



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 125 175**

⑫ Número de solicitud: 9602245

⑬ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **07.10.96**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.99**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.99

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Valladolid, y
en su representación el Vicerrector de
Investigación R. Pedrosa Sáez
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES**

⑲ Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;
Martínez de Benito, Fernando;
Iglesias Alvarez, Rosario;
Citores González, Lucía y
Ferrerías Rodríguez, José Miguel**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta Sambucus nigra L., procedimiento para su obtención y preparación.**

㉒ Resumen:

Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., procedimiento para su obtención y su utilización.

La *nigrina b básica* presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 64000 en ausencia de reductor y 32000 para la cadena B, así como 32000 para la cadena A en presencia de reductor.

El procedimiento general para la obtención de las RIPs de *Sambucus nigra* de la presente invención comprende unas primeras operaciones de extracción, a partir de la corteza de la planta con una solución acuosa a base de cloruro sódico y fosfato monosódico, para obtener un extracto que sea capaz de inhibir la síntesis de proteínas, y purificación del mismo mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular.

La *nigrina b básica* se utiliza como inactivador del ácido ribonucleico e inhibidor de la biosíntesis de proteínas.

ES 2 125 175 A1

DESCRIPCION

Título de la invención

Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., procedimiento para su obtención y su utilización.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) las cuales impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico.

De forma más específica, la presente invención se refiere a una nueva RIP de dos cadenas obtenida de corteza de *Sambucus nigra* L. con potencial aplicación en la terapia del cáncer y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Estado de la técnica anterior a la invención

En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes, que son de naturaleza proteica y que a la espera de una definición bioquímica precisa se conocen con el nombre de proteínas inactivadoras de ribosomas (Gasperi-Campani y cols. *Biochem. J.* **186**, 439-441 [1980]; Gasperi-Campani y cols. *J. Nat. Prod.* **48**, 446-454 [1985]; Ferreras y cols. *Cell. Mol. Biol.* **35**, 89-95 [1989]; Merino y cols. *J. Exp. Bot.* **41**, 67-70 [1990]; Girbés y cols. *Cell. Mol. Biol.* **38**, 803-812 [1992]; Citores y cols. *Cell. Mol. Biol.* **39**, 885-995 [1993]; Stirpe y cols. *Bio/technol.* **10**, 405-412 [1992]; Citores y cols. *FEBS Lett.* **329**, 59-62 [1993]). Estas proteínas pueden ser de una cadena polipeptídica (de tipo 1), de dos cadenas polipeptídicas (de tipo 2) o de cuatro cadenas polipeptídicas (de tipo 4) (Citores y cols. *FEBS Lett.* **329**, 59-62 [1993]). Las de una cadena polipeptídica son N-glucosidasas del ácido ribonucleico ribosómico (Stirpe y cols. *Nucleic Acid Res.* **16**, t1349-1357 [1988]) mientras que las de dos cadenas tienen una actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico (cadena A) y una lectina (cadena B) (Stirpe y cols. *Biolotechnol.* **10**, 405-412 [1992]) que habitualmente reconoce restos de galactosa y sus derivados. Las proteínas de cuatro cadenas están formadas por dímeros del tipo A-B (equivalentes cada uno a una molécula de tipo 2 (Citores y cols. *FEBS Lett.* **329**, 59-62 [1993]). Estas proteínas (A y B) tienen una masa molecular (Mr) entre 20000 y 34000. Las cadenas A impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico (Jiménez y Vázquez, *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 649-672 [1985]; Roberts y Selitrennikoff, *Biosci. Rep.* **6**, 19-29 [1986]; Stirpe y Barbieri, *FEBS Lett.* **195**, 1-8 [1986]; Stirpe y cols. *Bio/technol.* **10**, 405-412 [1992]; Citores 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]). La inactivación consiste en la liberación de una adenina del ARN ribosómico mayor del ribosoma (Endo y Tsurugi, *J. Biol. Chem.* **262**, 8128-8130 [1987]; Stirpe y cols. *Nucleic. Acid Res.* **16**, 1349-1357 [1988]; Girbés y cols. *J. Bacteriol.* **175**, 6721-6724 [1993]; Iglesias y cols. *FEBS Lett.* **325**, 291-294 [1993]; Iglesias

