



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 074 929**

② Número de solicitud: 9202390

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **25.11.92**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.95**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.95

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Valladolid
CTT-OTRI Casa del Estudiante
c/ Real de Burgos s/n
47011 Valladolid, ES**

⑦ Inventor/es: **Girbes Juan, Tomás;
Arias Vallejo, Fco. Javier;
Rojo Rodríguez, M. Angeles;
Iglesias Álvarez, Rosario;
Ferrerías Rodríguez, José Miguel y
Méndez Corman, Enrique**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Proteína Euserratina 4 de la planta Euphorbia serrata L., procedimiento para su obtención y su utilización.**

⑤ Resumen:

Proteína Euserratina 4 de la planta Euphorbia serrata L., procedimiento para su obtención y su utilización. La Euserratina 4 presenta la siguiente composición de aminoácidos: Cys-0,8, Asp-35,8, Thr- 15,8, Ser-20,0, Glu-20,6, Pro-9,8, Gly- 14,2, Ala-11,6, Val-24,3, Met-1,6, Ile-15,4, Leu29,9, Tyr-11,4, Phe-10,6, Lys-24,3, His-2,7, Arg-6,2.

El procedimiento comprende: (a) extraer un liofilizado de Euphorbia serrata L.; (b) filtrar el extracto líquido por un lecho cromatográfico; (c) someter el fluido extraído a cromatografía de intercambio iónico; (d) eluir la columna con una solución de ClNa y NaPo₄H₂; (e) dializar la proteína eluida y someterla a cromatografía de intercambio iónico; (f) purificar la Euserratina 4, por cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico.

La Euserratina 4 se utiliza como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la síntesis de proteínas.

DESCRIPCION

Proteína euserratina 4 de la planta euphorbia serrata L., procedimiento para su obtención y su utilización.

5

Campo técnico de la invencion

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las proteínas inactivadoras de ribosomas, las cuales impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico. De forma más específica, la presente invención se refiere a una proteína denominada Euserratina 4 aislada de la planta Euphorbia serrata L., con actividad N - glucosidasa del ácido ribonucleico e inhibidora de la síntesis de proteínas, a su procedimiento de obtención a partir de dicha planta y a sus diferentes utilizaciones.

15 **Estado de la técnica anterior a la invencion**

En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes que son de naturaleza protéica y que a la espera de una definición bioquímica precisa se conocen con el nombre de proteínas inactivadoras de ribosomas (Gasperi - Campani y cols. *Biochem.J.* 186, 439 - 441 [1980]; Gasperi - Campani y cols. *J.Nat.Pro.* 48, 446 - 454 [1985]; Ferreras y cols. *Cell.Mol.Biol.* 35, 89 - 95 [1989]; Merino y cols. *J.Exp. Bot.* 41, 67 - 70 [1990]. Estas proteínas tienen una masa molecular (Mr) entre 20000 y 33000, son de naturaleza básica e impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico (Jiménez y Vázquez, *Annu.Rev.Microbiol.* 39, 649 - 672 [1985]; Roberts y Selitrennikoff, *Biosc.Rep.* 6, 19 - 29 [1986] Stirpe y Barbieri, *FEBS Lett.* 195, 1,8 [1986]; Endo y Tasurugi, *J.Biol.Chem.* 262, 8128 - 8130 [1987]; Stirpe y cols. *Nucleic Acid Res.* 16, 1349 - 1357 [1988]). El papel biológico de estas toxinas en la planta que las produce es totalmente desconocido (Roberts y Selitrennikoff *Biosc.Rep.* 6, 19 - 29 [1986]. Estas proteínas son inmunológica y químicamente diferentes unas de otras aunque guardan alguna homología secuencial en los aminoácidos del extremo amino - terminal en particular cuando las toxinas pertenecen a la misma familia botánica (Montecucchi y cols. *Int.J.Peptide Protein Res.* 33, 263 - 267 [1989]. Su enorme interés reside en que se utilizan en la construcción de inmunotoxinas para terapia del cáncer (Vitetta y Uhr, *Annu.Rev.Immunol.* 3, 197 - 212 [1985]; Frankel y cols. *Annu.Rev.Med.* 37, 125 - 142 [1986]; Koppel, *Bioconj, Chem.* 1, 13 - 23 [1990] Lord, *Plant Physiol.* 85, 1 1 - 3 [1987] y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Till y cols. *Science* 242, 1166 - 1168 [1988]; Ghetie y cols. *Bioconj, Chem.* 1, 24 - 31 [1990]). Muy recientemente se ha encontrado que diversos miembros de este grupo de proteínas y en particular la llamada tricosantina poseen per se carácter inactivador del virus RNA VIH - 1 que es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (McGrath y cols. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 86, 2844 - 2848 [1989]; Lee - Huang y cols. *FEBS Lett.* 272, 12 - 18 [1990]; Lee - Huang y cols. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 6570 - 6574 [1991]; Zarling y cols. *Nature* 347, 92 - 95 [1990]).

