



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 115 520**

② Número de solicitud: 9600419

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **05.02.96**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.98**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.98

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Valladolid**
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES

⑦ Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;**
Citores González, Lucía;
Martínez de Benito, Fernando;
Iglesias Alvarez, Rosario y
Ferreras Rodríguez, José Miguel

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, procedimiento para su obtención y utilización.**

⑤ Resumen:

Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris* procedimiento para su obtención y utilización. La beetin 27, presenta una masa molecular relativa de 27080 daltons y posee la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal:

Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asn-Leu-Arg-Asn-Ile-Val-Lys-Asp-Ser-Lys-Leu-Val-Tyr-Glu-Ile-Pro-Met.

y la otra proteína, beetin 29, presenta una masa molecular relativa de 29000 daltons y posee la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal:

Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asn-Leu-Arg-Asn-Ile.

El procedimiento general para la obtención 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, exclusión molecular y cromatografía de fase reversa.

Dichas proteínas tienen aplicación como inhibidoras de la biosíntesis de proteínas y como inactivadoras del ácido ribonucleico genómico del virus y tienen utilidad en la terapia del cáncer y del SIDA y de enfermedades víricas de las plantas.

ES 2 115 520 A1

DESCRIPCION

Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris* procedimiento para su obtención y utilización.

5 **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 ribonucléico.

De forma más específica, la presente invención se refiere a dos nuevas RIPs de una cadena obtenidas de hojas de *Beta vulgaris* infectadas con el virus de la amarillez de la remolacha, útiles en la terapia del cáncer, del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y de las enfermedades víricas de las plantas.

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

La presente invención se refiere al procedimiento de obtención y su utilización como inactivador de ácido ribonucléico, y en particular del ARN ribosómico y genómico viral lo que provoca la inhibición de la biosíntesis de proteínas, de dos proteínas vegetales de las hojas de la planta *Beta vulgaris*.

En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibitoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes, que son de naturaleza protéica y caracter antiviral 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]).

En la actualidad se clasifica a las RIPs en tres categorías: RIPs de tipo 1, de tipo 2 y de tipo 4 (Citores y cols. *FEBS Letters* 329, 59-62 [1993]). Las RIPs de tipo 1 (vegetales y bacterianas) están formadas por una sola cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad de inhibidor de síntesis de proteínas; las RIPs de tipo 2 (solo vegetales hasta ahora) están formadas por dos cadenas polipeptídicas disimilares, una cadena inhibidora de síntesis de proteínas equivalente a las RIPs de tipo 1 que se denomina cadena A y una cadena con propiedades de lectina que se denomina cadena B; las RIPs de tipo 4 (sólo vegetales hasta ahora) están formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, siendo cada dímero una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente a una RIP de tipo 2. Las RIPs de tipo 2 y 4 pueden a su vez ser tóxicas como ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina (Citores y cols. *FEBS Letters* 329, 59-62 [1993]), debido a que pueden atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (Stirpe y cols., *Biotechnology* 10, 405-412 [1992]). Por otro lado las RIPs de tipo 2 y 4 pueden ser también no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones, esto es no tienen toxicidad alguna a las concentraciones utilizadas con las RIPs tóxicas tales como ricina, abrina, etc. (Girbés y cols., *J. Biol. Chem.* 268, 18195-18199 [1993]; Girbés y cols., *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-1186 [1993]). Las RIPs de tipo 1 son menos tóxicas para las mismas células y animales de ensayo que las de tipo 2 tóxicas, excepción hecha de los macrófagos (Stirpe y cols., *Biotechnology* 10, 405-412 [1992]), debido a que no pueden entrar por mediación de receptores de membrana.