y cols. *FEBS Lett.* **318**, 189-192 [1993]). El papel biológico de estas toxinas en la planta que las produce es totalmente desconocido (Roberts y Selitrennikoff *Biosci. Rep.* **6**, 19-29 [1986]). Estas proteínas son inmunológica y químicamente diferentes unas de otras aunque guardan alguna homología secuencial en los aminoácidos del extremo amino-terminal en particular cuando las toxinas pertenecen a la misma familia botánica (Montecucchi y cols. *Int. J. Peptide Protein Res.* **33**, 263-267 [1989]; Arias y cols. *Planta* **186**, 532-540 [1992]).

El enorme interés de las proteínas inactivadoras de ribosomas reside en que se utilizan en la construcción de inmunotoxinas para terapia del cáncer (Vitetta y Uhr, *Annu. Rev. Immunol.* **3**, 197-212 [1985]; Frankel y cols. *Annu. Rev. Med.* **37**, 125-142 [1986]; Koppel, *Bioconj. Chem.* **1**, 13-23 [1990]; Lord, *Plant Physiol.* **85**, 1-3 [1987]) y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Till y cols. *Science* **242**, 1166-1168 [1988]; Ghetie y cols. *Bioconj. Chem.* **1**, 24-31 [1990]; Khan y cols. *AIDS* **4**, 1197-1204 [1990]; Byers y cols. *AIDS* **4**, 1189-1196 [1990]). Muy recientemente se ha encontrado que diversos miembros de este grupo de proteínas y en particular la llamada tricosantina poseen per se carácter inactivador del virus RNA HIV-1 que es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (McGrath y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2844-2848 [1989]; Lee-Huang y cols. *FEBS Lett.* **272**, 12-18 [1990]; Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6570-6574 [1991]; Zarling y cols. *Nature* **347**, 92-95 [1990]).

Dado que las proteínas son sustancias antigénicas poderosas, para poder abordar cualquier tipo de terapia con ellas es necesario disponer de una batería de dichas toxinas lo más amplia posible con el objeto de seleccionar la menos inmunorreactiva por un lado y de poder substituir la toxina o la parte tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente por otro. Además no todas estas toxinas proteicas poseen la misma citotoxicidad (Lee-Huang y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6570-6574 [1991]).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a una nueva proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de *Sambucus nigra* L., a un procedimiento para su preparación y a sus aplicaciones.

La mencionada proteína es una nueva proteína vegetal que, en base a sus propiedades químico-físicas y bioquímicas, se clasifica en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas de tipo dos, o de dos cadenas polipeptídicas, que en contraste con la ricina no posee actividad tóxica sobre ratones ni células HeLa en cultivo. Además, y en contraste con la ricina y la nigrina b (Girbés y cols. *Plant Mol. Biol.* **22**, 1181-1186 [1993]), no aglutina los eritrocitos.

La originalidad de la presente invención frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior reside en la búsqueda de nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo 2 en corteza de *Sambucus nigra* L., en cuya corteza ya se ha descrito la existencia de una proteína inactivadora

de ribosomas de tipo 2, llamada nigrina b (Girbés y cols. *Plant Mol.Biol.* 22, 1181-1186 [1993]), que si aglutina a los eritrocitos.

La nueva proteína de la presente invención está constituida por dos cadenas, al menos una de ellas con actividad N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico, en especial con actividad de N-glucosidasa del ácido ribonucleico 28 S de ribosomas de mamíferos; caracterizándose dicha nueva proteína porque 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.

La proteína de la presente invención así definida es capaz de interaccionar catalíticamente con el ácido ribonucleico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. Su poder inhibidor es muy superior a los inhibidores antibióticos no proteicos de la biosíntesis de proteínas (Pestka, S. (1977) Inhibitors of protein synthesis. En: *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*. Ed. H. Weissbach y S. Pestka. Academic Press. pp. 468-553).

Adicionalmente, dicha proteína presenta actividad como N-glucosidasa del ácido ribonucleico ribosómico ARN-r.