40

Dado que las proteínas son sustancias inmunogénicas poderosas, para poder abordar cualquier tipo de terapia con ellas es necesario disponer de una batería de dichas toxinas lo más amplia posible con el objeto de seleccionar la menos inmunorreactiva por un lado, y de poder substituir la toxina o la parte tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente por otro. Además no todas estas toxinas protéicas poseen la misma citotoxicidad (Lee - Huang y cols. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 6570 - 6574 [1991]).

45

Descripción detallada de la invencion

La presente invención, tal y como indica su título, se refiere a una proteína de la planta Euphorbia serrata L., denominada Euserratina 4, a un procedimiento para su obtención y a su utilización como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la síntesis de proteínas.

50

La mencionada proteína es una toxina vegetal de naturaleza protéica que en base a sus propiedades químico - físicas, inmunogénicas y bioquímicas por un lado y a su composición química y su secuencia amino - terminal por otro, se clasifica en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas.

55

La Euserratina 4 se aísla de la planta Euphorbia serrata L. mediante un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

60

- a) extraer la Euphorbia serrata L. previamente liofilizada con una solución acuosa de NaCl y NaPO_4H_2 ;

ES 2 074 929 A1

- b) filtrar el extracto líquido resultante previamente acidulado a través de un lecho cromatográfico.
- c) someter el fluido extraído a cromatografía de intercambio iónico, desechándose la parte no retenida en la columna;
- 5 d) eluir la columna, previamente lavada con soluciones acuosas de acetato sódico y fosfato monosódico, con una solución de NaCl y NaPO₄H₂;
- e) someter a diálisis la proteína eluida y seguidamente a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica para obtener las fracciones conteniendo la Euserratina 4;
- 10 f) purificar la Euserratina 4 a homogeneidad por cromatografía de exclusión molecular y por cromatografía de intercambio iónico.

15 La masa molecular relativa (Mr) de la Euserratina 4 así obtenida, determinada por el procedimiento de electroforesis en geles de poliacrilamida y por el procedimiento de cromatografía de exclusión molecular resultó ser de 29.200 y 29.500, respectivamente.

20 Por otra parte, se ha podido determinar que la Euserratina 4 posee cadenas glucídicas reactivas, con el sistema de detección de glicanos de Boehringer (Mannheim).

La composición de aminoácidos se determinó por hidrólisis ácida de la proteína y por análisis cromatográfico de los aminoácidos resultantes. Los valores se relacionan en la siguiente Tabla 1.

25 TABLA 1

Composición de aminoácidos de la Euserratina 4.

Aminoácido	Euserratina 4
Cys	0,8 (1)*
Asp	35,8 (36)
Thr	15,8 (16)
35 Ser	20,0 (20)
Glu	20,6 (21)
Pro	9,8 (10)
Gly	14,2 (14)
40 Ala	11,6 (11)
Val	24,3 (24)
Met	1,6 (2)
Ile	15,4 (15)
45 Leu	29,9 (30)
Tyr	11,4 (11)
Phe	10,6 (11)
Lys	24,3 (24)
50 His	2,7 (3)
Arg	6,2 (6)
Trp	no determinado

55 * Entre paréntesis se indica el número más probable de restos de aminoácidos. Se admite un error de ± 2 restos excepto en Cys.

60

ES 2 074 929 A1

Asimismo, se determinó la secuencia amino - terminal empleando un secuenciador de proteínas, que resultó ser la que se indica a continuación:

5 1 5 10
Ala - Pro - Ile - Asn - Tyr - Pro - Ser - Val - Lys - Phe - Thr - Thr - His - Leu -
15 20 25
Ala - Ser - Val - Gly - Ser - Tyr - Gln - Ser - Phe - Met - Ser - Ser - Leu - Glu -
29
10 Asn

Se ha comprobado que la Euserratina 4, así obtenida y caracterizada, es una proteína capaz de interactuar catalíticamente con el ácido ribonucleico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes.

15 Su homología de secuencia de aminoácidos en el extremo amino - terminal con la tricosantina es superior al 35% considerando 23 restos de la tricosantina.

Guarda también un buen grado de homología con la cadena A de la ricina.

