



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 119 676**

⑫ Número de solicitud: 9600440

⑬ Int. Cl.⁶: A01N 59/00

C07K 14/415

/(A01N 59/00

A01N 37:40

A01N 43:653)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **16.02.96**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.98**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.98

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Valladolid,
y en su Representación el Rector
Fco. Javier Alvarez Guisasola
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES**

⑲ Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;
Torre Minguela, Carlos de;
Iglesias Alvarez, Rosario y
Ferrerías Rodríguez, José Miguel**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento artificial y sus utilizaciones para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29.**

㉒ Resumen:

Procedimiento artificial y sus utilizaciones, para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29.

Se describe un procedimiento para inducir de manera artificial la aparición de las proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas que denominamos beetin 27 y beetin 29 en las hojas de las plantas de la especie *Beta vulgaris*, consistente en la aplicación tópica por aspersión de una disolución diluida en agua de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), o de ácido salicílico, o de 3-amino-1,2,4-triazol o de compuestos que como consecuencia de su degradación produzcan peróxido de hidrógeno.

Las aplicaciones más inmediatas del procedimiento son: 1) el fortalecimiento de la resistencia natural de las plantas de la especie *Beta vulgaris* a los virus vegetales; 2) la producción de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas beetin 27 y beetin 29.

ES 2 119 676 A1

DESCRIPCION

Título de la invención

Procedimiento artificial para inducir en la planta *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas "beetin 27" y "beetin 29".

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la familia de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas (antiviral RIPs: antiviral ribosome inactivating proteins), las cuales degradan el ácido ribonucleico (ARN) y como consecuencia inhiben la biosíntesis de proteínas y la replicación de los virus ARN.

De forma más específica, la presente invención se refiere a la inducción artificial de las proteínas monocatenarias beetin 27 y beetin 29, clasificadas dentro de la familia de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, en las hojas y raíces de *Beta vulgaris*, con utilidad en la terapia del cáncer, del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y de las enfermedades víricas de las plantas.

Estado de la técnica anterior a la invención

La presente invención se refiere al procedimiento de inducción de unas proteínas monocatenarias de las hojas de *Beta vulgaris* para cuyo procedimiento de aislamiento y aplicaciones se ha entregado una solicitud de patente en la Oficina de Patentes y Marcas, el día 5 de febrero de 1996, con el número P-9600419.

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 carácter antiviral, que a la espera de una definición bioquímica precisa se conocen con el nombre de proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs (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]).

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]).

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 (sólo 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 ribonucleico (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]; Jimenez y Vázquez, *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 649-672 [1985]). Las RIPs inhiben ribosomas de tipo eucariotico (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]). Sólo 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 rARN mayor del ribosoma (Endo y Tsurugi, *J. Biol. Chem.* 262,8128-8130 [1987]; Stirpe y cols. *Nucleic Acid Res.* 16,1349-1357 [1988]).

Las RIPs poseen carácter antiviral contra virus animales y virus vegetales (Stirpe y cols., *Biotechnology* 10, 405-412 [1992]; Barbieri y cols., *Biochim. Biophys. Acta* 1154,237282 [1993]; Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12208-12212 [1994]). Muy recientemente se ha encontrado que las RIPs poseen también *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]; Zarling y cols. *Nature* 347,92-95 [1990];

Olson y cols. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **7**, 1025-1030 [1991]; Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12208-12212 [1994]). Los ensayos clínicos realizados con tricosantina (GLQ223) sobre enfermos de SIDA indican que la administración por infusiones repetidas de esta proteína antiviral inactivadora de ribosomas son seguras y relativamente bien toleradas y que promueven el incremento de la población de linfocitos CD4+ y CD8+ (Kahn y cols. *Antimicrob. Agents CH.* **38**, 260-267 [1994]) y la disminución de la concentración de antígeno p24 (Byers y cols. *AIDS* **4**, 1189-1196 [1990]). Por otro lado, la empresa Genelabs Technologies Inc. ha comunicado que va a acelerar el desarrollo de la tricosantina (GLQ223) para el SIDA y que ha iniciado discusiones con otras empresas con vistas a financiar el desarrollo y comercialización de la tricosantina (GLQ223) (*AIDS Weekly* 23 Mayo 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 terapéutico para el SIDA (Rebutan, *Bulletin, Bitter Melon Therapy Group* **2**, 1-10 [1994]).

