



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 095 190**

⑫ Número de solicitud: 9500509

⑤① Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **06.03.95**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.97**

Fecha de concesión: **28.07.97**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.97**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.97

⑦③ Titular/es: **Universidad de Valladolid y en
Representación el Vicerrector de Investigación,
Rafael Pedrosa Saez
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES**

⑦② Inventor/es: **Girbes Juan, Tomás;
Martínez de Benito, Fernando;
Citores González, Lucía;
Iglesias Alvarez, Rosario y
Ferrerías Rodríguez, José Miguel**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, de la planta Sambucus nigra L., procedimiento para su obtención y su utilización.**

⑤⑦ Resumen:

Proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., procedimiento para su obtención y su utilización.

La Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, presentan masas moleculares relativas de 29000, 40000 y 27500 daltons respectivamente. Alfa-nigritina presenta la siguiente secuencia de aminoácidos en su extremo amino-terminal:

Ala-Ser-Val-Leu-Asp-Ser-Ile-Gln-Phe-Val-Ser-Leu-
Glu-Lys-Xxx-Ala-Val-Tyr-Glu-Gln-Asn.

Gamma-nigritina presenta tres péptidos trípticos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

a) Val-Thr-Asn-Ser-Phe-Tyr-Leu

b) Tyr-Xxx-Pro-Ser-Ile-Ile-Arg

c) Trp-Xxx-Asn-Thr-His-Ser-Tyr-Leu-Asn-Glu-Ile-
Phe-Ile-Xxx-Leu.

El procedimiento general para la obtención de las RIPs de *Sambucus nigra* de la presente invención comprende el aislamiento de las mismas de hojas de

Sambucus nigra incluyendo una primera operación de extracción con solución acuosa a base de cloruro de sodio y fosfato monosódico para obtener un extracto que sea capaz de inhibir la síntesis de proteínas, seguido de purificación del extracto mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular.

La Alfa-nigritina, Beta-nigritina, y Gamma-nigritina se utiliza como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la biosíntesis de proteínas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 095 190 B1

DESCRIPCION

Proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* 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 (RIPs) las cuales impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico.

De forma más específica, la presente invención se refiere a nuevas RIPs de una cadena obtenidas de hojas de *Sambucus nigra* L. con potencial aplicación en la terapia del cáncer y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Estado de la técnica anterior a la invención

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 proteica 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.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]; Gírbés y cols. *Cell.Mol.Biol.* 38, 803-812 [1992]; Citores y cols. *Cell.Mol.Biol.* 39, 885-995 [1993]; Stirpe y cols. *Bio/technol.* 10, 405-412 [1992]; Citores y cols. *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]). Estas proteínas pueden ser de una cadena polipeptídica (de tipo 1), de dos cadenas polipeptídicas (de tipo 2) o de cuatro cadenas polipeptídicas (de tipo 4) (Citores y cols. *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]). Las de una cadena polipeptídica son N-glucosidasas del ácido ribonucleico ribosómico (Stirpe y cols. *Nucleic Acid Res.* 16, 1349-1357 [1988]) mientras que las de dos cadenas tienen una actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico (cadena A) y una lectina (cadena B) (Stirpe y cols. *Bio/technol.* 10, 405-412 [1992]) que habitualmente reconoce restos de galactosa y sus derivados. Las proteínas de cuatro cadenas están formadas por dímeros del tipo A-B (equivalentes cada uno a una molécula de tipo 2) (Citores y cols. *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]). Estas proteínas (A y B) tienen una masa molecular (Mr) entre 20000 y 34000. 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, *Biosci.Rep.* 6, 19-29 [1986]; Stirpe y Barbieri, *FEBS Lett.* 95, 1-8 [1986]; Stirpe y cols. *Bio/technol.* 10, 405-412 [1992]; Citores y cols. *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]; Gírbés y cols. *J.Biol.Chem.* 268, 18195-18199 [1993]; Gírbés y cols. *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-1186 [1993]). La inactivación consiste en la liberación de una adenina del ARN ribosómico mayor del ribosoma (Endo y Tsurugi, *J.Biol.Chem.* 262, 8128-8130 [1987]; Stirpe y cols. *Nucleic Acid Res.* 16, 1349-1357 [1988]; Gírbés y cols. *J. Bacteriol.* 175, 6721-6724 [1993]; Iglesias y cols. *FEBS Lett.* 325, 291-294 [1993]; Iglesias

y cols. *FEBS Lett.* 318, 189-192 [1993]). El papel biológico de estas toxinas en la planta que las produce es totalmente desconocido (Roberts y Selitrennikoff *Biosci.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]; Arias y cols. *Planta* 186, 532-540 [1992]).

El enorme interés de las proteínas inactivadoras de ribosomas 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]; Khan y cols. *AIDS* 4, 1197-1204 [1990]; Byers y cols. *AIDS* 4, 1189-1196 [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 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]).