Las cadenas polipeptídicas A y B de las RIPs 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 ribonucléico (Roberts, y cols, *Biosc. Rep.* 6, 19-29 [1986]; Stirpe, y Barbieri, *FEBS Lett.* 195, 1-8 [1986]; Olsnes, y Pihl, en : *Molecular Action of Toxins and Viruses* (Cohen, P. and Van Heyningen, S. eds.) pp. 51-105, Elsevier, Amsterdam, New York [1982]; Barbieri, y Stirpe, *Cancer Surv.* 1, 489-520 [1982]; Stirpe, y cols., *Bio/tech.* 10, 405-412 [1992]; Citores L. y cols., *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]; Girbés y cols., *J. Biol. Chem.* 268, 18195-18199 [1993]; Girbés y cols., *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-1186 [1993]; Jiménez y Vázquez, *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 649-672 [1985]). Las RIPs inhiben ribosomas de tipo eucariótico (Stirpe, y cols., *Bio/tech.* 10, 405-412 [1992]; Citores L. y cols., *FEBS Lett.* 329, 59-62 [1993]; Girbés y cols., *J. Biol. Chem.* 268, 18195-18199 [1993]; Girbés y cols., *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-1186 [1993]). Solo algunas RIPs inhiben los ribosomas bacterianos (Girbes y cols, *J.Bacteriol.* 175, 6721-6724 [1993]). La inactivación consiste en la liberación de una adenina del ARNr 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 suelen ser 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]).

5 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]).

10 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 “[SIDA]” (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];
15 Zarlino y cols. *Nature* 347,92-95 [1990]). Resultados recientes obtenidos con enfermos de SIDA indican que los enfermos tratados con la RIP monocatenaria tricosantina (GLQ223) experimentan notables incrementos en la población de linfocitos T CD4+ que son las células blanco de la infección por el virus del SIDA (VIH-1) (Kahn y cols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 260-267 [1994]. Por otro lado, estudios realizados con enfermos de sida tratados con la RIP monocatenaria MAP aislada de *Momordica charantia* han rendido resultados esperanzadores para la utilización de esta proteína como agente
20 terapéutico para el SIDA (Rebutan, *Bulletin,Bitter Melon Therapy Group* 2, 1-10 [1994]).

Las RIPs de tipo 2 y en particular la ricina, y la RIP monocatenaria GAP 31 se ha demostrado además que poseen actividad antitumoral (Barbieri y Stirpe *Cancer Surv.* 1,489520 [1982]; Lee-Huang y
25 cols. *J.Mol.Biol.* 240, 92-94 [1994]).

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 por otro de poder substituir la toxina o la parte
30 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]).

Las hojas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) moderadamente infectadas por el virus del amarilleo recogidas en los campos de cultivo contienen unas proteínas inactivadoras de ribosomas que denominamos “beetins” que inhibe fuertemente la biosíntesis de proteínas y degradan el ácido ribonucleico (ARN) genómico de virus ARN, y que en base a sus propiedades estructurales y funcionales puede ser clasificadas como proteínas antivirales e inactivadoras de ribosomas (Stirpe y cols., *Biotechnology* 10,
35 405-412 [1992]). *Las dos beetins son las primeras proteínas inactivadoras de ribosomas inducibles por virus que se han descrito.*

Las dos beetins presentan además como característica específica y especial una homología en la secuencia de amino ácidos del extremo N-terminal de 48, 42, 55 y 53% con las proteínas anti-HIV (anti-SIDA) tricosantina (McGrath y cols. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86,2844-2848 [1989]), MAP 30 (Lee-Huang y cols.
45 *FEBS Lett.* 272,12-18 [1990]) y TAP 29 (Lee-Huang y cols. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88,6570-6574 [1991]) y la proteína antiviral PAP-S (Kung y cols. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 3301-3318 [1990]) respectivamente, lo que la convierte en especialmente valiosa.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a dos nuevas proteínas denominadas beetins de *Beta vulgaris*, a un procedimiento para su preparación y a sus aplicaciones.