20 Su extraordinaria potencia como inhibidor de la biosíntesis de proteínas y su parecido con la tricosantina, la proteína anti - VIH - 1 más conocida y estudiada, le confiere una enorme utilidad.

25 Las aplicaciones más importantes de la Euserratina 4 son: como inactivador in vitro de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivador in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos, como inhibidor de la biosíntesis de proteínas en sistemas in vitro, como inhibidor de la biosíntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales específicos de dichas células y tejidos, y como antiviral contra el virus ARN, en particular el VIH causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana.

30 También puede utilizarse para inhibir la propagación funcional in vivo y en células intactas aisladas del ácido ribonucleico en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucleico (virus ARN).

35 Finalmente, la Euserratina 4, puede utilizarse para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

Modos de realización de la invención

40 Los diferentes aspectos de la invención se describen con el siguiente ejemplo ilustrativo que no pretende limitar en modo alguno la invención, cuyo alcance viene definido única y exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo

45 Este ejemplo se desglosa en tres partes: a) obtención de Euserratina 4 a partir de *Euphorbia serrata* L.; b) caracterización químico - física, composición de aminoácidos, secuencia de aminoácidos amino - terminal, desarrollo de anticuerpos en conejo y actividad N - glucosidasa del RNA; c) inhibición de la biosíntesis de proteínas.

50 a) *Obtención de Euserratina 4.*

300 g de planta total *Euphorbia serrata* L. liofilizada se extrajeron con 6 L de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,2) a 4°C durante 12 h. La pasta resultante se filtró a través de una malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se acidificó a pH 4 con ácido acético glacial y los sólidos que aparecieron se eliminaron por centrifugación a 12400 x g durante 45 min a 0°C. El fluido sobrenadante se filtró a través de un lecho cromatográfico de 1 x 5 cm de Sephadex G - 25. El fluido eluido (aproximadamente 5 L) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 12 x 2,6 cm). La solución de equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido protéico acidificado se aplicó a la columna. La parte no retenida a la columna se desechó. A continuación la columna se lavó con solución de acetato sódico 10 mM (pH 4,5), hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo. A continuación se lavó la columna con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Los dos lavados se desecharon. Por último la columna se

eluyó con solución 1 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). La proteína eluida en 110 mL se sometió a dialisis durante toda la noche a 4°C frente a tampón fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Seguidamente se sometió a la proteína a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica en CM - Sepharose Fast Flow (columna de 12 x 1,3 cm preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 7). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 0,7 L de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 7) y 0,7 L de solución 300 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 mL por min y se recogieron fracciones de 10 mL. Se recogieron cuatro grupos de fracciones: I (fracciones 15 a 20 con 60 mL aproximadamente), II (fracciones 21 a 25 con 50 mL aproximadamente), III (fracciones 28 a 37 con 98 mL aproximadamente) y IV (fracciones 39 a 45 con 68 mL aproximadamente). Las fracciones de cada grupo se juntaron. El grupo IV contenía Euserratina 4. La Euserratina 4 se purificó a homogeneidad por cromatografía de exclusión molecular en Fast Protein Liquid Chromatography Superdex 75 (con 400mM NaCl y 5mM de fosfato monosódico (pH 7) como fase móvil), y por cromatografía de intercambio iónico en FPLC - Mono S. Se utilizó un gradiente formado por 50 mL de solución de fosfato 5 mM (pH 7) y 50 mL de solución 200 mM de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7).

b) Caracterización químico - física, composición y secuencia amino - terminal de aminoácidos, actividad N - glucosidasa del r - ARN y actividad inmunogénica de la Euserratina 4.

20 - *Caracterización químico - física*

La masa molecular relativa (Mr) se determinó por dos procedimientos, (1) electroforesis en geles de poliacrilamida y (2) cromatografía de exclusión molecular, cuyos protocolos se detallan a continuación:

25 (1) Protocolo de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se emplean geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecilsulfato sódico) siguiendo el procedimiento de Laemly (1970) con un aparato Mighty - Small II de Hoefer (San Francisco, Cal., USA) y una fuente de alimentación Promax modelo FAC - 400. El procedimiento esencialmente es como se describe a continuación. Se disuelven entre 1 - 10 µg de las muestras en un tampón desnaturante que contiene 75 mM de Tris - HCl (pH 8.8), 2% de SDS, 10% de glicerol y 5% de β - ME. Se hierve la muestra 90 segundos y se le añade azul de bromofenol hasta una concentración de 0.02%. El gel consta de dos fases con distinta concentración de poliacrilamida: "el gel separador" se forma con una mezcla de un 14.6% de acrilamida y un 0.4% de bisacrilamida (15% T 2.7%C), Tris - HCl 375 mM (pH 8.8), SDS 0.1%, persulfato amónico 0.1% y TEMED 0.07%, y "el gel de compactación" que está formado por 3.9% acrilamida, 0.1% bisacrilamida (4% T 2.7% C), Tris - HCl 125 mM (pH 6.8), SDS 0.1%, persulfato amónico 0.08% y TEMED 0.08%. La electroforesis se lleva a cabo en tampón Tris - HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM y SDS 0.1%, durante aproximadamente 45 - 60 min (el frente de azul de bromofenol sirve como testigo del proceso) a la intensidad limitante de 20 mA por gel y 20°C de temperatura. Al finalizar la electroforesis se retiran los geles y se tiñen durante 3 - 4 h con solución de tinte formada por 0.125% de coomassie brilliant blue R - 250 en una solución al 50% de metanol y 10% de ácido acético en agua. Después se cambia el gel a un recipiente con solución de destiñido compuesta de ácido acético 7%, metanol 5% en agua, hasta que se destiñe suficientemente.

45 Para determinar la masa molecular aparente (Mr) de las muestras se colocan en una de las calles varios marcadores de masa molecular conocida: BSA de 68000 Daltons, L - Glutamato Deshidrogenasa de 54000 D, Alcohol Deshidrogenasa de 37000 D, Anhidrasa Carbónica de 29000 D, e Inhibidor de Tripsina 20100D. La Mr se determina por interpolación.

50 El valor de Mr obtenida por este procedimiento fue de 29200.

(2) Protocolo de cromatografía de exclusión molecular

Se inyectan 200 µg de proteína en 200 µl de tampón fosfato de sodio 5 mM (pH 6,66) que contiene NaCl 0,4 M en un sistema FPLC (Cromatografía líquida de proteínas rápida) de Pharmacia equipado con una columna Superdex 75 de Pharmacia y un detector de luz ultravioleta. La columna se equilibra previamente con fosfato de sodio 5 mM (pH 6,66) que contiene NaCl 0,4 M. La elución se hace con el mismo tampón a un flujo de 0,5 ml/min. Para determinar la masa molecular aparente (Mr) de las muestras se cromatografían varios marcadores de masa molecular conocida: BSA de 68000 Daltons, Alcohol Deshidrogenasa de 37000 D, Inhibidor de Tripsina de 20100 D, Aprotinina de 6500 D, Dextrano azul de 200000 D y tirosina de 181 D. La Mr se determina por interpolación.

El valor de Mr obtenida por este procedimiento fue de 29500.

La Euserratina 4 posee cadenas glucídicas reactivas con el sistema de detección de glicanos de Boehringer (Mannheim), para lo cual se utilizó “el Glycan Detection Kit” de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). Se disolvieron 1 - 10 μg de muestra en 20 μl de tampón acetato sódico 0.1 M (pH 5.5) y se añadieron 10 μl de una disolución de metaperiodato sódico 6.67 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ para oxidar los grupos hidroxilo de los azúcares a grupos aldehído. A continuación se incubó durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente el exceso de metaperiodato sódico se destruyó añadiendo 10 μl de disulfito sódico 15 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se dejó actuar a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se añadieron 5 μl de una solución de DIG - succinil - ϵ - ácido amidocaproico hidrazida, con lo cual se une el grupo DIG (digoxigenina) a los aldehídos de los azúcares gracias al grupo hidrazido. Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Por último se añadieron 15 μl de tampón (Tris - HCl 300 mM (pH 8,8), 8% SDS, 40% glicerol, 20% 2 - ME), se hirvió la mezcla a 100°C durante 2 min y se añadieron 2 μl de azul de bromofenol 0.5% (p/v). Las muestras se sometieron a electroforesis como se indica anteriormente. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore) utilizando el sistema semiseco Semi - Phor modelo TE70 de Hoefer. Las muestras se separan previamente por electroforesis como se describe en el apartado anterior, pero en vez de ser teñidas se embeben durante 15 min en un tampón de transferencia compuesto por Tris - HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM, SDS 1.3 mM y 10% de metanol. El lecho de papel consiste en tres trozos de papel Whatman 3M (Whatman International Ltd. Maidstone, England) del mismo tamaño que el gel y otros tres dos milímetros más grandes por cada lado, también embebidos en el mismo tampón. La membrana de nitrocelulosa Immobilon de Millipore a la que serán transferidas las proteínas, también cortada al mismo tamaño que el gel, se humedece unos 10 segundos en metanol puro y a continuación se lava con abundante agua tipo I, tras lo cual se sumerge en tampón de transferencia durante 15 min. Una vez preparadas las capas del “sandwich” de transferencia (lecho de papel sobre y bajo la membrana), se colocan sobre uno de los electrodos, teniendo el cuidado de evitar en lo posible el estancamiento de burbujas. A continuación se coloca el segundo electrodo y se conecta a la fuente de alimentación a la intensidad limitante de 0.8 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ de gel durante 1 h. Tras la transferencia la membrana se incubó en el tampón de bloqueo proporcionado por el “Kit”, durante 30 min. Después, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min. con 50 ml de TBS pH 6.5 (Tris - HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M). Seguidamente la membrana se incubó con el anticuerpo anti - DIG conjugado con fosfatasa alcalina disuelto en TBS pH 6.5 durante 1 h. Tras lo cual se lavó como antes. Finalmente, se añadió el sustrato de la fosfatasa alcalina formado por X - fosfato y NBT disueltos en tampón Tris - HCl 0.1 M (pH 9.5) conteniendo MgCl_2 0.05 M y NaCl 0.1 M. El desarrollo del color se efectuó sin agitación y en pocos minutos. Para parar la reacción se lavó varias veces con agua destilada.

