegetales es el biorreactor agitado de acero inoxidable reutilizable. Sistemas con un biorreactor de un único uso pueden ser usados, como sistemas agitados de manera orbital, por ejemplo, Infors Multitron con ShakerBag u OrbShake Bioreactor [Kuhner AG]. Biorreactores de un único uso, en los que el caldo de cultivo en la bolsa de

5 cultivo desechable oscila verticalmente mediante un movimiento de onda mixta, pueden ser usados para la propagación, así como para la producción. En todos los biorreactores de onda mixta, se induce una onda, así como se introduce oxígeno sin burbujas en el caldo de cultivo o bien sacudiendo una bolsa (AppliFlex™, BIOSTAT® CultiBag RM, Wave Bioreactor™) o bien elevando respectivamente las secciones inferiores de una plataforma, en la que se coloca una bolsa.

10 Además, las operaciones de procedimiento generales en este campo también se conocen en la técnica y pueden ser ajustadas sin más problemas por el experto en la técnica. Estas operaciones de procedimiento generales para un procedimiento de cultivo de células vegetales se relacionan con el modo en que se añaden o retiran los nutrientes, las células y los productos con respecto al tiempo [Payne, G., *et al.*, 1991; "Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System", (Hanser Publishers)].

15 Los componentes, tales como, por ejemplo, hidratos de carbono, nutrientes, vitaminas, antioxidantes e elicitors proporcionados a las células pueden ser suministrados de diferentes maneras. Los componentes pueden ser añadidos en una etapa de crecimiento particular tal como de retardo, exponencial o estacionario. Todos los componentes pueden ser suministrados de una vez y después, tras un periodo de tiempo adecuado, puede recuperarse el producto resultante. En otras circunstancias, no todos los componentes pueden ser suministrados a la vez. En su lugar, uno o más de ellos pueden ser suministrados en momentos diferentes durante el cultivo. Además, las adiciones pueden ser discontinuas o por etapas en cuanto al tiempo de contacto inicial y la duración de tal suministro puede variar para componentes diferentes. Los componentes pueden ser suministrados en una pluralidad de partes. Puede suministrarse uno o más componentes como parte de disoluciones puestas en contacto de manera separada con el cultivo celular o porciones del mismo.

25 Las porciones del cultivo en suspensión pueden ser retiradas en cualquier momento o periódicamente y ser usadas para la crioconservación, la propagación celular adicional, la producción y/o la recuperación. Tales porciones que contienen células pueden exponerse adicionalmente a nutrientes u otros componentes según se desee. Se describe, a modo de ejemplo, en el presente documento, procedimientos de transferencia de cultivos en suspensión. Preferiblemente, medio que contiene nutrientes u otros componentes es añadido para reponer una parte o todo el volumen retirado. Las porciones de tal material retirado pueden volver a ser añadidas en el cultivo original, por ejemplo, células y medio pueden ser retirados, una porción de las células o de medio pueden ser usados para la recuperación de producto y las células o el medio restante pueden ser devueltos.

35 El caudal de suministro de los componentes al cultivo o los niveles de diversos componentes en el cultivo puede controlarse para producir y recuperar ventajosamente el producto. Porciones separadas del cultivo pueden ser expuestas a componentes de cualquiera de los modos anteriores y después ser combinadas en proporciones determinadas como ventajosas para la producción. Además, el contenido celular del cultivo puede ser ajustado para proporcionar el producto, o propagar las células, ventajosamente. El ajuste del contenido celular puede ser combinado ventajosamente con estrategias para ponerlo en contacto con nutrientes u otros componentes.

40 La reposición de medio recién preparado para las células que se someten a biosíntesis activa también puede emplearse para potenciar la producción proporcionando nutrientes esenciales que se han agotado durante el cultivo. Miyasaka *et al.* pudieron estimular células de fase estacionaria de *Salvia miltiorrhiza* para producir los metabolitos de diterpeno criptotansinona y ferruginol simplemente añadiendo sacarosa al medio [Miyasaka *et al.*, "Regulation of Ferruginol and Cryptotanshinone Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Salvia miltiorrhiza*", *Phytochemistry* 25: 637-640 (1986)]. Por tanto, se prefiere emplear un protocolo de intercambio de medio periódico para el método de cultivo celular de la presente invención, con el fin de proporcionar beneficios similares.

50 Se contempla además que la cantidad de medio intercambiado, la frecuencia de intercambio y la composición del medio a reponer puedan variarse según se requiera. La capacidad para estimular la biosíntesis mediante intercambio del medio tiene importantes implicaciones para el diseño y funcionamiento de un procedimiento comercial eficaz en modo continuo, semicontinuo o discontinuo. En un funcionamiento "discontinuo", se suministran componentes particulares del medio, tales como nutrientes, de manera, o bien periódica, o bien continua. En una realización preferida, una porción sustancial, tal como, por ejemplo, una porción de aproximadamente el 70% al 90%, de los contenidos de un cultivo discontinuo se reemplaza por medio recién preparado para un crecimiento y producción celular continuados; este modo de procedimiento se asemeja a un funcionamiento "discontinuo repetido" y se denomina procedimiento "semicontinuo". En una realización preferida alternativa, el procedimiento es "continuo", es decir, se suministra medio recién preparado de manera continua, y se retira medio efluente de manera continua o repetitiva.

60 Todas las concentraciones indicadas en el presente documento se refieren a los valores iniciales promedio en el medio extracelular después de la adición. Las concentraciones en las disoluciones de alimentación y, por tanto, concentraciones locales en contacto con las células, pueden ser mayores que las indicadas. En aquellos casos en los que deben añadirse preparaciones que contienen material celular, tal como, por ejemplo, Mycel inactivado de, por ejemplo, especies de *Fusarium* tales como *F. heterosporium*, *Gibberella zeae*, o especies de *Pythium* tales como *P. graminicola*, las cantidades a añadir pueden basarse en la concentración de un constituyente específico de la preparación, o la cantidad puede representar una determinada fracción del volumen de cultivo. El efecto deseado,

por ejemplo, o bien crecimiento o bien producción, puede lograrse manipulando las condiciones de los medios descritas anteriormente añadiendo, retirando o cambiando la concentración de uno o más nutrientes u otros agentes. Partiendo de las concentraciones indicadas en el presente documento como guía, una optimización de rutina puede establecer componentes específicos, o una combinación de componentes, y concentraciones, que son particularmente útiles para maximizar la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Además de modificar los componentes del medio, también pueden modificarse otras condiciones de reacción para obtener el resultado deseado, por ejemplo, manipulando condiciones que incluyen, pero se limitan a, la temperatura y el pH, o manipulando cualquier combinación de estas condiciones. Las condiciones de los medios pueden ser modificadas fácilmente, y manipuladas, en vista de la guía proporcionada en el presente documento y disponible a partir de la técnica, para lograr un rendimiento óptimo, que puede variar entre líneas celulares.

El término "cultivo en suspensión", tal como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células dispersado en un medio líquido. En una realización preferida, el cultivo en suspensión es un cultivo de células no embriónicas dispersado en un medio de nutrientes líquido. Se entiende fácilmente que los cultivos en suspensión comprenden células en diversas fases de agregación. Se encuentra en las suspensiones un intervalo de tamaños de agregados con tamaños que oscilan entre decenas de micrómetros de diámetro (células individuales o células agregadas un poco) y agregados de muchos milímetros de diámetro, que consisten en muchos miles de células. Los cultivos en suspensión que comprenden tales agregados están abarcados por el método de la presente invención.

Para transferir células a un cultivo en suspensión, se retiran, por ejemplo, de un callo y se transfieren a recipientes de cultivo estériles que contienen medio de nutrientes. El cultivo en suspensión puede, por ejemplo, iniciarse usando un medio de nutrientes que tuvo éxito en la generación previa de, por ejemplo, un cultivo de callo friable, preferiblemente sin agentes gelificantes. Sin embargo, se aprecia que los medios optimizados para cultivo en suspensión pueden diferir del óptimo para callos de la misma línea celular. Alternativamente, o adicionalmente, el cultivo de células vegetales también puede derivarse de una colección de células criopreservadas.

Una vez iniciado, un cultivo en suspensión puede ser cultivado adicionalmente, o bien (i) separando sustancialmente las células del medio (normalmente mediante filtración, por ejemplo, filtración a vacío) y luego volviendo a introducir una porción a un medio que contiene nutrientes, o bien (ii) transfiriendo un volumen de caldo de cultivo (células y medio) en un medio que contiene nutrientes, o bien (iii) permitiendo que las células se asienten seguido por la retirada de cualquier porción de medio ya presente y volviendo a introducir medio que contiene nutrientes. Cuando las células y los medios se transfieren de manera volumétrica, la razón del volumen transferido con respecto al volumen final puede ser preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta sustancialmente todo el volumen, más preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 50% e incluso más preferiblemente desde el 10% hasta aproximadamente el 20%. En caso de que se transfiera todo el volumen, pueden suministrarse nutrientes recién preparados de forma concentrada, dando como resultado sólo un pequeño aumento de volumen. Por tanto, el cultivo puede dividirse en porciones, que pueden ser empleadas adicionalmente de manera individual para, o bien hacer crecer más células, para producir ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, o bien ambos. Cada porción puede, pero no necesita, ser cultivada en las mismas condiciones o como el cultivo original. La duración del crecimiento puede extenderse complementando un medio parcialmente agotado con nutrientes.

Las células cultivadas según el método de la presente invención producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona, tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, las células producen uno o más de estos compuestos bioactivos en una cantidad detectable en las condiciones de cultivo celular mostradas en los ejemplos adjuntos.

El término "uno o más" tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, en el término "uno o más ésteres de ingenol" o "uno o más derivados de tiglian-3-ona" se refiere a exactamente uno, pero también a más de uno, tal como, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete y así sucesivamente. Además, el término "uno o más" no define el número real de un tipo de molécula presente, sino que se refiere al número de moléculas distintas de la clase enumerada. Por ejemplo, el término "uno o más ésteres de ingenol" se refiere a exactamente un éster de ingenol tal como, por ejemplo, al ingenol-3-angelato preferido, pero también a más de uno, tal como, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc., ésteres de ingenol diferentes. Lo mismo se aplica, haciendo los cambios necesarios, al término "uno o más derivados de tiglian-3-ona".

En la segunda etapa del método de la presente invención, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona que se ha(n) producido mediante las células cultivadas se recupera(n). El ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona pueden ser recuperados a partir del cultivo completo o a partir de cualquier porción de cultivo, y pueden ser recuperados en cualquier momento durante el cultivo o después de completarse el periodo de cultivo. Preferiblemente, las células se cultivan durante de aproximadamente 12 a 16 días antes de la recuperación, más preferiblemente las células se cultivan durante aproximadamente 12 a 16 días sin ninguna etapa intermedia de subcultivo. Se apreciará que todos los compuestos bioactivos del grupo que consiste en ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona producidos pueden ser recuperados, o, preferiblemente, que uno o más compuestos bioactivos particulares del grupo que consiste en ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona de interés son recuperados, tal como por ejemplo, sólo ingenol, sólo uno o más ésteres de ingenol o

sólo uno o más derivados de tiglian-3-ona.

Los métodos de recogida de cultivos en suspensión se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, pueden emplearse dispositivos que pueden separar la biomasa del sobrenadante (medio de cultivo), permitiendo de ese modo el procesamiento separado de biomasa y medio de cultivo. La biomasa puede separarse a escala de producción, por ejemplo, usando un separador continuo GEA Westfalia de tipo CSC 20-06-476, capacidad de 2 m³/h, 8320 rpm, volumen de recipiente de 8 l. La unidad es adecuada para la desinfección, la limpieza en el sitio y el enfriamiento. El sobrenadante puede recogerse usando un tanque de mantenimiento de temperatura controlada de 2,5 m³; el sólido se descargará de manera semicontinua por medio de una bomba de diafragma.

El material/la biomasa celular y/o el sobrenadante pueden ser usados directamente para la extracción o pueden ser liofilizados antes del procedimiento de extracción. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica con el fin de preparar material o material en suspensión celular para el método de extracción apropiado. Los compuestos bioactivos del grupo que consiste en ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona pueden ser recuperados mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, extracción usando un disolvente no acuoso polar o apolar, extracción usando un medio ácido, extracción usando un medio básico, y recuperación mediante absorción a resina, en la que la resina está o bien dentro o bien fuera del recipiente de cultivo. Tal como se muestra, por ejemplo, en los ejemplos 18 y 19, la adsorción a resina dentro del cultivo celular permite la extracción de los compuestos bioactivos sin la necesidad previa de recoger la biomasa/el sobrenadante, facilitando de ese modo, en gran medida, la extracción del compuesto mientras continúa al mismo tiempo el cultivo celular.

Los métodos de aislamiento de los compuestos bioactivos del grupo que consiste en ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona producidos comprenden, sin limitación, etapas de método tales como extracción de biomasa húmeda, células liofilizadas o suspensiones acuosas de células usando disolventes orgánicos como, por ejemplo, metanol, acetato de etilo, acetona o tolueno, seguido por extracción líquido-líquido y/o una separación cromatográfica posterior usando, por ejemplo, cromatografía de líquidos (CL), CL de fase inversa, o cromatografía líquido/líquido. Un ejemplo de matriz de fase sólida usada en cromatografía en columna es la poliamida. Tales métodos de aislamiento de los compuestos bioactivos se han descrito en la técnica. Por ejemplo, si va a recuperarse ingenol-3-angelato, pueden emplearse las etapas de purificación descritas en Vasas *et al.* 2012 [Vasas *et al.* 2012; European Journal of Organic Chemistry; 5115-5130]. Cuando el compuesto que va a recuperarse es 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona, pueden emplearse las etapas de purificación descritas en el documento WO2007/070985 A1. Finalmente, puede aislarse ingenol, por ejemplo, y el rendimiento puede incluso enriquecerse aplicando el método descrito en el documento WO2013/050365 A1.

