



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 119 677**

⑫ Número de solicitud: 9600441

⑤① Int. Cl.⁶: A01G 7/06

C07K 14/415

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **16.02.96**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.98**

Fecha de concesión: **29.03.99**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.99**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.99

⑦③ Titular/es: **Universidad de Valladolid**
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES

⑦② Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;**
Torre Minguela, Carlos de;
Iglesias Alvarez, Rosario y
Ferreras Rodríguez, José Miguel

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Procedimiento mecánico artificial y sus utilizaciones para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris*, proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento mecánico artificial y sus utilizaciones, para inducir en la planta *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), 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 plantas de la especie *Beta vulgaris*, (remolacha azucarera), consistente en la agresión mecánica de las hojas de las plantas de la especie *Beta vulgaris* por corte o por aplicación de un abrasivo.

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

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

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

ES 2 119 677 B1

DESCRIPCION

Título de la invención

Procedimiento mecánico artificial, para inducir en la planta *Beta vulgaris* (remolacha azucarera) 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 impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico.

De forma más específica, la presente invención se refiere a la inducción mecánica artificial en las hojas y raíces de *Beta vulgaris*, de dos proteínas monocatenarias denominadas beetin 27 y beetin 29, clasificadas dentro de la familia de proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, con potencial aplicación 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 por agresión física de unas proteínas monocatenarias de las hojas de *Beta vulgaris*.

En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes, que son de naturaleza protéica y caracter 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 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]). Sólo algunas RIPs inhiben los ribosomas bacterianos (Girbés 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 caracter antiviral contra virus animales y virus vegetales (Stirpe y cols., *Biotechnology* **10**, 405-412 [1992]; Barbieri y cols., *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 237-282 [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 caracter 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 Anti Viral 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 proteicas 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 amarillez 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 con 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.

Por otro lado la utilización de RIPs monocatenarias para la construcción de plantas transgénicas resistentes a virus (Lodge y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7089-7093 [1993]) confiere a las beetin 27 y beetin 29 una importancia especial en la lucha contra los virus vegetales cuyo material genómico es ácido ribonucleico (ARN).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere al procedimiento mecánico artificial para inducir en plantas de la especie *Beta vulgaris* la expresión de dos proteínas antivirales inactivadora de ribosomas (RIPs) denominadas beetin 27 y beetin 29 que inhiben la biosíntesis de proteínas e inactivan el ácido ribonucleico.

El procedimiento consiste en una agresión mecánica, por ejemplo, tratamiento de las hojas con un abrasivo o realización de cortes a las hojas de plantas de la especie *Beta vulgaris* (remolacha azucarera). En cualquiera de los dos casos, el tratamiento se realiza una sola vez, de día o de noche indistintamente.

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 beetin 29 por la técnica de "Western blot" utilizando anticuerpos policlonales de conejo frente a beetin 27. La originalidad de la presente invención, frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior, reside en que las beetin 27 y beetin 29 no se encuentran apreciablemente ni en hojas ni en raíces de plantas sanas de la especie *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), ni de plantas de la especie *Beta vulgaris* (remolacha azu-

carera) no inducidas por los productos químicos utilizados en el procedimiento descrito en la patente española solicitada el día 5 de Febrero de 1996 con el número P-9600419, mientras que aparece cuando las plantas de la especie *Beta vulgaris* (remolacha azucarera) se someten al procedimiento aquí descrito. Las proteínas expresadas como consecuencia del procedimiento de la presente invención están constituidas por una sola cadena con actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico.

Las aplicaciones más importantes de las beetin 27 y beetin 29 inducidas por el presente procedimiento son las propias de las proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas: como inactivadoras de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivadoras del ácido ribonucleico, como inhibidoras de la síntesis de proteínas en general, como inhibidoras de la síntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos o acopladas 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 de la remolacha azucarera 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) Agresión mecánica de las plantas de la especie *Beta vulgaris*.

La semilla de la especie *Beta vulgaris* (variedad monogérmica) 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 relleno 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 tres lotes. En cada uno de los lotes, las hojas se trataron por como se describe a continuación: lote 1, lote de referencia sin tratar; lote 2, aplicación por aspersión de un abrasivo (carborundum) sobre las hojas para posteriormente agredir suavemente su superficie; lote 3, realización de cortes en una de las hojas.

Los extractos crudos de las plantas de los distintos lotes se obtuvieron después de 4 días de la agresión, aunque el periodo puede acortarse.

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

Los extractos crudos de hojas de *Beta vulgaris* se obtienen como se describe a continuación. Las hojas de *Beta vulgaris* fueron trituradas y extraídas con 4 volúmenes (4 ml por gramo de hoja) de una solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7,4) que contenía 140 mM de cloruro de sodio, 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 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 pre-equilibrada 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 isoformas 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 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 y reaccionó fuertemente con la beetin 27 y con beetin 29.

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

Se disuelven 0.25 μ g de una mezcla de beetin 27 y beetin 29, y 80 μ g de extractos crudos de plantas control y tratadas mecánicamente como se indica en el apartado a) del Modo de Realizar la Invención, en un tampón desnaturizante 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 poli(acrilamida 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 poli(acrilamida: "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%) en una proporción de 1/2500 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 1/10000, 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 5 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 sólo en las calles que contenían 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 obtenidos de las plantas control no pudo detectarse beetin 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento mecánico artificial para inducir en la planta *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), proteínas antivirales inactivadoras de ribosomas, denominadas beetin 27 y beetin 29, que consiste en realizar una agresión mecánica por corte o por aplicación de un abrasivo sobre la superficie de las hojas, pudiéndose llevar a cabo con luz u oscuridad.

2. Utilización del procedimiento mecánico artificial para inducir en la planta *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), 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 mecánico artificial para inducir en la planta *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), 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 2 119 677
⑫ N.º solicitud: 9600441
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: A01G 7/06, C07K 14/415

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CANDELA, M.E. et al. "Soluble pathogenesis-related proteins of Capsicum annuum leaves induced by cucumber mosaic virus infection". BIOLOGIA PLANTARUM. 1993. Vol. 35, n° 4, páginas 609-615	
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