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 inmunoreactiva 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 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 nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de la planta de *Sambucus nigra* L., denominadas alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina, a un procedimiento para su obtención y a su utilización.

Las mencionadas proteínas son nuevas toxinas vegetales de naturaleza proteica que, en base a sus propiedades químico-físicas y bioquímicas, se clasifican en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo I o de una sola cadena.

La originalidad de la presente invención frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior reside en la búsqueda de proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo 1 en *Sambucus nigra* L., en la cual ya se ha descrito la existencia de una proteína inactivadora de ribosomas de tipo 2 (Gírbés y cols. *Plant Mol.Biol.* 268, 18195-18199 [1993]).

Las nuevas proteínas de la presente invención

están constituidas por una sola cadena con actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico, en especial con actividad de N-glucosidasa del ácido ribonucleico 28 S de ribosomas de mamíferos; caracterizándose dichas nuevas proteínas porque ligadas a una molécula transportadora (anticuerpo, hormona u otra proteína) reconocible por un receptor de membrana presente en la célula diana, permiten la actuación específica y selectiva de la toxina sobre dichas células diana por inactivación del ácido ribonucleico de sus ribosomas.

Las proteínas de la presente invención así definidas son capaces de interaccionar catalíticamente con el ácido ribonucleico 5 y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. Su poder inhibidor es muy superior a los inhibidores antibióticos no proteicos 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, dichas proteínas presentan actividad como N-glucosidasas del ácido ribonucleico ribosómico ARN-r.

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. Ther.* 21, 371-387 [1983]), una proteína con actividad anti-HIV-1 (Zarling y cols. *Nature* 347 92-95 [1990]), confieren a estas proteínas una enorme utilidad.

Las aplicaciones más importantes de las RIPs de tipo 1 de la presente invención son: como inactivadoras *in vitro* de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivadoras *in vitro* del ácido ribonucleico de mamíferos, como inhibidoras de la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*, como inhibidoras de la síntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos y como antivirales contra virus ARN, en particular el HIV causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA).

Asimismo, a partir de dichas proteínas es posible la construcción de conjugados con otras especies químicas con la finalidad de inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación *in vivo* de ribosomas de organismos eucariontes. El transporte de proteínas al interior celular se consigue acoplándolas a transportadores adecuados como anticuerpos, hormonas y otras proteínas que puedan ser reconocidas por receptores específicos en la superficie celular y que puedan ser internalizados [Stirpe y cols. *Bio/technol.* 10, 405-412 (1992); Barbieri y Stirpe, *Cáncer Surv.* 1, 490-520 (1982)].

Por lo tanto, las RIPs de tipo 1 de la presente invención son potencialmente útiles para la terapia de enfermedades tales como cáncer y SIDA.

El procedimiento general para la obtención de las RIPs de *Sambucus nigra* de la presente invención comprende el aislamiento de las mismas de hojas de *Sambucus nigra* incluyendo una primera operación de extracción con un solución acuosa a base de cloruro de sodio y fosfato monosódico para obtener un extracto que sea capaz

de inhibir la síntesis de proteínas, seguido de purificación del extracto mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular.

El procedimiento general para la obtención de las RIPs de una cadena a partir de hojas de *Sambucus nigra* de la presente invención comprende las siguientes operaciones:

a) Obtención del extracto proteico de hojas de dicha planta con cloruro sódico y fosfato monosódico.

b) Acidificación del extracto obtenido y cromatografía de intercambio iónico.

c) Diálisis y desarrollo de una cromatografía de intercambio iónico de la proteína obtenida en la etapa anterior con un gradiente de sal.

d) Cromatografía de exclusión molecular de los picos de proteína de la etapa anterior.

e) Diálisis y cromatografía de intercambio iónico de los picos que presentan inhibición de la síntesis de proteínas de la etapa anterior.

Las masas moleculares relativas (Mr) de alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina, determinadas por el procedimiento de electroforesis en geles de poliacrilamida, son 29000, 40000 y 27500 daltons respectivamente.

La secuencia aminoacídica de péptidos trípticos de la gamma-nigritina se determinó con un secuenciador de proteínas, resultando la siguiente secuencia aminoacídica:

	1	5
Pico 6:	Val-Thr-Asn-Ser-Phe-Tyr-Leu	
	1	5
Pico 7:	Tyr-Xxx-Pro-Ser-Ile-Ile-Arg	
	1	5
Pico 10:	Trp-Xxx-Asn-Thr-His-Ser-Tyr-Leu-Asn-	
	10	15
	Glu-Ile-Phe-Ile-Xxx-Leu	

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

	1	5	10
	Ala-Ser-Val-Leu-Asp-Ser-Ile-Gln-Phe-Val-Ser-		
		15	20
	Leu-Glu-Lys-Xxx-Ala-Val-Tyr-Glu-Gln-Asn		

La secuencia amino-terminal de beta-nigritina y gamma-nigritina no se pudo determinar por estar bloqueado su extremo amino-terminal.