Preferiblemente, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona recuperados en la etapa (b) poseen actividad terapéutica, o pueden ser modificados para proporcionar compuestos bioactivos que tienen una actividad terapéutica. La actividad terapéutica puede ser mediada por medio de la regulación de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) o independientemente de la actividad de la proteína cinasa C. Preferiblemente, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona, o los compuestos bioactivos derivados de los mismos, se caracterizan porque regulan la actividad de la proteína cinasa C. El término "regulación de la actividad de la proteína cinasa C", tal como se usa en el presente documento, incluye la activación de la proteína cinasa C así como modificaciones de sus funciones tales como, por ejemplo, el enriquecimiento de su actividad. Preferiblemente, los compuestos recuperados en la etapa (b) del método de la invención pueden activar la proteína cinasa C. La familia de la proteína cinasa C de serina/treonina cinasas desempeña un papel central en la mediación de la transducción de señales de estímulos extracelulares que dan como resultado la producción del segundo diacilglicerol mensajero. El profundo papel de las PKC en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis celular las convierte en interesantes dianas farmacológicas [O'Brian *et al.* 2001; Cancer Metastasis Reviews: 20, 95-100]. El ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona se conocen como activadores de la proteína cinasa C. Por ejemplo, la unión a la proteína cinasa C y su activación mediante ingenol ha sido descrita por Haler *et al.* 1992 [Haler *et al.* 1992; Cancer Research: 52, 202-208]. La interacción de ingenol-3-angelato con la proteína cinasa C ha sido descrita, por ejemplo, por Kedei *et al.* 2004 [Kedei *et al.* 2004; Cancer Research: 64, 3243-3255]. La activación de la proteína cinasa C por un miembro de derivados de tiglian-3-ona, el compuesto 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona, ha sido descrita, por ejemplo, por Boile *et al.* 2014 [Boile *et al.* 2014; PLoS ONE: 9, e108887].

Los ensayos para la determinación de la actividad de la proteína cinasa C se conocen bien en la técnica, tales como, por ejemplo, el ensayo de la proteína cinasa tal como se describió en Kedei *et al.* 2004 [Kedei *et al.* 2004; Cancer Research: 64, 3243-3255] o tal como se describió en Boile *et al.* 2014 [Boile *et al.* 2014; PLoS ONE: 9, e108887].

Preferiblemente, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona, por sí mismos, poseen actividad terapéutica. Incluso más preferiblemente, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona, por sí mismos, poseen actividad terapéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cánceres de piel incluyendo melanomas, carcinomas de células escamosas (SCC) y carcinomas de células basales (BCC), cánceres de cabeza y cuello, cánceres de mama y cánceres de próstata.

- Según la presente invención, se proporciona un método nuevo para la producción de ingenol, éster de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Usando células cultivadas en un cultivo en suspensión, es posible ahora la producción en serie de ingenol, éster de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, por ejemplo, mediante técnicas de cultivo celular semicontinuas o continuas. Actualmente no se dispone de un enfoque de este tipo para el cultivo de células vegetales para la producción en serie de ingenol, éster de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. La falta de tales métodos actualmente significa que estos compuestos bioactivos se aíslan en pequeñas cantidades sólo a partir de plantas recolectadas, dado que los métodos de producción semisintéticos y sintéticos de estos compuestos no están disponibles desde un punto de vista económico, tal como se comentó anteriormente.
- El método de la presente invención permite el aislamiento de mayores cantidades de estos compuestos en comparación con las cantidades aisladas a partir de plantas previamente descritas. Tal como se muestra en el ejemplo 6 (figura 9) a continuación, se obtuvieron al menos 1,14 mg por litro de cultivo en suspensión de ingenol-3-angelato. Tal como se detalla también en el ejemplo 6, esto corresponde a una cantidad de 4,56 mg de ingenol-3-angelato por kg de peso fresco. En la técnica anterior [Hohmann *et al.* 2000; Planta Medica: 66, 291-294], por otro lado, se notificó que los métodos de aislamiento a partir de estas plantas dieron como resultado sólo 1 mg de ingenol-3-angelato por 900 g de material vegetal fresco (correspondiente a aproximadamente 1,1 mg/kg de material vegetal fresco). En particular, en la técnica anterior, para aislar estas cantidades, tuvieron que emplearse plantas, mientras que la expresión de estos compuestos no se ha detectado en cultivos *in vitro* obtenidos a partir de estas plantas. Por el contrario, aunque los hallazgos de la técnica anterior tales como en Adolf *et al.* [Adolf *et al.* 1984; Planta Medica: 50, 259-261] describen la presencia de ésteres de diterpeno del tipo ingenano en los materiales de partida (por ejemplo, los explantes de plantas), estos compuestos ya no estaban presentes en los cultivos de callo finales, sugiriendo de ese modo que la expresión de ingenol y ésteres de ingenol se pierde en condiciones de cultivo *in vitro*.
- Por tanto, los presentes hallazgos muestran, por primera vez, que el ingenol-3-angelato, como representante de los ésteres de ingenol, puede obtenerse, de hecho, en condiciones de cultivo *in vitro*, y que las cantidades que pueden obtenerse de ese modo son superiores a las cantidades que pueden obtenerse mediante extracciones a partir de plantas, tal como se llevaba a cabo anteriormente.
- Por consiguiente, en una realización preferida del método de la invención, las células en la etapa (a) producen ingenol-3-angelato a una concentración de al menos 1,14 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión, más preferiblemente al menos 1,5 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión y lo más preferiblemente al menos 1,8 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión, mientras que en un litro de cultivo en suspensión, una cantidad de biomasa (en base de peso fresco) de al menos 150 g está presente en el momento de la recogida de las células. Más preferiblemente, una cantidad de biomasa (en base de peso fresco) de al menos 200 g, y lo más preferiblemente de al menos 250 g por litro de cultivo en suspensión está presente en el momento de la recogida de las células.
- Usando la suspensión de cultivo completa para la extracción del ingenol, el éster de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona, pueden obtenerse, tanto los compuestos presentes en el sobrenadante, como los compuestos presentes dentro de las células.
- En una realización preferida alternativa del método de la invención, un kg de peso fresco de las células en la etapa (a) produce ingenol-3-angelato en una cantidad de al menos 4,56 mg, más preferiblemente en una cantidad de al menos 6 mg de ingenol-3-angelato, y lo más preferiblemente en una cantidad de al menos 7,2 mg de ingenol-3-angelato. Se apreciará que esta cantidad es producida por las células tras su cultivo en la suspensión y, por tanto, incluye la cantidad de ingenol-3-angelato obtenido en el sobrenadante, así como la cantidad obtenida a partir de las propias células.
- El término "kg de peso fresco", tal como se usa según la presente invención, se refiere al peso de biomasa presente en el cultivo celular determinado después de la retirada del sobrenadante. Por consiguiente, sólo se mide el peso de las propias células. Preferiblemente, las células se recogen por medio de filtración a vacío y se determina el peso fresco de esta biomasa filtrada a vacío.
- Preferiblemente, la cantidad de ingenol-3-angelato indicada anteriormente es la cantidad combinada determinada llevando a cabo las etapas de filtración a vacío, liofilización de la biomasa, extracción del compuesto y análisis mediante CL/EM o HPLC (en este orden) y la cantidad determinada a partir del sobrenadante.
- En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona y en el que las condiciones del cultivo celular comprenden condiciones de agitación, preferiblemente a aproximadamente 130 rpm, en oscuridad, a una temperatura de aproximadamente 23°C a 27°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C y en el que, opcionalmente, los cultivos

celulares se subcultivan a intervalos regulares, preferiblemente cada 6-8 días; y

(b) recuperar el ingenol, el uno o más ésteres de ingenol y/o el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a), preferiblemente después de un cultivo continuo durante de aproximadamente 12 a 16 días.

En otra realización preferida del método de la invención, el método comprende, además, antes de la etapa (a) una etapa adicional de: (a-0) cultivar explantes de una planta de la familia *Euphorbiaceae* en medio semisólido o sólido, obteniendo de ese modo material de callo friable.

El término "material de callo friable" se refiere a una masa de células sustancialmente indiferenciadas cultivada en un medio sólido o semisólido. Los métodos para la formación de material de callo friable y la propagación del callo se conocen generalmente en la técnica. Métodos no limitantes para obtener un callo incluyen, por ejemplo, esterilización de superficie de material de origen vegetal, por ejemplo, lavando a fondo con agua limpia, usando un desinfectante tal como hipoclorito, usando agentes humectantes tales como Tween o Triton, usando agentes antibióticos y/o usando agentes antifúngicos. La formación del callo puede iniciarse a partir de cualquier parte viable de la planta (denominada también en el presente documento como "explanete de la planta"), preferiblemente de tejido de la raíz, el tallo o la hoja de la planta. El material de origen vegetal puede ser una parte intacta de la planta, o una porción de la misma. Para obtener un callo friable, el material de origen vegetal se coloca en la superficie de un medio solidificado o un medio semisólido, y se incuba en un entorno estéril durante aproximadamente 1-12 semanas, hasta que crezca una masa de células indiferenciadas (el material de callo friable) en proximidad al material de origen vegetal. Después de establecerse el material de callo friable, las células se cultivan en medio de nutrientes líquido según el método de la invención.

Las condiciones de cultivo para la propagación del callo friable, incluyendo componentes de los medios, intervalos de pH, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, macrosales y microsales, vitaminas y reguladores del crecimiento, se conocen bien en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 97/44476. En una realización preferida, la propagación del callo friable comprende usar un agente gelificante. Los agentes gelificantes incluyen, por ejemplo, agar, hidrogeles, gelatina y Gelrite®. Puede usarse carbón vegetal para retirar los residuos y los compuestos orgánicos no deseados.

En una realización particularmente preferida, la propagación del callo friable comprende la iniciación de material de callo friable en medio que comprende vitaminas. En una realización particularmente preferida alternativa, la propagación del callo friable comprende el cultivo de callo friable en medio que comprende una mezcla de clorhidrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina y ácido nicotínico. El medio para la iniciación y propagación del callo friable, para todas las realizaciones de la presente invención, puede ser un medio sólido o un medio semisólido. Preferiblemente, el medio para la iniciación y propagación del callo friable según la presente invención es un medio sólido. Técnicas de subcultivo conocidas en la técnica pueden ser usadas para la transferencia de porciones de callo friable periódicamente en serie a una fuente de nutrientes recién preparada. Preferiblemente, la frecuencia de transferencia de callos es de entre 4 y 6 semanas.

En otra realización preferida del método de la invención, el medio de nutrientes en la etapa (a) se complementa con uno o más compuestos químicos que inducen la ruta biosintética para ingenol y/o ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona.

Compuestos químicos que pueden inducir la ruta biosintética para ingenol y/o ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona incluyen, sin limitación, los elicitores descritos anteriormente. Después de añadirse al medio de cultivo de un cultivo en suspensión de células de *Euphorbiaceae*, estos compuestos confieren un aumento de la concentración de ingenol y/o ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona. Los términos elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento, se usan según la presente invención de manera intercambiable, y ambos se refieren a compuestos de origen biológico (o biótico) y no biológico (o abiótico) que provocan el aumento en el metabolismo secundario descrito anteriormente cuando son añadidos a cultivos de células vegetales. Ejemplos, no limitantes, de microorganismos de uso como elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento incluyen *Botrytis cinerea*, *Phytophthora megasperma*, *Pinellas stripticum*, *Oligosporus sp.*, *Pythium mamillatum*, *Pythium sylvaticum*, *Verticillium dahlia*, *Verticillium sp.*, *Penicillium minioluteum*, *Phytophthora lateralis*, *Cytospora cincta*, *Cytospora leucostoma*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria solani*, *Alternaria cucumerina*, *Botrytis squamosa*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum trifolii*, *Colletotrichum orbiculare*, *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. tritici*, *Geotrichum sp.*, *Leptosphaeria korrae*, *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* y *Venturia inaequalis*.

Ejemplos, no limitantes, de fracciones o productos microbianos de uso como elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento incluyen quitosano, celulicina, liquenano, Multifect XL, glucomanano, Multifect CL, pleurano, resinas, glucano, Pulpzyme, carboximetilglucano, SP431, hidroximetilglucano, pectinol, sulfoetilglucano, rapidasa, manano,

Klerzyme, xilano, quitinasa, manobiosa, manotriosa, manopentaosa y manotetraosa.

Ejemplos, no limitantes, de elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento así como algunas sustancias bioquímicas que se producen de manera natural de uso como elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento incluyen ácido araquidónico, ácido elaídico, AMP cíclico, dibutilil AMP cíclico, jasmonato de metilo, cis-jasmone, miconazol, ácido ferúlico, AMO-1618, Triton X-100, ácido benzoico y derivados, ácido salicílico y derivados, galato de propilo, sesamol, cloruro de clorocolina, 3,4-diclorofenoxitrietil (amina), ácido cloroetilfosfónico, ácido dietilditiocarbámico, ácido nordihidroguaiarético, ditiotreitil, metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, b-amino-DL-fenilalanina, sulfato de vanadilo, uniconazol, paclobutrazol, espermina, espermidina, putrescina, cadavarina, sulfato de protamina, SKF-7997, MER 29, ancimidol, triadimefón, fosfón D, tiourea, sulfato de dextrano, hidroquinona, glutamato de quitosano, fenpropimorfo, procloraz, naptifina, EDU, HTA, MPTA, glutatión, EGTA, giberelinas, ácido abscísico, 1,3-difenil urea, diazolidinil urea, floriglucinol, alginato de sodio y carragenano.

