(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 777 884**

(51) Int. CI.:

C12P 17/18 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A61K 31/4355 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2010 PCT/US2010/039228**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10148338**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 10790289 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2443229**

(54) Título: **Producción de alcaloides por cultivo celular de Veratrum californicum**

(30) Prioridad:

18.06.2009 US 218178 P
25.05.2010 US 348070 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2020

(73) Titular/es:

PHYTON HOLDINGS, LLC (100.0%)
2711 Centerville Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US

(72) Inventor/es:

SRINIVASAN, VENKATESH;
ALFORD, JENNIFER;
SLUSAR-PLACE, BETH;
SWINDELL, CHARLES;
HORN, MICHAEL;
ALVI, KHISAL y
GORR, GILBERT

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 alcaloides por cultivo celular de *Veratrum californicum*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la producción de alcaloides a partir del cultivo de células de Liliaceae.

Antecedentes de la invención

La ruta Hedgehog (Hh) desempeña un papel fundamental en la embriogénesis y la diferenciación de tejidos humanas y, por lo tanto, la interrupción de la ruta Hh está involucrada en algunos defectos de nacimiento, así como en cánceres. Se pueden utilizar moléculas pequeñas para activar o bloquear la ruta Hh, por ejemplo, dirigidas a Patched, una proteína de la ruta Hh que inhibe la división celular, o Smoothened, una proteína de la ruta Hh que promueve la división celular. Por ejemplo, el alcaloide ciclopamina, que se encuentra en plantas del género *Veratrum* de la familia Liliaceae, puede bloquear la ruta Hh dirigiéndose a Smoothened, inhibiendo de esta forma el crecimiento celular. La ciclopamina y otros alcaloides de la superfamilia *Veratrum* se han identificado como agentes terapéuticos potenciales para tratar enfermedades en las que está involucrada la ruta Hh. Asimismo, los precursores biosintéticos, los derivados o los derivados sintéticos de dichos alcaloides pueden ser terapéuticamente activos.

Desde hace tiempo se sabe que la ciclopamina, cuando es ingerida por animales, causa defectos neuronales graves, y actualmente su papel en la tumorigénesis ha suscitado atención. La ciclopamina puede bloquear la acción de genes mutados que producen carcinomas de células basales de la piel, la forma más común de cáncer humano. Los estudios en células de ratón sugieren que la ciclopamina puede utilizarse para tratar varios tipos de cáncer, incluidos meduloblastomas en el cerebro y rabdomiosarcomas en músculos. Los hallazgos anteriores también ponen en relieve la promesa de enfoques de tratamiento basados en mecanismos dirigidos a rutas de señalización específicas que son fundamentales para un cáncer particular.

Debido a que la ciclopamina y otros alcaloides de la superfamilia *Veratrum* pueden demostrar ser fármacos contra el cáncer útiles, existe la necesidad de procedimientos de producción eficaces para estos compuestos. La producción comercial de alcaloides y otros metabolitos secundarios es impredecible en el sentido en que incluso cuando se sabe que una planta produce un metabolito particular, es impredecible si las células de la planta producirán el metabolito en un cultivo de células no diferenciadas. Ma et al. han divulgado "un sistema de cultivo *in vitro* para la embriogénesis somática y la regeneración de plantas verdes de *Veratrum californicum*", pero los resúmenes no divulgan la producción de alcaloides a partir de cultivos de células no diferenciadas. Ma et al., "Somatic Embryogenesis and Green Plant Regeneration from *Veratrum californicum*", 11th IAPTC&B Congress Poster Sessions P-1033. Ritala et al., "Tissue culture and genetic engineering of an important anticancer compound producing plant Veratrum californicum Duran", Planta Medica 2006; 72. Véase también la publicación de Estados Unidos Nº 2009/0305338. Los alcaloides de *Veratrum* también se pueden producir en cultivos de tejido diferenciado, tales como brotes o raíces. Estos tejidos diferenciados pueden derivarse a partir de tejido inicialmente no diferenciado o mediante transformación genética, por ejemplo, raíces pilosas (*hairy roots*) o teratomas de tipo brote (*shooty teratomas*) o similares. El tejido transformado también puede cultivarse como suspensión de células no diferenciadas. La presente invención proporciona procedimientos para producir alcaloides en cultivo de células no diferenciadas.

Resumen de las formas de realización preferidas de la invención

La invención proporciona varios procedimientos para producir alcaloides a partir de un cultivo de células vegetales. Un objetivo de la invención es obtener cantidades comercialmente significativas del producto final a partir de fermentadores aireados de gran volumen. Otro objetivo es proporcionar procedimientos para aumentar el rendimiento volumétrico.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento que comprende:

a. cultivar células vegetales de la especie Veratrum californicum en un medio nutritivo para formar un cultivo celular de células no diferenciadas que produce un alcaloide de Veratrum; y

b. recuperar el alcaloide, en el que el alcaloide contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo].

El alcaloide puede ser ciclopamina o jervina. La etapa de cultivo puede comprender:

a. cultivar las células vegetales en un medio de crecimiento; y subsiguientemente

b. cultivar las células vegetales en un medio de producción que es diferente del medio de crecimiento.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo], comprendiendo dicho procedimiento cultivar células no diferenciadas de una planta que pertenece a la especie *Veratrum californicum* que producen un alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] en un recipiente en presencia de uno o más estimulantes que promueven la biosíntesis del alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo], en el que la fase gaseosa presente en el recipiente de cultivo se regula a un valor inferior al de la concentración de oxígeno en la atmósfera desde la etapa inicial del cultivo, o en el que la concentración de oxígeno disuelto en un medio fluido que está en contacto con las células se regula a un valor inferior al de la concentración saturada de oxígeno disuelto a la temperatura desde la etapa inicial del cultivo, y recuperar el compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] a partir de los cultivos resultantes.

Las células de la planta que producen el compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] pueden cultivarse mediante la introducción de un gas oxigénico que contiene el 0,03% -10% de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo.

En el presente documento se divulga un procedimiento para producir uno o más alcaloides a partir de un cultivo celular en suspensión mediante el cultivo de células vegetales de la familia Liliaceae en un medio nutritivo para formar un cultivo celular que produce uno o más alcaloides de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum*, o un precursor de dicho alcaloide o un derivado de dicho alcaloide, y recuperar uno o más alcaloides. En este procedimiento, las células vegetales son células de *Veratrum* o de *Amianthium*, preferentemente células de *Veratrum californicum*. Las células pueden ser células no diferenciadas, pero no células embriogénicas.

Las células vegetales pueden cultivarse en un medio de crecimiento. El medio de crecimiento puede ser capaz de inducir un aumento del crecimiento de al menos el 50% en una semana. Las células vegetales pueden cultivarse en un medio de producción.

En otra forma de realización, las células vegetales se cultivan en un medio de crecimiento y después, subsiguientemente, se cultivan en un medio de producción. En una forma de realización específica, el medio de crecimiento y el medio de producción son diferentes. Tal como se divulga en el presente documento, se cultivan células vegetales del género *Veratrum* en un medio de crecimiento que es capaz de inducir un aumento del crecimiento de al menos el 50% en una semana, y después estas células vegetales se cultivan en un medio de producción que es diferente del medio de crecimiento y que produce al menos aproximadamente 0,1 mg/l de uno o más alcaloides de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum* o precursores o derivados de los mismos, y después se recupera al menos un alcaloide.

En el presente documento se divulgan diversos cultivos de células, tales como cultivos en suspensión de células de *Veratrum*. En el presente documento se divulga un cultivo de células de *Veratrum* que son capaces de producir al menos aproximadamente 0,1 mg/l de uno o más alcaloides de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum* o precursores o derivados de los mismos. En el presente documento se divulga un cultivo en suspensión que tiene células de la familia de Lilliaceae y uno o más alcaloides de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum* en una cantidad de al menos 0,1 mg/l. En el presente documento se divulgan alcaloides, precursores, derivados o extractos de estos cultivos celulares no diferenciados.

Los procedimientos y los cultivos descritos en el presente documento pueden producir al menos aproximadamente 0,1 mg/l de uno o más alcaloides, de forma más preferida al menos aproximadamente 0,3 mg/l, al menos aproximadamente 0,5 mg/l, al menos aproximadamente 0,75 mg/l, al menos aproximadamente 1 mg/l, o al menos aproximadamente 1,5 mg/l. Estos rendimientos pueden medirse como la producción de uno o más alcaloides individuales o como una medida de alcaloides totales.

En otra forma de realización, el alcaloide contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo]. En formas de realización preferidas, el alcaloide es ciclopamina o jervina.

En el presente documento se divulga un procedimiento para producir uno o más compuestos alcaloides que contienen un sistema de anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] en el que se cultivan células vegetales no diferenciadas de una planta que pertenece a la familia Liliaceae, y que producen uno o más compuestos alcaloides que contienen un sistema de anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] en medio nutritivo y los compuestos alcaloides que contienen un sistema de anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] se recuperan del cultivo resultante.

Las células pueden cultivarse en presencia de factores bióticos y/o abióticos que estimulan y/o promueven la biosíntesis de, por ejemplo, compuestos alcaloides que contienen un sistema de anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo].

En el presente documento se divulga un procedimiento para producir un compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] cultivando células de una planta que pertenece a la familia Liliaceae que producen un compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] en un recipiente en presencia de uno o más estimulantes que promueven la biosíntesis del alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14 (13-

>12)-abeo], y en el que la fase gaseosa presente en el recipiente de cultivo se regula a un valor inferior al de la concentración de oxígeno en la atmósfera desde la etapa inicial del cultivo, o en el que la concentración de oxígeno disuelto en un medio fluido que está en contacto con las células se regula a un valor inferior al de la concentración saturada de oxígeno disuelto a la temperatura desde la etapa inicial del cultivo, y recuperando el compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] a partir de los cultivos resultantes. Tal como se divulga en el presente documento, las células de la planta que producen el compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] se cultivan mediante la introducción de gas oxigénico que contiene el 0,03%-10% de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A, B y C muestran la detección de ciclopamina en un callo de *Veratrum californicum* por CL-EM. La figura 1A muestra el ion individual extraído (m/z 412 M^++H de ciclopamina). La figura 1B muestra el espectro de EM del pico de TIC a 3,40, y la figura 1C muestra el espectro de TIC del extracto de callo.

Las figuras 2A, B y C muestran la detección de ciclopamina en un callo de *Veratrum californicum* por CL-EM. La figura 2A muestra el ion individual extraído (m/z 412 M^++H de ciclopamina). La figura 2B muestra el espectro de EM del pico de TIC a 3,40, y la figura 2C muestra el espectro de TIC del extracto de callo.

La figura 3 muestra los espectros de monitorización de múltiples reacciones (MRM) de muestras en suspensión de células de *Veratrum*. Los iones para dos analitos de interés se detectaron por encima del nivel de ruido: ciclopamina y jervina.

La figura 4 muestra los espectros de monitorización de múltiples reacciones (MRM) de un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum* por UPLC/EM/EM. La muestra se concentró antes de la inyección.

Las figuras 5A y B muestran títulos de ciclopamina en medio de producción basado en MS y SH los días 8, 9 y 10 utilizando un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum*. La figura B muestra los datos sin incluir valores atípicos de pocillos secos.

La figura 6 muestra títulos de ciclopamina en medio de producción basado en MS y SH los días 8, 9 y 10 utilizando un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum*.

La figura 7 muestra títulos de ciclopamina en medio de producción basado en MS y SH los días 8, 9 y 10 utilizando un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum*.

La figura 8 muestra títulos de ciclopamina en medio de producción basado en MS y SH los días 8, 9 y 10 utilizando un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum*.

La figura 9 muestra títulos de ciclopamina en medio de producción basado en MS y SH los días 8, 9 y 10 utilizando un cultivo en suspensión de *Veratrum californicum*.