La Euserratina 4 desarrolló color gris oscuro indicativo de la presencia de azúcares en su cadena.

Como patrón se utilizó la glicoproteína transferrina (76000D).

40 - Composición y secuencia aminoterminal

La composición de aminoácidos se determinó hidrolizando las proteínas durante 24 h, 48 h y 72 h a 110°C, con 200 μl de HCl 5.7 M conteniendo β - ME al 0.05% (v/v), en tubos cerrados a vacío. Las muestras hidrolizadas se secaron al vacío en caliente, se disolvieron en tampón citrato sódico 0.2 M (pH 2.2), conteniendo norleucina 25 mM, y se aplicaron a un analizador de aminoácidos Beckman System 6000 equipado con un procesador de datos Shimadzu modelo C - R6A (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japón). La sensibilidad empleada en el espectrofotómetro fue tal que la escala total era de 0.1 unidades de D.O. a 440 y 570 nm. Para detectar la presencia del aminoácido cisteína una alícuota fue previamente oxidada con ácido per fórmico recién preparado (se incubó a temperatura ambiente durante 2 h una mezcla de 900 μl de ácido fórmico con 50 μl de H_2O_2). El tratamiento de la muestra secada consistió en añadir 25 μl de ácido fórmico y 30 μl del ácido per fórmico (previamente enfriado a 0°C) y se incubó a 0°C durante 2 h 30 min. tras lo cual se secó y hidrolizó durante 24 h. como se explicó anteriormente.

55 La composición de aminoácidos así obtenida se detalla en la Tabla 1 anteriormente expuesta.

La secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de las proteínas se realizó por degradación de Edman. El proceso consiste en la reacción en medio básico del reactivo de Edman (fenilisotiocianato) con el grupo amino del aminoácido del extremo amino terminal del polipéptido. El posterior tratamiento con TFA rompe el primer aminoácido (sin alterar los otros enlaces peptídicos) que queda formando un derivado de tiazolinona, el cual al tratarse con un ácido en solución acuosa genera un feniltiohidantoin (PTH) - aminoácido estable. El proceso se llevó a cabo empleando un secuenciador Knauer modelo 810,

ES 2 074 929 A1

5 acoplado en serie a un analizador de PTH - aminoácidos Knauer (Pisher y cols., 1989). Los PTH - derivados resultantes fueron analizados empleando una columna Nucleosil 10 C - 18 (2 x 250 mm) de 5 μ m de diámetro de partícula, equilibrada con un 88% de fase móvil A (acetato sódico 7.6 mM: acetonitrilo [85:51(v/v)] pH 4.77) y un 12% de fase móvil B (acetonitrilo). La columna fue eluída a un flujo de 1 ml.min⁻¹ a 15°C con el siguiente gradiente de acetonitrilo: 12% durante 1.05 min, de 12% a 22% en 4.95 min., de 22% a 31% en 4 min., de 31% a 33% en 7 min., de 33% a 35% en 6 min. y de 35% a 90% en 0.15 min. El cromatograma de cada etapa era comparado automática y manualmente con un cromatograma patrón.