Las mencionadas proteínas son nuevas toxina vegetal de naturaleza proteica que, en base a sus propiedades químico-físicas y bioquímicas, se clasifican en la familia de proteínas antivirales con actividad de
55 proteína inactivadora de ribosoma (RIP: ribosome-inactivating protein) 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 hojas de *Beta vulgaris* infectadas con virus vegetales y no en las hojas sanas no infectadas y no tratadas con pesticidas o herbicidas.
60

Las nuevas proteínas de la presente invención están constituidas por una sola cadena con actividad

N-glucosidasa del ácido ribonucleico, en especial con actividad de N-glucosidasa del ácido ribonucleico 28 S de ribosomas de mamíferos y 25 S de ribosomas vegetales y del ácido ribonucleico (ARN) genómico de virus ARN. Su utilidad en terapia se basa en el empleo que se ha hecho de las proteínas de esta familia en la terapia del cáncer y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Esa utilidad se caracteriza de dos maneras: 1) cualquiera de estas proteínas ligada a una molécula transportadora (anticuerpo, hormona u otra proteína) reconocible por un receptor de membrana presente en la célula diana, permite la actuación específica y selectiva de la toxina sobre dichas células diana por inactivación del ácido ribonucleico de sus ribosomas; 2) cualquiera de estas proteínas en forma libre es capaz de degradar el ácido ribonucleico (ARN) genómico de virus ARN.

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 antiviral perteneciente también a la familia de proteínas inactivadoras de ribosomas con actividad anti-HIV-1 (Zarling y cols. *Nature* 347 92-95 [1990], confieren a esta proteína una enorme utilidad.

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 de organismos eucariontes. El transporte de proteínas al interior celular se consigue acoplándolas a transportadores adecuados como anticuerpos, hormonas y otros receptores específicos de la superficie celular y que pueden ser introducidos en el interior celular (Stirpe y Cols. *Bio/technol.* 10, 405-412 (1992) ; Barbieri y Stirpe, *Cancer Sur.* 1, 490-520 (1982)).

Las aplicaciones más importantes de las RIPs de tipo 1 de la presente invención son: como inactivadoras de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivadora del ácido ribonucleico de mamíferos y de plantas, como inhibidoras de la síntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales, u otras moléculas transportadoras, 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) y los virus vegetales.

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 en mamíferos y para las enfermedades víricas de las plantas.

El procedimiento general para la obtención de las beetins de la presente invención comprende el aislamiento de las mismas de hojas de *Beta vulgaris* infectadas con el virus de la amarillez de la remolacha azucarera, incluyendo las etapas que se indican a continuación:

- 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 desarrollo de una cromatografía de fase reversa.

Modos de realizar la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente con un ejemplo, como es la obtención de beetin 27 y beetin 29, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Este ejemplo se desglosa en 9 Partes:

- a) Obtención de beetin 27 y beetin 29 a partir de hojas de *Beta vulgaris*, b) determinación de las masas moleculares aparentes, c) presencia de cadenas glucídicas, d) secuencias amino-terminal, e) actividad N-glucosidasa sobre el ARN ribosómico, f) actividad N-glucosidasa sobre el ARN genómico viral, g) inhibición de la biosíntesis de proteínas, h) relación inmunológica con otras proteínas.