Modos de realizar la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente con un ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Este ejemplo se desglosa en 9 Partes:

a) Obtención de alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina a partir de hojas de *Sambucus nigra*, b) determinación de la masa molecular aparente, c) presencia de cadenas glucídicas en alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina, d) secuencia amino-terminal de alfa-nigritina, e) obtención de péptidos trípticos de gamma-nigritina,

f) actividad N-glucosidasa sobre el ARN, g) inhibición de la biosíntesis de proteínas, h) relación inmunológica, i) toxicidad.

a) *Obtención de alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina*

300 g de hojas de *Sambucus nigra* se extrajeron con 2 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 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 (aproximadamente 1920 ml) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 9,5 cm). La solución de equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido proteico 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 6,66). 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 6,66). Todo el eluato conteniendo proteína se recogió y se dializó a 4°C durante 12 h frente a 25 l de una solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 6,66). Esta preparación proteica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica en CM-Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 2,6 cm) preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 6,66). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 500 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) y 500 ml de solución 300 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 ml por min y se recogieron fracciones de 11,9 ml. Se recogieron 2 grupos de fracciones capaces de inhibir síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo: I (fracciones 13 a 24 con 143 ml aproximadamente) y II (fracciones 35 a 50 con 190 ml aproximadamente). Las fracciones de cada grupo se juntaron. El grupo I se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75 HiLoad (columna de 2,6 x 60 cm) equilibrada con una solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) conteniendo 0,4 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 2 ml por min y se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones 23 a 29 que mostraron actividad inhibidora se juntaron y se dializaron frente a 4 l de agua (3 veces) y se liofilizó. Se obtuvieron 10,5 mg de los cuales 3 mg se resuspendieron en una solución 5mM de fosfato monosódico (pH 6,66). Esta solución se sometió a cromatografía de intercambio catiónico en gradiente de fuerza iónica a través de Mono S acoplada a FPLC (columna de 1 ml preequilibrada con la misma solución). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 40 ml de solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,1 M de cloruro de sodio y 60 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,3 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 1 ml por min y se

recogieron fracciones de 1,5 ml. Las fracciones 11 a 15 que inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocito de conejo se juntaron y se dializaron frente agua y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la proteína alfa-nigritina.

El grupo II se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75 HiLoad equilibrada con una solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) conteniendo 0,4 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 2 ml por min y se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones 19 a 20 y 22 a 29 que inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo se juntaron y se dializaron frente a agua y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera para el primer grupo 0,6 mg y 26,7 mg para el segundo. Los 0,6 mg se resuspendieron en una solución 5mM de fosfato monosódico (pH 6,66). Esta solución se sometió a cromatografía de intercambio catiónico en gradiente de fuerza iónica a través de Mono S acoplada a FPLC (columna de 1 ml preequilibrada con la misma solución). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 40 ml de solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,15 M de cloruro de sodio y 60 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,3 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 1 ml por min y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Las fracciones 14 a 18 que inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocito de conejo se juntaron y se dializaron frente agua y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la proteína Beta-nigritina.

De los 26,7 mg obtenidos en el segundo grupo, 3 mg se resuspendieron en una solución 5mM de fosfato monosódico (pH 6,66). Esta solución se sometió a cromatografía de intercambio catiónico en gradiente de fuerza iónica a través de Mono S acoplada a FPLC (columna de 1 ml preequilibrada con la misma solución). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 40 ml de solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,15 M de cloruro de sodio y 60 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,3 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 1 ml por min y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Las fracciones 12 a 18 que inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocito de conejo se juntaron y se dializaron frente a agua y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la proteína Gamma-nigritina.

b) *Determinación de la masa molecular aparente de alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina*

La masa molecular relativa se determinó por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685, [1970]) con un aparato Mighty-Small II de Hoefer (San Francisco, Cal., USA) y una fuente de alimentación Promax modelo F4C-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% y metanol 5% en agua, hasta que se destiñe suficientemente.

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

Los valores de Mr obtenidos fueron 29000, 40000 y 27500 daltons para la alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina respectivamente.

c) presencia de cadenas glucídicas en alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina

Para detectar la existencia de grupos glucídicos en las proteínas estudiadas 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 mg.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 mg.ml⁻¹. Se dejó actuar a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se añadieron 5 µl de una solución de DIG-succinil-ε-acido 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 protocolo descrito por los fabricantes del sistema de transferencia utilizado, el sistema semiseco Semi-Phor modelo TE70 de Hoefer. Las muestras se separan previamente por electroforesis como se describe anteriormente, 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 (obtenida con un sistema MilliQ de Millipore), 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 mA.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 5-Bromo 4 cloro 3 indolil-fosfato y NTB (cloruro de Nitroblue-tetrasodio-disulfato disuelto en dimetilformamida) disueltos en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 9,5) conteniendo MgCl₂ 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. Las proteínas con azúcares en sus cadenas desarrollaron un color gris oscuro. Como patrón se utilizó la glicoproteína transferrina (76000 daltons).