10 La secuencia obtenida resultó ser la siguiente:

	1	5	10
	Ala - Pro - Ile - Asn - Tyr - Pro - Ser - Val - Lys - Phe - Thr - Thr - His - Leu -		
15	15	20	25
	Ala - Ser - Val - Gly - Ser - Tyr - Gln - Ser - Phe - Met - Ser - Ser - Leu - Glu -		
	29		
	Asn		

20 - *Actividad N - glucosidasa del r - ARN*

La actividad N - glucosidasa de la Euserratina 4 se determinó de dos formas diferentes: a) como liberación de adenina de ribosomas tratados con Euserratina 4, y b) como liberación del fragmento de r - RNA como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el r - RNA depurinado.

25 A continuación se explican detalladamente los protocolos empleados en cada caso.

a) Protocolo de medición mediante HPLC de adenina liberada de los ribosomas por acción de la Euserratina 4.

30 Se incuban ribosomas de hígado de rata (25 pmoles) a 37°C durante 10 minutos con la toxina en una mezcla de reacción de 50 μ l que contiene 20 mM Tris.HCl (pH 7.8), 100 mM NH₄Cl, 7 mM acetato de magnesio y 1 mM de Ditiotreitól. La reacción se para introduciendo la muestra en un baño de agua - hielo (0°C). Los ribosomas se precipitan añadiendo a las muestras un volumen (50 μ l) de etanol absoluto a - 20°C e incubando a - 80°C durante 10 min. A continuación se centrifugan las muestras durante 15 35 min. a 4°C a 13000 x g, se recuperan 85 μ l de sobrenadante y se les añade 165 μ l de agua de tipo I y 100 μ l de cloroacetaldehído 140 mM. Se incuba a 80°C durante 40 min y se deja enfriar en hielo. El cloroacetaldehído que no ha reaccionado con la adenina se extraer con 600 μ l de dietileter saturado con agua destilada, esto se repite otras tres veces. Las trazas de éter se eliminan incubando las muestras a 40 80°C durante 10 min y centrifugando con una centrifuga de vacío durante 2 min. Por último las muestras se filtran con un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μ m de tamaño de poro. La etenoadenina se determina por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). 100 μ l (equivalentes a 6 pmol de ribosomas) se analizaron con un equipo de HPLC de Kontron equipado con un espectrofluorímetro modelo SFM modelo 25 y un sistema de control de cromatografía y análisis de datos modelo 450 MT. La columna fue 45 una Spherisorb C18 de fase reversa 10 μ m de tamaño de partícula) equilibrada con tampón 20 mM de Tetraborato de sodio/ - ácido fosfórico (pH 7,7). La muestra se eluyó con un gradiente lineal de 0 - 40% de metanol en el mismo tampón. La tasa de flujo fue 1 ml/min y el espectrofluorímetro se ajustó a una longitud de onda de excitación de 315 nm y longitud de onda de emisión de 415 nm. La etenoadenina se cuantificó mediante ajuste lineal utilizando patrones de etenoadenina.

50 Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 2:

55

60

TABLA 2

Efecto de Euserratina 4 sobre la liberación de Adenina de ribosomas purificados de hígado de rata.

Relación Molar EU 4/ribosomas (pmol de EU 4/pmol de ribosomas)	Adenina liberada (pmol/pmol de ribosomas)
1:1	0,71
1:10	0,54

b) Liberación del fragmento de r - RNA como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el r - RNA depurinado obtenido de ribosomas de lisado de reticulocito de conejo. La liberación del fragmento de r - RNA se determinó incubando 400 μg de ribosomas purificados de lisados de reticulocitos se incubaron con 18,2 μg de Euserratina 4 en solución tampón [8 mN Ac2Mg, 150 mM ClK, 25 mM Tris - HCl (pH 7,8)], durante 15 min a 37°C. Después el R - RNA se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado de Tris - HCl 0,1 M pH 7,8, en presencia de 2,5 mM EDTA y 1 volumen de 0,5% SDS/50 mM Tris - HCl pH 7,6. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el r - RNA se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 0,3 M de acetato de sodio pH 5,2 a - 80°C durante 2 h. A continuación se trató el r - RNA con 1 volumen de anilina 2 M pH 4,5. La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen, dos veces). El r - RNA se precipitó a continuación con dos volúmenes de etanol y 0,3 M AcNa (pH 5,2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue. El precipitado de r - RNA obtenido en la última etapa se resuspendió en H₂O. Se colocaron 6 μg de r - RNA en tampón de electroforesis (100 mg/ml de sacarosa, 7 M de urea, 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de azul de bromofenol, Tris - HCl 89 mM (pH 8.3), ácido bórico 89 mm, EDTA 25 mM (pH 8. 3)) en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4,85% acrilamida y 0,15% de bisacrilamida preparado en un tampón que contenía Tris - HCl 89 mM (pH 8,3), ácido bórico 89 mM y EDTA 25 mM (pH 8,3). La electroforesis se llevó a cabo a 21 mA durante 50 min en un sistema de minigeles (7 x 10 cm.) (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm.