Descripción detallada de la invención

Alcaloides y células productoras de alcaloides

El término "alcaloide", tal como se utiliza en el presente documento significa cualquier miembro de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum*, así como precursores de dicho alcaloide y derivados de dicho alcaloide. En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a la producción de un miembro de la superfamilia de alcaloides de *Veratrum*. La presente invención se refiere a la producción de compuestos alcaloides que contienen un sistema de anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo]. Los ejemplos de alcaloides de *Veratrum* incluyen, pero sin limitación, los enumerados en la tabla siguiente:

Tabla 1: Alcaloides de *Veratrum* ejemplares

Denominación	Nº de registro CAS
Cevina	124-98-1
Geralbina	
Germina	508-65-6
Germina; O^3-(*R*)-2-metilbutanoílo	465-78-1
Germina; O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	42138-61-4
Germina; O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^3-Ac	465-77-0

Denominación	Nº de registro CAS
Germina; O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^{3}, O^{7}-di-Ac	508-66-7
Germina; O^{16}-(2-metilbutanoílo)	135636-53-2
Germina; O^{3},O^{15}-bis(2-metilbutanoílo)	175030-77-0
Germina; O^{3},O^{15}-bis(2-metilbutanoílo), O^{7}-Ac	
Germina; O^{15}-angeloílo	240802-94-2
Germina; O^{3}-angeloílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^{7}-Ac	639-11-2
Germina; *O*-angeloílo, *O*-tigloílo, *O*-Ac	
Germina; O^{3},O^{15}-diangeloílo, 7-Ac	122332-72-3
Germina; O^{3},O^{15}-bis(2-metil-2-butenoílo)	90541-57-4
Germina; O^{3}-(2-hidroxi-2-metilbutanoílo), O^{15}-(2-metilbutanoílo)	134357-41-8
Germina; O^{3}-(*R*)-2-hidroxi-2-metilbutanoílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	508-67-8
Germina; O^{3}-(*R*)-2-hidroxi-2-metilbutanoílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^{7}-Ac	560-48-5
Germina; O^{3}-(2*R*,3*R*)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	426-34-6
Germina; O^{3}-(2*R*,3*R*)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^{7}-Ac	58162-51-9
Germina; O^{3}-(2*S*,3*R*)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo, O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	595-64-2
Germina; O^{3}-(2*S*,3*R*)-(3-acetoxi-2-hidroxi-2-metilbutanoílo), O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	23211-84-9
Germina; O^{3}-(2*S*,3*R*)-(3-acetoxi-2-hidroxi-2-metilbutanoílo), O^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, O^{7}-Ac	465-75-8
Germina; O^{15}-(3,4-dimetoxibenzoílo)	33352-59-9
Germina; O^{15}-(3,4-dimetoxibenzoílo), O^{3}-Ac	33352-58-8
Germina; O^{3}-(3,4-dimetoxibenzoílo), O^{15}-(2-metilbutanoílo)	142735-72-6
Germina; O^{3}-(3,4-dimetoxibenzoílo), O^{15}-(2-metilbutanoílo), O^{7}-Ac	214046-03-4
Germina; 1α-acetoxi, O^{3}-(2ξ-hidroxi-2-metilbutanoílo), O^{15}-(2-metilbutanoílo)	182693-36-3
Hakurirodina	56857-49-9
Hakurirodina; 22R, 28-dihidro	38636-84-9
Hakurirodina; 22*R*, 28-dihidro, 3-*O*-Ac	38636-85-0
Hosukinidina	72765-23-2
Isorubijervina	468-45-1
Isorubijervina; O^{3}-β-$_{D}$-glucopiranósido	468-46-2
Isorubijervina; 12β-hidroxi	164178-46-5
Jervina	469-59-0
Jervina; *O*-Ac(*O*-acetiljervina)	14788-78-4
Jervina; *N*-metoxicarbonilo (Verapatulina)	
Jervina; *N*-(2-metoxicarboniletilo)	132943-48-7
(Metiljervina-*N*-3'-propanoato)	
Jervina; O^{3}-β-$_{D}$-glucopiranósido (Pseudojervina)	36069-05-3
Jervina; 3-cetona (Jervinona)	
Jervina; 11β-alcohol (Veratrobasina)	20226-97-5
Jervina; 11β-alcohol, 3,11-di-Ac	
Jervina; 11-desoxo (Ciclopamina)	4449-51-8
Jervina, 11-desoxo, *O,N*-di-Ac	
Jervina; 11-desoxo, 3-*O*-β-$_{D}$-glucopiranósido (Cicloposina)	23185-94-6

Denominación	Nº de registro CAS
Jervina; 1α-hidroxi, 5α,6-dihidro	
Loveraína	
20-(2-metil-1-pirrolin-5-il)pregn-4-en-3-ona	55486-07-2
Neoveratalina A	
Neoveratalina A; 7α-hidroxi	
Petisidinina; 3-Ac	
Procevina	468-24-6
Protoverina; *O*^{6},*O*^{7}-di-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, *O*^{3}-(+)-2-hidroxi-2-metilbutanoílo	143-57-7
Protoverina; *O*^{6},*O*^{7}-di-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, *O*^{3}-(+)-*treo*-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo	124-97-0
Protoverina; *O*^{6}-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, *O*^{3}-(+)-2-hidroxi-2-metilbutanoílo	67375-42-2
Protoverina; *O*^{6}-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, *O*^{3}-(+)-*treo*-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo	67370-03-0
Protoverina; *O*^{6},*O*^{7}-di-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo, *O*^{3}-angeloílo	663-93-4
Protoverina; 3-[(2*S*,3*R*)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoílo], *O*^{6},*O*^{7}-di-Ac, *O*^{15}-(*R*)-2-metilbutanoílo	82535-71-5
Protoverina; *O*^{3}-(2-hidroxi-2-metilbutanoílo), *O*^{15}-(2-metilbutanoílo)	
Rubijervina	79-58-3
Rubijervina; 12-epímero	472-00-4
Rubiverina	
16,28-Secosolanida-5,22(28)-dieno-3,16-diol, $_{9Cl}$; forma (3β,16α,20*S*,25α)	29271-49-6
16,28-Secosolanida-5,22(28)-dieno-3,16-diol, $_{9Cl}$; forma (3β,16α,20*S*,25α), 3-*O*-β-$_{D}$-glucopiranósido	54557-67-4
16,28-Secosolanida-5,22(28)-dieno-3,16-diol, $_{9Cl}$; forma (3β,16α,20*S*,25α), 16-Ac	36506-65-7
16,28-Secosolanida-5,22(28)-dieno-3,16-diol, $_{9Cl}$; forma (3β,16α,20*S*,25α), 16-Ac, 3-*O*-β-$_{D}$-glucopiranósido	30511-97-8
16,28-Secosolanid-5-eno-3,16-diol; forma (3β,16α,22*R*,25*S*)	65027-01-2
16,28-Secosolanid-5-eno-3,16-diol; forma (3β,16α,22*S*,25*S*)	65027-00-1
16,28-Secosolanid-5-eno-3,16-diol; forma (3β,16α,22*S*,25*S*), 16-Ac	36069-45-1
Shinonomenina	70598-84-4
Solanidina *O*-β-$_{D}$-galactopiranósido	511-37-5
Sinaína	
Tienmulilmina	
Tienmulilminina	
Veracevina; 3-(*Z*)-2-metil-2-butenoílo	62-59-9
Veracintina	33596-06-4
Veracintina; 3-*O*-β-$_{D}$-glucopiranósido	67006-43-3
Veracintina; 3-*O*-α-$_{L}$-ramnósido	110934-18-4
Veraflorizina	70598-85-5
Veragenina	
Veralbidina	
Veralinina	
Veralinina; estereoisómero, 3-β-$_{D}$-glucopiranósido	58078-63-0

Denominación	Nº de registro CAS
Veralkamina	17155-31-6
Veralkamina; *O,O*-di-Ac	195244-85-0
Veralkamina; 5α,6,12,13-tetrahidro	17155-36-1
Veralobina	6242-49-5
Veralodina	41787-59-1
Veralodisina	52617-23-9
Veralodisina; 3-O-β-$_D$-glucopiranósido	56598-27-7
Veralosidinina	52389-14-7
Veramanina	182816-87-1
Veramarina	4565-85-9
Veramina	21059-48-3
Veraminina	
Veramitalina	313697-00-6
Veranovina	
Verareína	
Veratramina	60-70-8
Veratramina; O^3-β-$_D$-glucopiranósido	475-00-3
Veratramina; 23-desoxi	
Veratramina; 20-epímero	
Veratramina; 20-epímero, O^{23}-β-$_D$-glucopiranósido	148440-62-4
Veratra-5,11,13-trieno-3,23-diol; forma (3β,22*S*,23*R*,25*S*), 23-*O*-β-$_D$-glucopiranósido	148440-63-5
Veratrenona	55839-66-2
Verazina	14320-81-1
Verazina; 22*S*,*N*-dihidro	17463-47-7
Verazina; 22*S,N*-dihidro, 3-*O*-β-$_D$-glucopiranósido	128351-76-8
Verazina; 12β-hidroxi, 22*S,N*-dihidro	164178-47-6
Verazina; 20-epímero	145033-50-7
Verdina	73667-53-5
Verina	
Vertalina B	118985-28-7
Vertalina B; 16-desoxi	91421-75-9
Vertalina B; 16-desoxi, 3-*O*-β-$_D$-glucopiranósido	128351-77-9
δ-lactona de ácido zigadenílico	
δ-lactona de ácido zigadenílico ; O^{16}-angeloílo	
Zigadenina; O^3-Ac	2777-79-9
Zigadenina; O^3-(*R*)-2-metilbutanoílo	
Zigadenina; O^3-angeloílo	67370-02-9
Zigadenina; O^3-angeloílo, β-*N*-óxido	313677-61-1
Zigadenina; O^3-(3,4-dimetoxibenzoílo)	31329-58-5

Tal como se divulga en el presente documento, el alcaloide es un alcaloide que puede producirse a partir de una célula de *Veratrum* o de *Amianthium*. Tal como se divulga en el presente documento, el alcaloide es un alcaloide que puede producirse a partir de una célula de *Veratrum*. Tal como se divulga en el presente documento, el alcaloide en sí posee actividad terapéutica, o puede modificarse para producir compuestos bioactivos. En la presente invención,

el alcaloide contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo]. En una forma de realización preferida de la invención, el alcaloide es ciclopamina o jervina.

El procedimiento incluye cultivar células productoras de alcaloides para producir uno o más alcaloides, tal como se han definido anteriormente. El término "células productoras de alcaloides" se refiere a cualquier célula capaz de producir uno o más alcaloides en al menos un conjunto de condiciones de cultivo. "Células productoras de alcaloides" puede referirse a células que producen uno o más alcaloides en una cantidad detectable en las condiciones de cultivo del procedimiento.

En los procedimientos de producción de alcaloides descritos en el presente documento, el cultivo celular comprende células de la familia Liliaceae. Tal como se divulga en el presente documento, el cultivo celular comprende células de los géneros *Veratrum* y/o *Amianthium*. En la presente invención, el cultivo celular comprende células de *V. californicum*. Las células en cultivo pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, las células pueden ser de uno o más géneros, especies, variantes o cepas. Las células pueden ser de origen natural, o pueden ser híbridos o células genéticamente alteradas. Los ejemplos de células vegetales incluyen, pero sin limitación, las enumeradas en la tabla siguiente:

Tabla 2: Especies de células ejemplares útiles para la producción de alcaloides

Género ejemplar	Especie ejemplar	Subespecies/variedades ejemplares
Amianthium	muscitoxicum	
Fritillaria	camtschatcensis	
Schoenocaulon	officinale	
Veratrum	album	ssp. album, ssp. oxysepalum, ssp./var. lobelianum, var. Grandiflorum
Veratrum	calfornicum	var. calfornicum, var. Caudatum
Veratrum	eschholtzii	
Veratrum	fimbriatum	
Veratrum	grandiflorum	
Veratrum	lobelianum	
Veratrum	maackii	
Veratrum	nigrum	var. Ussuriense
Veratrum	oblongum	
Veratrum	officinalis	
Veratrum	oxysepalum	
Veratrum	patulum	
Veratrum	sabadilla	
Veratrum	stamineum	
Veratrum	stenophyllum	
Veratrum	taliense	
Veratrum	viride (viridae)	var. Verabore
Veratrum	woodii	
Zygadenus	gramineus	
Zygadenus	paniculatus	
Zygadenus	venenosus	

El tejido utilizado para iniciar el cultivo celular puede seleccionarse sobre la base, por ejemplo, de su capacidad de favorecer la producción de uno o más alcaloides particulares.

El cultivo celular puede ser un cultivo de callos. Un callo es una masa celular sustancialmente no diferenciada cultivada en medio solidificado. Los procedimientos para la formación de callos y la propagación de callos son generalmente conocidos en la técnica. En una forma de realización, un callo se inicia por medio de cualquier parte viable de la planta monocotiledónea, preferentemente embriones inmaduros de la planta monocotiledónea. Por ejemplo, el inicio del cultivo celular puede incluir la esterilización de superficie del material de origen vegetal, por ejemplo, lavando minuciosamente con agua limpia, utilizando un desinfectante tal como hipoclorito, utilizando

agentes humectantes tales como Tween o Triton, utilizando antibióticos y/o utilizando agentes antifúngicos. La parte de la planta se puede utilizar intacta, o puede utilizarse una porción de la misma, tal como un embrión extraído de una semilla. Típicamente, la parte de la planta se dispone en la superficie del medio solidificado y se incuba en un entorno estéril durante aproximadamente 1-12 semanas, hasta que crece una masa de células no diferenciadas (el callo) en la proximidad de la parte de la planta. Después de establecer el cultivo de callos, las células se cultivan en un medio nutritivo tal como se describe con más detalle más adelante. Las células no diferenciadas se pueden distinguir de las células embriogénicas por la presencia de una vacuola, debido a que las células embriogénicas son altamente citoplasmáticas y no están vacuoladas.

Para la propagación de callos, las condiciones de cultivo, que incluyen componentes de los medios, intervalos de pH, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, macrosales y microsales, vitaminas y reguladores del crecimiento, se describen todas, por ejemplo, por Bringi en el documento WO 97/44476. En una forma de realización, la propagación de callos comprende el uso de un agente gelificante, un agente antioscurecimiento, carbón vegetal y/o ciclos de luz/oscuridad. Los agentes gelificantes incluyen, por ejemplo, agar, hidrogeles, gelatina y gelrite. Puede utilizarse carbón vegetal para eliminar desechos y compuestos orgánicos no deseados. Un inóculo ejemplar es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 g/25 ml. Pueden utilizarse técnicas de subcultivo conocidas en la técnica para la transferencia en serie periódica de porciones de callo a una fuente nueva de nutrientes.

El cultivo celular para producir alcaloides puede ser un cultivo en suspensión. El término "cultivo en suspensión" se utiliza para describir células estructuralmente no diferenciadas que están dispersadas en un medio nutritivo líquido. Se entiende que los cultivos en suspensión comprenden células en diversas etapas de agregación. El intervalo de tamaño de agregados que se encuentran en las suspensiones presenta tamaños que varían desde decenas de micrómetros de diámetro (células individuales o pocas células agregadas) hasta agregados de muchos milímetros de diámetro, que están constituidos por muchos miles de células. En general, el cultivo en suspensión puede iniciarse utilizando un medio de cultivo que resultó satisfactorio en el cultivo de callos, sin agentes gelificantes, aunque los medios optimizados para el cultivo en suspensión pueden diferir del óptimo para el callo de la misma línea celular. Un cultivo celular también puede derivarse opcionalmente de una colección de células crioconservadas.