Alfa-nigritina y gamma-nigritina poseen cadenas glucídicas reactivas con el sistema de detección de glicanos de Boehringer.

d) secuencia amino-terminal de alfa-nigritina

La secuencia amino-terminal se determinó como se indica en Limas y cols. (Planta 181,1-9 [1990]) con un secuenciador de proteínas Knauer modelo 810 equipado con un analizador de PTH-aminoácidos (feniltiohidantoil derivados de los aminoácidos). La secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal 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 ácido trifluoroacético (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 feniltiohidantoín (PTH)-aminoácido estable. Los PTH-derivados resultantes fueron analizados empleando una columna Nucleosil C-18 (2 x 250 mm) de 5 µm de diámetro de partícula, equilibrada con un 88% de fase móvil A (acetato sódico 7,6 mM:acetonitrilo [85:15(v/v)] pH 4,77)

y un 12% de fase móvil B (acetonitrilo). La columna fue eluida a un flujo de 1 ml.min⁻¹ a 51°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. La secuencia se determinó en ausencia de polibreno. Las secuencia se presenta en la Tabla 1. La secuencia amino-terminal de beta-nigritina y gamma-nigritina no se pudo determinar por estar bloqueado su extremo aminoterminal.

TABLA 1

Secuencia amino-terminal de la alfa-nigritina.

1	5	10
Ala-Ser-Val-Leu-Asp-Ser-Ile-Gln-Phe-Val-Ser-		
	15	20
Leu-Glu-Lys-Xxx-Ala-Val-Tyr-Glu-Gln-Asn		

e) Obtención de péptidos tripticos de la gamma-nigritina

La digestión de la proteína nativa disuelta en N-metilmorfolina 0.2 M (pH 8.2) se realizó con tripsina 1% (p/p) durante 6 h a 37 °C. La reacción rindió una colección de péptidos que se separaron por un sistema cromatográfico en fase reversa por medio de HPLC equipado con dos bombas (Waters 680) y un controlador de gradiente automático (Waters 990) a través de una columna C₁₈ RP Nova Pak (150 x 3.9 mm). La cromatografía se realizó durante 300 min a un flujo de 30 ml.h⁻¹ en presencia de ácido trifluoroacético 0.1% (v/v) en agua con un gradiente lineal 0-40% de acetonitrilo. El perfil de la elución de dichos aminoácidos fue registrado por un analizador modelo Waters 990.

Cada pico cromatográfico se recogió por separado.

La secuencia aminoacídica de los diferentes péptidos tripticos obtenido se llevó a cabo (Limas y cols. 1990), con un secuenciador de proteínas Knauner modelo 810 equipado con un analizador de PTH-aminoácidos (feniltiohidantoin derivados de los aminoácidos) (Fisher y cols., 1989). Las secuencias de los péptidos se determinaron en presencia de polibreno (utilizado como fijador del péptido). Los PTH-aminoácidos se identificaron y cuantificaron por cromatografía en HPLC en fase reversa con una columna C₁₈.

Se obtuvieron 3 péptidos tripticos con la siguiente secuencia aminoacídica:

	1	5
Pico 6:	Val-Thr-Asn-Ser-Phe-Tyr-Leu	
	1	5
Pico 7:	Tyr-Xxx-Pro-Ser-Ile-Ile-Arg	
	1	5
Pico 10:	Trp-Xxx-Asn-Thr-His-Ser-Tyr-Leu-	
	10	15
	Asn-Glu-Ile-Phe-Ile-Xxx-Leu	

f) Actividad N-glucosidasa sobre el ARN

La actividad N-glucosidasa de las nigritinas se determinó como liberación del fragmento de ARN como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el ARN depurinado por las nigritinas. La liberación del fragmento de ARN se determinó incubando 100 µl de lisado de reticulocitos de conejo (obtenido tal y como se describirá más adelante) con 10 µg de toxina en una solución que contenía [MgAc₂ 1 mM, ditiotritol 5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM], durante 15 min a 37°C. Después el ARN 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 0, 5% SDS/50 mM Tris-HCl (pH 7, 6). La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el ARN 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 ARN con 1 volumen de anilina 2 M (pH 4, 5) durante 10 min a 0 °C en oscuridad. La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen, dos veces). El ARN se precipitó a continuación con dos volúmenes de etanol y 0,3 M NaAc (pH 5,2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue. El precipitado de ARN obtenido en la última etapa se resuspendió en H₂O. 3 µg de ARN en tampón de electroforesis (100 mg/ml) de sacarosa, 7 M de urea, 0,4 gg/ml de azul de bromofenol, Tris-HCl 89 mM (pH 8,3), ácido Bórico 89 mM, EDTA (etilen diamino tetra-acético) 25 mM (pH 8,3), se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4,85% acrilamida y 0,15% de bisacrilamida) preparado según Salustio y Stanley (J.Biol.Chem. 265, 582-588 [1990]) 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 ténido del gel se realizó con bromuro de etidio (0,5 µg.ml⁻¹) durante 30 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm. Alfa, beta y gamma nigritinas mostraron actividad N-glucosidasa.

g) 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 que se describen a continuación. Se utilizaron lisados de reticulocitos de conejo, S-30 de hígado de rata y S-30 obtenidos de germen de distintas especies vegetales (trigo, *Vicia sativa* L. y *Cucumis melo* L.).

