



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 074 935**

② Número de solicitud: 9300408

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **02.03.93**

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, Francisco J.;
Rojo Rodríguez, Mari Angeles;
Iglesias Alvarez, Rosario;
Ferrerías Rodríguez, José Miguel;
Citores González, Lucía y
Muñoz Martínez, Raquel**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Proteína Ebulina 1 de la planta Sambucus ebulus L., procedimiento para su obtención y su utilización.**

⑤ Resumen:

Proteína Ebulina 1 de la planta Sambucus ebulus L. procedimiento para su obtención y su utilización.

La Ebulina 1 es una proteína vegetal inactivadora de ribosomas del tipo de dos cadena A y B con una masa molecular relativa de 26.000 y 30.200 respectivamente.

El procedimiento comprende: extraer la planta Sambucus ebulus L., filtrar el extracto líquido y centrifugarlo; someter el fluido sobrenadante a cromatografía de afinidad recogiendo la fracción proteínica la cual se concentra y se somete a otra cromatografía de afinidad para obtener la proteína deseada.

La Ebulina 1 se utiliza como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la síntesis de proteínas.

DESCRIPCION

Proteína Ebulina 1 de la planta *Sambucus ebulus* L., procedimiento para su obtención y su utilización.

Campo técnico de la invención

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 Ebulina 1, aislada de la planta *Sambucus ebulus* 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 utilidades.

Estado de la técnica anterior a la invención

En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibitorias 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 activadoras de ribosomas (Gasperi-Campani y cols. *Biochem. J.* 186, 439-441 [1980]; Gasperi-Campani y cols. *J. Nat. Prod.* 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 pueden ser de una cadena polipeptídica (de tipo 1) o de dos cadenas polipeptídicas (de tipo 2). Las de una cadena polipeptídica son N-glucosidasas del ácido ribonucleico ribosómico (Stirpe y cols., *Nuc. Acid Res.* 16, 1349-1357 [1988]), mientras que las de dos cadenas tienen una N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico (cadena A) y una lecitina (cadena B) (Stirpe y cols. *Biotechnology* 10, 405-412 [1992]) que habitualmente reconoce restos de galactosa y sus derivados aunque no se excluyen cadenas B más específicas. Estas proteínas (A y B) tienen una masa molecular (Mr) entre 20000 y 33000 y son de naturaleza básica. Las cadenas A 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]). La inactivación consiste en la liberación de una adenina del r-ARN mayor del ribosoma (Endo y Tsurugi, *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, 1-3 [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 al menos cuatro proteínas de esta familia (RIPS) poseen *per se* carácter inactivador del virus ARN HIV-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]).

Las RIPs de tipo 2 y en particular la ricina se ha demostrado además que poseen actividad antitumoral (Barbieri y Stirpe *Cancer Surv.* 1, 489-520 [1982]).

Dado que las proteínas son sustancias antigénicas 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 por otro de poder sustituir la toxina o la parte tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente. Además no todas estas toxinas proteicas poseen la misma citotoxicidad (Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6570-6574 [1991]).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su título, se refiere a una proteína de la planta *Sambucus ebulus* L., denominada Ebulina 1, a un procedimiento para su obtención y a su utilización como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la síntesis de proteínas.

La mencionada proteína es una nueva toxina vegetal de naturaleza protéica que, en base a sus propiedades químico-físicas y bioquímicas, se clasifica en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo dos o de dos cadenas.

La Ebulina 1 se aísla de la planta *Sambucus ebulus* L. mediante un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

a) extraer la planta *Sambucus ebulus* L. (hojas), previamente molida con una solución acuosa de NaCl y NaPO_4H_2 ;

b) filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado;

c) aplicar el fluido sobrenadante a una columna cromatográfica para someterlo a un proceso de cromatografía de afinidad, lavando la columna con un tampón de extracción;

d) eluir la columna lavada con el tampón de extracción conteniendo D-galactosa y recoger la fracción proteínica;

e) concentrar la fracción proteínica y someterla a cromatografía de afinidad equilibrando la columna con NaCl y NaH_2PO_4 rindiendo el eluato dos picos, de los cuales el primero de ellos corresponde a la Ebulina

Mediante este procedimiento se obtiene la Ebulina 1 en un estado de pureza final del 99% determinada por electroforesis en gel de polia-

crilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (GPA-SDS).

La cromatografía de la etapa (c) suele llevarse a cabo con un gel de Sepharose 6B (compuesto por una matriz de agarosa al 6%) tratado con ácido, normalmente HCl durante unas 3 horas a unos 50°C, y equilibrando con un tampón de extracción.

Por su parte, la cromatografía de la etapa (e) suele llevarse a cabo con un gel Superdex 75 HI Load (compuesto por agarosa y dextrano).