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

Las aplicaciones más importantes de la RIP de tipo 2 de la presente invención son: como inactivador *in vitro* de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivador *in vitro* del ácido ribonucleico de mamíferos, como inhibidor de la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*, como inhibidor de la síntesis de proteínas en células y tejidos, acoplada a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos y como antiviral contra virus ARN, en particular el HIV causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

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

Por lo tanto, la RIP de tipo 2 de la presente invención es potencialmente útil para la terapia de enfermedades tales como cáncer y SIDA.

El procedimiento general para la obtención de la RIP de dos cadenas a partir de corteza de *Sambucus nigra* de la presente invención comprende

las siguientes operaciones:

- a) Obtención del extracto proteico de corteza de dicha planta con cloruro sódico y fosfato monosódico.
- b) Acidificación del extracto obtenido y cromatografía de intercambio iónico.
- c) Diálisis y desarrollo de una cromatografía de intercambio iónico de la proteína obtenida en la etapa anterior con un gradiente de sal.
- d) Cromatografía de exclusión molecular de los picos de proteína de la etapa anterior.
- e) Diálisis y cromatografía de intercambio iónico de los picos que presentan inhibición de la síntesis de proteínas de la etapa anterior.

Modos de realizar la invención

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

Este ejemplo se desglosa en 12 partes:

a) obtención de nigrina b básica a partir de corteza de *Sambucus nigra*; b) determinación de la masa molecular aparente; c) presencia de cadenas glucídicas en nigrina b básica; d) determinación de la estructura y masa molecular real por espectroscopía de masas de nigrina b básica; e) actividad N-glucosidasa sobre el ARN; f) inhibición de la biosíntesis de proteínas; g) actividad topoisomerasa sobre ADN; h) actividad N-glucosidasa sobre ARN viral; i) relación inmunológica; j) actividad aglutinante sobre eritrocitos humanos; k) construcción del conjugado con transferrina humana; l) toxicidad.

a) Obtención de nigrina b básica

250 g de corteza de *Sambucus nigra* se extrajeron con 2 l de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,5) a 4°C durante 12 h. La pasta resultante se filtró a través de malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se acidificó a pH 4 con ácido acético glacial y los sólidos que aparecieron se eliminaron por centrifugación a 12400 x g durante 45 min a 0°C. El fluido sobrenadante (aproximadamente 1840 ml) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 8,2 cm). La solución de equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido proteico acidificado se aplicó a la columna. La parte no retenida a la columna se desechó. A continuación la columna se lavó con solución de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo. A continuación se lavó la columna con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 6,66). Los dos lavados se desecharon. Por último la columna se eluyó con solución 1 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66). Todo el eluato que contiene la proteína se recogió y se dializó a 4°C durante 12 h frente a 25 l de una solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 6,66). Esta preparación proteica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en gradiente

de fuerza iónica en CM-Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 2,6 cm preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 6,66). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 500 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) y 500 ml de solución 300 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 ml por min y se recogieron fracciones de 11,9 ml. Se recogieron 3 grupos de fracciones capaces de inhibir síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo: I (fracciones 4 a 14 con 262 ml aproximadamente), II (fracciones 15 a 27 con 310 ml aproximadamente) y III (fracciones 37 a 49 con 310 ml aproximadamente). Las fracciones de cada grupo se juntaron. El grupo II se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75 HiLoad (columna de 2,6 x 60 cm) equilibrada con una solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66) conteniendo 0,4 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 2 ml por min y se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones 14 a 22 que mostraron actividad inhibidora se juntaron y se dializaron frente a 4 l de agua (3 veces) y se liofilizaron. Se obtuvieron 228,5 mg que en lotes de 3,5 mg se resuspendieron en una solución 5mM de fosfato monosódico (pH 6,66). Esta solución se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico en gradiente de fuerza iónica a través de Mono S acoplada a FPLC (columna de 1 ml preequilibrada con la misma solución). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 30 ml de solución de 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,75 M de cloruro de sodio, 20 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,15 M de cloruro sódico y 10 ml de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 6,66), 0,3 M de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 1 ml por min y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Las fracciones 13 a 17 que inhibieron síntesis de proteínas en lisado de reticulocito de conejo se juntaron y se dializaron 3 veces frente a 4 litros de agua y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la proteína nigrina b básica.