Para obtener un lisado de reticulocitos de conejo se parte de 4 conejos de entre 3-4 kg y se les somete a un tratamiento previo con fenilhidrazina, sustancia que impide la completa maduración de los reticulocitos. La fenilhidrazina es preparada fresca de la siguiente forma: se pesan 0,25 g y se disuelven en 7 ml de tampón fosfato sódico 5 mM (pH 7,4), conteniendo 0,14 M de NaCl. A continuación se vuelve a ajustar el pH con NaOH 0,1 N hasta pH 7-7,5 y finalmente se enrasa a 10 ml con agua tipo I. Tras filtrarse a través de una membrana de 0,22 µm se guarda en frasco de vidrio tapado en total oscuridad.

La fenilhidrazina se inyecta subcutáneamente

en el lomo de los animales, 1 ml de la solución por conejo durante 5 días seguidos. Tras dos días de descanso se anestesian con 2 ml de pentotal sódico $2 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, y se sangran seccionando la vena yugular y la arteria carótida. La sangre se recoge sobre vasos de precipitados previamente bañados sus paredes con 1 ml de heparina al 0,05 %. Posteriormente la sangre se filtra a través de 2 gasas para limpiarla de coágulos. La sangre filtrada se centrifuga a 6000 rpm (5500 xg) durante 15 min a 2°C en un rotor JA-14. Se retira el sobrenadante con ayuda de un sistema de vacío y se añaden al sedimento 200 ml de la solución de NaCl 130 mM, KCl 5 mM y MgCl_2 7,5 mM. Tras resuspender los reticulocitos se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Se desecha el sobrenadante y se vuelve a lavar otras 2 veces de la forma ya descrita. El sedimento obtenido en la última centrifugación se pesa y se le añade un volumen de solución de MgCl_2 2 mM y DTT 10 mM. Con esta solución se lisan los reticulocitos agitándolos durante 10 min a 4°C . El lisado se centrifuga a 15000 rpm (27000 xg) durante 15 min a 2°C en un rotor JA-20. Se recoge el sobrenadante y se le añade un décimo de volumen del tampón Tris -HCl 200 mM (pH 7,8) y KCl 0,5 M. Tras homogeneizar la mezcla se reparte en alícuotas de 300 μl y se guarda a -80°C hasta su uso. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 50 μl que contenía 10 μl de lisado y Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, Ditiotreititol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Creatín-Fosfato 10 mM, creatín quinasa 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 mM de Hemina, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,04 mM y L- ^3H valina 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. 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) y 30 μl de H_2O_2 del 30% (v/v) para eliminar el color de las muestras. Después de 15 min se añaden 500 μl de TCA al 20% (p/v), (para que precipiten las cadenas polipeptídicas formadas). Los precipitados proteicos 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).

El S-30 de hígado de rata se hizo según se describe a continuación. La rata es sacrificada bajo los efectos del pentotal sódico ($100\text{-}200 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso) perfundiendo el hígado con tampón de extracción compuesto de: Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 150 mM, MgAc_2 , 3 mM y DTT 5 mM. El hígado, una vez extraído, se lava dos veces con el mismo tampón, posteriormente se trocea con tijeras y se homogeneiza manualmente durante 5 min manteniendo el homogeneizador en un baño de agua/hielo. Durante el proceso se añade un volumen de tampón equivalente a cinco/cuartos el peso en gramos del hígado. El tejido homoge-