La masa molecular relativa (Mr) de la Ebulina 1 así obtenida se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida, resultando ser de 26.000 para la cadena A y de 30.200 para la cadena B.

Las secuencias de los aminoácidos del extremo aminoterminal de dichas cadenas son las siguientes:

Cadena A: Ile- Asp- Tyr- Pro- Ser- Val- Ser- Phe- Asn- Leu- Ala- Gly- Ala- Lys- Ser- Thr- Thr- Tyr- Arg- Asp- Phe- Leu- Lys- Asn- Leu;

Cadena B: Asp- Gly- Glu- Thr- Xxx- Ala- Ile- Pro- Ala- Pro- Phe- Thr- Arg- Arg- Ile- Val- Gly- Xxx- Asp- Gly- Leu- Glu- Val- Asp- Phe-

(Xxx significa que puede ser cualquier aminoácido).

Se ha comprobado que la Ebulina 1, así obtenida y caracterizada, es una proteína capaz de interaccionar catalíticamente con el ácido ribonucleico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de mamíferos. Su poder inhibidor es muy superior a los inhibidores antibióticos no protéicos de la biosíntesis de proteínas (Pestka, S, (1977) Inhibitors of protein synthesis. En: Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. Ed. H Weissbach y S. Pestka. Academic Press. pp. 468-553).

Adicionalmente, la Ebulina 1 presenta actividad como N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico (r-ARN) y actividad aglutinante de eritrocitos humanos.

La extraordinaria potencia como inhibidor de la biosíntesis de proteínas y su efecto sobre el ácido ribonucleico, equivalente al ejercido por ejemplo por la PAP (pokeweed antiviral protein, Irvin *Pharmacol.Ter.* 21, 371-387 [1983], una proteína con actividad anti-VIH-1 (Zarling y cols. *Nature* 347, 92-95 [1990]), confieren a la Ebulina 1 una enorme utilidad.

Las aplicaciones más importantes de la Ebulina 1 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 biosíntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos y como antiviral contra virus RNA, en particular el VIH causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA).

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

Finalmente, la Ebulina 1, puede utilizarse para inactivar células blanco específicas en seres

humanos y animales de experimentación.

Modos de realización de la invención

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

Este ejemplo se desglosa en cuatro partes:

a) obtención de Ebulina 1 a partir de hojas de *Sambucus ebulus* L.; b) determinación de la masa molecular aparente; c) actividad N-glucosidasa del RNA; d) inhibición de la biosíntesis de proteínas.

a) Obtención de Ebulina 1

100 g de hojas de *Sambucus ebulus* L. se molieron con 1000 ml de solución 280 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,5) a 4°C durante 12 h. El extracto resultante se filtró a través de una malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se centrifugó a 13000 rpm en rotor JA-14 (centrifuga Beckman JA 21) y se recogió el sobrenadante (990 ml). El fluido sobrenadante se aplicó a una columna cromatográfica (9.5 x 5 cm) cargada con 190 ml de Sepharose 6B tratada con ácido (250 ml de Sepharose 6B tratados con 0.1 N HCl durante 3 h a 50°) equilibrada con un tampón de extracción (280 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico pH 7,5). A continuación se lavó la columna con dicho tampón de extracción hasta que la absorbancia a 280 mμ descendió hasta la línea base. Entonces se aplicó una solución del citado tampón de extracción conteniendo 200 mM D-galactosa. El pico de absorbancia se recogió y se concentró hasta 7.5 ml con membrana de Amicón YM 10. La solución concentrada de proteína se aplicó entonces a una columna Superdex 75 HI Load equilibrada con 400 mM NaCl y 5 mM fosfato sódico (pH 6.66). La columna se eluyó con una solución 400 mM NaCl y 5 mM fosfato monosódico (pH 6,66). El eluato rindió dos picos de unos diez ml cada uno, siendo el primero la Ebulina 1 (el pico de mayor Mr) electroforéticamente homogénea.

b) Determinación de la masa molecular aparente.

La masa molecular relativa se determinó por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecilsulfato sódico) por el procedimiento de Laemmli (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 reite-
 ran los geles y se tiñen durante 3-4 h con solución de teñido 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 desteñido compuesta de ácido acético 7%, metanol 5% en agua, hasta que se destiñe suficientemente.

Para determinar la masa molecular aparente (Mr) de las muestras se coloca 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 20100 D. La Mr se determina por interpolación.