Ejemplos, no limitantes adicionales, de elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento incluyen DCPTA, DIPTA, ACC, brasinoesteroides, BHA, BHT, OTA, pirofosfato de potasio, ácido p-aminohipúrico, pirofosfato de sodio, cinamato de bencilo, uracilo, ácido jasmónico, melatonina, clorhidrato de hidroxilamina, dihidroisojasmone, tionicotinamida, isojasmone, S-adenosil-L-metionina, trifosfato de inosina, tetrahidrojasmone, ácido indol-3-láctico, lactona de cis-jasmone, ácido indol-3-pirúvico, dihidrojasmone, ácido indol-2-carboxílico, jasminolactona, indol-3-aldehído, jasmolactona, N-indolil-acetilvalina, ácido 12-oxofitodienoico, fosfato de piridoxal, jasmonol, dihidrojasmonato de metilo, g-metildecilactona, biperidilo, tiglato de citronelilo, 4-acetamidofenol, acetato de jasmonilo, imidazol, mastoparán, octil-β-D-glucopiranosido, ácido lisofosfatídico, 3-aminopiridina, cipermetrina, ácido guanílico, cantaridina, ácido citidílico, ácido acetilsalicílico, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, ácido 2,6-dicloroisocotínico, ácido 3-(2-hidroxifenil)propiónico, óxido nítrico, ácido traumático, ácido tiobenzoico, ácido cítrico, dimetilaminofenilalanina, ácido citidílico, ácido p-hidroxifenilpirúvico, ácido málico o sal del ácido málico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, malato de potasio, benzoato de etilo, sales y derivados del ácido cítrico, ácido 3,4-dihidroxicinámico, mononucleótido de adenina de flavina, ácido 4-hidroxicinámico, mononucleótido de flavina, N-acetil-L-fenilalanina, ácido 3-benzoilpropiónico, ácido p-hidroxicinámico, ácido 5',5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), ácido β-hidroxipirúvico, ácido 4-hidroxifenilpirúvico, S-adenosilmetionina, cinamato de metilo, fosfato de piridoxal, salicilato de metilo, 6-aminonicotinamida, benzoato de 2-naftilo, 4-dimetilaminopiridina, salicilato de fenilo, N-(2-hidroxietil)succinimida, ácido 2-oxoglutarico, propacloro, tiamina, propionato de vinilo, clorhidrato de trietilamina, ácido 3,5-diisopropilsalicílico, sulfato de adenina, p-amino-L-fenilalanina, salicilato de bencilo, 1,2-bencisoxazol, ácido 2,4-carbonildibenzoico, L-citrulina, 4-fosfato de D-eritrosa, 1,6-difosfato de fructosa, trifosfato de inosina, diclorhidrato de N-metilputrescina, clorhidrato de β-feniletilamina, lisina, ácido guanílico, melatonina, ácido aminociclopropanocarboxílico, pirofosfato de isopentilo, N-acetil-L-glutamina, isoglutamina, treonina, pirofosfato de potasio, pirofosfato de sodio, ácido L-2-aminoadípico, N-metil-N-propagilbencilamina, clorhidrato, hemisulfato de aminoguanidina, ácido L-(+)-2-amino-7-fosfonoheptanoico, sulfamato de amonio, aducto de espermina-bis(óxido nítrico), aducto de dietilamina-bis(óxido nítrico), galactosa, valina, vitamina B-12, ácido ascórbico y derivados, coronatina, fenobarbital, pregnenolona, 24-epi-brasinolida, dihidrojasmonato de n-propilo, jasmonato de propilo y jasmonato de epimetilo.

Ejemplos, no limitantes adicionales, de elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento incluyen xilanas, butacloro, quitooligosacáridos, isotiocianato de butilo, aducto de espermina-bis(óxido nítrico), clorambeno, N,N'-diacetilquitobiosa isopropilamina bis, carbamato de etilo, 2-hidroxietilhidrazina, aducto de óxido nítrico, ácido dihidroglutarico disódico, aducto de dietilamina-bis(óxido nítrico), triptofol, N,N'-diacetil-13-quitobiósido de bencilo, tiourea, ácido siringico, tioacetamida, benzotiadiazol, 2,4,6-triquiorfenol, biperidilo, metocloruro de piridin-2-aldoxima, gosipol y derivados, oxalato de potasio monohidratado, ácido 2-cloro-4-metilisonicotínico, bromhidrato de poli-L-lisina, indometacina, nerol, N,N',N'-triacetilquitotriosa, ácido N-(1-naftil)ftalámico, N,N'-diacetilquitobiosa, oxalato, oxalato de diamonio, clorhidrato de octapomina, nigerano, oxizamida, p-hidroxiacetofenona, 2-metilpirazina, ácido péctico, ácido metoxiacético, lisozima, N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina, óxido nítrico, glutatión (reducido), acetato de lantano, 1,2-diaminopropano, ácido linolénico, 1,3-diaminopropano, lipasa, β-mercaptoetilamina, yodoacetamida, hidroxilamina, 2-hidroxietilhidrazina, desoxiglucosa, dinocap, ácido 2-clorobenzoico, 1,3-difenilurea, 2-metil-1,2-DL-(3-piridil)-1-propano, peróxido de hidrógeno, 5-bromouracilo, hidroperóxido de urea, 7-nitrodiazol, ácido sebácico, 8-hidroxiquinolona, peróxido de benzoílo, ácido acetoamidocinámico, N-metilmaleimida, 2-aminoantraquinona, peróxido de cumeno, ácido N-acetil-L-glutámico, N-acetil-D-glucosamina, agmatina, octil-β-D-glucopiranosido, 3-acetilpiridina, fluorofosfatos de diisopropilo, lactato de butirilo, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, 7-bromo-5-cloro-8-hidroxiquinolona, hidroxietil-β-1,3-glucano, benzoato de bencilo, dextrano, bromoxinilo, amarillo Lucifer, siringaldehído, quitinasa, bacitracina, cianuro de calcio, glucanos, ácido glutámico, morfolina, octametilciclotetrasiloxano, clorhidrato de trigonelina, ácido antranílico, metanosulfonato de colistina, colchicina, 2,4-diclorofenol, L-fenilalanina-2-naftilamida, ácido hidroxiglutarico, y sus sales, ácido DL-2-hidroxi-3-metilbutírico, 1-10-fenantrolina monohidratada, propionato de N-sulfosuccinimidil-3-(4-hidroxifenilo), trans-1,6-difenilhexatrieno, peróxido de hidrógeno de urea, peróxido de hidrógeno, bestatina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, goma gellan, celulasa, ácido pimélico, fosfocloridato de diisopropilo, nitrapirina, hidroperóxido de t-butilo, DL-fosfinotricina amonio, siringato de metilo, trifluralina, tridecanona, mimosina, narigenina, dimetilaminopiridina, 1-bencilimidazol, DL-o-clorofenilalanina, cloruro de cetilpiridinio, hidroquinona y siringomicina. Todos estos compuestos se han descrito, por ejemplo, en el documento EP 1 398 384.

Elicitores, estimulantes y reactivos de potenciamiento preferidos según esta realización de la invención incluyen, sin ser limitantes, ácido salicílico y jasmonato de metilo.

5 En una realización preferida adicional del método de la invención, la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* es una planta del género *Euphorbia*. Más preferiblemente, la planta del género *Euphorbia* es una planta de las especies *Euphorbia peplus*, *Euphorbia lathyris* o *Euphorbia epithymoides*. Lo más preferiblemente, la planta del género *Euphorbia* es una planta de las especies *Euphorbia peplus* o *Euphorbia lathyris*.

10 El ingenol y los ésteres de ingenol se han detectado en diversas partes de plantas que representan miembros del género *Euphorbia*, tal como, por ejemplo, *Euphorbia peplus*, *Euphorbia lathyris*, *Euphorbia antiquorum*, *Euphorbia helioscopia*, *Euphorbia paralias*, *Euphorbia drummondii* y *Euphorbia hirta* [Hohmann *et al.* 2000; Planta Medica: 66, 291-294]. En la actualidad, el ingenol se obtiene de manera más común mediante extracción a partir de semillas de *Euphorbia lathyris*. El ingenol-3-angelato se obtiene de manera más común de *Euphorbia peplus*.

15 En una realización más preferida del método de la invención, el/los compuesto(s) recuperado(s) en (b) es/son ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol. Por tanto, es particularmente preferido que, en aquellos casos en los que la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* sea una planta del género *Euphorbia*, el/los compuesto(s) recuperado(s) en la etapa (b) según el método de la invención sean ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol.

20 Por consiguiente, en una realización preferida, la invención se refiere a un método de producción de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada del género *Euphorbia* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol; y

(b) recuperar el ingenol producido en (a).

30 En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a un método de producción de uno o más ésteres de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada del género *Euphorbia* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más ésteres de ingenol; y

35 (b) recuperar el uno o más ésteres de ingenol producidos en (a).

En otra realización preferida, la invención se refiere a un método de producción de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

40 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia peplus* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol; y

(b) recuperar el ingenol producido en (a).

45 En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a un método de producción de uno o más ésteres de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia peplus* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más ésteres de ingenol; y

50 (b) recuperar el uno o más ésteres de ingenol producidos en (a).

En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un método de producción de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

55 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia lathyris* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol; y

(b) recuperar el ingenol producido en (a).

60 En aún una realización preferida alternativa adicional, la invención se refiere a un método de producción de uno o más ésteres de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

65 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia lathyris* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más ésteres de ingenol; y

(b) recuperar el uno o más ésteres de ingenol producidos en (a).

En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un método de producción de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

5 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia epithymoides* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol; y

(b) recuperar el ingenol producido en (a).

10 En una realización preferida alternativa adicional, la invención se refiere a un método de producción de uno o más ésteres de ingenol, comprendiendo el método las etapas de:

15 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia epithymoides* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más ésteres de ingenol; y

(b) recuperar el uno o más ésteres de ingenol producidos en (a).

20 En otra realización más preferida del método de la invención, el compuesto recuperado en la etapa (b) es ingenol-3-angelato y el medio de nutrientes en la etapa (a) se complementa con ácido angélico.

25 Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, la adición de ácido angélico (ácido 2-metil-2(Z)-butenoico) al medio de nutrientes dio como resultado una producción potenciada de ingenol-3-angelato. Preferiblemente, el ácido angélico se añade al medio de cultivo a una concentración entre 1 μM y 5 mM, más preferiblemente entre 100 μM y 4 mM, tal como, por ejemplo, entre 300 μM y 3 mM, y lo más preferiblemente la concentración añadida al medio de nutrientes es de aproximadamente 0,5 mM. El ácido angélico puede obtenerse comercialmente, por ejemplo, de TCI Deutschland GmbH.

30 Por consiguiente, en una realización preferida, la invención se refiere a un método de producción de ingenol-3-angelato, comprendiendo el método las etapas de:

35 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* en un medio de nutrientes complementado con ácido angélico aproximadamente 0,5 mM en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol-3-angelato; y

(b) recuperar el ingenol-3-angelato producido en (a).

40 En una realización más preferida, la invención se refiere a un método de producción de ingenol-3-angelato, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada del género *Euphorbia* en un medio de nutrientes complementado con ácido angélico aproximadamente 0,5 mM en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol-3-angelato; y

45 (b) recuperar el ingenol-3-angelato producido en (a).

En aún una realización preferida adicional, la invención se refiere a un método de producción de ingenol-3-angelato, comprendiendo el método las etapas de:

50 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia pepplus* en un medio de nutrientes complementado con ácido angélico aproximadamente 0,5 mM en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol-3-angelato; y

(b) recuperar el ingenol-3-angelato producido en (a).

55 En una realización preferida adicional alternativa, la invención se refiere a un método de producción de ingenol-3-angelato, comprendiendo el método las etapas de:

60 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia lathyris* en un medio de nutrientes complementado con ácido angélico aproximadamente 0,5 mM en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol-3-angelato; y

(b) recuperar el ingenol-3-angelato producido en (a).

65 En una realización preferida adicional alternativa, la invención se refiere a un método de producción de ingenol-3-angelato, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Euphorbia epithymoides* en un medio de nutrientes complementado con ácido angélico aproximadamente 0,5 mM en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol-3-angelato; y

5 (b) recuperar el ingenol-3-angelato producido en (a).

En una realización preferida alternativa del método de la invención, la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* es una planta del género *Fontainea* o *Hylandia*. Más preferiblemente, la planta del género *Fontainea* o *Hylandia* es una planta seleccionada del grupo que consiste en *Fontainea picrosperma*, *Fontainea venosa* y *Hylandia dockrillii*.

Tal como se comentó anteriormente en el presente documento, las plantas o las partes vegetales del género *Fontainea* o *Hylandia*, en particular las especies *Fontainea picrosperma*, *Fontainea venosa* o *Hylandia dockrillii*, se usan actualmente como fuente para obtener derivados de tiglian-3-ona.

En una realización más preferida del método de la invención, el/los compuesto(s) recuperado(s) en (b) es/son uno o más derivados de tiglian-3-ona. Por tanto, es particularmente preferido que, en aquellos casos en los que la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* sea una planta del género *Fontainea* o *Hylandia*, el/los compuesto(s) recuperado(s) en la etapa (b) según el método de la invención sea(n) uno o más derivados de tiglian-3-ona.

Por consiguiente, en una realización preferida, la invención se refiere a un método de producción de uno o más derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada del género *Fontainea* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

(b) recuperar el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a un método de producción de uno o más derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada del género *Hylandia* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

(b) recuperar el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

En otra realización preferida, la invención se refiere a un método de producción de uno o más derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Fontainea picrosperma* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

(b) recuperar el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a un método de producción de uno o más derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Fontainea venosa* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

(b) recuperar el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a un método de producción de uno o más derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta de la especie *Hylandia dockrillii* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

(b) recuperar el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).

Es particularmente preferido según estas realizaciones del método de la invención de producción de uno o más

derivados de tiglian-3-ona que el derivado de tiglian-3-ona sea 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (EBC-46).

Además, se describe en el presente documento un cultivo de células vegetales en suspensión, en el que las células son células obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae*, y en el que las células vegetales producen ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona.

Preferiblemente, estos cultivos celulares en suspensión se cultivan/producen/pueden producir/proporcionan según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento.

Las definiciones y la realización preferida proporcionada anteriormente en el presente documento con respecto al método de la invención también se aplican, haciendo los cambios necesarios, a este cultivo celular en suspensión descrito en el presente documento.

Además, se describe en el presente documento una biomasa de células vegetales que comprende células vegetales obtenidas, o que pueden obtenerse, a partir del cultivo celular en suspensión descrito en el presente documento, y que comprende ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona.

De nuevo, todas las definiciones y la realización preferida proporcionada anteriormente en el presente documento con respecto al método de la invención se aplican, haciendo los cambios necesarios, a esta biomasa de células vegetales descrita en el presente documento.

El término "biomasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere al material biológico que compone la masa celular del cultivo en suspensión. En otras palabras, cuando las células del cultivo celular en suspensión se separan del medio líquido, se obtiene la biomasa. El término "biomasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una biomasa recién obtenida, pero también a una biomasa que se ha almacenado, por ejemplo, en forma de biomasa congelada, biomasa criopreservada o polvo liofilizado.

La biomasa, según la divulgación, comprende ingenol, ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona. Por consiguiente, la biomasa descrita en el presente documento representa una fuente valiosa de estos compuestos, que pueden ser aislados de la biomasa.

Además, se describen en el presente documento células criopreservadas de un cultivo de células vegetales en suspensión descrito en el presente documento.

Células criopreservadas pueden prepararse añadiendo, en primer lugar, un crioprotector y, posteriormente, congelando los cultivos en suspensión de células vegetales descritos en el presente documento.