b) *Determinación de la masa molecular aparente de la nigrina b básica.*

La masa molecular relativa se determinó por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685, [1970]) con un aparato Mighty-Small II de Hoefer (San Francisco, Cal., USA) y una fuente de alimentación Promax modelo FAC-400. El procedimiento esencialmente es como se describe a continuación. Se disuelven entre 1-10 µg de la muestra 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%. 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. 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 la muestra se colocan en una de las calles varios marcadores de masa molecular conocida: Albúmina de suero bovino de 68000 Daltons, L-Glutamato Deshidrogenasa de 54000, Alcohol Deshidrogenasa de 37000, Anhidrasa Carbónica de 29000, e Inhibidor de Tripsina 20100. La Mr se determina por interpolación.

Los valores de Mr obtenidos en ausencia de reductor fueron 64000 Daltons para la nigrina b básica. Nigrina b básica presenta una cadena B y una cadena A unidas por puentes disulfuro que en presencia de reductor tienen una Mr de 32000 Daltons para la cadena B, y de 32000 para la cadena A.

c) *Presencia de cadenas glucídicas en la nigrina b básica.*

Para detectar la existencia de grupos glucídicos en las proteínas estudiadas se utilizó "el Glycan Detection Kit" de Boehringer Mannheim, (Mannheim, Alemania). Se disolvieron 1-10 µg de muestra en 20 µl de tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,5) y se añadieron 10 µl de una disolución de metaperiodato sódico 6,67 mg.ml⁻¹ para oxidar los grupos hidroxilo de los azúcares a grupos aldehído. A continuación se incubó durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente el exceso de metaperiodato sódico se destruyó añadiendo 10 µl de disulfito sódico 15 mg.ml⁻¹. Se dejó actuar a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se añadieron 5 µl de una solución de DIG-succinil-ε-acido amidocaproico hidrazida, con lo cual se une el grupo DIG (digoxigenina) a los aldehídos de los azúcares gracias al grupo hidrazido. Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Por último se añadieron 15 µl de tampón (Tris-HCl 300 mM (pH 8,8), 8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-ME), se hirvió la mezcla a 100°C durante 2 min y se añadieron 2 µl de azul de bromofenol 0,5 % (p/v). Las muestras se sometieron a electroforesis como se indica anteriormente. Posteriormente la proteína se transfirió 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. La muestra se separa previamente por electroforesis como se describe anteriormente, pero en vez de ser teñida se embeben durante 15 min en un tampón de transferencia compuesto por Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM, SDS 1,3 mM y 10% de metanol. El lecho de papel consiste en tres trozos de papel Whatman 3M (Whatman international

Ltd., Maidstone, England) del mismo tamaño que el gel y otros tres dos milímetros más grandes por cada lado, también embebidos en el mismo tampón. La membrana de nitrocelulosa Immobilon de Millipore a la que serán transferida la proteína, 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 membrana 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 NBT (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 patrón se utilizó la glucoproteína transferrina (76000 daltons).

Nigrina b básica posee cadenas glucídicas reactivas con el sistema de detección de glicanos de Boehringer.

d) *Determinación de la estructura y masa molecular real por espectroscopía de masas de la nigrina b básica*

La masa molecular real y el número de cadenas presentes en la nigrina b básica se determinó por espectroscopía de masas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en ausencia y presencia de reductor de acuerdo con el protocolo siguiente:

1 mg de nigrina b básica se resuspende en un volumen total de 0,5 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 0,1 % en presencia o ausencia de 40 mg/ml de Ditiotreitól. Ambas muestras se incuban en baño a 37°C durante 30 minutos. 4 μl de cada muestra anterior se mezclan por separado con 40 μl de una disolución saturada de ácido sinapínico conteniendo un 30% de acetonitrilo y un 0,1% de TFA. 1 μl de esta última disolución se deposita en el portamuestras del aparato, se deja secar completamente y se somete a energía radiante por laser UV en 70 pulsos de 0,08 μs de duración, frecuencia de pulso de 6 Hz y un potencial de 30,0 kV registrando el valor medio obtenido. El ensayo para cada muestra en presencia o ausencia de reductor se realiza por quintuplicado.