Crioconservación mediante un procedimiento de 2 etapas

En el presente documento se divulga un procedimiento de 2 etapas para la inducción de tolerancia a la desecación en cultivos en suspensión de células vegetales de *Veratrum*, así como etapas de deshidratación y crioprotección antes de congelar los cultivos en suspensión de células vegetales en condiciones criogénicas. Las suspensiones celulares de células vegetales de *Veratrum* generalmente contienen muchos agregados de células grandes, y los procedimientos alternativos de crioconservación tales como, por ejemplo, vitrificación, son desventajosos para su uso con suspensiones de células vegetales de *Veratrum* cuando los cultivos en suspensión de células vegetales contienen una cantidad significativa de células vegetales altamente agregadas, a menos que se tomen medidas para minimizar la agregación celular. Las soluciones de vitrificación tienen una osmolaridad muy alta, lo que puede provocar que las células presentes en el exterior del agregado se dañen por medio de la solución de vitrificación antes de que la solución de vitrificación penetre en las células ubicadas en las porciones internas del agregado celular. Este fenómeno hace que el momento de la exposición a las soluciones de vitrificación sea muy difícil de determinar y, por lo tanto, estas no son deseables para su uso con células vegetales que son agregados sustanciales. Sin embargo, en un procedimiento que se expone más adelante, los agregados celulares se eliminan sustancialmente permitiendo de esta forma el uso de procedimientos de vitrificación.

En consecuencia, los procedimientos divulgados se desarrollaron como un medio eficaz de crioconservación de suspensiones de células vegetales de *Veratrum* con un alto nivel de restauración de la función celular después de la descongelación de las células vegetales crioconservadas. En el presente documento se divulga un procedimiento que proporciona más del 50% de recuperación de células viables después de la descongelación de las células vegetales de *Veratrum* crioconservadas utilizando las técnicas de crioconservación establecidas en el presente documento. También se divulga en el presente documento un procedimiento que proporciona más del 75% de recuperación de células viables tras la descongelación de las células vegetales de *Veratrum* crioconservadas utilizando las técnicas de crioconservación establecidas en el presente documento.

Cuando se desea utilizar crioconservación, los cultivos en suspensión de células vegetales de *Veratrum* que se van a crioconservar se precultivan en medio líquido GM (IND64) durante aproximadamente 7 a aproximadamente 10 días. Tal como se divulga en el presente documento, el cultivo en suspensión de células vegetales es un cultivo en suspensión de células vegetales que comprende células no diferenciadas. Las suspensiones celulares deberán transferirse a medio nuevo cada 7 a 10 días. Subsiguientemente, los cultivos en suspensión de células vegetales se transfieren a medio GM (IND64) solidificado que comprende de aproximadamente el 0,8% de agarosa a aproximadamente el 1% de agarosa y se cultivan en la oscuridad durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 10 días a 25 ºC.

Tabla 3: Medio GM (IND64)*

Componente	Cantidad
Sacarosa	20 g/l
SH Macro (10X)	100 ml/l
SH Micro (1000X)	1 ml/l
Solución madre de hierro (50X)	10 ml/l
SH Vitaminas (50X)	20 ml/l
Dicamba (10 mM)	1 ml/l

* Se añaden aproximadamente 8 g/l o más de agarosa a la formulación para preparar medio sólido. El pH final es de aproximadamente 5,6.

Después del precultivo de las células vegetales de *Veratrum* en medio GM (IND64) sólido durante un periodo de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 10 días, las células vegetales pueden crioconservarse utilizando los procedimientos de crioconservación de 2 etapas de la invención. Los procedimientos de crioconservación de la invención implican transferir células vegetales de *Veratrum* a medio GM líquido que comprende de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,5 M de sorbitol o sacarosa, y cultivar las células vegetales de *Veratrum* durante aproximadamente 16 horas a aproximadamente 48 horas en un agitador giratorio (120 rpm). Las células vegetales de *Veratrum* en suspensión transferidas pueden ser pequeños agregados de células vegetales.

Tal como se divulga en el presente documento, las células vegetales de *Veratrum* transferidas se agregan formando sustancialmente agregados pequeños mediante el uso de, por ejemplo, un homogeneizador Bellco y un tamiz de tejido Bellco Cellector™ (malla 10/1910 µm y malla 20/860 µm) (Bellco Biotechnology, Vineland, Nueva Jersey).

El medio GM líquido se retira y las células vegetales de *Veratrum* se transfieren subsiguientemente al medio líquido de crioconservación 1. La tabla 4 proporciona los componentes del medio de crioconservación 1.

Tabla 4: Medio de crioconservación 1

Componentes
Medio GM líquidos [IND64]
Azúcar seleccionado* [0,5 M-1,0 M]
DMSO [5,0-10,0%]

* Por un azúcar seleccionado se entiende un azúcar neutro, un azúcar de alcohol, sacarosa, maltosa, trehalosa o glicerol. Los azúcares neutros incluyen, pero sin limitación, glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa o ácido glucurónico. Los azúcares de alcohol incluyen, pero sin limitación, maltitol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, lactitol, eritritol o manitol.

Tal como se divulga en el presente documento, el medio de crioconservación 1 comprende aproximadamente el 6% de DMSO. Las células vegetales de *Veratrum* se incuban en el medio de crioconservación 1 durante no menos de aproximadamente 2 horas a no más de aproximadamente 4 horas en hielo, después de lo cual se transfieren volúmenes de 2 ml de la suspensión de células vegetales en medio de crioconservación 1 a crioviales. Los crioviales de suspensión de células vegetales transferidas se enfrían después de 0 ºC a -40 ºC a una velocidad de -0,33 a -1 ºC por minuto. Después del enfriamiento, los crioviales se sumergen en nitrógeno líquido y se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido. Las figuras 5-7 muestran la recuperación del cultivo de células vegetales de *Veratrum* crioconservado que puede obtenerse realizando una técnica de crioconservación coherente con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Crioconservación mediante vitrificación

Tal como se divulga en el presente documento, después del precultivo de células vegetales de *Veratrum* en medio GM (IND64) sólido durante un periodo de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 10 días, las células vegetales se crioconservan utilizando técnicas de vitrificación. Tal como se divulga en el presente documento, se transfieren células vegetales de *Veratrum* a medio líquido GM (IND64) que comprende aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,5 M de sorbitol o sacarosa, y las células vegetales se cultivan durante aproximadamente 16 horas a aproximadamente 48 horas en un agitador giratorio (120 rpm). Tal como se divulga en el presente documento, las células vegetales de *Veratrum* en suspensión transferidas son células vegetales agregadas

formando agregados pequeños producidas utilizando un homogeneizador Bellco y un tamiz de tejido Bellco Cellector™ (malla 20/860 um) (Bellco Biotechnology, Vineland, Nueva Jersey).

A continuación, se retira el medio líquido GM (IND64) y se transfiere subsiguientemente el 10-30% p/v de células vegetales de *Veratrum* nuevas a medio de crioconservación 2. La composición del medio de crioconservación 2 se proporciona en la tabla 5. Si es necesario, el pH se ajusta a un pH de entre aproximadamente 5-7.

Tabla 5: Medio de crioconservación 2

Componentes
Azúcar seleccionado* [0,2 M-0,5 M]
Agente de permeación [DMSO 0-25% y/o etilenglicol 0-2 M]
Trisacárido seleccionado** [50-200 mM]

* Por un azúcar seleccionado se entiende un azúcar neutro, un azúcar de alcohol, sacarosa, maltosa, trehalosa o glicerol. Los azúcares neutros incluyen, pero sin limitación, glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa o ácido glucurónico. Los azúcares de alcohol incluyen, pero sin limitación, malitiol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, lactitol, eritritol o manitol.

** Por un trisacárido seleccionado se entiende melecitosa, panosa, rafinosa, kestosa o lactosacarosa.

Preferentemente, las células vegetales de *Veratrum* se incuban en el medio de crioconservación 2 (densidad celular = 20%) durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 4 ºC, después de lo cual se retira el medio de crioconservación 2. Aproximadamente una parte de las células vegetales de *Veratrum* tratadas con medio de crioconservación 2 se pesan y se añaden a cada criovial. Se añaden aproximadamente 5 partes en peso de solución crioprotectora fría a cada criovial y las células se enfrían a 0 ºC (en hielo) antes de su inmersión en N_2 líquido. La composición de la solución crioprotectora fría se proporciona en la tabla 6. Inmediatamente después de esta incubación, el criovial se sumerge en nitrógeno líquido.

Tabla 6: Medio de solución crioprotectora fría

Componentes
Azúcar seleccionado* [1,0-2,0 M]
Catión divalente [5,0-10,0 mM]
Agente de permeación [DMSO 0-50% o etilenglicol 0-10 M]

* Por un azúcar seleccionado se entiende un azúcar neutro, un azúcar de alcohol, sacarosa, maltosa, trehalosa o glicerol. Los azúcares neutros incluyen, pero sin limitación, glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa o ácido glucurónico. Los azúcares de alcohol incluyen, pero sin limitación, malitiol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, lactitol, eritritol o manitol.

Descongelación y recuperación

En el presente documento se divulgan procedimientos para descongelar y recuperar suspensiones de células vegetales de *Veratrum* crioconservadas. Tal como se divulga en el presente documento, se descongelan crioviales que comprenden suspensiones de células vegetales de *Veratrum* crioconservadas a un intervalo de temperatura de aproximadamente 37 ºC a aproximadamente 42 ºC, en un baño de agua u otro entorno de temperatura mantenida, con agitación ocasional o agitación suave durante 3 a 5 minutos o hasta que las células congeladas se hayan descongelado.

Después de la descongelación y la esterilización de los crioviales (generalmente por exposición a etanol), si se utiliza el procedimiento de 2 etapas, el contenido de los crioviales se pasa a través de un filtro con succión para eliminar la solución de crioconservación, y las células presentes sobre el papel de filtro se transfieren a medio GM (IND64) sólido, y se incuban a 25 ºC en la oscuridad durante 16-24 horas. Las células descongeladas se transfieren a medio nuevo aproximadamente cada 7 días hasta que se producen 1-2 gramos de biomasa. Si se utiliza el procedimiento de vitrificación, el contenido de cada criovial descongelado y esterilizado se vierte/se diluye en 10 ml de medio que contiene aproximadamente 5-10 mM de cationes divalentes y aproximadamente 0,1-1,0 M de un azúcar seleccionado durante 10 minutos, después se pasa a través de un filtro con succión para eliminar la solución, y las células presentes sobre el papel de filtro se transfieren a medio GM (IND64) sólido y se incuban a 25 ºC en la oscuridad durante aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas. Después, el papel de filtro con células se transfiere a un medio GM (IND64) sólido nuevo y después se transfiere cada 7 días a un medio GM nuevo a 25 ºC en la oscuridad para la restauración de las funciones celulares.

Cultivo celular: medio nutritivo

El procedimiento del primer aspecto de la presente invención incluye una etapa de cultivo de las células en un medio nutritivo. El procedimiento también puede incluir más de una etapa de cultivo de las células en un medio nutritivo. El término "medio nutritivo" significa un medio que es adecuado para el cultivo de callos de células vegetales y/o cultivos en suspensión. El término "medio nutritivo" es general y abarca tanto "medio de crecimiento" como "medio de producción". Un "medio de crecimiento" es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de las células cultivadas. En formas de realización preferidas, el medio de crecimiento proporciona un aumento de crecimiento de al menos 50% en una semana. Un "medio de producción" es un medio nutritivo que favorece la producción de uno o más alcaloides. Aunque el crecimiento puede producirse en un medio de producción, la producción puede tener lugar en un medio de crecimiento, y tanto el crecimiento como la producción pueden tener lugar en un solo medio nutritivo, un medio de producción favorece la producción de compuestos diana con respecto al medio de crecimiento. El procedimiento descrito en el presente documento 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.

En el contexto de metabolitos secundarios no asociados con el crecimiento, un medio de producción tiene preferentemente a) un nivel aumentado de sacarosa u otra fuente de carbono, y/o b) un nivel reducido de un componente inorgánico tal como nitrato, amonio, fosfato y/o potasio, y/o c) un nivel de calcio diferente en comparación con el medio de crecimiento. Véase la patente de Estados Unidos 4.717.664. Un experto en la técnica reconoce que el crecimiento celular se ve favorecido generalmente por una relación equilibrada o relativamente baja de carbono con respecto a componentes inorgánicos tales como nitrógeno y fosfato, mientras que el crecimiento celular está limitado por una relación relativamente alta de carbono con respecto a componentes inorgánicos. En consecuencia, el medio de producción puede utilizar condiciones limitantes de crecimiento, por ejemplo una alta proporción de carbono con respecto a componentes inorgánicos, para promover la producción de alcaloides frente al crecimiento celular. Véanse, por ejemplo, Sakuta M. y Komamine A., "Cell Growth and accumulation of Secondary Metabolites", Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants, capítulo 5, vol. 4, páginas 97-114 (1987); Majerus F. y Pareilleux A., "Alkaloid accumulation in Ca-alginate entrapped cells of Catharanthus roseus: Using a limiting growth medium", Plant Cell Reports (1986) 5: 302-305. Los medios nutritivos pueden basarse en sales basales de Murashige y Skoog (MS) o en sales basales de Schenk y Hildebrandt (SH) (Sigma-Aldrich). Los medios de producción (PM) ejemplares incluyen, pero sin limitación, medios que contienen una base de sal (por ejemplo, MS o SH), más macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sacarosa al 5%, jasmonato de metilo (MJS) 100 µM y Dicamba 20 µM . Los medios de crecimiento ejemplares incluyen, pero sin limitación, medios que contienen una base de sal (por ejemplo, MS o SH), más sacarosa al 2% y Dicamba 10 µM.