El término "criopreservación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un método de conservación de células de interés enfriándolas hasta temperaturas por debajo de cero. A temperaturas suficientemente bajas, se detienen las actividades enzimáticas y/o químicas que normalmente provocarían daño en las células. La esencia de la criopreservación es efectuar la deshidratación celular y, la concentración del citosol, de una manera controlada y mínimamente perjudicial, de manera que se impide o minimiza la cristalización en el citosol durante el enfriamiento brusco en nitrógeno líquido. Con procedimientos de criopreservación convencionales, las muestras (células y/o tejidos) se equilibran en una disolución que contiene un crioprotector. La suspensión se enfría y se siembra con un cristal de hielo a una temperatura ligeramente por debajo de su punto de congelación. Posteriormente, la suspensión se enfría a una velocidad óptima hasta una temperatura por debajo de cero intermedia (por ejemplo, de -30 a -40°C) antes del enfriamiento brusco en nitrógeno líquido. Durante la formación de hielo en el medio de suspensión, los solutos son excluidos de la matriz de hielo y son concentrados en una fracción no congelada del medio de suspensión.

El término "crioprotector", según la presente divulgación, se refiere a compuestos que son adecuados para proteger las células en las etapas de congelación posteriores. Los crioprotectores funcionan aumentando la concentración de soluto en células. Con el fin de ser biológicamente viables, los crioprotectores deben penetrar fácilmente las células y no deben ser tóxicos para las células. Ejemplos no limitantes de crioprotectores incluyen glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol y glicerol, así como dimetilsulfóxido (DMSO). Preferiblemente, los crioprotectores empleados según la presente divulgación son dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol.

Las definiciones y la realización preferida o los aspectos proporcionados anteriormente en el presente documento, con respecto al método de la invención, así como al cultivo en suspensión y la biomasa de células vegetales descritos en el presente documento, también aplican, haciendo los cambios necesarios, a estas células criopreservadas de un cultivo de células vegetales en suspensión descrito en el presente documento.

Las células de *Euphorbiaceae* criopreservadas que pueden producir ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona según la presente divulgación tienen un nivel alto de restauración de la función celular tras la descongelación de las células vegetales criopreservadas. Preferiblemente, más del 50% de células viables que

pueden producir ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona son recuperadas tras la descongelación de las células *Euphorbiaceae* criopreservadas; más preferiblemente más del 75% de células viables que pueden producir ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona son recuperadas tras la descongelación de las células de *Euphorbiaceae* criopreservadas.

5 Además, se describe en el presente documento, un método descrito en el presente documento para producir ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, en el que las células vegetales para el cultivo en la etapa (a) se obtienen a partir de las células criopreservadas descritas en el presente documento.

10 Según este aspecto, el método descrito en el presente documento de producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona comprende las etapas de:

(A) recuperar (una) célula(s) vegetal(es) viable(s) a partir de las células criopreservadas descritas en el presente documento;

15 (B) propagar las células de la(s) célula(s) viable(s) de (A);

(C) cultivar dichas células obtenidas en (B) en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona; y

20 (D) recuperar el ingenol, el uno o más ésteres de ingenol y/o el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (C).

Según este aspecto del método descrito en el presente documento, las células criopreservadas descritas en el presente documento se descongelan en una primera etapa, recuperando de ese modo células viables que pueden producir ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona.

Con este fin, pueden descongelarse crioviales, que comprenden células de *Euphorbiaceae* criopreservadas que pueden producir ingenol, ésteres de ingenol y derivados de tiglian-3-ona, en un baño de agua u otro entorno de temperatura sostenida a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C. Preferiblemente, las células se descongelan a una temperatura de aproximadamente 45°C en un baño de agua u otro entorno de temperatura sostenida con agitación ocasional o agitación suave durante aproximadamente 90 segundos o hasta que se descongelen las células congeladas.

35 Una vez que las células están descongeladas, las células se transfieren al medio de nutrientes para la propagación celular. Se apreciará que la propagación celular puede ser en forma de un cultivo celular en suspensión, o en forma de callos.

40 Por ejemplo, para preparar material de callo a partir de células descongeladas, la disolución descongelada se lava y la biomasa se separa de la disolución. A continuación, la biomasa lavada se siembra en placa, en un medio de nutrientes, y se incuba en oscuridad hasta que se obtiene el material de callo. Este material de callo puede usarse posteriormente como material de partida para los diversos aspectos descritos en el presente documento.

45 Preferiblemente, el método es de la siguiente manera: la disolución descongelada se vierte en una disolución de lavado de 10 ml, preferiblemente una disolución que comprende sorbitol 0,25 M y $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 M. Tras la incubación, la biomasa se separa de la disolución. Preferiblemente, la incubación se lleva a cabo durante de aproximadamente 5 a 25 minutos, más preferiblemente durante de aproximadamente 10 a 20 minutos, y lo más preferiblemente la incubación se lleva a cabo durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, la biomasa lavada se siembra en placa en medio MS sólido, preferiblemente un medio MS que comprende sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l. A continuación, se incuban las placas en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de varias semanas, se obtiene el material de callo recuperado. Tiempo de recuperación preferente, pero no limitante, según la divulgación, está entre aproximadamente 4 semanas y aproximadamente 16 semanas.

55 Alternativamente, las células descongeladas se transfieren a un medio de nutrientes líquido y se propagan en forma de un cultivo en suspensión.

60 Preferiblemente, se incluye una etapa intermedia durante la propagación en la etapa (B) que incluye evaluar las células recuperadas para la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, con el fin de confirmar que las células recuperadas todavía pueden producir dichos compuestos. Los medios y métodos para determinar la producción de ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona se han descrito anteriormente en el presente documento.

Finalmente, en una última etapa, el ingenol, los ésteres de ingenol y/o los derivados de tiglian-3-ona son recuperados del cultivo celular tal como se describió anteriormente.

65

En un aspecto preferido adicional del método descrito en el presente documento, o del cultivo de células vegetales en suspensión descrito en el presente documento, un kg (peso fresco) de células produce al menos 4,56 mg de ingenol-3-angelato, preferiblemente al menos 6 mg de ingenol-3-angelato, y lo más preferiblemente al menos 7,2 mg de ingenol-3-angelato. Tal como se comentó anteriormente en el presente documento, estas cantidades se refieren a la cantidad producida por dichas células, es decir la cantidad combinada de ingenol-3-angelato obtenida a partir de las células en la biomasa, así como del sobrenadante.

En un aspecto preferido adicional alternativo del método descrito en el presente documento, o del cultivo de células vegetales en suspensión descrito en el presente documento, las células producen ingenol-3-angelato a una concentración de al menos 1,14 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión, más preferiblemente al menos 1,5 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión y lo más preferiblemente al menos 1,8 mg de ingenol-3-angelato por litro de cultivo en suspensión, mientras que en un litro de cultivo en suspensión está presente una cantidad de biomasa (en base de peso fresco) de al menos 150 g en el momento de la recogida de las células. Más preferiblemente, una cantidad de biomasa (en base de peso fresco) de al menos 200 g, y lo más preferiblemente de al menos 250 g por litro de cultivo en suspensión está presente en el momento de la recogida de las células.

Las definiciones y las realizaciones preferidas, o los aspectos, descritos anteriormente en el presente documento se aplican, haciendo los cambios necesarios, a estos aspectos preferidos.

Se apreciará que todas las etapas del método descrito en el presente documento se llevan a cabo en el orden descrito, es decir la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b). Cuando se incluye una etapa (a-0) adicional, esta etapa se lleva a cabo en primer lugar, antes de la etapa (a). En otras palabras, los métodos reivindicados comprenden (o consisten en) una etapa (a) primera y una etapa (b) posterior o, alternativamente, una etapa (a-0) primera, una etapa (a) posterior y una etapa (b) tercera posterior a la etapa (a). Lo mismo se aplica a las etapas (A) a (D) del método de la invención de producción ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona usando células criopreservadas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto medio en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, de la patente.

En cuanto a las realizaciones caracterizadas en esta memoria descriptiva, en particular en las reivindicaciones, se pretende que cada realización mencionada en una reivindicación dependiente se combine con cada realización de cada reivindicación (independiente o dependiente) de la que depende dicha reivindicación dependiente. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación 1 independiente que enumera 3 alternativas A, B y C, una reivindicación 2 dependiente que enumera 3 alternativas D, E y F, y una reivindicación 3 que depende de las reivindicaciones 1 y 2 y que enumera 3 alternativas G, H e I, debe entenderse que la memoria descriptiva da a conocer de manera inequívoca realizaciones correspondientes a las combinaciones A, D, G; A, D, H; A, D, I; A, E, G; A, E, H; A, E, I; A, F, G; A, F, H; A, F, I; B, D, G; B, D, H; B, D, I; B, E, G; B, E, H; B, E, I; B, F, G; B, F, H; B, F, I; C, D, G; C, D, H; C, D, I; C, E, G; C, E, H; C, E, I; C, F, G; C, F, H; C, F, I, a menos que se mencione específicamente lo contrario.

De manera similar, y también en aquellos casos en los que las reivindicaciones independientes y/o dependientes no enumeren alternativas, se entiende que, si las reivindicaciones dependientes se refieren, de nuevo, a una pluralidad de reivindicaciones anteriores, se considera que se da a conocer de manera explícita cualquier combinación del contenido cubierto de ese modo. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación 1 independiente, una reivindicación 2 dependiente que se refiere de nuevo a la reivindicación 1, y una reivindicación 3 dependiente que se refiere de nuevo a ambas reivindicaciones 2 y 1, se deduce que se da a conocer de manera clara e inequívoca la combinación del contenido de las reivindicaciones 3 y 1, así como también la combinación del contenido de las reivindicaciones 3, 2 y 1. En el caso de que esté presente una reivindicación 4 dependiente adicional, que se refiere a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, se deduce que se da a conocer de manera clara e inequívoca la combinación del contenido de las reivindicaciones 4 y 1, de las reivindicaciones 4, 2 y 1, de las reivindicaciones 4, 3 y 1, así como de las reivindicaciones 4, 3, 2 y 1.

Las consideraciones anteriores se aplican, haciendo los cambios necesarios, a todas las reivindicaciones adjuntas. Para dar un ejemplo no limitante, la combinación de las reivindicaciones 8 y 1 está prevista de manera clara e inequívoca en vista de la estructura de la reivindicación. Lo mismo se aplica, por ejemplo, a la combinación de reivindicaciones 8, 1 y 2, u 8, 7 y 1, etc.

Las figuras muestran:

Figura 1: ingenol recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 7 y día 14, respectivamente.

Figura 2: ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 7 y día 14, respectivamente.

Figura 3: relación entre la concentración de ingenol recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de producción complementado con ácido salicílico 30 μ M, y recogido en el día 16, con respecto a la concentración de ingenol recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 16 (100%).

Figura 4: relación entre la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de producción complementado con ácido salicílico 30 μ M, y recogido en el día 16, con respecto a la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 16 (100%).

Figura 5: relación entre la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de producción complementado con jasmonato de metilo (MeJA) 1 μ M, y recogido en el día 16, con respecto a la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 16 (100%).

Figura 6: relación entre la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de producción complementado con ácido angélico 0,5 mM, y recogido en el día 7 y día 14, con respecto a la concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de biomasa de un cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* en medio de crecimiento, y recogido en el día 7 y día 14 (100%).

Figura 7: espectros de UPLC-EM/EM de muestras de biomasa de *Euphorbia peplus* derivadas de cultivo celular en suspensión no embriogénico. Se detectaron dos iones de metabolito secundario (primer gráfico m/z = 295,2 y segundo gráfico m/z = 313,2) obtenidos a partir del ion de ingenol original (m/z = 366,19; $M+NH_4^+$) por encima del nivel de ruido en muestras derivadas de cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* no embriogénico.

Figura 8: espectros de UPLC-EM/EM de muestras de biomasa de *Euphorbia peplus* derivadas de cultivo celular en suspensión no embriogénico. Se detectaron dos iones de metabolito secundario (primer gráfico m/z = 295,3 y segundo gráfico m/z = 313,3) obtenidos a partir del ion del éster de ingenol original ingenol-3-angelato (m/z = 431,35; $M+NH_4^+$) por encima del nivel de ruido en muestras derivadas de cultivo celular en suspensión de *Euphorbia peplus* no embriogénico.

Figura 9: concentración de ingenol-3-angelato recuperado a partir de 1 litro de cultivo en suspensión (que comprende el sobrenadante y 250 g de biomasa) de *Euphorbia peplus* cultivado en medio MS (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l) con y sin complementación con ácido angélico 0,5 mM, y recogido en el día 14. En ausencia de ácido angélico, se detectó una concentración de 1,14 mg de ingenol-3-angelato en 1 litro de cultivo en suspensión, correspondiente a 4,56 mg de ingenol-3-angelato producido por kg (biomasa recién preparada) de células. En presencia de ácido angélico 0,5 mM, se detectó una concentración de 1,8 mg de ingenol-3-angelato en 1 litro de cultivo en suspensión, correspondiente a 7,2 mg de ingenol-3-angelato producido por kg (biomasa recién preparada) de células.

Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: esterilización superficial de material vegetal intacto

Material vegetal intacto de *Euphorbia peplus* (raíces, tallos y hojas) se lavó a fondo con agua del grifo. El material vegetal intacto se cortó en pequeños trozos (explantes de la planta) de aproximadamente 3 - 4 cm. Los explantes de la planta se lavaron con detergente y con agua corriente durante de aproximadamente 10 a 15 minutos. Los explantes se esterilizaron superficialmente sumergiendo los explantes en una disolución de alcohol isopropílico (IPA) al 70% (v/v), que contenía 2-3 gotas de Tween 20, durante 1 minuto (agitado suavemente durante este tiempo). A continuación, los explantes se almacenaron en una disolución de NaOCl (2,8 g/100 ml de hipoclorito de sodio) durante de 15 a 30 minutos dependiendo de la parte de la planta. Posteriormente, los explantes se enjuagaron brevemente con agua destilada estéril, de 3 a 4 veces, para retirar todas las trazas de agentes esterilizantes. Después de la desinfección superficial, los explantes se mantuvieron en placas de Petri cubiertas en la cabina de flujo laminar, hasta que estuvieran listas para el procesado, para evitar la deshidratación. Antes de que los explantes se colocaran en el medio de cultivo sólido, se retiraron con un bisturí estéril los extremos cortados de los explantes y los explantes se cortaron en trozos más pequeños de un tamaño apropiado (0,25 - 0,5 cm).