- a) *Obtención de beetin 27 y beetin 29*

300 g de hojas de *Beta vulgaris* infectadas con el virus de la amarillez se extrajeron con 2,4 l de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,4) 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 14300 x g durante 45 min a 0°C. El fluido sobrenadante (aproximadamente 3,5 l) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 4,8 cm). La solución de equilibrio de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4). El fluido proteico acidificado se aplicó a la columna y el no retenido en la columna se desechó. A continuación la columna se lavó con solución de acetato sódico 10 mM (pH 4) 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 0, 5 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 agua. Esta preparación proteica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica en S Sepharose Fast Flow (columna de 1 x 6 cm preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 6,66). Primero se fijó la proteína (que previamente se llevó a fosfato monosódico 5 mM (pH 6,66), se lavó la columna con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo, y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 75 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) conteniendo 30 mM de cloruro sódico y 75 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) conteniendo 200 mM de cloruro sódico programado en un equipo de cromatografía líquida FPLC (Pharmacia). La velocidad se ajustó a 1 ml por min y se recogieron fracciones de 2 ml. Se recogieron y juntaron dos grupos de fracciones que mostraron actividad inhibidora en un sistema de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo: I (fracciones 41 a 48 con 32 ml) y II (fracciones de 49 a 54 con 12 ml). Cada solución de proteína se llevó a 0,4 M de cloruro sódico y 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 4 ml. Para el grupo I las fracciones que mostraron actividad inhibidora en este paso cromatográfico fueron de la 20 a 25 y para el grupo II fueron de la 17 a 23. En cada caso se mezclaron y se dializaron frente a 4 l de agua (2 veces). La solución de proteína de cada grupo se llevó a fosfato monopotásico 5 mM (pH 4,7) y se sometió a cromatografía de fase reversa utilizando una columna ProRPc HR5/2 de Pharmacia (columna de 0,5 x 2 cm). Previamente está columna se equilibró con las siguientes soluciones: Primero con 5 ml de tampón B (fosfato monopotásico 5 mM (pH 4,7) conteniendo 80% de metanol) a un flujo de 0.5 ml/min, a continuación 5 ml de un gradiente de 100 a 0% de B en tampón A (fosfato monopotásico 5 mM (pH 4,7), y finalmente 5 ml de tampón A. Primero se fijó la proteína, se lavó la columna con 5 ml de tampón A, y después se aplicó el gradiente consistente en 4 ml de gradiente 0-20% de B en tampón A seguido por 14 ml de gradiente 20-60% de B en tampón A. La velocidad se ajustó a 0.5 ml por min y se recogieron fracciones de 0.5 ml. Las fracciones de 27 a 33 para el grupo I y de 20 a 34 para el grupo II inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocito de conejo. Del grupo I se obtuvo una mezcla de las proteínas beetin 27 y beetin 29, mientras que del grupo II se obtuvo la beetin 27 pura a homogeneidad electroforética.

b) *Determinación de la masa molecular aparente de la beetin 27 y la beetin 29*

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 Pro-max modelo FAC-400. El procedimiento esencialmente es como se describe a continuación. Se disuelven 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.

El valor de Mr obtenido fue de 27080 daltons para la beetin 27 y de 29000 daltons para la beetin 29.

c) *Presencia de cadenas glucídicas en beetin 27 y beetin 29*

5

Para detectar la existencia de grupos glucídicos en la beetin 27 y beetin 29 se utilizó “el Glycan Detection Kit” de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). Se disolvieron 20 μg de la fracción que contenía beetin 27 y beetin 29 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). 10 μg de Beetin 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 PDVF 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 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ 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 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 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. Las proteínas con azúcares en sus cadenas desarrollaron un color gris oscuro. Como patrones se utilizaron las glicoproteínas transferrina (76000 daltons) y anhidrasa carbónica (30000 daltons).

45

d) *Secuencia amino-terminal de beetin 27 y beetin 29*

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 (feniltiohidantoilderivados 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 10 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 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 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.

60

ES 2 115 520 A1

Las secuencias se determinaron en ausencia de polibreno. Las secuencias son las siguientes:

Beetin 27

5 Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-
1 5 10 15 20
Asn-Leu-Arg-Asn-Ile-Val-Lys-Asp-Ser-Lys-Leu-Val-Tyr-Glu-Ile-Pro-Met
10 25 30 35

Beetin 29

Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-
1 5 10 15 20
15 Asn-Leu-Arg-Asn-Ile
25

e) Actividad N-glucosidasa de beetin 27 sobre el ARN ribosómico

20 La actividad N-glucosidasa de la beetin 27 se determinó como liberación del fragmento de ARN como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el ARN depurinado por la beetin 27. La liberación del fragmento de ARN se determinó incubando 100 μ l de lisado de reticulocitos de conejo o bien de S-30 de *Vicia sativa* (obtenidos tal y como se describirá más adelante) con 6 μ g de beetin 27 en una solución que contenía [MgAC₂ 1 mM, ditiotreitól 5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM] en caso de reticulocitos de conejo, o bien [MgAC₂ 9 mM, ditiotreitól 5 mM, KCl 25 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM] en el caso del S-30 de *Vicia sativa* durante 30 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 μ g de ARN en tampón de electroforesis (100 mg/ml de sacarosa, 7 M de urea, 0,4 μ g/ml de azul de bromofenol, Tris-HCl 89 mM (pH 8,3), ácido Bórico 89 mM, EDTA (etileno 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 teñido del gel se realizó con bromuro de etidio (0,5 μ g.ml⁻¹) durante 30 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm. Beetin 27 mostró actividad N-glucosidasa tanto en el ARN ribosómico de reticulocitos de conejo como en el S-30 de *Vicia sativa*.