De esta forma se obtiene una masa molecular para la nigrina b básica sin reducir de 63.469

u.m.a.. En presencia de reductor se detectan dos cadenas diferentes de masas 31.335 y 32.239 u.m.a. respectivamente. (Anexo 1)

e) *Actividad N-glucosidasa sobre el ARN*

La actividad N-glucosidasa de la nigrina b básica 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 nigrina b básica. La liberación del fragmento de ARN se determinó incubando 100 μl de lisado de reticulocitos de conejo (obtenido tal y como se describirá más adelante) con 10 μg de nigrina b básica en una solución que contenía [MgAc_2 1 mM, ditiotreitól 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 H_2O . 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 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 ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) durante 30 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm. La nigrina b básica muestra actividad N-glucosidasa ya que libera el fragmento de RNA característico de las RIPs después del tratamiento con anilina ácida.

f) *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 lisado de reticulocitos de conejo, S-30 de hígado de rata y S-30 obtenidos de germen de distintas especies vegetales (trigo, *Vicia sativa* L. y *Cucumis melo* L.).

Para obtener un lisado de reticulocitos de conejo se parte de 4 conejos de entre 3-4 kg y se les somete a un tratamiento previo con fenilhidrazina, sustancia que impide la completa maduración de los reticulocitos. La fenilhidrazina es preparada fresca de la siguiente forma: se pesan 0,25 g y se disuelven en 7 ml de tampón fosfato sódico 5 mM (pH 7,4), conteniendo 0,14 M de

NaCl. A continuación se vuelve a ajustar el pH con NaOH 0,1 N hasta pH 7-7,5 y finalmente se enrasa a 10 ml con agua tipo I. Tras filtrarse a través de una membrana de 0,22 μm se guarda en frasco de vidrio tapado en total oscuridad.

La fenilhidrazina se inyecta subcutáneamente en el lomo de los animales, 1 ml de la solución por conejo durante 5 días seguidos. Tras dos días de descanso se anestesian con 2 ml de pentotal sódico 2 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 una bomba 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, Ditiotreititol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 1 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Creatín-Fosfato 10 mM, creatín quinasa 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 mM de Hemina, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,04 mM y L-[³H]valina 2 $\mu\text{Ci/ml}$. 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) perfundiéndolo el hígado con tampón de extracción para hígado 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 ve-

ces con el tampón de extracción de hígado, posteriormente se trocea con tijeras y se homogeneiza manualmente durante 5 min manteniendo el homogeneizador en un baño de agua/hielo. Durante el proceso se añade un volumen del tampón correspondiente, equivalente a cinco/cuartos el peso en gramos. 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 de 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 el 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 guardan a -80°C hasta su uso. La reacción de síntesis de proteínas se llevó a cabo en mezclas de un volumen final de 25 μl que contenía 10 μl de S-30 de hígado y Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 8 mM, NH₄Cl 100 mM, Ditiotreititol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 2 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 1 mM, CTP (Citidín 5' Trifosfato) 0,2 mM, Fosfoenolpiruvato 2 mM, Piruvato quinasa 40 $\mu\text{g/ml}$, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,1 mM y L-[³H]valina 3 $\mu\text{Ci/ml}$. La reacción se incubó a 37 °C durante 60 min. La reacción de síntesis de proteínas se para con la adición de 500 μl de KOH 0,1 N (utilizado para degradar las moléculas de los aminoacil-tRNAs cargados que no se han incorporado en la cadena polipeptídica). Después de 15 min se añaden 500 μl de TCA al 20% (p/v), (para que precipiten las cadenas polipeptídicas formadas).