Ejemplo 2: inducción de callo friable en medio sólido

Explantes de planta se colocaron en medios basales sólidos modificados de Murashige y Skoog (sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con bencilaminopurina (BAP) 0,5 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 0,5 mg/l). Los cultivos se incubaron en oscuridad en una incubadora mantenida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 4-6 semanas, se obtuvo material de callo primario. El material de callo primario se retiró del explante y se transfirió a medio sólido fresco. La frecuencia de transferencia de los callos dependió de la tasa de crecimiento y osciló entre 4-8 semanas. Los explantes de la planta obtenidos fueron explantes de *Euphorbia peplus* preparados según el ejemplo 1.

Ejemplo 3: iniciación de cultivos en suspensión de *E. peplus*

Para la iniciación de cultivos en suspensión, se transfirió material de callo friable (aproximadamente 40-60 g/l) a medio MS (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos en suspensión se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de cultivo en un agitador rotatorio a 130 rpm en oscuridad. La temperatura de cultivo fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Dependiendo del crecimiento celular, las suspensiones de *E. peplus* se transfirieron después de entre 6-14 días, mediante inoculación de 40-60 g/l de biomasa en medio de cultivo recién preparado, tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 4: mantenimiento de cultivos en suspensión de *E. peplus*

El mantenimiento de cultivos en suspensión de *E. peplus* se realizó semanalmente transfiriendo 40-60 g/l de biomasa filtrada a vacío a medio MS recién preparado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido. Finalmente, las células se cultivaron en la oscuridad a 130 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ejemplo 5: extracción de biomasa de *E. peplus*

Se enfrió bruscamente biomasa de *E. peplus* (o bien material de callo o bien biomasa de las suspensiones filtrada a vacío) con nitrógeno líquido directamente después del muestreo para detener la actividad metabólica. A continuación, se liofilizaron las muestras de biomasa. Para producir un extracto, se pesaron muestras de biomasa liofilizada y se añadió aproximadamente 15-20 veces tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Las células se rompieron durante 90 s en un molino de perlas (2 perlas) y esta mezcla se centrifugó posteriormente durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior.

Ejemplo 6: extracción de suspensión de *E. peplus*

Se liofilizó una muestra de un cultivo en suspensión de *E. peplus* y posteriormente se pesó. El liofilizado se volvió a suspender en 15-20 veces el volumen de tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Esta mezcla se homogeneizó durante 90 s en un molino de perlas (usando dos perlas) y posteriormente se centrifugó durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior. El cultivo en suspensión liofilizado contiene, tanto el sobrenadante, como la biomasa. Por consiguiente, se midió mediante este enfoque, la concentración combinada de compuestos liberados en el sobrenadante y de compuestos presentes dentro de las células. Tal como se muestra en la figura 9, se detectó una concentración de 1,14 mg de ingenol-3-angelato en 1 litro de cultivo en suspensión, correspondiente a 4,56 mg de ingenol-3-angelato por kg de biomasa recién preparada. En presencia de ácido angélico 0,5 mM adicional, se detectó una concentración incluso mayor de 1,8 mg de ingenol-3-angelato en 1 litro de cultivo en suspensión, correspondiente a 7,2 mg de ingenol-3-angelato por kg de biomasa recién preparada.

Ejemplo 7: criopreservación y descongelación

Se transfirió una muestra de biomasa de *E. peplus* filtrada a vacío de 7 días a medio MS modificado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 5%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Después de 7 días se transfirieron aproximadamente 0,5 g de células filtradas a vacío a 1,5 ml de una disolución de sacarosa 1 M que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5 M y glicerol 0,5 M como crioprotectores y se almacenaron durante 60 min en hielo. A continuación, se enfriaron los viales en un congelador de baja temperatura (al menos -70°C) hasta -40°C mediante el uso del recipiente de congelación Mr. Frosty™ de Nalgene® (velocidad de enfriamiento: -1°C por minuto) y a continuación se almacenaron los viales durante 8 días en nitrógeno líquido.

Para el procedimiento de descongelación, los viales se sumergieron en un baño de agua (45°C) durante aproximadamente 90 s. La disolución descongelada se vertió en 10 ml de disolución de lavado que contenía sorbitol 0,25 M y $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,0025 M. Después de 10 min, la biomasa se separó de la disolución y se sembró en placa en medio MS sólido (sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). A continuación, se incubaron las placas en oscuridad en una incubadora mantenida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 4-6 semanas, se obtuvo material de callo recuperado. Los experimentos descritos en el presente documento para células recién preparadas se repitieron con estas células criopreservadas y descongeladas y se confirmó la capacidad de las células descongeladas para producir los compuestos de interés según la presente invención.

Ejemplo 8: expresión de ingenol e ingenol-3-angelato en cultivo en suspensión

Se inocularon cultivos en suspensión con aproximadamente 50 g de biomasa (peso fresco)/l y se cultivaron en medio MS (sales basales de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos en suspensión se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de cultivo en un agitador rotatorio a 130 rpm en oscuridad. La temperatura de cultivo fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se recogió biomasa de *Euphorbia peplus* en los días 7 y 14 y se determinaron las concentraciones de ingenol (véase la figura 1) y de ingenol-3-angelato (véase la figura 2) después de la recuperación.

Ejemplo 9: alimentación de precursor con ácido angélico

Se logró un aumento de ingenol-3-angelato adicional usando ácido angélico como precursor. Un cultivo en suspensión de *E. peplus*, recién transferido o, de hasta 14 días, se complementó con ácido angélico 0,5 mM. Después de la adición, no se observó influencia sobre el crecimiento celular. Se usó la misma cantidad de agua estéril como control negativo. Después de la adición de ácido angélico, el cultivo se cultivó durante 7-14 días (véase la figura 6).

Ejemplo 10: inducción de ingenol y ingenol-3-angelato con ácido salicílico

Para inducir la expresión de ingenol y de ingenol-3-angelato, se usó ácido salicílico como elicitor. Un cultivo en suspensión de 7 días de *E. peplus* (50 ml) se complementó con ácido salicílico 30 μ M. Para los respectivos controles negativos, se usó la misma cantidad de agua estéril. Después de la inducción, el cultivo se cultivó adicionalmente durante 9 días, dando como resultado un tiempo de cultivo total hasta la recogida de 16 días (ingenol: véase la figura 3 e ingenol-3-angelato: véase la figura 4).

Ejemplo 11: inducción de ingenol-3-angelato con jasmonato de metilo

Para inducir la expresión ingenol-3-angelato, se usó jasmonato de metilo como elicitor. Un cultivo en suspensión de 7 días de *E. peplus* (50 ml) se complementó con jasmonato de metilo 1 μ M. Para los respectivos controles negativos, se usó la misma cantidad de agua estéril. Después de la inducción, el cultivo se cultivó adicionalmente durante 9 días, dando como resultado un tiempo de cultivo total hasta la recogida de 16 días (véase la figura 5).

Ejemplo 12: análisis de ingenoles - ingenol

Se usó el siguiente método para la detección de ingenol:

Columna:	C18, Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1x50 mm; 1,7 μ						
Cromatógrafo:	UPLC, Waters Acquity UPLC, con bomba binaria						
Disolvente:	A: tampón de acetato de amonio 10 mmol + ácido fórmico al 0,1% B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%						
Gradiente:	Tiempo (min):	0,00	1,50	2,00	3,00	3,10	5,00
	% de disolvente A:	34	34	0	0	34	34
	% de disolvente B:	66	66	100	100	66	66
Tiempo de ejecución:	5,00 min						
Caudal:	0,4 ml/min						
Volumen de inyección:	4 μ l						
Tiempo de retención:	aproximadamente 0,40 min (ingenol)						
Detector:	Espectrómetro de masas, Waters Quattro Premier						
Detección:	ESI+						
	(continuación)						
Identificación:	ingenol m/z = 366,19 -> 295,2 / 366,19 -> 313,2						
Condiciones:	Tensión del capilar:	1,0 kV					
	Tensión de cono:	15 V					
	Temp. fuente:	150°C					
	Temp. desolvatación:	400°C					
	Gas de desolvatación:	800 l/h					
	Gas de cono:	50 l/h					

Aplicando estas condiciones a los extractos celulares descritos, por ejemplo, en el ejemplo 6, se identificó ingenol de manera clara en la muestra (véase la figura 7) por comparación con un material de referencia.

Ejemplo 13: análisis de ingenoles - ingenol-3-angelato

Se usó el siguiente método para la detección de ingenol-3-angelato:

Columna:	C18, Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1x50 mm; 1,7 μ						
Cromatógrafo:	UPLC, Waters Acquity UPLC, con bomba binaria						
Disolvente:	A: tampón de acetato de amonio 10 mmol + ácido fórmico al 0,1% B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%						
Gradiente:	Tiempo (min):	0,00	1,50	2,00	3,00	3,10	5,00
	% de disolvente A:	34	34	0	0	34	34
	% de disolvente B:	66	66	100	100	66	66
Tiempo de ejecución:	5,00 min						

ES 2 770 769 T3

Caudal:	0,4 ml/min	
Volumen de inyección:	4 µl	
Tiempo de retención:	aproximadamente 0,88 min (ingenol-3-angelato)	
Detector:	Espectrómetro de masas, Waters Quattro Premier	
Detección:	ESI+	
Identificación:	Ingenol-3-angelato m/z = 431,35 -> 295,3 / 431,35 -> 313,3	
Condiciones:	Tensión del capilar:	1,0 kV
	Tensión de cono:	15 V
	Temp. fuente:	150°C
	Temp. desolvatación:	400°C
	Gas de desolvatación:	800 l/h
	Gas de cono:	50 l/h

Aplicando estas condiciones a los extractos celulares descritos, por ejemplo, en el ejemplo 6, se identificó ingenol-3-angelato de manera clara en la muestra (véase la figura 8) por comparación con un material de referencia.

5 Ejemplo 14: materiales

Se obtuvieron los siguientes materiales de los siguientes proveedores:

Material	Proveedor
Medio MS	PhytoTechnology Laboratories
Jasmonato de metilo	Bedoukian
Ácido salicílico	Sigma Aldrich
Ácido angélico	TCI GmbH
Bencilaminopurina	Sigma Aldrich
Ácido diclorofenoxiacético	Duchefa Biochemie
Sacarosa	Riedel-de Haën
Strata-X (1 ml)	Phenomenex
Acetato de amonio	Fluka
Etanol	Merck
Hipoclorito de sodio	Merck
Alcohol isopropílico	Merck
Tween 20	Sigma Aldrich
(continuación)	
Material	Proveedor
Gelrite®	Duchefa Biochemie
Dimetilsulfóxido	Sigma Aldrich
Glicerol	Sigma Aldrich
Nitrógeno líquido	Air Liquide
Sorbitol	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio	Merck
SEFAR Nitex 90 µM	Sefar AG
Sepabeads® SP-207	Resindion S.R.L.
Amberlite XAD	Sigma Aldrich
Diaion HP-20	Sigma Aldrich
Ácido acético glacial	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Acetona	Th. Geyer GmbH & Co. KG

Ejemplo 15: extracción de sobrenadante de *E. peplus*

El sobrenadante se separó de la biomasa por medio de filtración a vacío y posteriormente se liofilizó. Las muestras liofilizadas volvieron a suspenderse en 15-20 veces el volumen de tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Esta mezcla se homogeneizó durante 90 s en un molino de perlas (usando dos perlas) y posteriormente se centrifugó durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior. Se confirmó la presencia de ingenol-3-angelato e ingenol en el sobrenadante y se determinaron las concentraciones respectivas en experimentos repetidos.

Ejemplo 16: recuperación de ingenol de cultivos en suspensión de *E. peplus* mediante adsorción a resina

La recuperación de ingenol de cultivos celulares en suspensión de *Euphorbia peplus* que producen ingenol se logró mediante el uso de resinas adsorbentes. Con el fin de recuperar el ingenol, se añadieron 2 ml de resina estéril (por ejemplo, Sepabeads SP207 o Amberlite XAD1180N o Diaion HP-20), 3 ml de etanol y 150 µl de ácido acético a 30 ml de un cultivo en suspensión de 14 días de *E. peplus* que se hizo crecer en condiciones de crecimiento. Para simplificar la separación de la resina, fue incorporada en una bolsa de tejido SEFAR. Se evaluó la recogida de las bolsas de resina después de 5 h, 24 h, 48 h y 120 h de agitación en la suspensión a temperatura ambiente y se confirmó que podía recuperarse ingenol en todo momento, obteniéndose las cantidades más altas después de 120 h de agitación. Posteriormente, las bolsas de resina se separaron del caldo de suspensión celular y se lavaron a fondo tres veces con agua desionizada. En un ejemplo, se desorbieron dos ml de resina (1 volumen de lecho, BV) con 8 - 10 ml (4 - 5 BV) de disolvente orgánico como, por ejemplo, acetona o alcohol, con y sin acidificación adicional. En un ejemplo, se desorbió la resina con 10 ml de etanol puro acidificado con 500 µl de ácido acético glacial durante 30 min. Se detectó el contenido de ingenol recuperado en el sobrenadante después de su separación de la resina y fue cuantificado con CL/EM tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 17: recuperación de ingenol-3-angelato de cultivos en suspensión de *E. peplus* mediante adsorción a resina

La recuperación de ingenol-3-angelato de cultivos celulares en suspensión de *Euphorbia peplus* que producen ingenol-3-angelato se logró mediante el uso de resinas adsorbentes. Con el fin de recuperar el ingenol-3-angelato, se añadieron 2 ml de resina estéril (por ejemplo, Sepabeads SP207 o Amberlite XAD1180N o Diaion HP-20), 3 ml de etanol y 150 µl de ácido acético a 30 ml de un cultivo en suspensión de 14 días de *E. peplus* que se hizo crecer en condiciones de crecimiento. Para simplificar la separación de la resina, fue incorporada en una bolsa de tejido SEFAR. Se evaluó la recogida de las bolsas de resina después de 5 h, 24 h, 48 h y 120 h de agitación en la suspensión a temperatura ambiente y se confirmó que podía recuperarse ingenol-3-angelato en todo momento, obteniéndose las cantidades más altas después de 120 h de agitación. Posteriormente, las bolsas de resina se separaron del caldo y se lavaron a fondo tres veces con agua desionizada. En un ejemplo, se desorbieron dos ml de resina (1 volumen de lecho, BV) con 8 - 10 ml (4 - 5 BV) de disolvente orgánico como, por ejemplo, acetona o alcohol, con y sin acidificación adicional. En un ejemplo, se desorbió la resina con 10 ml etanol puro acidificado con 500 µl de ácido acético glacial durante 30 min. Se detectó el contenido de ingenol-3-angelato recuperado en el sobrenadante después de su separación de la resina y fue cuantificado con CL/EM tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 18: recuperación *in situ* de ingenol de cultivos en suspensión de *E. peplus* mediante adsorción a resina