45 f) Actividad N-glucosidasa de beetin 27 sobre el ARN 5 genómico viral

La actividad N-glucosidasa de la beetin 27 (actividad depurinante) se determinó como liberación de fragmentos de ARN como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el ARN del virus del mosaico del tabaco (TMV) depurinado por la beetin 27.

La depurinación se realizó a tres pHs distintos: 4, 6 y 7.

La depurinación a pH 4 se realizó incubando 5 μ g de RNA del virus del mosaico del tabaco con beetin 27 en 25 μ l de una solución que contenía acetato de sodio 20 mM (pH 4) y NH₄Cl 100 mM durante 1 hora a 37°C.

La depurinación a pH 6 se realizó incubando 5 μ g de RNA del virus del mosaico del tabaco con beetin 27 en 25 μ l de una solución que contenía acetato de sodio 20 mM (pH 6) y NH₄Cl 100 mM durante 1 hora a 37°C.

La depurinación a pH 7 se realizó incubando 5 μ g de RNA del virus del mosaico del tabaco con beetin 27 en 25 μ l de una solución que contenía TrisHCl 10 mM (pH 7) y EDTA 1 mM durante 1 hora a 37°C.

La depuración se determinó tratando las muestras 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. 0,5 µg de ARN 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 (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 teñido 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. Beetin 27 mostró actividad N-glucosidasa sobre el ARN del virus del mosaico del tabaco liberándose numerosos fragmentos de ARN. Para depurar el ácido ribonucleico del virus en estas condiciones experimentales se necesitaron concentraciones de beetin 27 de 240 µg/ml (pH 6 y 7) y 24 µg/ml (pH 4).

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 dos especies vegetales (trigo y *Vicia sativa* 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 anestesia con 2 ml de pentotal sódico 2 g.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 MgCl₂ 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 MgCl₂ 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, MgCl₂ 1,5 mM, Ditiotretitol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Creatín-Fosfato 10 mM, creatín quinasa 40 µg/ml, 0,02 mM de Hemina, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,04 mM y L-[³H]valina 2 µCi/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 H₂O₂ 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 (100-200 mg.g⁻¹ de peso) perfundiendo el hígado con tampón de extracción compuesto de: Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 150 mM, MgAC₂ 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 homoge-

neiza 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 homogeneizado 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 μ l que contenía 10 μ l de S-30 de hígado de rata y Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 8 mM, NH₄Cl 100 mM, Ditioneitol 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 μ g/ml, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,1 mM y L- [³H]valina 3 μ Ci/ml. La reacción se incubó a 37°C durante 60 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). 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).

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, Ditioneitol 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 1.

TABLA 1

Efecto de la beetin 27 sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)
Lisados de reticulocitos de conejo	1,15
Hígado de rata	68
Germen de trigo	617
Germen de <i>Vicia sativa</i> L.	1368

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 entre beetin 27 y beetin 29

Las dos beetins 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]), utilizando beetin 27 purificada a homogeneidad electroforética.

Un conejo de 3-4 kg fue inyectado en el ganglio linfático popliteo con 0,1 mg de proteína (beetin 27) disuelta en 50 μ l de tampón fosfato monosódico 5 mM (pH 7,4) conteniendo 0.14 M de cloruro sódico a la que se añadieron 50 μ l de adyuvante completo de Freund. Después de 4 semanas se inyectaron 0.1 mg de proteína subcutáneamente en el lomo (esta vez disuelta en 1 ml de agua y 1 ml de adyuvante incompleto de Freund). Después de 6 semanas de la primera inyección, el conejo se anestesió con 2 ml de pentotal sódico 2 g.ml⁻¹ y se sangró seccionando la vena yugular y la arteria carótida. La sangre se incubó durante 1 hora a 37°C y después 12 horas a 40°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 beetin 27 y con beetin 29.