En una forma de realización, las células se cultivan en primer lugar en un medio de crecimiento, y después las células se cultivan en un medio de producción que es diferente del medio de crecimiento. Cuando las células se transfieren de un medio de crecimiento a un medio de producción, el medio de producción posee preferentemente un mayor nivel de fuente de carbono y/o relación C:N, por ejemplo, una mayor concentración de un sacárido. El medio de producción también comprende preferentemente fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico tales como un aminoácido. Otros componentes del medio nutritivo pueden introducirse en el cultivo después de poner en contacto las células y el medio por primera vez. En una forma de realización, estos ingredientes, tales como sacárido adicional, se suministran en una corriente de alimentación de forma intermitente o continua según sea necesario. Por supuesto, dado que los productos alcaloides contienen nitrógeno, es deseable proporcionar nitrógeno adecuado para mantener y mejorar la acumulación de los productos deseados.

El efecto deseado, por ejemplo, crecimiento o producción, se puede lograr manipulando otras condiciones de reacción que incluyen, pero sin limitación, temperatura, pH y luz/oscuridad; manipulando las condiciones de los medios añadiendo, eliminando o cambiando la concentración de uno o más nutrientes u otros agentes; o manipulando cualquier combinación de estas condiciones. En algunas formas de realización preferidas, el efecto deseado se logra manipulando el medio. En particular, los cultivos en suspensión que producen alcaloides son capaces de lograr velocidades de crecimiento rápidas y altas densidades celulares cuando se utilizan nutrientes adecuados y condiciones de reacción adecuadas. Un experto en la técnica puede incorporar, modificar y manipular fácilmente las condiciones de los medios en vista de la guía proporcionada en el presente documento para lograr un rendimiento óptimo, que puede esperarse que varíe entre líneas celulares.

Los alcaloides descritos en el presente documento son metabolitos secundarios que se producen a través de una serie de muchas etapas enzimáticas, que requieren la acción coordinada de muchas enzimas diferentes para producir y modificar secuencialmente precursores que finalmente se convierten en metabolitos secundarios diana. Al mismo tiempo, la producción de metabolitos secundarios se reducirá si otras enzimas metabolizan los precursores del metabolito deseado, drenando los grupos de precursores necesarios para construir los metabolitos secundarios. Por lo tanto, los estimulantes de enzimas particulares o inhibidores de otras enzimas pueden aumentar la velocidad y/o el rendimiento final de metabolitos secundarios en el cultivo de líneas celulares particulares. Además de nutrientes típicamente empleados en el cultivo de células vegetales, se pueden incluir otros ingredientes para mejorar la producción de alcaloides. En una forma de realización, el medio nutritivo incluye al menos un componente

seleccionado de entre agentes potenciadores, elicitores, estimulantes, precursores, inhibidores, reguladores del crecimiento, metales pesados y compuestos inhibidores de etileno.

La adición de uno o más agentes potenciadores al cultivo celular puede mejorar la producción de alcaloides. Los agentes potenciadores incluyen, pero sin limitación, agentes antisenescencia, agentes que afectan a la biosíntesis o a la acción del etileno, reguladores del crecimiento de las plantas, precursores, inhibidores de reacciones competitivas para precursores o los productos deseados, elicitores, jasmonato y compuestos relacionados de la ruta del ácido 12-oxofitodienoico, compuestos que tienen actividad de tipo auxina y sus precursores, y compuestos que tienen actividad de tipo citoquinina. La adición al medio de cultivo de precursores que incluyen, pero sin limitación, colesterol y/o acetato y/o sales de los mismos, puede aumentar la velocidad de biosíntesis y/o el rendimiento final. Dicha alimentación de precursores podría combinarse con otros factores tales como, pero sin limitación, inhibidores de rutas biosintéticas no deseadas y/o estimulación de la ruta biosintética deseada, por ejemplo, por medio de luz.

Se sabe que la producción de alcaloides indólicos en cultivos de células de *Catharanthus roseus* se suprime mediante la adición de compuestos de tipo auxina; asimismo, en el medio de cultivo para la producción de alcaloides, la omisión o la disminución del contenido de sustancias de tipo auxina mejoró la producción. La mejora de la producción de alcaloides por medio del o de los agentes potenciadores seleccionados se puede confirmar experimentalmente.

La velocidad de producción de alcaloides está determinada no por una única etapa limitante de la velocidad, sino por una interacción compleja entre una pluralidad de factores limitantes. La mitigación de uno cualquiera de los factores limitantes mejorará la producción de alcaloides, aunque la magnitud de la mejora dependerá de las condiciones de cultivo particulares, que determinan los efectos limitantes relativos de otras etapas en la producción de alcaloides una vez se haya mitigado una limitación particular. Las condiciones de cultivo que afectan a la interacción entre varios factores limitantes incluyen: la composición genética de las células; la composición del medio de cultivo; y el entorno gaseoso, la temperatura, la iluminación y el protocolo del proceso. El o los agentes potenciadores añadidos a un cultivo particular generalmente se seleccionará en vista de los factores limitantes en ese cultivo, que pueden determinarse empíricamente comparando los efectos de los agentes potenciadores individuales tal como se establece en el presente documento. Las cantidades típicas de agentes potenciadores para el cultivo celular son conocidas en la técnica.

Los elicitores incluyen, pero sin limitación, ácido jasmónico, jasmonato de metilo, jasmonatos naturales o sintéticos, ácido tuberónico, ácido cucúrbico, coronatina, indanoil-amidas tales como 6-etil-indanoil-isoleucina, ácidos alcanoicos, ácido 12-oxofitodienoico, sistemina, volicitina y compuestos relacionados con cualquiera de estos elicitores ejemplares. Los elicitores también incluyen, pero sin limitación, oligosacáridos, por ejemplo oligosacáridos de plantas, hongos o microbios; quitosano; quitina; glucanos; polisacáridos cíclicos; preparaciones que contienen material celular de bacterias, hongos, levaduras, plantas o insectos; material contenido en la 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.

Los elicitores especialmente útiles para la producción de alcaloides de *Veratrum* incluyen compuestos relacionados con el ácido jasmónico tales como jasmonatos, cucurbatos y tuberonatos. Las indanoil-amidas también son elicitores útiles. Los metales pesados tales como el cadmio, el vanadio y la plata son útiles en forma de sal o de complejo. La quitina, los quitosanos (especialmente el glutamato de quitosano), los N-acetiloligosacáridos, los polisacáridos pécticos, los glicanos fúngicos (que contienen 5 o más azúcares), los glucoproteogalactanos fúngicos, los elicitores de esfingolípidos, los polisacáridos pécticos y el ácido araquidónico también son elicitores útiles.

Los reguladores e inhibidores de crecimiento ejemplares incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos por Bringi en el documento WO 97/44476. Estos se pueden utilizar solos o en cualquier combinación. En general, los reguladores del crecimiento de las plantas incluyen una amplia diversidad de sustancias fácilmente conocidas por la literatura general de plantas. De estos, los reguladores del crecimiento particularmente adecuados para cultivos de *Veratrum* incluyen, pero sin limitación, compuestos de tipo auxina y/o citoquinina, por ejemplo, ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido naftalenoacético (NAA), ácido fenoxiacético y ácidos fenoxiacéticos sustituidos con halógeno, picloram, dicamba, bencilaminopurina, kinetina, zeatina, tidiazurón y ácido indolacético. Los aminoácidos incluyen cualquier aminoácido natural o sintético utilizado por las células, tales como la glutamina, el ácido glutámico y el ácido aspártico.

Otros compuestos que incluyen, pero sin limitación, ácido alfa-amino-isobutírico (que simula la inducción de rol C) y/o alfa DL-di-fluorometil-ornitina (que puede inducir un fenotipo/situación bioquímica similar a la inducida por RI-T-ADN) podrían añadirse al medio de cultivo para reducir compuestos no relacionados y/o para aumentar los rendimientos del producto.

También es deseable reducir o evitar el oscurecimiento oxidativo en el cultivo celular. Por lo tanto, se pueden añadir agentes antioscurecimiento para inhibir la oxidación de exudados fenólicos. Las células en cultivo son células no diferenciadas, que son menos susceptibles al oscurecimiento que las células embrionarias.

Los intervalos de concentración sugeridos para estos componentes del medio se proporcionan más adelante, pero la optimización rutinaria puede mostrar condiciones preferidas fuera de estos intervalos para líneas celulares particulares y/o condiciones de cultivo particulares. Todas las concentraciones se refieren a valores iniciales promedio en el medio extracelular después de la adición. Las concentraciones en las soluciones de alimentación y, por lo tanto, localmente, en contacto con las células podrían ser más altas que las indicadas. Los elicitores, tales como los compuestos relacionados con el ácido jasmónico, se pueden utilizar a dosis de aproximadamente 0,01 µmol/l a aproximadamente 1 mmol/l, preferentemente de aproximadamente 1 µmol/l a aproximadamente 500 µmol/l. Las preparaciones que contienen material celular pueden añadirse en función de la concentración de un constituyente específico de la preparación o como una fracción del volumen de cultivo. Los metales pesados y los inhibidores de etileno, tales como sales o complejos de plata, se pueden utilizar en concentraciones de hasta aproximadamente 1 mmol/l, preferentemente de aproximadamente 0,01 µmol/l a aproximadamente 500 µmol/l. Se pueden utilizar otros inhibidores de las rutas metabólicas a concentraciones de aproximadamente 1 µmol/l a aproximadamente 5 mmol/l. Los compuestos aromáticos que incluyen una funcionalidad metilendioxi pueden incluirse en concentraciones de aproximadamente 0,1 µmol/l a aproximadamente 5 mmol/l, preferentemente de aproximadamente 1 µmol/l a aproximadamente 2 mmol/l. Los reguladores del crecimiento tales como compuestos con actividad de tipo auxina; compuestos con actividad de tipo citoquinina; compuestos con actividad de tipo ácido giberrélico, de tipo ácido absícico o de tipo brasinoesteroide, pueden utilizarse a concentraciones de aproximadamente 0,001 µmol/l a aproximadamente 2 mmol/l, preferentemente de aproximadamente 0,01 µmol/l a aproximadamente 1 mmol/l. Los precursores, tales como aminoácidos o precursores terpenoides, se pueden utilizar a concentraciones de aproximadamente 1 µmol/l a aproximadamente 20 mmol/l, preferentemente de aproximadamente 10 µmol/l a aproximadamente 10 mmol/l. Utilizando estas concentraciones sugeridas como guía, la optimización rutinaria puede discernir qué componente o combinación de componentes y qué concentraciones, incluidas concentraciones fuera de los intervalos sugeridos anteriormente, son útiles para maximizar la producción de alcaloides.

Cultivo celular: otras condiciones de reacción

Tal como se ha descrito anteriormente, las células pueden cultivarse en condiciones que favorezcan la producción y/o el crecimiento. Además de modificar los componentes del medio, también se pueden modificar otras condiciones de reacción para obtener el resultado deseado. Por ejemplo, se puede ajustar el intervalo de temperatura. Las temperaturas preferidas incluyen aproximadamente de 0 ºC a aproximadamente 35 ºC, de forma más preferida de aproximadamente 15 ºC a aproximadamente 35 ºC, y de forma incluso más preferida de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 30 ºC. De la misma forma, se pueden alterar los periodos del ciclo de luz/oscuridad, o se puede aplicar dentro de un ciclo de producción un primer periodo de tiempo (más de 24 horas) en la oscuridad seguido de un segundo periodo de tiempo (más de 24 horas) de iluminación (preferentemente de aproximadamente 10 µmol de fotones $m^{-2}s^{-1}$ a aproximadamente 250 µmol de fotones $m^{-2}s^{-1}$). Este procedimiento puede aplicarse una o dos veces, o puede aplicarse varias veces de forma repetitiva.

Los niveles de gases tales como oxígeno, dióxido de carbono y etileno pueden regularse para favorecer la producción de alcaloides o para favorecer la acumulación de biomasa. El cultivo rutinario en recipientes de cultivo a escala de laboratorio mantenidos en una atmósfera de aire, con cierres típicos tales como láminas, tapones o tapas, da como resultado niveles de oxígeno disuelto por debajo de la saturación del aire y niveles de dióxido de carbono y etileno más altos que los presentes en el aire atmosférico. Por lo tanto, de forma rutinaria, los niveles de dióxido de carbono en el espacio de cabeza del cultivo son típicamente superiores a aproximadamente el 0,03% v/v. Sin embargo, las concentraciones de dióxido de carbono y/o etileno se pueden ajustar para favorecer la producción de alcaloides o para favorecer la propagación celular. En una forma de realización, la producción de alcaloides se favorece ajustando el nivel de dióxido de carbono en el espacio de cabeza o la corriente de aireación para que sea aproximadamente el 0,1% (aproximadamente 3 veces el nivel atmosférico) a aproximadamente el 10%, preferentemente de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 7% en equilibrio con el líquido a la temperatura de operación. En otra forma de realización, la concentración de etileno es inferior a aproximadamente 500 ppm y preferentemente inferior a 200 ppm medida en la fase gaseosa en equilibrio con la fase líquida a la temperatura de operación. Los gases también se pueden proporcionar de forma independiente, por ejemplo, las fuentes de oxígeno y dióxido de carbono pueden ser diferentes.