Los valores Mr obtenidos fueron 26000 para la Cadena A y 30200 para la Cadena B.

c) *Actividad N-glucosidasa sobre el r-ARN de la Ebulina 1.*

La actividad N-glucosidasa de la Ebulina 1 se determinó como liberación del fragmento de r-RNA como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el r-RNA depurinado por la Ebulina 1. La liberación del fragmento de r-RNA se determinó incubando ribosomas purificados de lisado de reticulocito de conejo con Ebulina 1, como se indica a continuación. 0.3 unidades de A₂₆₀ de ribosomas purificados de lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con 6.8 µg de Ebulina 1 en solución conteniendo 2 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitól, 50 mM KCl y 20 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 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), en presencia de 10 mM EDTA. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el r-RNA se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 300 mM acetato sódico (pH 5.2), a -80°C durante 2 h. A continuación se trató el r-RNA con 1 volumen de 2 M anilina (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 300 mM acetato sódico (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 agua. Se colocaron 3 µg de r-RNA en tampón de electroforesis (100 mg/ml de sacarosa, 7 M de urea, 0,4 µg/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 0.150 % 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 15 mA durante 100 min en un sistema de minigeles (7 x 10 cm) (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0.5 µg/ml bromuro de etidio durante 20 min. La visualización se realizó con

transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm.

d) *Inhibidor de la biosíntesis de proteínas.*

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

Las condiciones de síntesis de proteínas fueron distintas para cada sistema y se encuentran resumidas a continuación:

Hígado de rata: Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 8 mM, NH₄Cl 100 mM, Ditiotreitól 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 µg/ml, todos los aminoácidos protéicos menos L-valina 0,1 mM y L-[³H]valina 3 µ 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.

Sistemas vegetales (trigo y Vicia sativa L.): Tris.HCl 29 mM (pH 7,8), KCl 30 mM Mg(AcO)₂, 9,8 mM, NH₄Cl 28 mM, Ditiotreitól 5 mM, ATP (Adenosin 5'-Trifosfato) 4 mM, GTP (Guanosin 5'-Trifosfato) 1 mM, Creatín-Fosfato 8 mM, creatín quinasa 60 µg/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 µ 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.

Lisado de reticulocitos de conejo: Tris HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂, 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 µg/ml, 20 mM de Hemina, todos los aminoácidos protéicos menos L-valina 0,04 mM y L-[³H]valina 2 µ 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 20 min.

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 l 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).

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 se añade después del KOH, 100 µg BSA para facilitar la precipitación de proteínas.

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

Los resultados de estos experimentos se mues-

tran en la Tabla 1:

Tabla 1
Efecto de la Ebulina 1 sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)
Lisados de reticulocitos de conejo	8.5
hígado de rata	15
germen de trigo	>100000
germen de Vicia sativa L.	>100000

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

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la planta *Sambucus ebulus* L., denominada Ebulina 1, **caracterizada** por ser una proteína vegetal inactivadora de ribosomas del tipo de dos cadenas cuya masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida es de 26.000 para la cadena A y de 30.200 para la cadena B, y cuyas secuencias de aminoácidos del extremo amino terminal son las siguientes:

Cadena A: Ile- Asp- Tyr- Pro- Ser- Val- Ser- Phe- Asn- Leu- Ala- Gly- Ala- Lys- Ser- Thr- Thr- Tyr- Arg- Asp- Phe- Leu- Lys- Asn- Leu;

Cadena B: Asp- Gly- Glu- Thr- Xxx- Ala- Ile- Pro- Ala- Pro- Phe- Thr- Arg- Arg- Ile- Val- Gly- Xxx- Asp- Gly- Leu- Glu- Val- Asp- Phe- (Xxx significa que puede ser cualquier aminoácido).

2. Un procedimiento para la obtención de la proteína Ebulina 1, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) extraer la *Sambucus ebulus* L., previamente molida con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

b) filtrar el extracto líquido resultante a través de

una malla y centrifugar el filtrado;

c) aplicar el fluido sobrenadante a una columna para cromatografía de afinidad equilibrada con un tampón de extracción y lavar la columna con un tampón de extracción;

d) eluir la columna lavada con un tampón de extracción conteniendo D-galactosa y recoger la fracción proteínica;

e) concentrar la fracción proteínica y aplicarla a otra columna para cromatografía de afinidad equilibrada con NaCl y Na₃PO₄ rindiendo el eluato dos picos, de los cuales el primero de ellos corresponde a la Ebulina 1.

3. Utilización de la Ebulina 1 para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

4. Utilización de la Ebulina 1 para la inactivación in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

5. Utilización de la Ebulina 1, para la fabricación de medicamentos destinados a la inactivación de ribosomas sensibles a la toxina.

6. Utilización de la Ebulina 1, para la fabricación de medicamentos destinados a la inactivación del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

① ES 2 074 935

② N.º solicitud: 9300408

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.03.93**

④ Fecha de prioridad:

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	EP-390040-A (ITALFARMACO S.p.A.) 03.10.90 * Todo el documento *	1-6
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