neizado se centrifuga a 2500 rpm (750 xg) durante 5 min a 4°C en un rotor JA-20, tras lo cual el sobrenadante se recoge y, de nuevo, es centrifugado pero esta vez a 16000 rpm (30000 xg) 15 min a 4°C en el mismo rotor. El sobrenadante es retirado, teniendo especial cuidado no contaminarlo con la capa superior de grasa, y a continuación es filtrado a través de una columna de Sephadex G-25 (8 x 2,5 cm) previamente equilibrada con tampón de extracción. El eluato no retenido se recoge en fracciones y se juntan aquellas de color más intenso. Seguidamente se reparte el extracto en alícuotas y se guarda a -80°C hasta su uso. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 25 μl que contenía 25 μl de S-30 de hígado de rata y Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl_2 8 mM, NH_4Cl 100 mM, Ditiotreititol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 2 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 1 mM, CTP (Citidín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Fosfoenolpiruvato 2 mM, Piruvato quinasa 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,1 mM y L- ^3H valina 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. La reacción se incubó a 37°C durante 60 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 μl de TCA al 20% (p/v), (para que precipiten las cadenas polipeptídicas formadas). Los precipitados proteicos 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). El S-30 de gérmenes vegetales se hizo según Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]; Arias y cols. Phytochemistry 30, 3185-3187 [1991]. Se esterilizan las semillas con lejía comercial diluida (una parte de lejía y tres de agua corriente estéril) y se aclaran abundantemente con agua corriente estéril. Una vez aclaradas las semillas se depositan en el fondo de un tarro de vidrio (previamente esterilizado en autoclave) sobre cuatro capas de papel de filtro humedecido (esterilizado en estufa a 150°C). Todo este proceso se realiza dentro de una cabina de flujo laminar horizontal modelo Micro-H (Telstar S.A., Tarrasa). La germinación se lleva a cabo a 20°C en oscuridad y durante 4-5 días, al cabo de los cuales resultan gérmenes de aproximadamente 1 cm, de color blanco debido a la ausencia de clorofila.

Cuando el germen alcanza el tamaño deseado se separa de la semilla mediante pinzas de cirugía y es depositado en un vaso de precipitados enfriado a 0°C . Este proceso y todos los siguientes se realizan en condiciones libres de RNAsas. Se pesan entre 4-6 gramos de germen y se lavan dos veces con agua tipo I estéril (obtenida con el equipo Milli RO-Milli Q de Millipore (Madrid)) y una vez con tampón de extracción enfriado en un baño agua/hielo. El tampón de extracción utilizado está compuesto por Tris-HCl 20 mM (pH

7,8), KCl 25 mM, MgAc₂ 9 mM y DTT 5 mM. El germen lavado y escurrido se coloca en un mortero de porcelana no vitrificada enfriado a -20°C y se machaca durante unos 15 minutos, hasta que adquiere un aspecto homogéneo y brillante. Durante el proceso se añaden entre 0,2 y 0,4 ml de tampón de extracción. Todo el proceso se realiza en la cámara fría (4°C). A continuación se centrifuga el extracto a 4000 rpm (2000 xg) durante 10 minutos a 4°C en un rotor JA-20 de la centrífuga Beckman modelo J2-21 (Beckman instruments, INC, Palo Alto, CA, USA). Después se desecha el sedimento formado por restos de tejido vegetal y el sobrenadante se incuba durante 15 min a 0-2°C. Seguidamente se centrifuga de nuevo, pero esta vez a 16000 rpm (30000 xg) durante 20 min a 4°C en el mismo rotor. El sobrenadante resultante se recoge con una pipeta Pasteur evitando en lo posible la capa de grasa y se cromatografía a través de una columna de Sephadex G-25 (10 cm x 4 cm) equilibrada previamente con tampón de extracción. La elución se lleva a cabo en cámara fría. El eluato conteniendo las fracciones que muestran mayor opacidad es repartido en alícuotas de 0,2 ml, etiquetadas como S 30 y congeladas a -80°C hasta su uso. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 50 μ l que contenía 15 μ l de S-30 de germen vegetal y Tris-HCl 29 mM (pH 7,8), KCl 30 mM, Mg(AcO)₂ 9,8 mM, NH₄Cl 28 mM, Ditiotreititol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 4 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 1 mM, Creatín -Fosfato 8 mM, creatín quinasa 60 μ g/ml, t-RNA de germen de trigo 0,4 mg/ml, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,1 mM y L-[³H]valina 7,4 μ Ci/ml. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 min. La reacción de síntesis de proteínas se para con la adición de 500 μ l de KOH 0,1 N (utilizado para degradar las moléculas de los aminoacil-tRNAs cargados que no se han incorporado en la cadena polipeptídica) y 100 μ g BSA para facilitar la precipitación de proteínas. Después de 15 min se añaden 500 μ l de TCA al 20% (p/v), (para que precipiten las cadenas polipeptídicas formadas). Los precipitados proteicos 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). Los resultados se indican en la tabla 2.

TABLA 2

Efecto de las nigrinitas sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)		
	Alfa-ni-gritina	Beta-ni-gritina	Gamma-ni-gritina
Lisados de reticulocitos de conejo	34	8.41	2.44
hígado de rata	556	172	407
germen de trigo	>3000	>5000	>2000
germen de Vicia sativa L.	>3000	>5000	>2000
germen de Cucumis melo L.	>3000	>5000	>2000

IC₅₀ indica la concentración de proteína que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas en las condiciones standard de cada sistema acelular y se obtuvieron por regresión lineal de los resultados obtenidos incubando los distintos sistemas con cantidades variables de las distintas proteínas. Como control se incubaron los distintos sistemas en ausencia de proteína.

h) Relación inmunológica

La gamma-nigrinita posee una fuerte actividad inmunogénica que permitió obtener anticuerpos policlonales en conejo por los procedimientos standard (Harlow y Lane "Antibodies, a laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory [1988]).