Los gases disueltos pueden regularse variando uno o más de: la velocidad de agitación, la composición del gas de aireación, la velocidad de suministro del gas de aireación, la velocidad de purga del gas de aireación y la presión total en el recipiente de cultivo. Las velocidades de agitación se pueden regular a aproximadamente 1 a aproximadamente 500 por minuto (rotaciones u oscilaciones de agitadores o circulaciones de fluido). La velocidad de suministro de gas puede ser cualquier velocidad apropiada para lograr una concentración de gas disuelto que sea adecuada u óptima para la acumulación de biomasa celular o el mantenimiento o la formación de productos. Preferentemente, esta velocidad es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 volúmenes de gas por volumen de caldo de cultivo por minuto y se puede suministrar directamente al líquido de cultivo, o en una porción separada de líquido que posteriormente se mezcla con el resto del cultivo, o en el espacio de cabeza del cultivo, o dentro de un dispositivo para poner en contacto las especies de gas con el medio de cultivo. En una forma de realización, las concentraciones de oxígeno disuelto se regulan a de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 200%, preferentemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 150%, de saturación de aire a la

temperatura de operación. Por supuesto, es posible que por varias razones operativas, por ejemplo, reducción temporal de la aireación, el nivel de oxígeno disuelto pueda ser tan bajo como cero durante periodos de tiempo que van desde unos pocos minutos hasta varias horas. Las combinaciones útiles específicas de oxígeno, dióxido de carbono y etileno, fuera de estos intervalos, se pueden descubrir mediante experimentación rutinaria y se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Cultivo celular: operaciones de proceso

El modo operativo para un proceso de cultivo de células vegetales se refiere a la forma en que se añaden o eliminan nutrientes, células y productos con respecto al tiempo (Payne et al. 1991). Los ingredientes que se proporcionan a las células se pueden proporcionar de varias formas diferentes. Los ingredientes se pueden añadir en una etapa particular de crecimiento, tal como retardado, exponencial o estacionario. Todos los ingredientes pueden proporcionarse de una vez y después de un periodo de tiempo adecuado, el producto puede recuperarse. Alternativamente, no todos los ingredientes pueden proporcionarse de una vez. Más bien, uno o más de ellos se pueden proporcionar en diferentes momentos durante el cultivo. Además, las adiciones pueden ser discontinuas o escalonadas con respecto al tiempo de contacto inicial y la duración de dicha provisión puede variar para diferentes ingredientes. Los ingredientes se pueden proporcionar en una pluralidad de partes. Se pueden suministrar uno o más ingredientes como parte de soluciones que se ponen en contacto por separado con el cultivo celular o partes del mismo. Pueden eliminarse porciones del cultivo en cualquier momento o periódicamente y utilizarse para crioconservación, propagación celular adicional, producción y/o recuperación. Dichas porciones que contienen células pueden exponerse adicionalmente a nutrientes u otros ingredientes, según se desee. En el presente documento se describen ejemplos de procedimientos de subcultivo.

En una forma de realización, se puede añadir medio que contiene nutrientes u otros ingredientes para reponer una porción o la totalidad del volumen retirado. La velocidad de reabastecimiento (dilución) (velocidad de adición volumétrica dividida por el volumen de líquido en el recipiente) puede variar entre 0,1 y 10 veces la velocidad de crecimiento específico de las células. Pueden volver a añadirse porciones de dicho material retirado al cultivo original, por ejemplo, las células y el medio pueden retirarse, una parte de las células o el medio pueden utilizarse para la recuperación del producto y las células o el medio restantes pueden devolverse al mismo. La velocidad de suministro de ingredientes al cultivo o los niveles de varios ingredientes en el cultivo pueden regularse para producir y recuperar el producto ventajosamente. Pueden exponerse porciones separadas del cultivo a los ingredientes en cualquiera de los modos anteriores y luego combinarse en proporciones determinadas que son ventajosas para la producción. Además, el contenido celular del cultivo puede ajustarse para producir ventajosamente producto o células propagadas. El ajuste del contenido de células puede combinarse ventajosamente con estrategias para ponerlo en contacto con nutrientes u otros ingredientes.

El procedimiento de cultivo puede incluir intercambio de medio. Tal como se documenta por ejemplo por Bringi en el documento WO 97/44476, la eliminación del medio gastado y la reposición de medio nuevo periódicamente, por ejemplo, cada pocos días, puede mejorar significativamente la producción total, así como aumentar las cantidades de producto extracelular. Los efectos estimulantes del intercambio de medio pueden deberse a la retirada de producto *in situ,* lo que evitaría la inhibición de la retroalimentación y la degradación del producto. Dichos efectos positivos de retirada de producto *in situ* en la producción de metabolitos secundarios y la secreción en cultivos en suspensión de plantas no relacionadas han sido documentados por, entre otros, Robins et al., "The Stimulation of Anthraquinone Production by Cinchona ledgeriana Cultures with Polymeric Adsorbents," Appl. Microbiol Biotechnol 24: 35-41 (1986) y Asada et al., "Stimulation of Ajmalicine Production and Excretion from Catharanthus roseus: Effects of Adsorption *in situ*, Elicitors and Alginate Immobilization," Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 475-81 (1989). La eliminación periódica del medio gastado incorpora las ventajas anteriores y, adicionalmente, puede servir para suprimir la represión de la biosíntesis secundaria eliminando otros componentes inhibidores del medio. La retirada *in situ* del producto también se puede utilizar sin cambio de medio. Por ejemplo, el producto puede retirarse por absorción de resina para estimular una mayor producción.

La reposición de medio nuevo a las células que se someten a la biosíntesis activa también puede mejorar la producción al proporcionar nutrientes esenciales que se han agotado. Por ejemplo, Miyasaka et al. fueron capaces de estimular las células en fase estacionaria de *Salvia miltiorhiza* para producir los metabolitos de diterpeno criptotanshinona 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). Presumiblemente, la biosíntesis había cesado debido a la limitación de carbono en la fase estacionaria. El uso de un protocolo de intercambio periódico de medio para el presente procedimiento de cultivo puede proporcionar beneficios similares.

Se contempla que la cantidad de medio intercambiado, la frecuencia de intercambio y la composición del medio que se va a reponer pueden variar según diversas formas de realización de la invención. La capacidad de estimular la biosíntesis y la secreción por medio del intercambio tiene implicaciones importantes para el diseño y operación de un proceso comercial eficaz en modo continuo, semicontinuo o por alimentación por lotes.

Cuando todos los nutrientes se suministran inicialmente, y los contenidos del cultivo que comprenden células y producto se recolectan al final del periodo de cultivo, el modo operativo se denomina "proceso por lotes de una sola etapa". En la práctica, algunos ingredientes podrían añadirse primero y otros poco después, por ejemplo, debido a los requisitos de procesamiento por separado para diferentes ingredientes. Cuando un proceso por lotes se divide en dos fases secuenciales, una fase de crecimiento y una de producción, cambiándose el medio entre las dos fases, el modo operativo se denomina "proceso por lotes de crecimiento/producción en dos etapas". El procedimiento puede incluir una transición del medio de crecimiento al medio de producción mediante un cambio abrupto por etapas, o progresivamente mediante una serie de etapas, o mediante un cambio progresivo y continuo. En un extremo, el cambio progresivo se realiza mediante un reemplazo progresivo de un medio con una composición que cambia gradualmente. En otra alternativa, el cambio progresivo se realiza alimentando uno o más componentes del medio de producción al cultivo en fase de crecimiento. Este es un ejemplo del proceso de alimentación por lotes. En una operación de "alimentación por lotes", se suministran componentes del medio particulares tales como nutrientes y/o uno o más agentes potenciadores, ya sea de forma periódica o continua durante la totalidad o parte del transcurso de un cultivo de una o dos etapas. Se puede encontrar una descripción de nutrientes y agentes potenciadores, por ejemplo, en la tabla A o las tablas 1 y 2 del documento WO 97/44476. Adicionalmente, también se puede emplear una combinación de cambios abruptos y progresivos. En un ejemplo, una parte del medio nutritivo se puede cambiar abruptamente mientras otros componentes se alimentan lentamente.

Utilizando un modo de alimentación por lotes se ha descubierto que las células pueden mantenerse en un estado productivo durante un periodo prolongado y, de hecho, que la productividad de las células puede potenciarse. Será evidente para el experto en la técnica que la composición de la alimentación puede variarse para obtener los resultados deseados, tales como la prolongación de la fase de producción para aumentar el rendimiento del producto, o la prolongación de la fase de crecimiento para lograr una mayor densidad de biomasa. La selección de condiciones adecuadas para lograr una productividad y un rendimiento óptimos se encuentran dentro de la habilidad del experto en vista de las enseñanzas descritas en el presente documento. De forma similar, las variaciones de otros parámetros operativos, tales como el tiempo y la duración de la adición y la velocidad de adición de los componentes del lote alimentado, para lograr los resultados deseados se encuentran al alcance del experto en la técnica en vista de las enseñanzas descritas en el presente documento.

En una forma de realización, una porción sustancial, pero no la totalidad, del contenido de un cultivo por lotes se reemplaza por medio nuevo para lograr un crecimiento celular y una producción en continuo; este modo de proceso se asemeja a una operación de "extracción y relleno repetidos" y se denomina "proceso semicontinuo". En otra forma de realización, el proceso es "continuo", es decir, se suministra continuamente medio nuevo y el medio efluente se elimina de forma continua o repetitiva.

En una forma de realización, el modo de operación es un "modo de perfusión", es decir, las células se mantienen sustancialmente dentro del reactor. En otra forma de realización, el proceso es "quimiostático", es decir, las células se retiran continuamente con el medio efluente.

Una vez iniciado, se puede seguir cultivando un cultivo en suspensión, ya sea separando las células sustancialmente del medio (típicamente por filtración) y después reintroduciendo una porción en un medio que contiene nutrientes, o transfiriendo un volumen de caldo de cultivo (células y medio) a un medio que contiene nutrientes, o permitiendo que las células se asienten y a continuación eliminando cualquier porción de medio ya presente y reintroduciendo medio que contiene nutrientes. Cuando las células se separan y se transfieren a un medio que contiene nutrientes diferente, la cantidad transferida puede ser de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 30%, preferentemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25%, sobre una base de peso nuevo. Debe indicarse que a medida que las células se aclimatan y/o crecen, esta fracción puede cambiar. Cuando las células y los medios se transfieren volumétricamente, la relación del volumen transferido con respecto al volumen final puede ser de aproximadamente el 1% a sustancialmente todo el volumen. En este caso, los nutrientes nuevos se pueden suministrar en forma concentrada, lo que da como resultado un pequeño aumento de volumen. El cultivo se puede dividir así en porciones. En una forma de realización, cada porción se utiliza opcionalmente para la producción de alcaloides. Cada porción puede, pero no es necesario, cultivarse en las mismas condiciones que la otra o como el cultivo original. La duración del cultivo es preferentemente de 2 a 50 días, de 2 a 15 días, de 5 a 10 días, o de aproximadamente 7 días. La duración del crecimiento puede prolongarse suplementando un medio parcialmente agotado con nutrientes.

Recuperación de alcaloide

Los alcaloides se pueden recuperar a partir de la totalidad del cultivo o a partir de cualquier porción del cultivo (solo medio, solo células o una cantidad de células y medio conjuntamente). El material celular puede liofilizarse previamente al procedimiento de extracción. Se pueden utilizar otros procedimientos conocidos en la técnica para preparar material celular y/o medio para el procedimiento de extracción apropiado. Los alcaloides se pueden recuperar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitación, extracción utilizando un disolvente polar no acuoso, extracción utilizando un medio ácido, extracción utilizando un medio básico, recuperación por absorción en resina en la que la resina se encuentra dentro o fuera del recipiente de cultivo. Los

alcaloides se pueden recuperar en cualquier momento durante el cultivo o después de la finalización del periodo de cultivo.

Para articular adicionalmente la invención descrita anteriormente, proporcionamos los ejemplos no limitantes siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de células de *Veratrum*

Los cultivos de células de *Veratrum* se inician a partir de cualquier parte adecuada de la planta de *Veratrum* utilizando técnicas aceptadas de cultivo de células vegetales. Las células sustancialmente no diferenciadas se propagan en medio nutritivo solidificado o líquido en las condiciones siguientes, excepto que las células cultivadas en medio solidificado no requieren agitación. Las células de *Veratrum* se cultivan a 20-30 ºC, a pH 4-7, en la oscuridad, utilizando agitación para mezclar el cultivo y proporcionando oxígeno y otros gases y ventilación poniendo en contacto el gas que contiene oxígeno con la suspensión celular. El oxígeno se mantiene al 10%-150% de saturación de aire a la temperatura de operación, y el dióxido de carbono se mantiene a más del 0,05%. El nivel de oxígeno y de otros gases se regula ajustando la agitación, la presión, la composición del gas, la velocidad de ventilación y/o la velocidad de alimentación del gas.

El medio contiene componentes capaces de soportar el crecimiento de células de *Veratrum*. Por ejemplo, el medio puede contener azúcar (aproximadamente 1-100 g/l) y nitrógeno acumulativo de una o más fuentes (aproximadamente 1-100 mmol/l). El medio también puede contener reguladores del crecimiento tales como compuestos de tipo auxina y/o citoquinina, por ejemplo ácido naftaleno-acético (NAA), ácido fenoxiacético y ácidos fenoxiacéticos sustituidos con halógeno, picloram, dicamba, bencilaminopurina, kinetina, zeatina, tidiazurón y/o ácido indolacético. El medio puede contener opcionalmente otros alcaloides de *Veratrum*, aminoácidos tales como glutamina, una fuente de iones de plata, por ejemplo, nitrato de plata o tiosulfato de plata, u otro ingrediente capaz de afectar a la biosíntesis o a la acción del etileno. La concentración de inóculo de células de *Veratrum* puede ser de aproximadamente 10 g de peso de células nuevas/l a aproximadamente 300 g de peso de células nuevas/l. El medio también puede contener uno o más elicitores, tales como una indanoil-amida, una sustancia relacionada con el ácido jasmónico u otro elicitor.