El interés enorme de las RIPs reside en que se utilizan para los siguientes objetivos: 1) 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]); 2) Construcción de Inmunotoxinas para la Terapia Experimental del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA (Till y cols. *Science* **242**, 1166-1168 [1988]; Ghetie y cols. *Bioconj Chem.* **1**, 24-31 [1990]); 3) Utilización Directa como Agente Antiviral contra el VIH para la Terapia Experimental del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (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]; Olson y cols. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **7**, 1025-1030 [1991]; Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12208-12212 [1994]; Kahn y cols. *Antimicrob. Agents CH.* **38**, 260-267 [1994]; *AIDS Weekly* 23 Mayo 1994); 4) como proteínas tóxicas para la creación de Plantas Transgénicas Resistentes a Virus y a Hongos (Lodge y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7089-7093 [1993]; Logemann y cols. *Biotechnology* **10**, 305-308 [1992]).

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 tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente. Además no todas estas toxinas protéicas poseen la misma citotoxicidad (Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6570-6574 [1991]).

Las hojas de plantas de la especie *Beta vulgaris* infectadas por los virus del amarilleo de la remolacha azucarera, recogidas en los campos de cultivo contienen unas proteínas, que denominamos beetin 27 y beetin 29 (sin publicar; solicitada la patente de procedimiento de obtención y aplicaciones por el mismo solicitante, el día 5 de Febrero de 1996 y con el número P-9600419) que inhiben fuertemente la biosíntesis de proteínas y que en base a sus propiedades estructurales y funcionales se clasifican dentro de la familia de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas (Stirpe y cols., *Biotechnology* **10**, 405-412 [1992]; Barbieri y cols., *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 237-282 [1993]). Beetin 27 y beetin 29 son las primeras proteínas de la familia de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas descritas que son inducibles por virus. Beetin 27 y beetin 29 tiene además como característica específica y especial el que se parecen extraordinariamente a varias de las proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas ensayadas con éxito frente al virus del SIDA, presentando una homología en la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal de 48, 42, 42, 55 y 53 % con las proteínas anti-VIH (anti-SIDA) tricosantina (McGrath y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2844-2848 [1989]), GAP (Lee-Huang y cols. *FEBS Letters* **291**, 139-144 [1991]), MAP 30 (Lee-Huang y cols. *FEBS Lett.* **272**, 12-18 [1990]), TAP 29 (Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6570-6574 [1991]) y PAP-S (Kung y cols. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3301-3318 [1990]) respectivamente, lo que las convierte en especialmente valiosas para la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y por lo tanto para la terapia del SIDA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento artificial para inducir, en plantas de la especie *Beta vulgaris*, la expresión de unas proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas (RIP) denominadas beetin 27 y beetin 29, que degradan el ácido ribonucleico (ARN) y por lo tanto inhiben la biosíntesis de proteínas e inhiben la replicación de los virus ARN.

El procedimiento consiste en un tratamiento de plantas de la especie *Beta vulgaris* (en el ejemplo que describimos en la presente solicitud se ha utilizado la remolacha azucarera), con una solución diluida de H₂O₂ o de ácido salicílico o de 3-amino-1,2,4-triazol. La aplicación puede ser única, pero los mejores resultados se obtienen con dos y en algunos casos tres y más aplicaciones. En la primera, se aplica la solución a las hojas de las plantas por aspersión de manera que moje las hojas. Para las aplicaciones sucesivas, los intervalos pueden ser variables pero los mejores resultados se obtienen con intervalos de 24 h. El tratamiento puede realizarse de día o de noche.

Para demostrar la inducción de las, proteínas antivirales beetin 27 y beetin 29, a partir de los cuatro días del primer tratamiento se analizan las hojas de remolacha para determinar inmunológicamente la presencia de beetin 27 y bee-

tin 29 por la técnica de "Western blot" utilizando anticuerpos policlonales de conejo frente a beetin 27, analizando la masa molecular y la actividad de beetin 27 y beetin 29 sobre el RNA medida por su efecto sobre la biosíntesis de proteínas y por su actividad N-glucosidasa del RNA. Los extractos protéicos de plantas de la especie *Beta vulgaris* tratadas de esta manera presentan una notable actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas por aparición de las proteínas beetin 27 y beetin 29.