Para la recuperación *in situ* de ingenol se usó una resina adsorbente. Se inoculó medio MS recién preparado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l) con 40-60 g/l de biomasa de *E. peplus* filtrada a vacío. Los cultivos se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido. Se añadieron dos ml de una resina estéril (por ejemplo, Sepabeads SP207 o Amberlite XAD1180N o Diaion HP-20), incorporada en una bolsa de tejido SEFAR, directamente al cultivo inoculado. Se cultivó el cultivo celular en suspensión viable en oscuridad a 130 rpm durante 14 días a 25°C ± 2°C, en presencia de la bolsa de tejido SEFAR que contenía resina. A continuación, se separó la bolsa de resina del caldo de suspensión celular y fue lavada a fondo tres veces con agua desionizada. En un ejemplo, se desorbieron dos ml de resina (1 volumen de lecho, BV) con 8 - 10 ml (4 - 5 BV) de disolvente orgánico como, por ejemplo, acetona o alcohol, con y sin acidificación adicional. En un ejemplo, se desorbió la resina con 10 ml de etanol puro acidificado con 500 µl de ácido acético glacial durante 30 min. Se detectó el contenido de ingenol recuperado en el sobrenadante después de su separación de la resina y fue cuantificado con CL/EM tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 19: recuperación *in situ* de ingenol-3-angelato de cultivos en suspensión de *E. peplus* mediante adsorción a resina

Para la recuperación *in situ* de ingenol-3-angelato se usó una resina adsorbente. Se inoculó medio MS recién preparado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l) con 40-60 g/l de biomasa de *E. peplus* filtrada a vacío. Los cultivos se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que

5 contenían 50 ml de medio líquido. Se añadieron dos ml de una resina estéril (por ejemplo, Sepabeads SP207 o Amberlite XAD1180N o Diaion HP-20), incorporada en una bolsa de tejido SEFAR, directamente al cultivo inoculado recién preparado. Se cultivó el cultivo celular en suspensión viable en oscuridad a 130 rpm durante 14 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en presencia de la bolsa de tejido SEFAR que contenía la resina. A continuación, se separó la bolsa de resina del caldo de suspensión celular y fue lavada a fondo tres veces con agua desionizada. En un ejemplo, se desorbieron dos ml de resina (1 volumen de lecho, BV) con 8 - 10 ml (4 - 5 BV) de disolvente orgánico como, por ejemplo, acetona o alcohol, con y sin acidificación adicional. En un ejemplo, se desorbió la resina con 10 ml de etanol puro acidificado con 500 μl de ácido acético glacial durante 30 min. Se detectó el contenido de ingenol-3-angelato recuperado en el sobrenadante después de su separación de la resina y fue cuantificado con CL/EM tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 20: esterilización superficial de semillas de *Euphorbia lathyris*

15 Semillas de *Euphorbia lathyris* se lavaron a fondo con agua del grifo. Las semillas se lavaron con detergente y con agua corriente durante de aproximadamente 10 a 15 minutos. Los explantes se esterilizaron superficialmente sumergiendo las semillas en una disolución de alcohol isopropílico (IPA) al 70% (v/v), que contenía 2-3 gotas de Tween 20, durante 1 minuto (agitado suavemente durante este tiempo). A continuación, las semillas se almacenaron en una disolución de NaOCl (2,8 g/100 ml de hipoclorito de sodio) durante 30 minutos. Posteriormente, las semillas se enjuagaron brevemente con agua destilada estéril 3 a 4 veces, para retirar todas las trazas de agentes esterilizantes. Después de la desinfección superficial, las semillas se mantuvieron en placas de Petri cubiertas en la cabina de flujo laminar, hasta que estuvieron listas para el procesado, para evitar la deshidratación. A continuación, las semillas se colocaron en medio sólido para la generación de callo.

Ejemplo 21: inducción de callo friable de *Euphorbia lathyris* en medio sólido

25 Se cortaron semillas estériles y se colocaron en medios basales sólidos modificados de Murashige y Skoog (sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). A continuación, los cultivos se incubaron en oscuridad en una incubadora mantenida a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de 4-6 semanas, se obtuvo material de callo primario. El material de callo primario se retiró de la semilla y se transfirió a medio sólido fresco. La frecuencia de transferencia de callos dependió de la tasa de crecimiento y osciló entre 4-8 semanas.

Ejemplo 22: iniciación de cultivos en suspensión de *E. lathyris*

35 Para la iniciación de cultivos en suspensión, se transfirió material de callo friable (aproximadamente 40-60 g/l) a medio MS (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos en suspensión crecieron en agregados celulares más grandes y se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de cultivo en un agitador rotatorio a 130 rpm en oscuridad. La temperatura de cultivo fue de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Dependiendo del crecimiento celular, se transfirieron las suspensiones de *E. lathyris* en un intervalo de 6-14 días inoculando 40-60 g/l de biomasa en medio de cultivo fresco tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 23: mantenimiento de cultivos en suspensión de *E. lathyris*

45 El mantenimiento de cultivos en suspensión de *E. lathyris* se realizó semanalmente transfiriendo 40-60 g/l de biomasa filtrada a vacío a medio MS recién preparado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido. Finalmente, las células se cultivaron en oscuridad a 130 rpm a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Ejemplo 24: extracción de biomasa de *E. lathyris*

50 Se enfrió bruscamente biomasa de *E. lathyris* (o bien material de callo o bien biomasa de las suspensiones filtrada a vacío) con nitrógeno líquido directamente después del muestreo para detener la actividad metabólica. A continuación, se liofilizaron las muestras de biomasa. Para producir un extracto, se pesaron muestras de biomasa liofilizada y se añadió aproximadamente 15-20 veces tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Las células se rompieron durante 90 s en un molino de perlas (2 perlas) y esta mezcla se centrifugó posteriormente durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior.

Ejemplo 25: extracción de sobrenadante de *E. lathyris*

60 Sobrenadante fue separado de la biomasa por medio de filtración a vacío y se liofilizó. El liofilizado volvió a suspenderse en 15-20 veces el volumen de tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Esta mezcla se homogeneizó durante 90 s en un molino de perlas (usando dos perlas) y se centrifugó posteriormente durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior.

65 La extracción de las suspensiones también puede llevarse a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 6 anterior.

La presencia de ingenol-3-angelato e ingenol se confirmó en diversas muestras y se determinaron las concentraciones respectivas en experimentos repetidos.

Ejemplo 26: esterilización superficial de semillas de *Euphorbia epithymoides*

semillas de *Euphorbia epithymoides* se lavaron a fondo con agua del grifo. Las semillas se lavaron con detergente y con agua corriente durante de aproximadamente 10 a 15 minutos. Los explantes se esterilizaron superficialmente sumergiendo las semillas en una disolución de alcohol isopropílico (IPA) al 70% (v/v), que contenía 2-3 gotas de Tween 20, durante 1 minuto (agitado suavemente durante este tiempo). A continuación, las semillas se almacenaron en una disolución de NaOCl (2,8 g/100 ml de hipoclorito de sodio) durante 30 minutos. Posteriormente, las semillas se enjuagaron brevemente con agua destilada estéril 3 a 4 veces para retirar todas las trazas de agentes esterilizantes. Después de la desinfección superficial, las semillas se mantuvieron en placas de Petri cubiertas en la cabina de flujo laminar, hasta que estuvieran listas para el procesado, para evitar la deshidratación. A continuación, las semillas se colocaron en medio sólido para la generación de callo.

Ejemplo 27: inducción de callo friable de *Euphorbia epithymoides* en medio sólido

Se cortaron semillas estériles y se colocaron en medios basales sólidos modificados de Murashige y Skoog (sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). A continuación, los cultivos se incubaron en oscuridad en una incubadora mantenida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 4-6 semanas, se obtuvo material de callo primario. El material de callo primario se retiró de la semilla y se transfirió a medio sólido fresco. La frecuencia de transferencia de callos dependió de la tasa de crecimiento y osciló de entre 4-8 semanas.

Ejemplo 28: iniciación de cultivos en suspensión de *Euphorbia epithymoides*

Para la iniciación de cultivos en suspensión, se transfirió material de callo friable (aproximadamente 40-60 g/l) a medio MS (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos en suspensión se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de cultivo en un agitador rotatorio a 130 rpm en oscuridad. La temperatura de cultivo fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Dependiendo del crecimiento celular, se transfirieron las suspensiones de *Euphorbia epithymoides* en un intervalo de 6-14 días inoculando 40-60 g/l de biomasa en medio de cultivo fresco tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 29: mantenimiento de cultivos en suspensión de *Euphorbia epithymoides*

El mantenimiento de cultivos en suspensión de *Euphorbia epithymoides* se realizó semanalmente transfiriendo 40-60 g/l de biomasa, filtrada a vacío, a medio MS recién preparado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Los cultivos se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido. Finalmente, las células se cultivaron en oscuridad a 130 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ejemplo 30: criopreservación y descongelación de *Euphorbia epithymoides*

Se transfirió una muestra de biomasa de *Euphorbia epithymoides* filtrada a vacío de 7 días a medio MS modificado (sal basal de fuerza completa, sacarosa al 5%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). Después de 7 días se transfirieron aproximadamente 0,5 g de células filtradas a vacío a 1,5 ml de una disolución de sacarosa 1 M que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5 M y glicerol 0,5 M como crioprotectores y se almacenaron durante 60 min en hielo. A continuación, se enfriaron los viales en un congelador de baja temperatura (al menos -70°C) hasta -40°C mediante el uso del recipiente de congelación Mr. Frosty™ de Nalgene® (velocidad de enfriamiento: -1°C por minuto) y a continuación se almacenaron los viales durante 8 días en nitrógeno líquido.

Para el procedimiento de descongelación, los viales se sumergieron en un baño de agua (45°C) durante aproximadamente 90 s. La disolución descongelada se vertió en 10 ml de disolución de lavado que contenía sorbitol 0,25 M y $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,0025 M. Después de 10 min, la biomasa se separó de la disolución y se sembró en placa en medio MS sólido (sal basal MS de fuerza media, sacarosa al 2%, complementado con BAP 0,5 mg/l y 2,4-D 0,5 mg/l). A continuación, se incubaron las placas en oscuridad en una incubadora mantenida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 4-6 semanas, se obtuvo material de callo recuperado. El material de callo puede usarse para la iniciación de cultivos celulares en suspensión y posteriormente puede lograrse la producción y la recuperación de ingenol y/o ingenol-3-angelato tal como se describió previamente.

Ejemplo 31: extracción de biomasa de *Euphorbia epithymoides*

Se enfrió bruscamente biomasa de *Euphorbia epithymoides* (o bien material de callo o bien biomasa filtrada a vacío de las suspensiones) con nitrógeno líquido directamente después del muestreo para detener la actividad metabólica. A continuación, se liofilizaron las muestras de biomasa. Para producir un extracto, se pesaron muestras de biomasa liofilizada y se añadió aproximadamente 15-20 veces tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Las células se rompieron durante 90 s en un molino de perlas (2 perlas) y esta mezcla se centrifugó posteriormente durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior.

Ejemplo 32: extracción de sobrenadante de *Euphorbia epithymoides*

5 El sobrenadante se separa de la biomasa por medio de filtración a vacío y se liofiliza. El liofilizado volvió a suspenderse en 15-20 veces el volumen de tampón con 80% de etanol y 20% de acetato de amonio a pH 1,5. Esta mezcla se homogeneizó durante 90 s en un molino de perlas (usando dos perlas) y se centrifugó posteriormente durante 10 min (14.000 rpm) para recibir el extracto en bruto que se usó para análisis posterior.

10 La extracción de las suspensiones también puede llevarse a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 6 anterior.

Ejemplo 33: análisis de ésteres de ingenol

Se usó el siguiente método para la detección de ingenol-3-mebutato:

Columna:	C18, como, por ejemplo, Phenomenex Synergi 4 µm Hydro-RP 80A, 4,6 x 250 mm	
Cromatógrafo:	HPLC, como, por ejemplo, serie Agilent 1200, con bomba binaria	
Disolvente:	A: agua desionizada B: acetonitrilo	
Mezcla de disolventes:	% de disolvente A:	34
	% de disolvente B:	66
Tiempo de ejecución:	6,00 min	
Caudal:	2 ml/min	
Volumen de inyección:	20 µl	
Tiempo de retención:	ingenol-5-angelato	→ aproximadamente 3,29 min
	ingenol-20-angelato	→ aproximadamente 4,42 min
	ingenol-3-tiglato	→ aproximadamente 4,67 min
	ingenol-3-angelato	→ aproximadamente 5,26 min
Detector:	Detector de red de diodos, como, por ejemplo, serie Agilent DAD 1200	
Longitud de onda:	225 nm	

15 La aplicación de estas condiciones a los extractos celulares descritos permite la detección de ésteres de ingenol. Mientras que los ésteres de ingenol enumerados anteriormente, ingenol-5-angelato, ingenol-20-angelato e ingenol-3-tiglato, fueron identificados en cultivo de células vegetales derivados de extractos celulares mediante sus tiempos de retención, el ingenol-3-angelato se caracterizó e identificó adicionalmente por comparación con un material de referencia.

20

REIVINDICACIONES

1. Método para producir ingenol, ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) cultivar células vegetales obtenidas a partir de una planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* en un medio de nutrientes en un cultivo celular en suspensión, en el que las células producen ingenol, uno o más ésteres de ingenol y/o uno o más derivados de tiglian-3-ona; y
- 10 (b) recuperar el ingenol, el uno o más ésteres de ingenol y/o el uno o más derivados de tiglian-3-ona producidos en (a).
2. Método según la reivindicación 1, que comprende, además, antes de la etapa (a) una etapa adicional de:
- 15 (a-0) cultivar explantes de una planta de la familia *Euphorbiaceae* en medio, obteniendo de ese modo material de callo friable.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el medio de nutrientes en la etapa (a) se complementa con uno o más compuestos químicos que inducen la ruta biosintética de ingenol y/o ésteres de ingenol y/o derivados de tiglian-3-ona.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* es del género *Euphorbia*, preferiblemente de las especies *Euphorbia peplus*, *Euphorbia lathyris* o *Euphorbia epithymoides*.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que ingenol y/o uno o más ésteres de ingenol se recuperan en (b).
6. Método según la reivindicación 5, en el que el compuesto recuperado en la etapa (b) es ingenol-3-angelato y en el que el medio de nutrientes en la etapa (a) se complementa con ácido angélico.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta seleccionada de la familia *Euphorbiaceae* es del género *Fontainea* o *Hylandia*, preferiblemente de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Fontainea picrosperma*, *Fontainea venosa* e *Hylandia dockrillii*.
- 35 8. Método según la reivindicación 7, en el que uno o más derivados de tiglian-3-ona se recuperan en (b).