Los precipitados proteicos son recogidos sobre filtros de fibra de vidrio (GF/A, Whatman) de 2,5 cm de diámetro, cada tubo de reacción es lavado 2 veces con 1 ml de TCA al 5% y luego el filtro con 2 ml de etanol absoluto del 96%. Posteriormente los filtros son secados a 120°C durante 10 min y colocados en el interior de viales de plástico a los cuales se les añade 2 ml de líquido de centelleo (Ready Safe de Beckman).

El S-30 de gérmenes vegetales se hizo según Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]; Arias y cols. Phytochemistry 30, 3185-3187 [1991]. Se esterilizan las semillas con lejía comercial diluida (una parte de lejía y tres de agua corriente estéril) y se aclaran abundantemente con agua corriente estéril. Una vez aclaradas las semillas se depositan en el fondo de un tarro de vidrio (previamente esterilizado en autoclave) sobre cuatro capas de papel de filtro humedecido (esterilizado en estufa a 150°C). Todo este proceso se realiza dentro de una cabina de flujo laminar horizontal modelo Micro-H (Telstar S.A., Tarrasa). La germinación se lleva a cabo a 20°C en oscuridad y durante 4-5 días, al cabo de los cuales resultan gérmenes de aproximadamente 1 cm, de color blanco debido a la ausencia de clorofila.

Cuando el germen alcanza el tamaño deseado se separa de la semilla mediante pinzas de cirugía y es depositado en un vaso de precipitados enfriado a 0°C. Este proceso y todos los siguen-

tes 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 eluto 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 µl que contenía 15 µl 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, Ditiotretitol 5 mM, ATP (Adenosín 5' Trifosfato) 4 mM, GTP (Guanosín 5' Trifosfato) 1 mM, Creatín-Fosfato 8 mM, creatín quinasa 60 µg/ml, t-RNA de germen de trigo 0,4 mg/ml, todos los aminoácidos proteicos menos L-valina 0,1 mM y L-[³H]valina 7,4 µCi/ml. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 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 100 µg BSA para facilitar la precipitación de proteínas. 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). Los resultados se indican en la tabla 1. (Anexo 2)

TABLA 1

Efecto de nigrina b básica sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml) nigrina b básica
Lisados de reticulocitos de conejo	0.018
hígado de rata	3.6
germen de trigo	>50000
germen de Vicia sativa L.	>50000
germen de Cucumis sativus L.	>50000

El 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.

g) *Actividad topoisomerasa sobre ADN*

La relajación de los ADN de los plásmidos pBluescript II KS, pUC19 y pGEM-4Z se lleva a cabo incubando, en un volumen final de 10 µl, 200 ng del ADN superenrollado y 10 µg de la toxina en tampón Tris-HCl 10 mM (pH=7,9) conteniendo NaCl 50 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM y 15 µg/ml de BSA durante 2 horas a 30 °C. Posteriormente las muestras se analizan en electroforesis en geles de agarosa del 0,8% en tampón Tris-HCl 89 mM (pH=8,3), ácido bórico 89 mM y EDTA 2,5 mM a 50 V hasta que el frente recorre 3/4 de gel. Los geles se tiñen con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos y se visualizan en lámpara UV a 312 nm.

La nigrina b básica muestra actividad topoisomerasa sobre los tres plásmidos ensayados, esto es pasa el ADN superenrollado a circular relajado y a lineal.

h) *Actividad N-glucosidasa sobre el ARN viral*

La degradación del ARN viral del TMV como consecuencia de la acción de la anilina ácida sobre ARN multidepurinado por la nigrina b básica se determina incubando 5 µg del ARN con una concentración final de 0,24 ó 0,024 mg/ml de nigrina b básica en solución (NH₄Cl 100 mM, AcNa 20 mM (pH=4)), durante 1 hora a 37°C. El tratamiento con anilina consiste en la adición de un volumen de anilina 2M (pH=4,5) seguido de dos extracciones con un volumen de éter cada vez, precipitación del ARN con 2,5 volúmenes de etanol y AcNa 0,3 M (pH=5,2) durante toda la noche a -80°C. El análisis electroforético se realiza de acuerdo con lo expuesto en el apartado e) con una cantidad de 0,5 µg de ARN por pocillo.