Estos componentes del medio pueden añadirse al comienzo del cultivo, después de la fase de crecimiento exponencial, o de forma intermitente a lo largo de todo el periodo de cultivo. Los componentes del medio se pueden añadir de una vez o en diferentes momentos durante el cultivo y se pueden alimentar de forma continua o intermitente. Los ingredientes se pueden añadir antes o después de la inclusión de células vegetales en el caldo de cultivo. Además, se pueden añadir nutrientes u otros ingredientes durante el cultivo. Opcionalmente, el medio se puede cambiar después de un periodo adecuado de cultivo mediante el cual las células se exponen nuevamente a un medio que contiene ingredientes similares a los descritos anteriormente. Dichos cambios incluyen cambiar la cantidad de uno o más de azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, y/o cambiar la cantidad de una o más fuentes de nitrógeno tales como nitrato, amonio, aminoácidos, casaminoácidos.

Después de un periodo de cultivo, el cultivo se recolecta y los niveles de alcaloides de *Veratrum* se cuantifican utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y se identifican alcaloides específicos de *Veratrum* utilizando cromatografía líquida-matriz de fotodiodos-espectrómetro de masas (CL-PDA-EM). Los alcaloides de *Veratrum* pueden recuperarse de estos cultivos mediante procedimientos apropiados de extracción y purificación.

Ejemplo 2: Detección y cuantificación de alcaloides de *Veratrum*

Este ejemplo proporciona un procedimiento analítico apropiado para cuantificar ciclopamina, jervina y alcaloides esteroideos relacionados en cultivos de *Veratrum sp.* El cribado inicial se realizó por cromatografía líquida-matriz de fotodiodos-espectrómetro de masas (CL-PDA-EM). Esta técnica es muy valiosa en la identificación de compuestos en mezclas complejas, especialmente cuando se utilizan algunos experimentos espectrométricos de masas especializados, tales como la monitorización de múltiples reacciones (MRM) y el monitor de iones individuales (SIM). Este enfoque dirigido es adecuado para investigar la producción de uno o más compuestos diana en cultivo celular.

En los experimentos de MRM, se lleva a cabo la exploración Q1 (exploración completa, primer cuadrupolo) y exploración por EM/EM (se obtienen fragmentos y producciones) de un analito. Después se seleccionan productos de fragmentación específicos de los iones pseudo-moleculares protonados ($M + H^+$) en función de su exploración inicial. Después se realiza la optimización del instrumento para lograr una detección más sensible basada en los pares de iones seleccionados. El procedimiento de selección ha demostrado ser fidedigno, preciso y sensible al nivel de µg/l.

Los experimentos de MRM con un instrumento de triple cuadrupolo se diseñaron para obtener la máxima sensibilidad de detección para los compuestos diana. Este tipo de experimento de espectrometría de masas se utiliza ampliamente para detectar y cuantificar fármacos y metabolitos de fármacos en la industria farmacéutica.

Utilizando las técnicas anteriores, es posible predecir el *m*/*z* del precursor y un *m*/*z* de fragmento (transición de MRM) para muchos metabolitos comunes de una molécula de fármaco una vez que se conoce la estructura y el peso molecular de la molécula. Estos experimentos de MRM se pueden utilizar para cribar metabolitos específicos y activar una exploración de iones del producto dependiente para confirmar la estructura del metabolito. El mismo principio se puede aplicar para estudiar la producción y la optimización de moléculas diana en un cultivo celular si se conoce el peso molecular y la estructura de la molécula diana. Estos experimentos de MRM altamente sensibles se utilizaron para activar adquisiciones dependientes de exploraciones de iones de producto (EM/EM). Se detectaron ciclopamina y jervina en cultivos de células vegetales de *Veratrum sp.* utilizando este procedimiento.

Metodología general: Se utilizó la metodología siguiente para cada ejemplo, excepto donde se indique.

Equipos y materiales:

Reactivos: acetonitrilo (grado HPLC), metanol (grado HPLC), $CHCl_3$ y ácido acético glacial (todos adquiridos de VWR)

Patrones: ciclopamina, jervina y/o tomatidina (Calbiochem).

Equipo: espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Premier (Micromass Ltd.), sistema Acquity UPLC (Waters), columna BEH C_{18} (1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters)

Preparación de patrones

Se disolvió 1 mg de alcaloide (por ejemplo, jervina, ciclopamina, tomatidina) individualmente en metanol ácido (ácido acético al 0,1% v/v) hasta un volumen final de 10 ml. La solución de patrón se sonicó durante 1 minuto.

Preparación de la muestra: Cada muestra de *Veratrum* se trituró en un vial de vidrio y se añadió metanol ácido (20 ml, ácido fórmico al 1%). La muestra se sonicó durante 2 horas, después se dejó en la oscuridad durante la noche. El vial se centrifugó y se retiró su sobrenadante. El sobrenadante se concentró en un evaporador giratorio, y el extracto resultante se reconstituyó en metanol ácido (ácido fórmico al 1% v/v).

Separación cromatográfica de líquidos: La separación se realizó en un sistema UPLC Waters Acquity equipado con una columna BEH C_{18} (1,7 µm, 2,1 x 50 mm). Se inyectaron partes alícuotas de veinte microlitros (20 µl) utilizando un automuestreador. El disolvente A era ácido fórmico al 0,05% en agua desionizada, y el disolvente B era acetonitrilo de grado HPLC con ácido fórmico al 0,05%.

La separación se logró mediante una retención inicial del 77% de A durante 1 minuto, un gradiente lineal del 77% de A al 100% de B en 4,5 minutos, seguido de una retención del 100% de B durante 0,1 minutos. Durante el análisis, el caudal fue de 350 µl/min, y la columna se mantuvo a 35 ºC.

Espectrometría de masas: Todos los datos de masa se obtuvieron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Premier (Micromass Ltd.). El espectrómetro de masas se operó con el programa informático MassLynx V4.0. Para las muestras investigadas, el instrumento se operó en modo de electropulverización positiva con un voltaje capilar de 3,50 kV, una temperatura de desolvatación de 120 ºC, una temperatura de fuente de 120 ºC y un voltaje de cono de muestra de 45 V. (Para la detección ejemplar de ciclopamina y jervina, véase el ejemplo 4, figura 3.)

Ejemplo 3: Producción de ciclopamina a partir de cultivo de callos

Se esterilizaron semillas de *Veratrum californicum* en su superficie utilizando técnicas estándar y se cultivaron en agar-medio de crecimiento solidificado. En algunos casos, las semillas se dispusieron en filtros empapados en agua durante 1 a 3 meses, después se transifirieron a la combinación agua/agar (0,5-1% de agar p/v) durante 2 a 4 semanas. El medio de crecimiento incluía:

Sales de MS, 2% p/v de sacarosa y 10 micromol/l de picloram;

Sales de MS, 2% p/v de sacarosa y 10 micromol/l de dicamba;

Sales de MS, 2% p/v de sacarosa y 10 micormol/l de ácido alfa-naftaleno-acético (NAA).

Antes del inicio del cultivo en suspensión (descrito en el ejemplo 4), se iniciaron callos y después se cultivaron en medio solidificado que contenía sales de MS, sacarosa al 2% y Dicamba 10 µM. Las transferencias de callos se realizaron periódicamente cada 1-8 semanas dependiendo del crecimiento de callos.

Se trituraron aproximadamente 50 mg de muestras de callos en un vial de vidrio y se extrajeron tres veces, cada una con una mezcla de 2 ml de metanol ácido y $CHCl_3$ (1:1 v/v) durante 60 minutos en un baño de sonicación. Cada vez, el vial se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante combinado se concentró en un evaporador centrífugo (Genavac). El extracto resultante se reconstituyó en una mezcla de cloroformo ($CHCl_3$) y metanol (MeOH) hasta un volumen final de 0,4 ml.

La separación cromatográfica se realizó tal como se describe en el ejemplo 2, excepto que utilizamos una retención inicial del 95% de A durante 1 minuto, un gradiente lineal del 95% de A al 100% de B en 10 minutos, seguido de la retención del 100% de B durante 1 minuto. El caudal fue de 0,3 ml/min.

Para el análisis de espectrometría de masas, se tomaron muestras de cada corriente líquida durante 0,1 s con espectros de masas adquiridos de 150 a 1000 Da. El instrumento se operó en modo de electropulverización positiva con un voltaje capilar de 3,00 kV, una temperatura de desolvatación de 120 ºC, una temperatura de la fuente de 100 ºC y un voltaje de cono de muestra de 45 V.

Se detectó ciclopamina en ambos callos. Véanse la figura 1 y la figura 2.

Ejemplo 4: Producción de alcaloides a partir del cultivo en suspensión

Los cultivos en suspensión se iniciaron transfiriendo aproximadamente 1 g de material de callo a un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenía 25 ml de un medio de crecimiento líquido que contenía sales de MS, sacarosa al 2% y Dicamba 10 µM. Este cultivo en suspensión se mantuvo en la oscuridad con agitación a 120 rpm en un agitador excéntrico de 1'. Los matraces se cerraron con un cierre de espuma de silicona de celda abierta para permitir la transferencia de gas. Los matraces se mantuvieron en una atmósfera de aire. Las células en suspensión del callo se transfirieron 5 veces a intervalos de transferencia apropiados durante un total de 45 días en medio de crecimiento líquido; el último ciclo fue de 11 días.

Se inocularon células en suspensión de cuatro cultivos de *Veratrum californicum* en MS-PM (un medio de producción basado en sales basales de Murashige y Skoog que contiene sales de MS, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sacarosa al 5%, jasmonato de metilo (MJS) 100 µM y Dicamba 20 µM) con una concentración de inóculo en peso nuevo del 20% p/v. Los cultivos se incubaron en una atmósfera de aire, en la oscuridad, a 25 ºC y con agitación a 180 rpm durante 14 días.

Las células en suspensión se prepararon para el análisis según la metodología general (véase el ejemplo 2), y el disolvente de cada vial de 2 ml de extracto reconstituido se eliminó mediante una corriente de nitrógeno. Los extractos de muestra se redisolvieron en 200 µl de metanol ácido (ácido fórmico al 1%) antes del análisis.

La adquisición de datos se realizó con exploración completa y monitorización de múltiples reacciones (MRM) de productos de fragmentación seleccionados de los iones pseudos-moleculares protonados (para ciclopamina *m/z, M+H*$^+$, 412,69 -> 321,65 y para jervina 426,58 -> 313,54). Se generaron curvas de calibración de cuatro puntos apropiadas para cada compuesto diana de interés inyectando 20 µl de soluciones de MeOH ácidas (ácido fórmico al 1%) que contenían cantidades conocidas de ciclopamina y jervina.

La identificación de dos alcaloides de interés, jervina y ciclopamina, se realizó comparando sus tiempos de retención, los espectros PDA UV, los espectros EM y los espectros EM/EM con los de los patrones conocidos. Se detectaron jervine y ciclopamina en un cultivo celular (véanse la figura 3 y la figura 4). La concentración de ciclopamina en el extracto se encontraba por debajo del límite de cuantificación, pero por encima del límite de detección (3:1, relación señal/ruido). La ciclopamina se detectó al nivel de µg/l.

Ejemplo 5: Producción de alcaloides a partir del cultivo en suspensión

Se esterilizaron en su superficie semillas de *Veratrum californicum* y se extrajeron embriones y se dispusieron en diversos medios sólidos tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3. Después de la esterilización de superficie, estos embriones se dispusieron directamente en medios sólidos que contenían sales de SH, sacarosa al 2% p/v y Dicamba 10 µM. El cultivo en medio sólido se continuó hasta que se produjeron callos de células no diferenciadas.

Se dispusieron porciones de callo con una densidad celular del 5% (p/v) en un medio de crecimiento líquido que contenía sales de SH, sacarosa al 2% y Dicamba 10 µM para formar un cultivo en suspensión. El índice de crecimiento para dichos cultivos en suspensión fue de aproximadamente 2 a lo largo de un periodo de crecimiento de 7 días. (El índice de crecimiento es la relación del peso nuevo o seco final con el peso nuevo o seco inicial correspondiente a lo largo de la duración del periodo de cultivo). Las células se separaron por filtración y después se inocularon en MS-PM o SH-PM a una densidad de inoculación de partida del 20% p/v. Las muestras se incubaron en una atmósfera de aire al 85% de humedad y 180 rpm en la oscuridad a una temperatura de 25 ºC. Se tomaron muestras de los cultivos y se analizaron después de 8, 9 y 10 días de incubación. Para un cultivo celular en suspensión de *Veratrum californicum,* la producción de alcaloides de *Veratrum* fue mayor en el día 9 tanto en MS-

PM como en SH-PM. Véanse la figura 5A y la figura 5B. La figura 6 y la figura 7 muestran datos de un experimento repetido utilizando el mismo cultivo celular. Los resultados para otro cultivo celular en suspensión de *Veratrum californicum* se muestran en la figura 8 y la figura 9.

Se detectaron ciclopamina y jervina en cada muestra. La producción de alcaloides aumentó desde el día 8 en adelante, posteriormente disminuyó hacia el día 14.

Ejemplo 6: Crioconservación de células de *Veratrum* utilizando el procedimiento de dos etapas

Se precultivan células de *Veratrum californicum* no diferenciadas de la cepa VEACCSP-94 en medio GM (IND64) líquido durante aproximadamente 7 días. Después del precultivo, las células no diferenciadas se transfieren a placas con medio GM (IND-64) sólido que comprenden aproximadamente el 0,8% o aproximadamente el 1,0% de agarosa.

Después del precultivo, las células de *Veratrum* se transfieren a medio GM (IND-64) líquido que comprende sorbitol 0,3-0,5 M y se incuban a aproximadamente 25 ºC durante aproximadamente 24 horas. Después de la incubación, las células de *Veratrum* se transfieren subsiguientemente a medio de crioconservación 1 líquido y se incuban durante aproximadamente 2-4 horas entre aproximadamente 0 ºC y 4 ºC.

Después, las células de *Veratrum* se enfrían a una velocidad de aproximadamente -0,33 ºC/minuto hasta que las células se enfrían a aproximadamente -40 ºC. Las células enfriadas se disponen inmediatamente en nitrógeno líquido y se crioconservan.