La originalidad de la presente invención, frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior, reside en que ni la beetin 27 ni la beetin 29 se encuentran apreciablemente ni en hojas de plantas sanas de la especie *Beta vulgaris* no infectadas por patógenos de plantas, ni de plantas de la especie *Beta vulgaris* no inducidas por los productos químicos utilizados en el presente procedimiento u otros que pudieran desencadenar el denominado stress oxidativo, mientras que aparece en las hojas cuando las plantas de la especie *Beta vulgaris* se someten al tratamiento con los productos indicados en la presente solicitud.

Las proteínas expresadas como consecuencia del procedimiento de la presente invención están constituidas por una sola cadena con actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico (ARN) tanto ribosómico como genómico de virus ARN.

Las aplicaciones más importantes de beetin 27 y beetin 29 inducidas por el presente procedimiento son las propias de una proteína antiviral inactivadora de ribosomas: como inactivadora de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivadora del ácido ribonucleico, como inhibidora de la síntesis de proteínas en general, como inhibidora de la síntesis de proteínas en células y tejidos acoplada a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos o acoplada a otros transportadores específicos, y como antivirales contra virus ARN. en particular el HIV causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y los virus ARN vegetales, en particular los virus del amarillez y de la rizomanía de la remolacha azucarera.

Modo de realizar la invención

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

a) Tratamiento de las plantas de la especie *Beta vulgaris* con compuestos químicos específicos.

La semilla de la especie *Beta vulgaris* (remolacha azucarera variedad monogérmén) fue depositada aproximadamente a 3 cm de la superficie de la maceta. En el fondo de la maceta se colocó una capa fina de arena, después se rellenó la maceta con mantillo y por último se puso una capa fina de un sólido desecante (Sanicat). A estos materiales de relleno se les sometió previamente a esterilización en un autoclave. Las macetas se colocaron en una habitación sometidas a luz blanca durante 12 h y la temperatura media de crecimiento fue de 20-23 °C, manteniendo constante la humedad.

Plantas de aproximadamente 7 cm de parte aérea se dividieron en cuatro lotes. En cada uno de los lotes, las hojas se trataron por aspersión con una de las soluciones siguientes: lote 1, lote

de referencia sin tratar; lote 2, tratamiento con 5 mM de H₂O₂; lote 3, tratamiento con 5 mM de ácido salicílico; lote 4, tratamiento con 5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol. Después de 24 h se repitió el tratamiento.

Los extractos crudos de las plantas de los distintos lotes se obtuvieron después de 3 días del segundo tratamiento, aunque el período puede acortarse e incluso puede realizarse de manera más energética, simplemente incrementando la concentración de los compuestos químicos utilizados.

b) Obtención del extracto protéico crudo de plantas de la especie *Beta vulgaris*.

Los extractos crudos de hojas y de raíces de *Beta vulgaris* se obtienen como se describe a continuación. Las hojas o raíces de *Beta vulgaris* fueron trituradas y extraídas con 4 volúmenes (4 ml por gramo de hoja) de tampón fosfato monosódico 5 mM (pH 7,4) conteniendo 0.14 M de cloruro sódico, durante toda la noche con agitación a 4°C. La pasta resultante se centrifuga a 13000 rpm durante 30 min a 0°C y el sobrenadante obtenido es lo que llamamos extracto crudo.

c) 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 equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4). El fluido protéico 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 protéica 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 esta 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.

d) *Obtención de anticuerpos policlonales de conejo frente a beetin 27.*

Beetin 27 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]).

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 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.

e) *Inmunodetección de beetin 27 y beetin 29 por la técnica de "Western blot"*

La reacción inmunológica de las beetin 27 y

beetin 29 frente a los anticuerpos se estudió mediante la técnica de "Western blot".