La reacción inmunológica de las beetin 27 y beetin 29 frente a los anticuerpos se estudió mediante la técnica de "Western blot".

Se disuelven 2 μ g de una mezcla que contiene beetin 27 y beetin 29 (en relación 2 a 1), en un tampón desnaturalizante 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%. A continuación se les somete a una electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685, [1970]). Se llevó a cabo 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 en el segundo apartado. 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. Tras la separación por electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore) utilizando el protocolo descrito por los fabricantes del sistema de transferencia utilizado, el sistema semisecco Semi-Phor modelo TE70 de Hoefer. Previamente 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 PDVF Immobilon de Millipore a la que serán transferidas las proteínas, también es cortada al mismo tamaño que el gel, se humedece unos 20 segundos

ES 2 115 520 A1

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 membrana durante 1 h. A continuación las membranas se procesaron para la reacción con los anticuerpos 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-beetin) 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.

Los anticuerpos frente a la proteína beetin 27 reconocieron en este ensayo las bandas electroforéticas correspondientes a las proteínas beetin 27 y beetin 29 en las calles que contenían la mezcla purificada de las dos proteínas El valor de Mr obtenido por comparación con marcadores de Mr fue de 27080 para la beetin 27 y de 29000 para la beetin 29.

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, **caracterizadas** porque dichas proteínas son capaces de interactuar con el ácido ribonucleico y provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares.

2. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, según reivindicación 1, **caracterizadas** porque la proteína mayoritaria, beetin 27, presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 27080 y posee la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal:

Beetin 27

1	5	10	15	20
Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-				
	25	30	35	
Asn-Leu-Arg-Asn-Ile-Val-Lys-Asp-Ser-Lys-Leu-Val-Tyr-Glu-Ile-Pro-Met.				

y la otra proteína, beetin 29, presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 29000 y posee la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal:

Beetin 29

1	5	10	15	20
Ala-Asp-Val-Thr-Phe-Asp-Leu-Glu-Thr-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-				
	25			
Asn-Leu-Arg-Asn-Ile.				

3. Procedimiento para la obtención de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, según la reivindicación 1, **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, exclusión molecular y cromatografía de fase reversa.

4. Procedimiento para la obtención de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones: a- extraer las hojas de *Beta vulgaris* L. infectadas con el virus de la amarillez 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 dos picos proteícos inhibidores de la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. f- aplicar los picos proteícos que presenta inhibición de la biosíntesis de proteínas a una columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con cloruro de sodio y fosfato monosódico por separado, rindiendo el eluato, en cada caso, picos proteícos de los cuales uno de ellos inhibe la biosíntesis de proteínas en cada caso. g- dializar las fracciones correspondientes a cada pico de inhibición y aplicarlos por separado a una columna de fase reversa equilibrada con un tampón de fosfato potásico y lavar la columna con tampón de fosfato potásico. h- eluir la columna con un gradiente de metanol rindiendo el eluato picos proteícos de los cuales uno de ellos inhibe la biosíntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo y corresponde a la mezcla de beetin 27 y beetin 29 o a beetin 27 en función del pico proteíco seleccionado en la etapa e.

5. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a las proteínas.

6. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para la inactivación in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

ES 2 115 520 A1

7. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para la inactivación in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de plantas.

5 8. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para la construcción de un producto para inhibir la propagación funcional de ácido ribonucleico, de utilidad en el tratamiento de enfermedades de mamíferos provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucleico (virus ARN).

10 9. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucleico, en enfermedades de plantas provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucleico (virus ARN).

15 10. Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), denominadas beetin 27 y beetin 29, de la planta *Beta vulgaris*, para la fabricación de un producto útil para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

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
X	HORNUNG, E. et al. "Cloning of a cDNA encoding a new ribosome-inactivating protein from Beta vulgaris vulgaris (mangold)". GENE. 1996. Vol. 170. Páginas 233-236 * Todo el documento, especialmente figura 3 *	1-10
A	WO-9420540-A (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 15.09.94 * Todo el documento *	1-10

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
28.04.98

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1