Dos conejos de 3-4 kg fueron inyectados subcutáneamente en el lomo con 0,5 mg de proteína en emulsión completa de Freund y 100 mM de NaCl. Las inyecciones se repitieron a las 3 y a las 6 semanas con 0,5 mg en emulsión incompleta de Freund. Después de dos meses de la primera inyección, los conejos se anestesian con 2 ml de pentotal sódico 2 g.ml⁻¹ y se sangran seccionando la vena yugular y la arteria carótida. La sangre se incubó durante 1 hora a 37°C y después 12 horas a 4°C. El suero (que contiene los anticuerpos policlonales) se separó del coágulo por centrifugación. Dicho suero se purificó por cromatografía de afinidad a través de Proteína A-Sepharosa y reaccionó fuertemente con la gamma-nigrinita.

La reacción inmunológica de las nigrinitas frente a los anticuerpos se estudió utilizando un sistema de filtración para "dot blot" de Tecgen S.A. 500, 250, 125 y 62.5 ng de proteína (alfa-nigrinita, beta-nigrinita, gamma-nigrinita) se inmo-

bilizaron en una membrana Immobilon P de Millipore (que previamente había sido tratada con etanol, lavada con agua y preincubada durante 10 minutos con TBS). A continuación las membranas se procesaron para la reacción con los anticuerpos (anti-gamma-nigritina) tal y como se describe a continuación. Se incubó la membrana durante 2 h a 37°C en TBS-BSA (5%) (Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), NaCl 0.9% y BSA 5%). Seguidamente se lavó durante 5 min 3 veces con tampón TBS-BSA (0.1%). Posteriormente se incubó con el anticuerpo específico (anti-gamma-nigritina) disuelto en TBS-BSA (0.1%) durante 16 h a 37°C. Nuevamente se lavó con TBS-BSA (0.1%) y después se incubó con el anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido en el mismo tampón en una proporción de 1/3000, durante 2 h a 37°C. Tras un nuevo lavado se añadió el sustrato formado por una mezcla de

NBT (disuelto en agua tipo I) y Fast Red (disuelto en Tris 0.2 M pH 8) preparado justo antes de ser usado. A los 20 min el color rojo estaba totalmente desarrollado y era parado lavando la membrana con agua destilada.

Beta-nigritina reaccionó parcialmente con anti-gamma-nigritina hasta 125 ng. Alfa-nigritina no reaccionó a ninguna de las concentraciones probadas.

i) Toxicidad

La toxicidad se determinó inyectando las proteínas a ratones. Se disolvieron 65 mg de proteína en 0,125 ml de una solución 5 mM fosfato monosódico (pH 7.5) conteniendo 0,14 M NaCl. La proteína se inyectó intraperitonealmente en ratones de 30 gramos de peso y se observó el número de supervivientes al cabo de 10 días. En todos los casos (alfa-nigritina, beta-nigritina y gamma-nigritina) la supervivencia fue del 100%.

REIVINDICACIONES

1. Proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., **caracterizadas** porque dichas proteínas son capaces de interaccionar con el ácido ribonucleico y provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares.

2. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada Alfa-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la proteína presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 29000 y porque esta posee la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal:

1	5	10
Ala-Ser-Val-Leu-Asp-Ser-Ile-Gln-Phe-Val-Ser-		
15	20	
Leu-Glu-Lys-Xxx-Ala-Val-Tyr-Glu-Gln-Asn		

3. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada Beta-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., según la reivindicación 1 **caracterizada** porque presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 40000.

4. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada Gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., según las reivindicaciones 1, **caracterizada** porque presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 27500 y porque esta presenta tres péptidos tripticos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

	1	5
Pico 6:	Val-Thr-Asn-Ser-Phe-Tyr-Leu	
	1	5
Pico 7:	Tyr-Xxx-Pro-Ser-Ile-Arg	
	1	5
Pico 10:	Trp-Xxx-Asn-Thr-His-Ser-Tyr-Leu-	
	10	15
	Asn-Glu-Ile-Phe-Ile-Xxx-Leu	

5. Procedimiento para la obtención de proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra* L., **caracterizado** porque comprende unas primeras operaciones de extracción de las hojas de la planta con una solución acuosa a base de cloruro sódico y fosfato monosódico para obtener un extracto que sea capaz de inhibir síntesis de proteínas y purificación del mismo mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular.