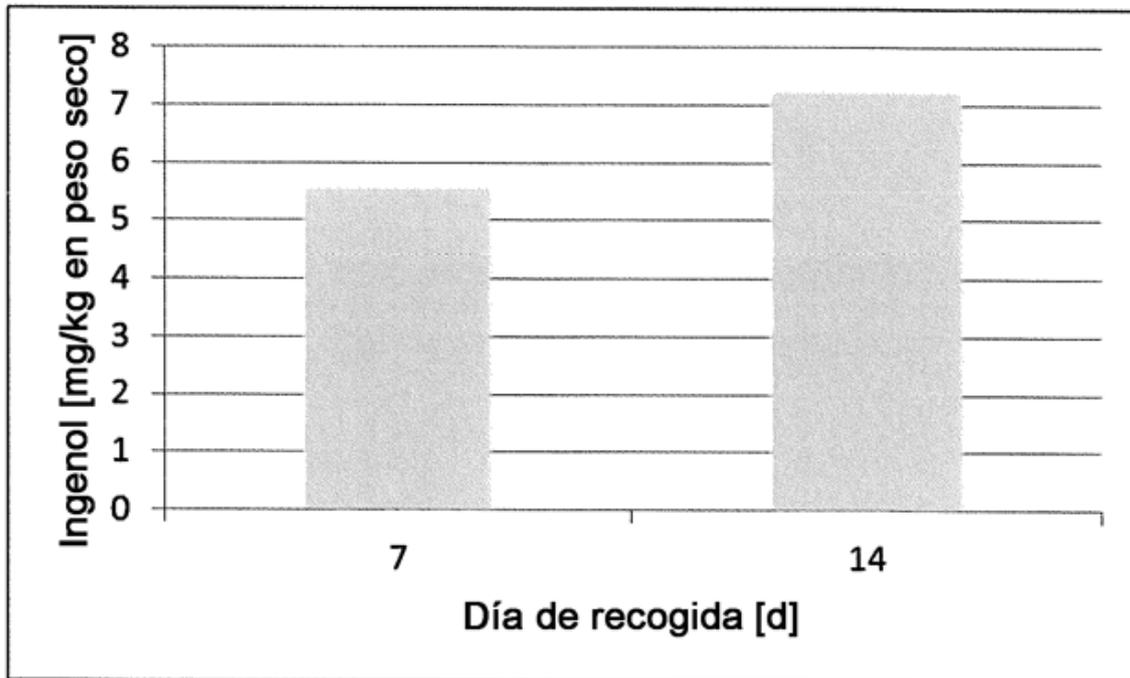


Figura 1

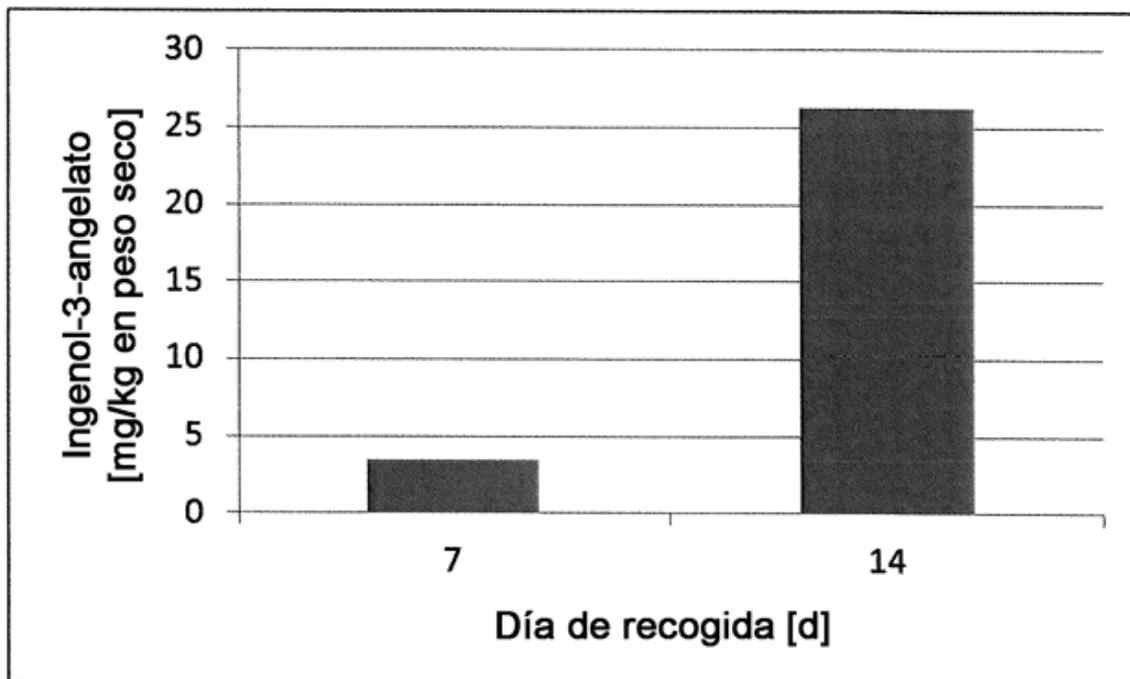


Figura 2

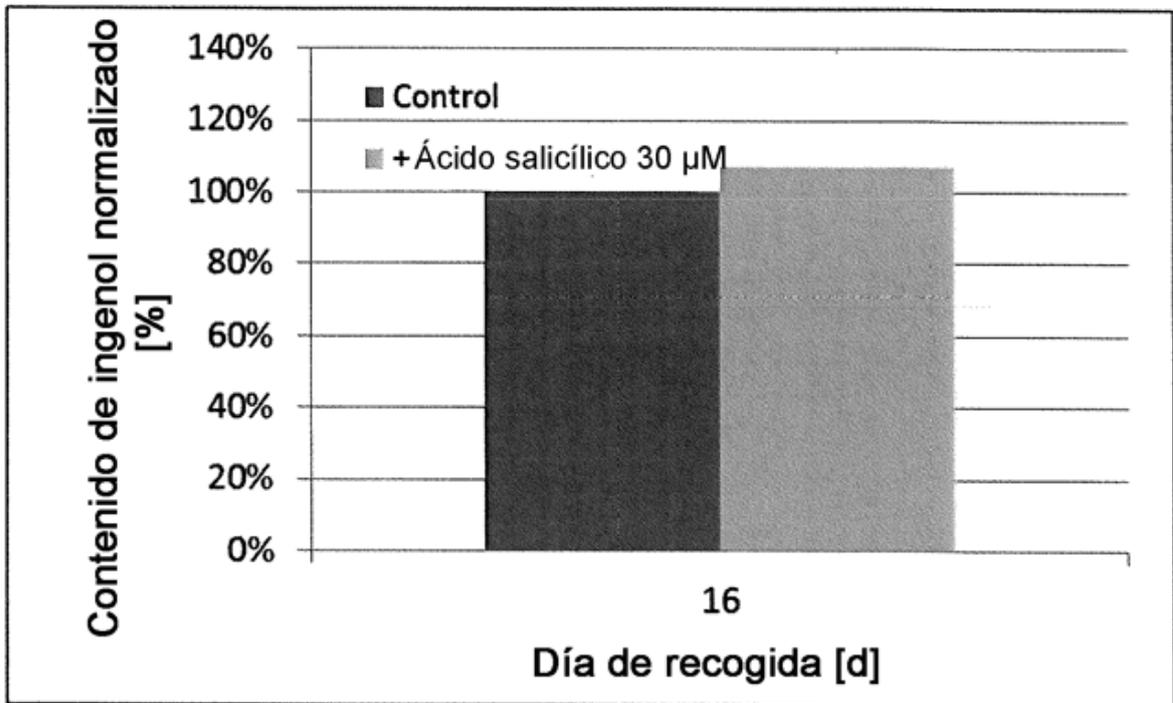


Figura 3

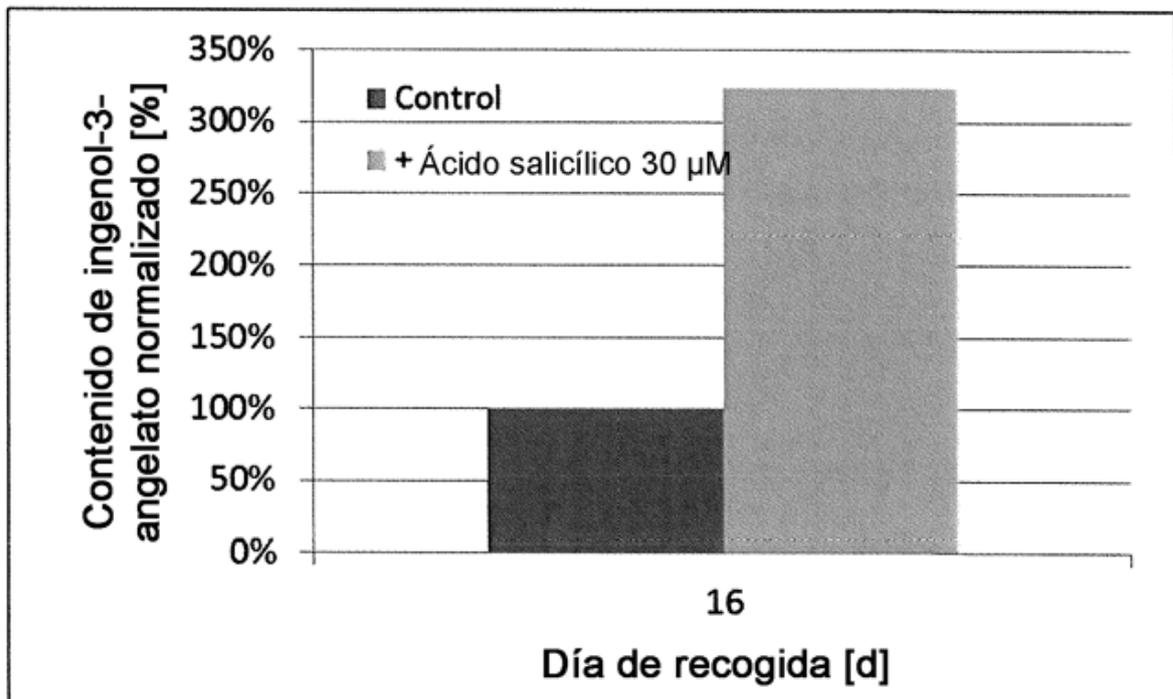


Figura 4

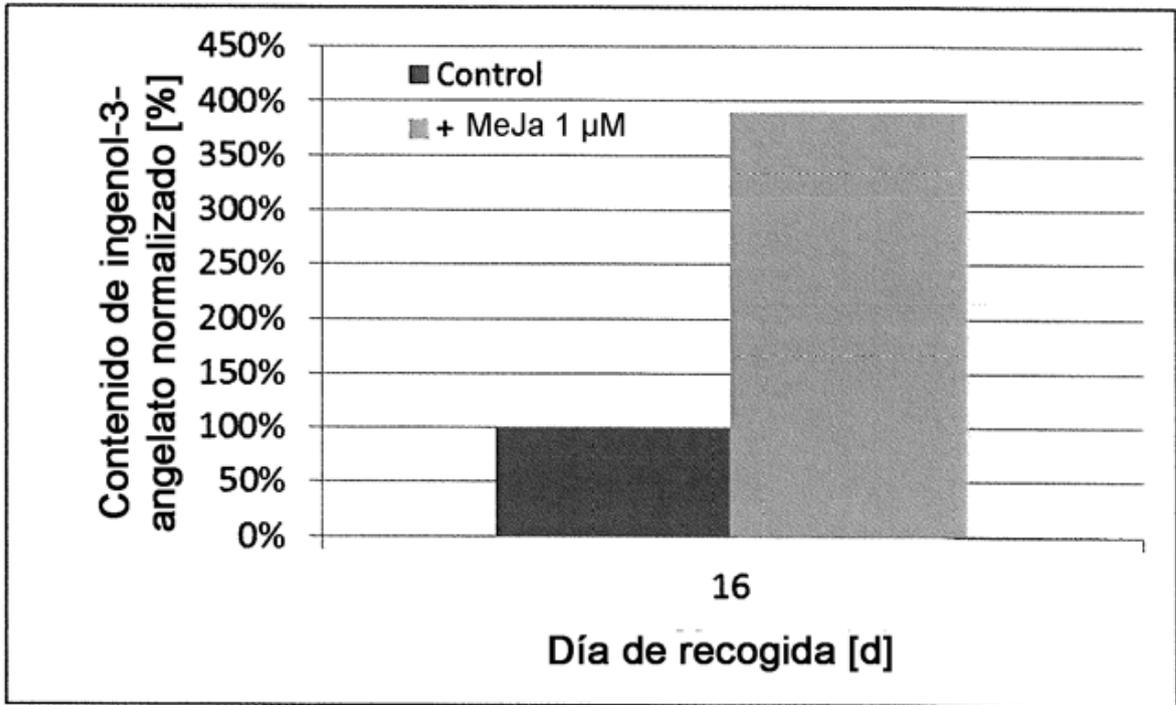


Figura 5

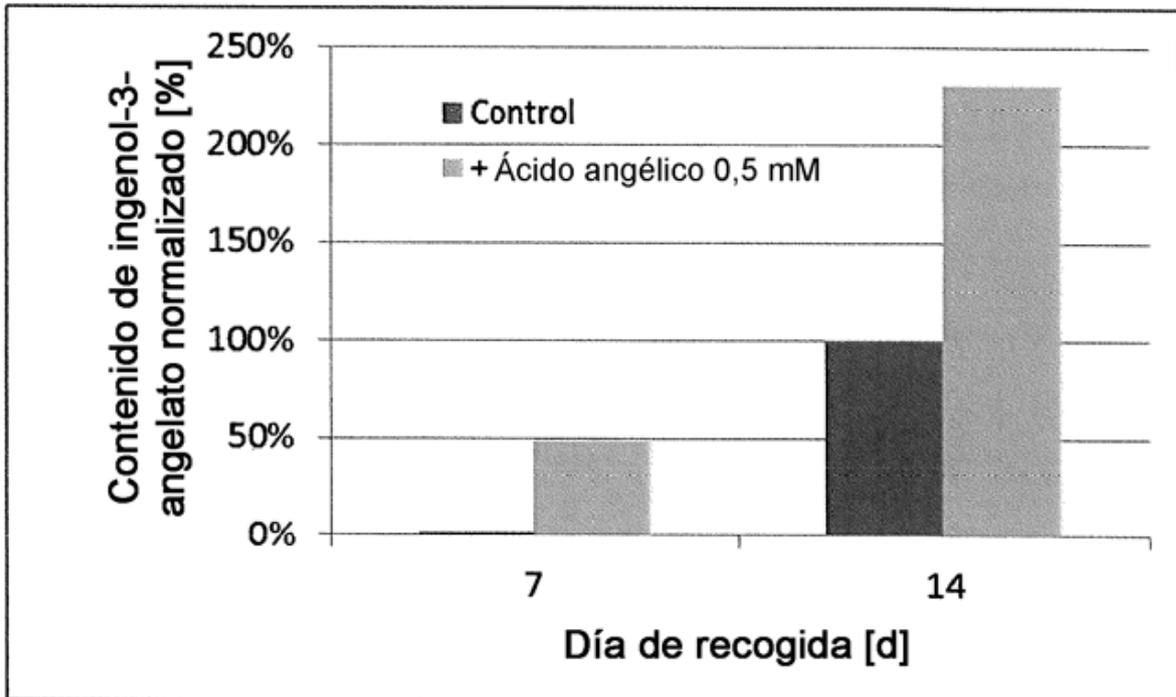


Figura 6

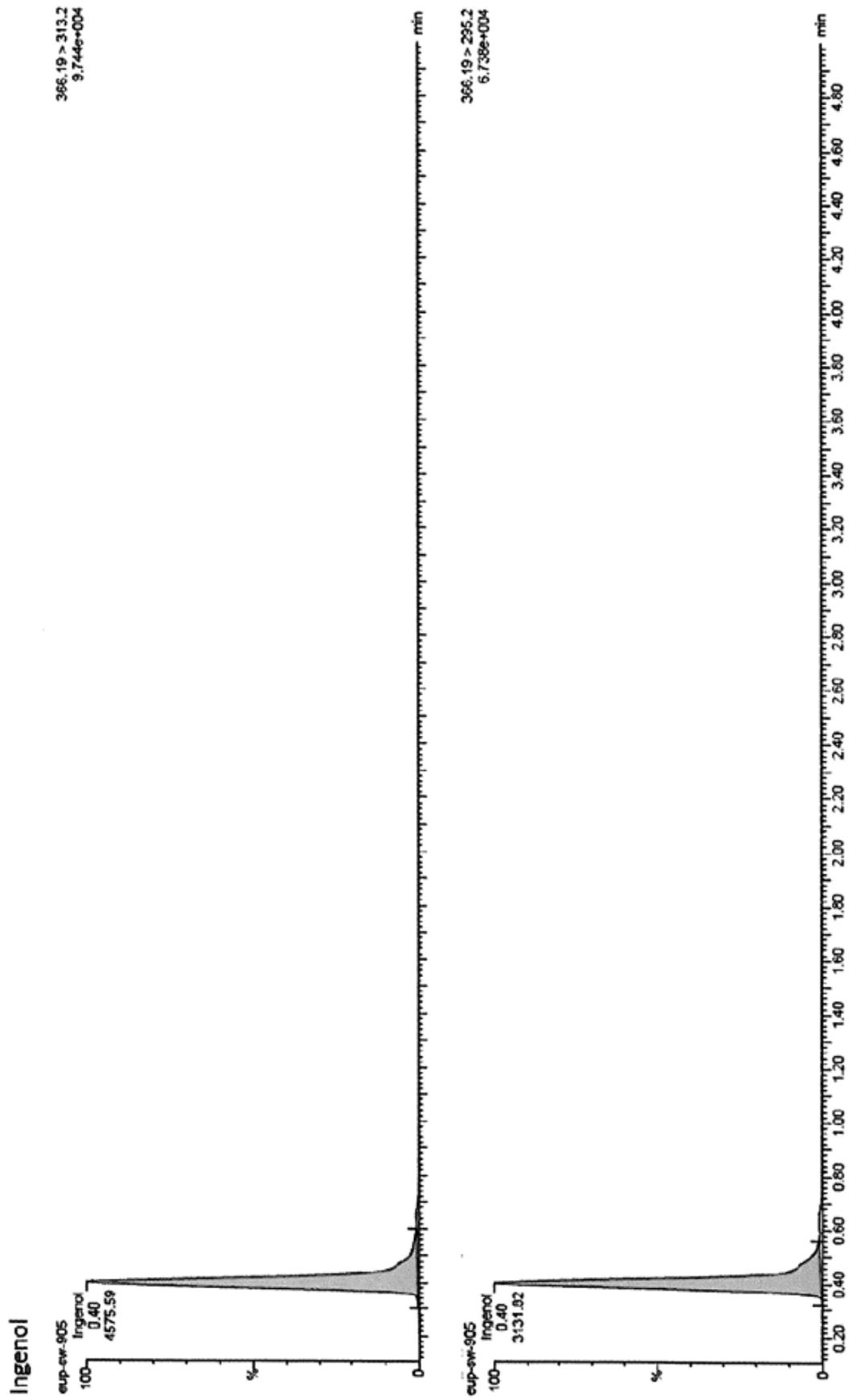


Figura 7

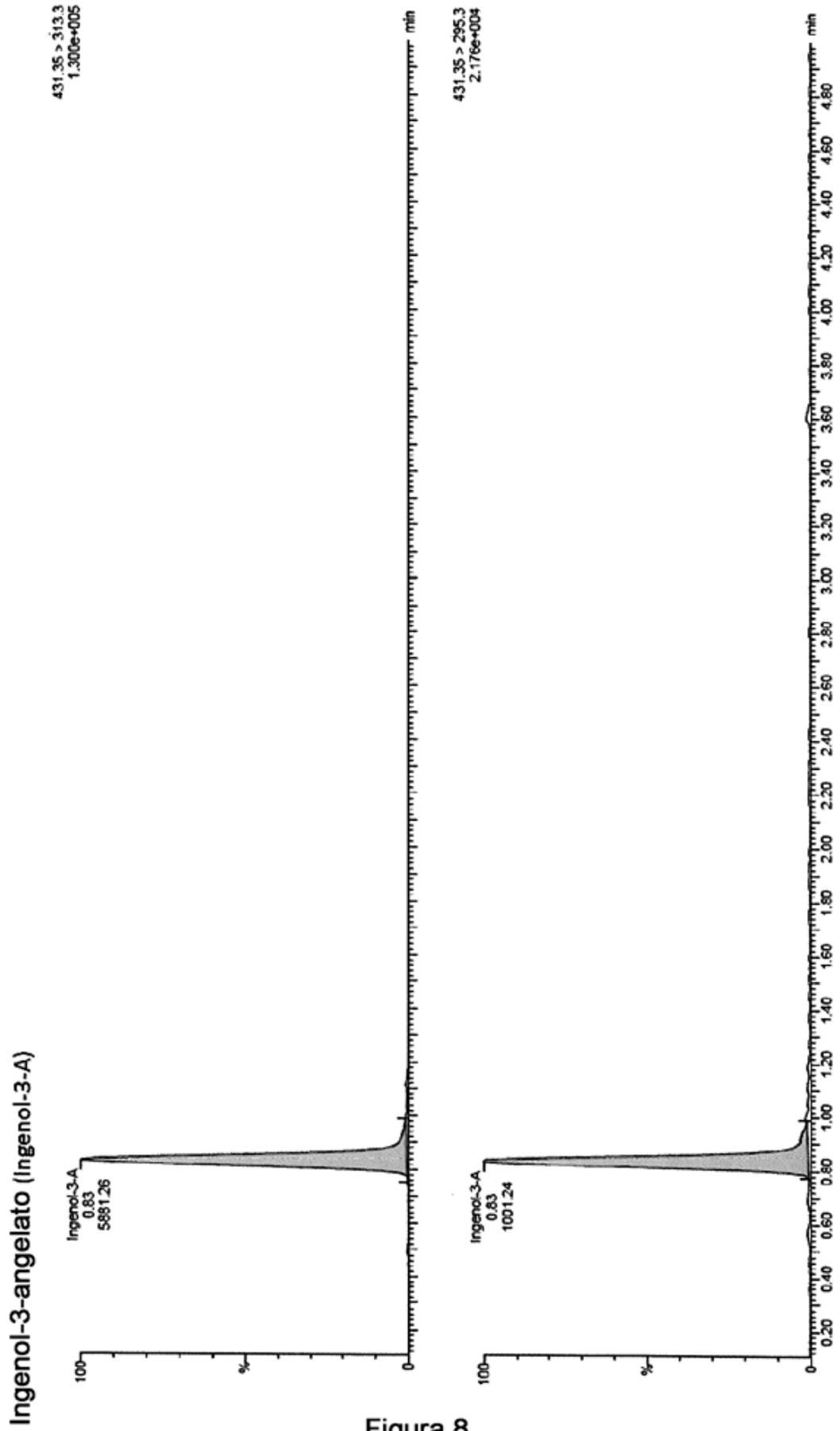


Figura 8

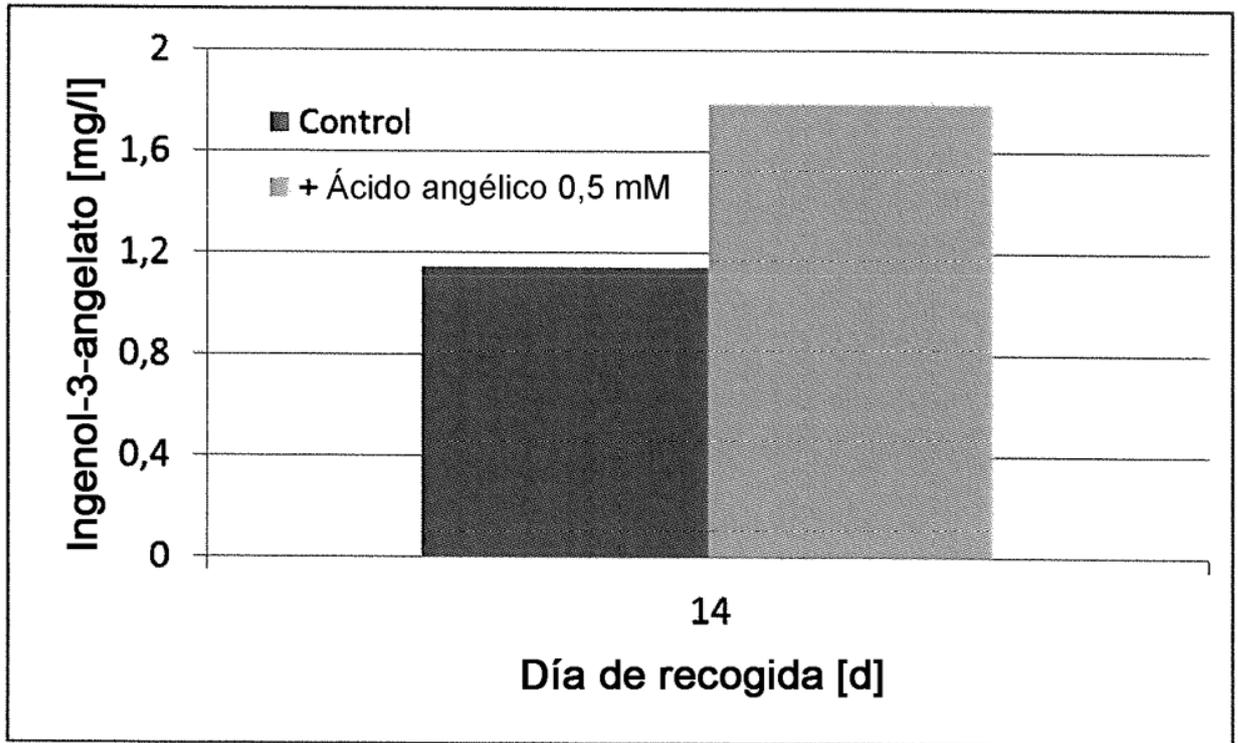


Figura 9

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2013050365 A [0007]
- WO 07070985 A [0018]
- WO 2007070985 A1 [0067]
- WO 2013050365 A1 [0067]
- WO 9744476 A [0082]
- EP 1398384 A [0090]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- **MWINE ; VAN DAMME.** *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, vol. 5, 652-662 [0006]
- **HOHMANN et al.** *Planta Medica*, 2000, vol. 66, 291-294 [0006] [0072] [0093]
- **LIANG et al.** *Synlett*, 2012, vol. 23, 2647-2652 [0007]
- **JÖRGENSEN et al.** *Science*, 2013, vol. 341, 878-882 [0007]
- **ALJIBOURI et al.** *Journal of Biotechnology Research Center*. 2014, vol. 8, 66-71 [0010]
- **ALJIBOURI et al.** *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY RESEARCH CENTER*. 2015 [0010]
- **TIDEMAN ; HAWKER.** *Annals of Botany*, 1982, vol. 49, 273-279 [0010]
- **YAMAMOTO.** *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1991, vol. 15, 247-257 [0010]
- *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer-Verlag Berlin, vol. III [0010]
- **ADOLF et al.** *Planta Medica*, 1984, vol. 50, 259-261 [0010] [0072]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 30220-46-3 [0015]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 75567-37-2 [0017]
- **PAYNE, G. et al.** *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*. Hanser Publishers, 1991 [0052]
- **MIYASAKA et al.** Regulation of Ferruginol and Cryptotanshinone Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 1986, vol. 25, 637-640 [0056]
- **VASAS et al.** *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 5115-5130 [0067]
- **O'BRIAN et al.** *Cancer Metastasis Reviews*, 2001, vol. 20, 95-100 [0068]
- **HALER et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 202-208 [0068]
- **KEDEI et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 3243-3255 [0068] [0069]
- **BOYLE et al.** *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, e108887 [0068] [0069]