Ejemplo 7: Recuperación de células de *Veratrum* descongeladas

Las células de *Veratrum* del ejemplo 6 se descongelan desde un estado congelado en un baño de agua a 42 ºC con agitación ocasional hasta que las células ya no están congeladas. Se realizan ensayos de viabilidad celular por TTC sobre las células descongeladas para determinar la viabilidad celular de las células descongeladas. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos de viabilidad celular por TTC. El ensayo TTC revela que más del 50% de las células descongeladas eran viables.

Ejemplo 8: Crioconservación mediante vitrificacion

Después de un precultivo de células vegetales de *Veratrum* no diferenciadas en medio GM (IND64) sólido durante un periodo de aproximadamente 7 días tal como se ha establecido anteriormente en el presente documento, las células vegetales se crioconservan utilizando técnicas de vitrificación. Las células vegetales de *Veratrum* cultivadas se transfieren a medio GM (IND64) líquido que comprende aproximadamente 0,5 M de sorbitol, y las células vegetales se cultivan durante aproximadamente 32 horas en un agitador giratorio (120 rpm). Las células vegetales de *Veratrum* en suspensión transferidas son células vegetales pequeñas agregadas producidas utilizando un homogeneizador Bellco y un tamiz de tejido Bellco Cellector™ (malla 20/860 um) (Bellco Biotechnology, Vineland, Nueva Jersey).

A continuación, se retira el medio GM (IND64) líquido y las células vegetales de *Veratrum* se transfieren subsiguientemente a medio de crioconservación 2. La composición del medio de crioconservación 2 se proporciona en la tabla 7.

Tabla 7: Medio de crioconservación 2

Componentes
Azúcar seleccionado* [0,2 a 0,4 M]
Trisacárido seleccionado** [60 a 190 mM]
Agente de permeación [etilenglicol 0,5 a 1 M]

* Por un azúcar seleccionado se entiende un azúcar neutro, un azúcar de alcohol, sacarosa, maltosa, trehalosa o glicerol. Los azúcares neutros incluyen, pero sin limitación, glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa o ácido glucurónico. Los azúcares de alcohol incluyen, pero sin limitación, malitiol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, lactitol, eritritol o manitol.

** Por un trisacárido seleccionado se entiende melecitosa, panosa, rafinosa, kestosa o lactosacarosa.

Las células vegetales de *Veratrum* se incuban en el medio de crioconservación 2 (densidad celular = 20%) durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 ºC, después de lo cual se retira el medio de crioconservación 2. Aproximadamente una parte de las células vegetales de *Veratrum* tratadas con medio de crioconservación 2 se pesan y se añaden a cada criovial. Se añaden aproximadamente 5 partes de solución crioprotectora fría a cada criovial y las células se incuban a 0 ºC (en hielo) durante un periodo corto. La composición de la solución

crioprotectora fría se proporciona en la tabla 8. Inmediatamente después de esta incubación, el criovial se sumerge en nitrógeno líquido.

Tabla 8: Solución crioprotectora fría

Componentes
Azúcar seleccionado* [1,0-2,0 M]
Catión divalente [5,0-10,0 mM]
Agente de permeación [etilenglicol 2-5 M]

* Por un azúcar seleccionado se entiende un azúcar neutro, un azúcar de alcohol, sacarosa, maltosa, trehalosa o glicerol. Los azúcares neutros incluyen, pero sin limitación, glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa o ácido glucurónico. Los azúcares de alcohol incluyen, pero sin limitación, malitiol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, lactitol, eritritol o manitol.

Se descongelan crioviales que comprenden células vegetales de *Veratrum* después de la crioconservación a una temperatura de aproximadamente 40 ºC, en un baño de agua u otro entorno de temperatura mantenida, con agitación ocasional o agitación suave durante aproximadamente 4 minutos o hasta que las células congeladas se hayan descongelado.

Después de la descongelación y la esterilización de los crioviales (generalmente mediante exposición a etanol), el contenido de cada criovial descongelado y esterilizado se vierte/se diluye en 10 ml de medio líquido que contiene aproximadamente cationes divalentes 5-10 mM y sorbitol 0,1-1,0 M durante 10 minutos, después se pasa a través de un filtro con succión para eliminar la solución, y las células presentes en el papel de filtro se transfieren a medio GM (IND64) sólido y se incuban a 25 ºC en la oscuridad durante aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas. Después, el papel de filtro con células se transfiere a un medio GM (IND64) sólido nuevo y después se transfiere cada 7 días a un medio GM nuevo a 25 ºC en la oscuridad para la restauración de las funciones celulares.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:

a. cultivar células vegetales de la especie *Veratrum californicum* en un medio nutritivo para formar un cultivo celular de células no diferenciadas que produce un alcaloide de Veratrum; y

b. recuperar el alcaloide, en el que el alcaloide contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo].

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el alcaloide es ciclopamina o jervina.

3. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de cultivo comprende:

a. cultivar las células vegetales en un medio de crecimiento; y subsiguientemente

b. cultivar las células vegetales en un medio de producción que es diferente del medio de crecimiento.

4. Un procedimiento para producir un compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo], comprendiendo dicho procedimiento cultivar células no diferenciadas de una planta que pertenece a la especie *Veratrum californicum* que producen un alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] en un recipiente en presencia de uno o más estimulantes que promueven la biosíntesis del alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo], en el que la fase gaseosa en el recipiente de cultivo está regulada a un valor inferior al de la concentración de oxígeno en la atmósfera desde la etapa inicial del cultivo, o en el que la concentración de oxígeno disuelto en un medio fluido que está en contacto con las células está regulada a un valor inferior al de la concentración saturada de oxígeno disuelto a la temperatura desde la etapa inicial del cultivo, y recuperar compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] de los cultivos resultantes.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que las células vegetales que producen el compuesto alcaloide que contiene un anillo C-nor-D-homo-[14(13->12)-abeo] se cultivan mediante la introducción de gas oxigenado que contiene el 0,03%-10% de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo.

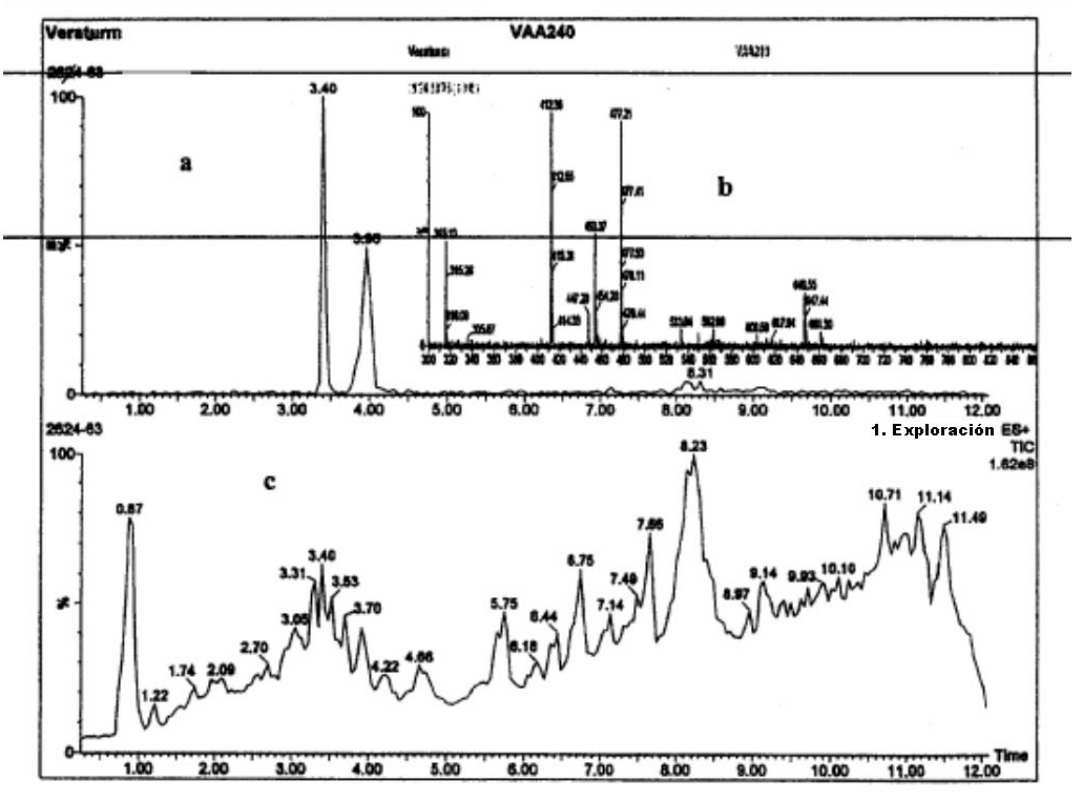

Versaturm
VAA240
a
b
c
3.40
5.90
8.31
1. Exploración ES+
TIC
0.87
1.22
1.74
2.09
2.70
3.05
3.31
3.40
3.53
3.70
4.22
4.66
5.75
6.18
6.44
6.75
7.14
7.49
7.86
8.23
8.97
9.14
9.93
10.10
10.71
11.14
11.49
Time