- *Actividad inmunogénica y especificidad inmunológica.*

La Euserratina 4 posee una fuerte actividad inmunogénica que permitió obtener anticuerpos policlonales en conejo por el siguiente procedimiento: Dos conejos de 3 - 4 Kg fueron inyectados subcutáneamente en el lomo con 0,5 mg de Euserratina 4 en emulsión de Freund completa y 100 ml de NaCl. Las inyecciones se repitieron a las 2 y a las 4 semanas con 0,5 mg en emulsión incompleta de Freund. Después de dos meses de la primera inyección, los conejos se anestesiaron con 2 ml de pentotal sódico (2g/ml) y se sangraron seleccionando la vena yugular y la arteria carótida. La sangre se incubó durante 1 h a 37°C y después 12 h a 4°C. El suero (conteniendo los anticuerpos monoclonales) se separa del coágulo por centrifugación.

La reacción de la proteína con el anticuerpo policlonal se lleva a cabo en placas de agarosa con pocillos (uno en el centro de la placa rodeado por otros seis). Las placas contienen 1,4% de agarosa, 140 mM de NaCl, 12 mM Na₂HPO₄ y 5 mM EDTA. En cada pocillo se añaden 50 μg de proteína excepto en el pocillo central, al cual se le añaden 200 μl de suero de conejo que contiene el anticuerpo policlonal. Las placas se incuban a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de agua durante 48 h. La reacción se determina visualmente por la aparición de una halo blanquecino de precipitación.

La Euserratina 4 presenta una reacción fuertemente positiva en este ensayo.

c) Inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Los estudios de inhibición de biosíntesis in vitro de proteínas se realizaron utilizando distintos sistemas acelulares en las condiciones estandar.

Las condiciones de síntesis de proteínas fueron distintas para cada sistema. Se encuentran resumidas a continuación:

Hígado de rata: Tris - HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 8 mM, NH₄ Cl 100 mM, Ditiotreitól

ES 2 074 929 A1

5 mM, ATP (Adenosin 5' - Trifosfato) 2 mM, GTP (Guanosin 5' - Trifosfato) 1 mM, CTP (Citidin 5' - Trifosfato) 0,2 mM, Fosfoenolpiruvato 2 mM, Piruvato quinasa 40 $\mu\text{g/ml}$, todos los aminoácidos protéicos menos L - valina 0,1 mM y L - [^3H]valina 3 Ci/ml. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 25 μl , La reacción se incubó a 37°C durante 60 min.

5

Sistemas vegetales (trigo y Vicia sativa L. y Cucumis sativus L.): Tris.HCl 29 mM (pH 7,8), KCl 30 mM Mg(AcO), 9,8 mM, NH₄Cl 28 mM, Ditiotreitól 5 mM, ATP (Adenosin 5' - Trifosfatp) 4 mM, GTP (Guanosin 5' - Trifosfato) 1 mM, Creatin - Fosfato 8 mm, creatín quinasa 60 $\mu\text{g/ml}$, t - RNA de germen de trigo 0,4 mg/ml, todos los aminoácidos protéicos menos L - valina 0,1 mM y L - [^3H]valina 7,4 $\mu\text{Ci/ml}$. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 50 μl . La reacción se incubó a 30°C durante 30 min.

10

Lisado de reticulocitos de conejo: Tris HCl₂O mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl 2, 1,5 mM, Ditiotreitól 5 mM, ATP (Adenosin 5' - Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosin 5' - Trifosfato) 0,2 mM, Creatín - Fosfato 10 mM, creatín quinasa 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 mM de Hemina, todos los aminoácidos protéicos menos L - valina 0,04 mm y L - [^3H]valina 2 $\mu\text{Ci/ml}$. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 50 μl . La reacción de se incubó a 30°C durante 20 min.

15

Escherichia coli: Tris - HCl 50 mM (pH 7,8), Mg(AcO)₂ 10 mM, NH₄Cl 80 mM, Ditiotreitól 5 mm, ATP (Adenosin 5' Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosin 5' Trifosfato) 0,02 mM, CTP (Citidin 51 Trifosfato) 0,02 mm, Fosfoenol piruvato 5 mM, Piruvato quinasa 30 $\mu\text{g/ml}$, T - RNA de *E. coli* 0,1 mg/ml, todos los aminoácidos proteicos menos L.Metionina 0,05 mM, L - [^{35}S] Met 1,48 $\mu\text{Ci/ml}$, 1 μl de polisomas y 1 μl de S - 100. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 50 μl . La reacción se incubó a 37°C durante 15 min.