6. Procedimiento para la obtención de proteína inactivadora de ribosomas, denominada alfa-nigritina, de la planta *Sambucus nigra*, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: a- extraer las hojas de *Sambucus nigra* previamente molidas con una solución acuosa de cloruro de sodio y fosfato monosódico. b- filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla

y centrifugar el filtrado. c- acidificar el fluido sobrenadante y aplicarlo a una columna para cromatografía de intercambio iónico, equilibrada con un tampón de acetato sódico y lavar la columna primero con tampón acetato y después con tampón fosfato. d- eluir la columna lavada con tampón fosfato conteniendo cloruro de sodio y recoger la fracción proteínica. e- dializar la fracción proteínica y aplicarla a una columna de intercambio iónico equilibrada con tampón fosfato, eluir la columna con un gradiente de sal rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. f- aplicar el segundo de los picos proteicos que presenta inhibición de la biosíntesis de proteínas a una columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con cloruro de sodio y fosfato monosódico, rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas. g- dializar las fracciones correspondientes al segundo pico de inhibición y aplicarlos a una columna de intercambio iónico Mono S, eluir la columna con un gradiente de sal, rindiendo el eluato picos proteicos de los cuales uno inhibe la biosíntesis de proteínas y corresponde a la alfa-nigritina.

7. Procedimiento para la obtención de proteína inactivadora de ribosomas, denominada Beta-nigritina, de la planta *Sambucus nigra*, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: a- extraer las hojas de *Sambucus nigra* previamente molidas con una solución acuosa de cloruro de sodio y fosfato monosódico. b- filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado. c- acidificar el fluido sobrenadante y aplicarlo a una columna para cromatografía de intercambio iónico, equilibrada con un tampón de acetato sódico y lavar la columna primero con tampón fosfato y después con tampón acetato. d- eluir la columna lavada con tampón fosfato conteniendo cloruro de sodio y recoger la fracción proteínica. e- dializar la fracción proteínica y aplicarla a una columna de intercambio iónico equilibrada con tampón fosfato, eluir la columna con un gradiente de sal rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. f- aplicar el tercero de los picos proteicos que presenta inhibición de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo a una columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con cloruro de sodio y fosfato monosódico, rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas. g- dializar las fracciones correspondientes al primer pico de inhibición y aplicarlos a una columna de intercambio iónico Mono S, eluir la columna con un gradiente de sal, rindiendo el eluato picos proteicos de los cuales uno inhibe la biosíntesis de proteínas y corresponde a la beta-nigritina.

8. Procedimiento para la obtención de proteína inactivadora de ribosomas, denominada gamma-nigritina, de la planta *Sambucus nigra*, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a- extraer las hojas de *Sambucus nigra* previamente molidas con una solución acuosa de cloruro de sodio y fosfato monosódico. b- filtrar

el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado. c- acidificar el fluido sobrenadante y aplicarlo a una columna para cromatografía de intercambio iónico, equilibrada con un tampón de acetato sódico y lavar la columna primero con tampón fosfato y después con tampón acetato. d- eluir la columna lavada con tampón fosfato conteniendo cloruro de sodio y recoger la fracción proteínica. e- dializar la fracción proteínica y aplicarla a una columna de intercambio iónico equilibrada con tampón fosfato, eluir la columna con un gradiente de sal rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. f- aplicar el tercero de los picos proteicos que presenta inhibición de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo a una columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con cloruro de sodio y fosfato monosódico, rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas. g- dializar las fracciones correspondientes al segundo pico de inhibición y aplicarlos a una columna de intercambio iónico Mono S, eluir la columna con un gradiente de sal, rindiendo el eluato picos proteicos de los cuales uno inhibe la biosíntesis de proteínas y corresponde a la gamma-ni-

gritina.

9. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina de la planta *Sambucus nigra*, para la inactivación *in vitro* de ribosomas sensibles a la proteína.

10. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas Alfa-nigritina, Beta-nigritina y Gamma-nigritina de la planta *Sambucus nigra*, para la inactivación *in vitro* del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

11. Utilización de la alfa-nigritina para la inactivación *in vitro* de ribosomas sensibles a la toxina.

12. Utilización de la alfa-nigritina para la inactivación *in vitro* del ácido ribonucleico.

13. Utilización de la beta-nigritina para la inactivación *in vitro* de ribosomas sensibles a la toxina.

14. Utilización de la beta-nigritina para la inactivación *in vitro* del ácido ribonucleico.

15. Utilización de la gamma-nigritina para la inactivación *in vitro* de ribosomas sensibles a la toxina.

16. Utilización de la gamma-nigritina para la inactivación *in vitro* del ácido ribonucleico.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 095 190
⑫ N.º solicitud: 9500509
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.03.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12N 9/22, C07K 14/415, A61K 38/46

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-9420540-A (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 15.09.94 * Todo el documento *	1-19
A	GIRBES, T. et al. "Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of Sambucus nigra L." PLANT MOLECULAR BIOLOGY. 1993. Vol. 22, páginas 1181-1186 * Todo el documento *	1-19

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.º:

Fecha de realización del informe
19.12.96

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1