La nigrina b básica multidepurina al ARN viral y como consecuencia de ello, tras dicha acción, el tratamiento del ARN con anilina ácida provoca la degradación del ARN viral de TMV a ambas

concentraciones.

i) *Relación inmunológica*

La nigrina b (proteína inactivadora de ribosomas de tipo 2 aislada de corteza de *Sambucus nigra*), ebulina 1 y ebulitina 1 α (RIP de tipo 2 y tipo 1 respectivamente obtenidas de hojas de *Sambucus ebulus*) poseen 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]).

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

Se utilizó un procedimiento equivalente para la obtención de anticuerpos policlonales de conejo frente a la nigrina b básica (proteína inactivadora de ribosomas de tipo 2 de corteza de *Sambucus nigra*).

El ensayo de la relación inmunológica se llevó a cabo en paralelo mediante técnicas de Inmuno-detección en Western Blot y E.L.I.S.A. El procedimiento seguido en el primer caso fue el siguiente:

2,5 μ g de cada proteína (nigrina b, ebulina 1, ebulitina 1 α y nigrina b básica) se sometieron a electroforesis y transferencia a membrana de Imobilon P (Millipore) según el procedimiento descrito anteriormente. El proceso se realizó sobre 3 membranas y cada una de ellas se sometió a reacción con un anticuerpo diferente.

Las membranas transferidas se incubaron durante 2 horas a 37°C con 20 ml por membrana de una solución del 15% (p/v) de leche desnatada disuelta en TBS (0,9 % (p/v) de NaCl, 20 mM Tris-HCl PH=7,4) Posteriormente se lavaron 3 veces con 20 ml por membrana de TBS conteniendo 0.1% (p/v) de BSA (Albúmina de suero bovino) desechando el líquido después de cada lavado. Tras el lavado, las membranas se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente en 10 ml por membrana de una solución de TBS conteniendo 1% (p/v) de BSA y 0.3 μ g/ml del anticuerpo policlonal específico (anticuerpo frente a nigrina b, ebulitina 1 α y ebulina 1 respectivamente). Tras la incubación las membranas se lavaron 3 veces como se describe anteriormente y posteriormente se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con 10 ml por membrana de una solución de TBS conteniendo 1% (p/v) de BSA y 0,3 μ g/ml de anticuerpo policlonal de cabra frente a conejo (SIGMA). Después, las membranas se lavaron 3 veces como se describe anteriormente y cada una se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con una solución 1:1 de Fast red (SIGMA)

en Tris-HCl 0,2 M pH=8 : Naphtol (SIGMA) en agua siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras desarrollar el color, las membranas se lavaron con agua y se secaron.

Ambas cadenas A y B de la nigrina b básica reaccionaron fuertemente con los anticuerpos frente a ebulitina 1 α y frente a la ebulina 1 y de forma más débil con el anticuerpo frente a nigrina b.

Para el ensayo de la relación inmunológica mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunospecific Assay) básicamente se siguió el procedimiento descrito por Pérez-Maceda y cols. (1991) y Clark y cols. (1988) pero con alguna modificación. Se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno con el fondo plano. Tanto las muestras a determinar (nigrina b básica) como la proteína utilizada en la recta patrón (nigrina b, ebulina 1 o ebulitina 1 α) se diluyeron en tampón carbonato/bicarbonato 0.1 M (pH 9.5) y se colocaron en los pocillos de forma que la concentración total de antígeno por pocillo fuera de 200 ng y el volumen total de 200 μ l, completando con BSA disuelto en el mismo tampón. La recta patrón consistió en concentraciones crecientes de la proteína patrón abarcando desde 1 ng hasta 20 ng y completando hasta 200 ng de proteína con BSA.