Se disuelven por separado 2 μ g de una mezcla que contiene beetin 27 y beetin 29 (relación 2 a 1), y 70 μ g de extractos crudos de plantas control y tratadas con 5mM de H₂O₂, o de ácido salicílico o de 3-amino-1,2,4-triazol, 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 hierven las muestras durante 90 segundos y se añade a cada una azul de bromofenol hasta una concentración de 0,02%. A continuación se somete a las muestras 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]). La electroforesis 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 semiseco 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 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 y en las calles contenía los extractos de las hojas de las plantas de la especie *Beta vulgaris* tratadas como se indica en el apartado a) del Modo de Realizar la Invención. En los extractos obtenidos de hojas y raíces obtenidos de las plantas control no pudo detectarse ni beetin 27 ni beetin 29 por un procedimiento tan sensible como este.

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, coincidentes con los descritos en la solicitud de patente de 5 de Febrero de 1996 con el número P-9600419 en donde se describe la obtención de las beetin.

f) Actividad N-glucosidasa de beetin 27 sobre el ARN

La actividad N-glucosidasa 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 µl de lisado de reticulocitos de conejo o bien de S-30 de *Vicia sativa* (obtenidos tal y como se describirá más adelante) con 10 µg de beetin 27 o con 0.4 mg de extracto crudo de plantas de la especie *Beta vulgaris* tratada con 5mM de H₂O₂ (extracto que reacciona con anticuerpos de conejo anti-Beetin) 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 µg/ml de azul de bromofenol, Tris-HCl 89 mM (pH 8,3), ácido Bórico 89 mM, EDTA (etilen diamino tetraacético) 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 Salústio 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.

Tanto la beetin 27 como el extracto crudo obtenido de plantas de la especie *Beta vulgaris* sometidas al tratamiento indicado en el apartado a) del Modo de Realizar la Invención, mostraron actividad N-glucosidasa, en este caso, del 28 S ARN ribosómico de reticulocitos de conejo y del 26 S ARN ribosómico de *Vicia sativa*.

g) Inhibición de la biosíntesis de proteínas

Los estudios de inhibición de biosíntesis de proteínas se realizaron utilizando en las condiciones que se describen a continuación y como sistemas de síntesis se utilizaron lisados de reticulocitos de conejo.

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 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) du-

rante 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 μ l 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 μ l que contenía 10 μ l de lisado y Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Ditiotretol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Creatín-Fosfato 10 mM, creatín quinasa 40 μ g/ml, 20 mM de Hemina, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,04 mM, L-[³H]valina 2 μ Ci/ml y la sustancia a ensayar que se añadió en volúmenes de hasta 10 μ l por mezcla de reacción. La reacción se incubó a 30 °C durante 20 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 aminoácil-tRNAs cargados que no se han incorporado en la cadena polipeptídica) y 30 μ l de H₂O₂ del 30% (v/v) para eliminar el color de las muestras. 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).

TABLA 1

Efecto de la beetin 27 y de los extractos de plantas tratadas o no con moduladores metabólicos sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por lisados de reticulocitos de conejo.

Muestra	IC ₅₀ (ng/ml)
	Lisados de reticulocitos de conejo
Beetin 27 purificada a homogeneidad	1,15
Extracto de referencia no tratado	3200,00
Extracto de plantas tratadas con H ₂ O ₂	360,00
Extracto de plantas tratadas con á. salicílico	240,00
Extracto de plantas tratadas con 3-amino-1,2,4-triazol	249,00

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

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento artificial para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29, que consiste en realizar aplicaciones tópicas por aspersión, de una solución diluida de peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, 3-amino-1,2,4-triazol o compuestos que como consecuencia de su degradación o efecto metabólico produzcan peróxido de hidrógeno, pudiéndose llevar a cabo con luz u oscuridad.

2. Utilización del procedimiento artificial para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*,

proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29, según reivindicación 1, para desencadenar la resistencia natural de las plantas de remolacha azucarera a la infección por virus, en particular los virus ARN de la amarillez de la remolacha y de la rizomanía.

3. Utilización del procedimiento artificial para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29, según reivindicación 1, para prever y combatir la infección por virus vegetales, en particular los virus de la amarillez de la remolacha azucarera y de la rizomanía de la remolacha azucarera.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 119 676
⑫ N.º solicitud: 9600440
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A01N 59/00, C07K 14/415 // (A01N 59/00, 37:40, 43:653)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NEUENSCHWANDER, U. et al. "Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance?". THE PLANT JOURNAL. 1995. Vol. 8, n° 2, páginas 227-233	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe 31.07.98	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------