Figura 1

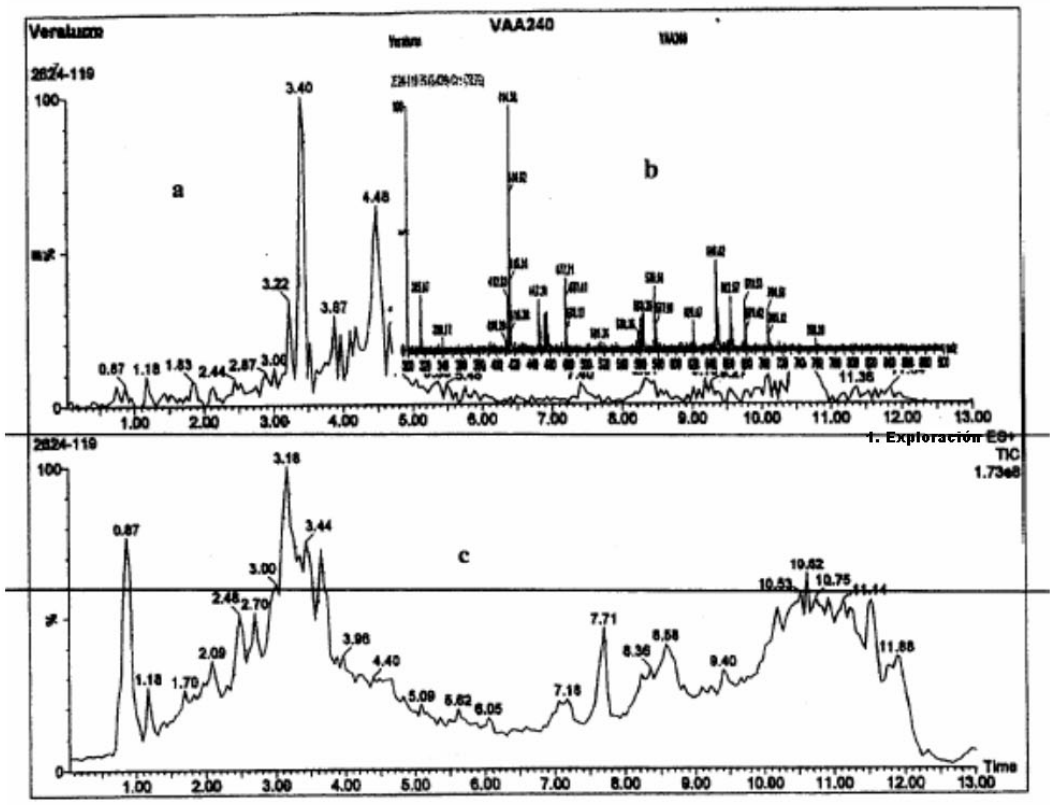

Veraluzo
VAA240
2624-119
a
b
c
1. Exploración ES+
TIC
1.73e8
Time

Figura 2

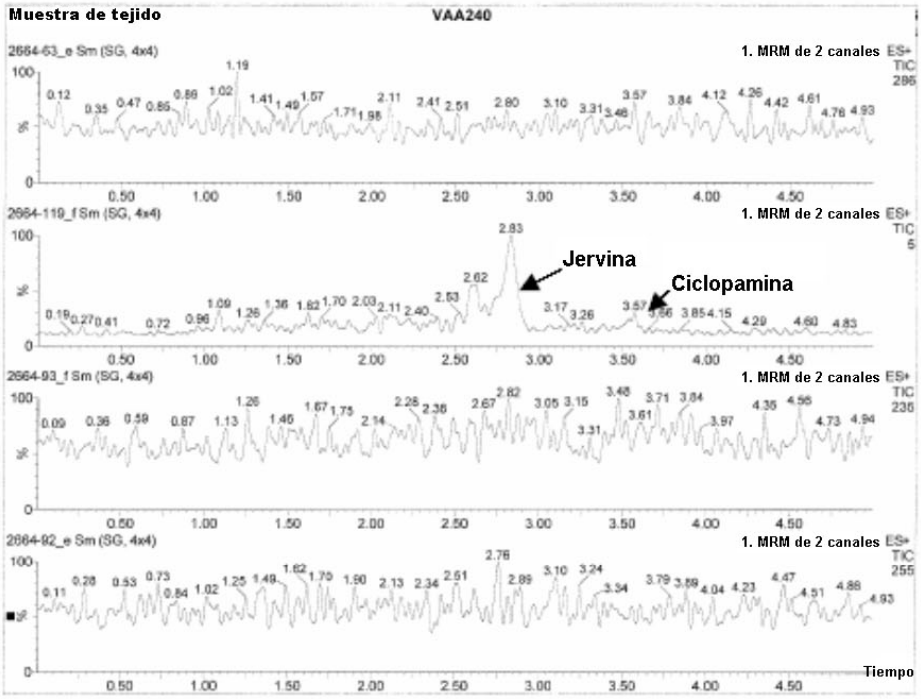

Muestra de tejido
VAA240
1. MRM de 2 canales ES+
TIC
Jervina
Ciclopamina
Tiempo

Figura 3

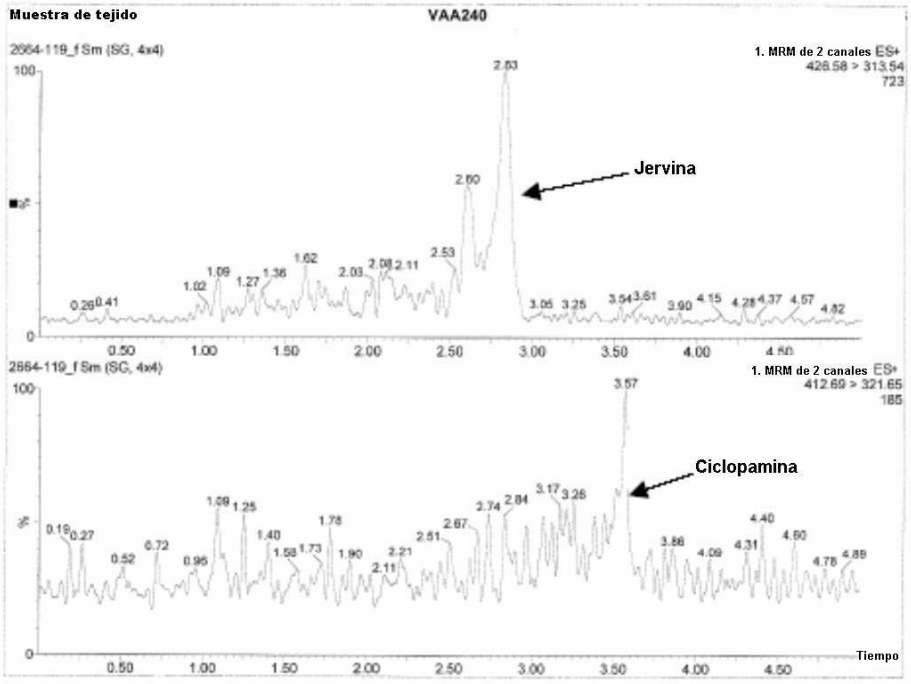
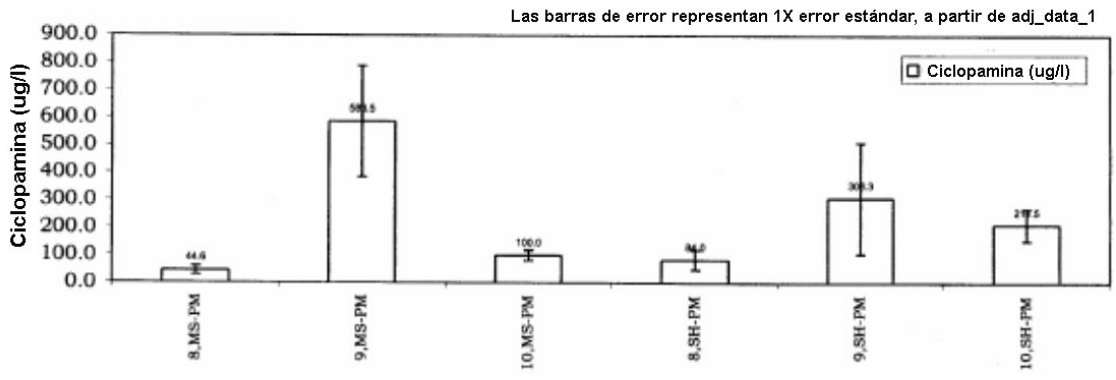
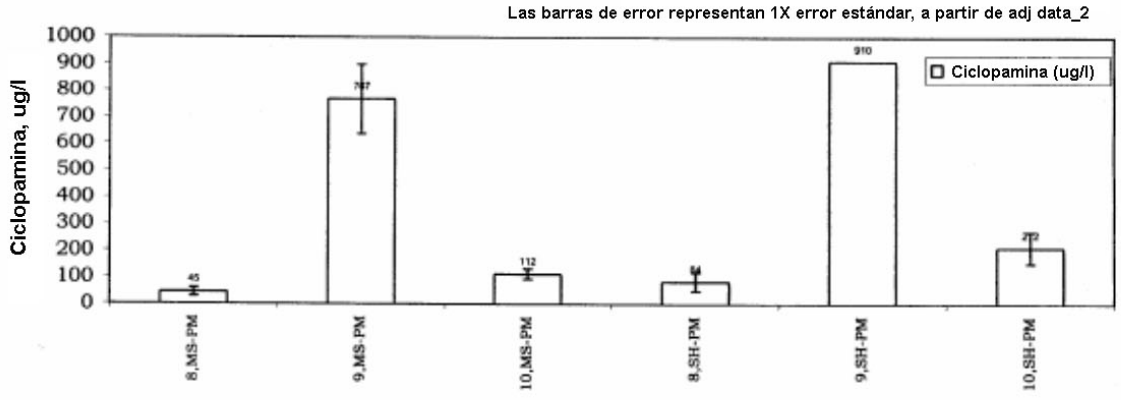

Muestra de tejido
VAA240
2664-119_f Sm (SG, 4x4)
1. MRM de 2 canales ES+
426.58 > 313.54
723
Jervina
2664-119_f Sm (SC, 4x4)
1. MRM de 2 canales ES+
412.69 > 321.65
185
Ciclopamina
Tiempo

Figura 4



Días en producción, medio de producción

Figura 5A



Días en producción, medio de producción

Figura 5B

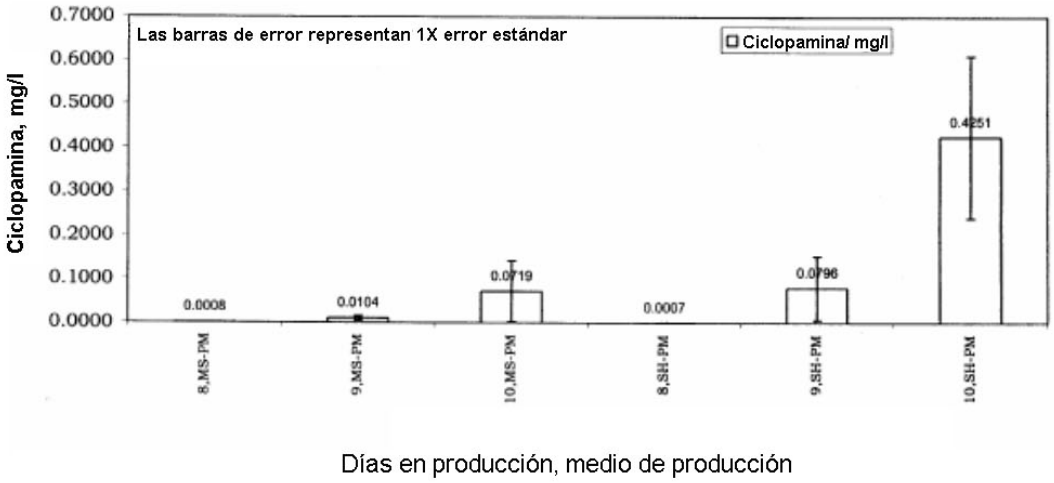

Las barras de error representan 1X error estándar
Ciclopamina/ mg/l
Ciclopamina, mg/l
0.7000
0.6000
0.5000
0.4000
0.3000
0.2000
0.1000
0.0000
0.0008
0.0104
0.0719
0.0007
0.0796
0.4251
8,MS-PM
9,MS-PM
10,MS-PM
8,SH-PM
9,SH-PM
10,SH-PM
Días en producción, medio de producción

Figura 6

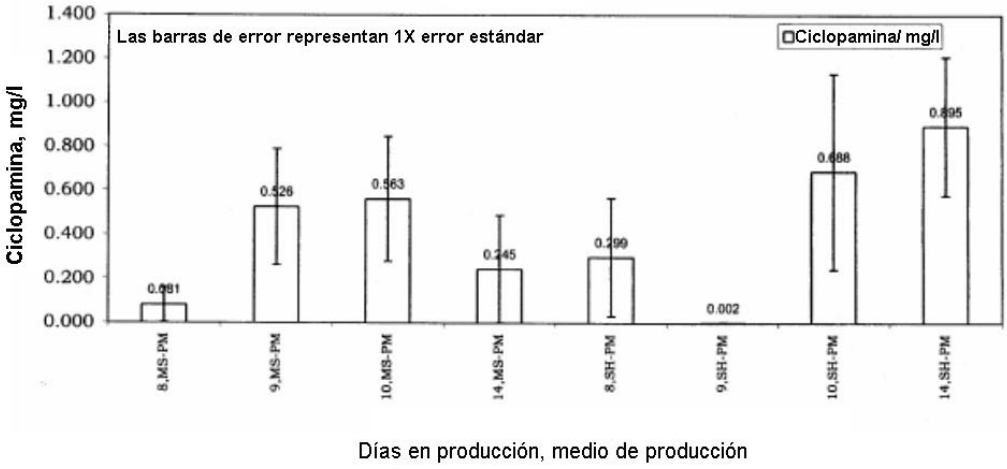
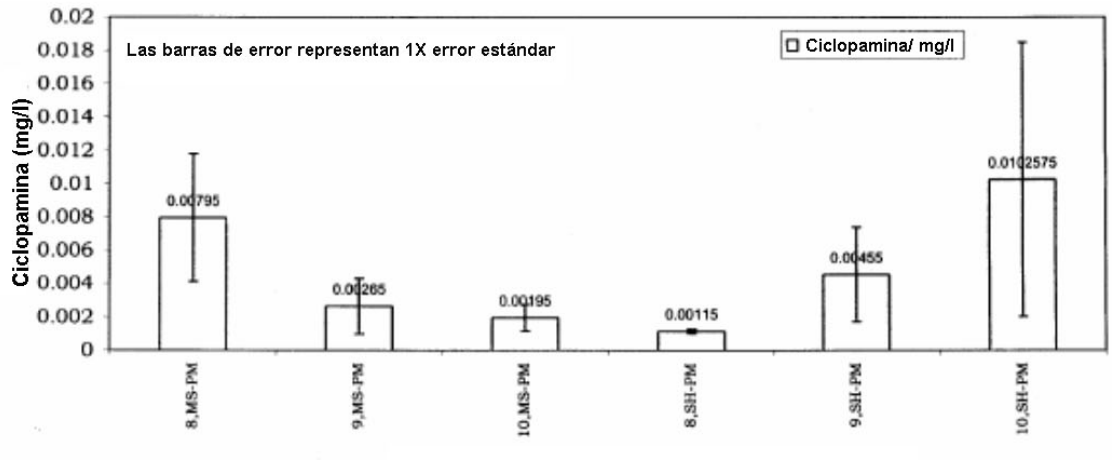

Las barras de error representan 1X error estándar
Ciclopamina/ mg/l
Ciclopamina, mg/l
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0.526
0.563
0.245
0.299
0.002
0.688
0.895
8,MS-PM
9,MS-PM
10,MS-PM
14,MS-PM
8,SH-PM
9,SH-PM
10,SH-PM
14,SH-PM
Días en producción, medio de producción

Figura 7



Días en producción, medio de producción

Figura 8

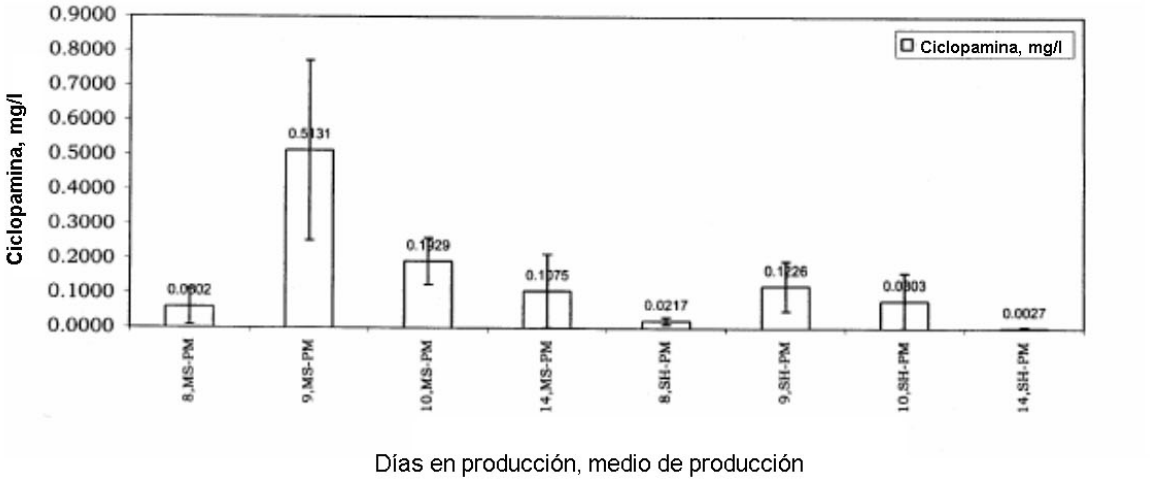

Ciclopamina, mg/l
0.9000
0.8000
0.7000
0.6000
0.5000
0.4000
0.3000
0.2000
0.1000
0.0000
Ciclopamina, mg/l
0.0802
0.5131
0.1929
0.1075
0.0217
0.1226
0.0803
0.0027
8,MS-PM
9,MS-PM
10,MS-PM
14,MS-PM
8,SH-PM
9,SH-PM
10,SH-PM
14,SH-PM
Días en producción, medio de producción

Figura 9