20

La reacción de síntesis de proteínas se para con la adición de 500 μl de KOH 0,1 N (utilizado para degradar las moléculas de los aminoacil - tRNAs cargados que no se han incorporado en la cadena polipeptídica). Después de 15 min se añaden 500 μl de TCA al 20% (p/v), (para que precipiten las cadenas polipeptídicas formadas). Los precipitados protéicos son recogidos sobre filtros de fibra de vidrio (GF/A, Whatman) de 2,5 cm de diámetro, cada tubo de reacción es lavado 2 veces con 1 ml de TCA al 5% y luego el filtro con 2 ml de etanol absoluto del 96%. Posteriormente los filtros son secados a 120°C durante 10 min y colocados en el interior de viales de plástico a los cuales se les añade 2 ml de líquido de centelleo (Ready Safe de Beckman).

30

En el caso del lisado de reticulocitos de conejo se añaden 30 μl de H₂O₂ del 30% (v/v) para eliminar el color de las muestras. En el caso de sistemas vegetales y de *Escherichia coli* se añadió después del KOH, 100 μg BSA para facilitar la precipitación de proteínas.

35

La radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo Beckman modelo LS 1710.

40

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3:

TABLA 3

Efecto de la Euserratina 4 sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

45

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)
Lisados de reticulocitos de conejo	1.45
hígado de rata	79
gérmen de trigo	>280000
germen de Vicia sativa L.	>280000
germen de Cucumis sativus L.	>280000
Escherichia coli	>280000

50

55

IC₅₀ indica la concentración de proteína que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas en las condiciones estandard de cada sistema acelular.

60

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la planta *Euphorbia serrata* L., denominada Euserratina 4, **caracterizada** porque presenta la siguiente composición de aminoácidos:

5
10
15
20
25

Cys	0,8 (1)
Asp	35,8 (36)
Thr	15,8 (16)
Ser	20,0 (20)
Glu	20,6 (21)
Pro	9,8 (10)
Gly	14,2 (14)
Ala	11,6 (11)
Val	24,3 (24)
Met	1,6 (2)
Ile	15,4 (15)
Leu	29,9 (30)
Tyr	11,4 (11)
Phe	10,6 (11)
Lys	24,3 (24)
His	2,7 (3)
Arg	6,2 (6)
Trp	no determinado

30 representando el número entre paréntesis, el número más probable de restos de aminoácido admitiéndose un error de ± 2 restos, excepto en Cys, y porque presenta la siguiente secuencia amino - terminal:

35

1	5	10
Ala - Pro - Ile - Asn - Tyr - Pro - Ser - Val - Lys -	Phe - Thr - Thr - His - Leu -	
15	20	25
Ala - Ser - Val - Gly - Ser - Tyr - Gln - Ser - Phe - Met - Ser - Ser - Leu - Glu -		
29		
Asn		

40 2. Un procedimiento para la obtención de la proteína Euserratina 4, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) extraer la *Euphorbia serrata* L. previamente liofilizada con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;
- 45 b) filtrar el extracto líquido resultante previamente acidulado a través de un lecho cromatográfico;
- c) someter el fluido extraído a cromatografía de intercambio iónico, desechándose la parte no retenida en la columna;
- 50 d) eluir la columna, previamente lavada con soluciones acuosas de acetato sódico y fosfato monosódico, con una solución de NaCl y NaPO₄H₂;
- e) someter a diálisis la proteína eluida y seguidamente a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica para obtener las fracciones conteniendo la Euserratina 4;
- 55 f) purificar la Euserratina 4 a homogeneidad por cromatografía de exclusión molecular y por cromatografía de intercambio iónico.

3. Utilización de la Euserratina 4 para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

60 4. Utilización de la Euserratina 4 para la inactivación in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

ES 2 074 929 A1

5. Utilización de la Euserratina 4, para la fabricación de medicamentos destinados a la inactivación de ribosomas sensibles a la toxina.

5 6. Utilización de la Euserratina 4, para la fabricación de medicamentos destinados a la inactivación del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22, C07K 14/415, A61K 38/46

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. Enero 1990. Vol. 41, n° 222. pág. 67-70. M.J. MERINO et al. "Plant Species Containing Inhibitors of Eukaryotic Polypeptide Synthesis" * Todo el documento *	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
28.07.95

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1