Para la nigrina b básica se añadieron las mismas cantidades crecientes desde 1 ng hasta 20 ng y completando hasta 200 ng de proteína con BSA de la misma manera que para nigrina b, ebulina 1 y ebulitina 1 α con objeto de comparar las rectas que obtengamos. El blanco fue 200 ng de BSA. Una vez añadidos los antígenos se dejaron las placas toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se desechó el líquido sobrenadante y se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de PBS-T pH 7,4 (Na₂HPO₄·2H₂O 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y Tween 20 0,05% (v/v)). Posteriormente se añadieron 200 μ l de PBS-BSA (idéntico al anterior salvo que el Tween 20 fue sustituido por BSA 3%). Se incubó durante 30 min a 37°C, tras lo cual se repetía el proceso de lavado con PBS-T. Seguidamente se añadieron 200 μ l del anticuerpo específico anti-proteína patrón diluido en PBS-T y se incubó 1 h a 37°C. Después se lavó como antes se indicó y se añadieron 200 μ l del anticuerpo anti-conejo (anticuerpo de ratón dirigido contra anticuerpos de conejo) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, y diluido en proporción 1/3000 en PBS-T, tras una incubación de 1h a 37°C se volvieron a lavar los pocillos con PBS-T. Por último se añadieron 200 μ l de sustrato p-Nitrofenilfosfato (pNPP) disuelto a una concentración de 1 mg.ml⁻¹ en glicina 0,1 M (pH=10,4) conteniendo MgCl₂ 1 mM y ZnCl₂ 1 mM, el desarrollo del color amarillo se realizó durante 1 h a 37°C. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector automático Pasteur diagnostics modelo LP400. De igual forma se operó para estudiar las relaciones frente a los anticuerpos anti-nigrina b (dilución 1/3000), anti-ebulina 1 completa (dilución 1/3000), anti-cadena A de ebulina 1 (dilución 1/1000) y anti-ebulitina 1 α (dilución 1/1000) empleando en cada caso anticuerpos obtenidos frente a ellas. Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado.

La reacción inmunológica de las nigrina b básica frente a los anticuerpos fue la siguiente: a) reacción aproximada de un 50% frente a anticuerpos anti-ebulina l completa; b) reacción mucho mayor del 50 % frente a anticuerpos anti-cadena A de ebulina l; c) reacción prácticamente nula frente a anticuerpos anti-nigrina b completa; d) reacción próxima al 200% en términos molares frente a anticuerpos anti- ebulitina l α , lo que indica que estos anticuerpos reconocen las dos cadenas de la nigrina b básica. (Anexo 3)

j) *Actividad hemaglutinante de eritrocitos*

La actividad hemaglutinante de eritrocitos de la nigrina b básica se determinó con el siguiente ensayo:

Se preparó una solución de sangre en 0,14 M de cloruro de sodio, 5 mM de fosfato (pH=7,5) con un 1% de eritrocitos y se añadieron 50 μ l a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. A su vez se añadieron 50 μ l de la solución de nigrina b básica a distintas concentraciones en el mismo tampón.

La nigrina b básica no produce aglutinación de sangre humana del grupo A, Rh+ a la concentración de 420 μ g/ml.

k) *Construcción del conjugado nigrina b básica-transferrina*

200 mg de holotransferrina humana se resuspendieron en 2 ml de tampón borato (pH=9) y se dializaron durante toda la noche frente a 4 l del mismo tampón para retirar las sales conservantes. Posteriormente se derivatizaron con 3,5 moles de 3-(2-piridilditio)propionil N-hidroxisuccinimida éster (SPDP) por mol transferrina incubando la mezcla a 30 °C durante 60 minutos. El exceso de SPDP se retiró por cromatografía de exclusión a través de una columna de Sephadex G-25 (1,5 x 15,5 cm) equilibrada con tampón acetato sódico 0,1 M (pH=4.5) conteniendo 0,1 M de NaCl y 1 mM de EDTA.

En paralelo, 15 mg de nigrina b básica se resuspendieron en 1,5 ml de fosfato monosódico 10 mM (pH=7,5) y se derivatizaron con 2 moles de 3-Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS) por mol de nigrina b básica incubando durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los restos sulfhidrilo de la transferrina derivatizada se redujeron con ditioneitol 50 mM incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de DTT se retiró por cromatografía de exclusión a través de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato monosódico 0,1 M (pH=7,5) conteniendo 0,1 M de NaCl y 1 mM de EDTA, el pico de transferrina se recogió sobre la nigrina b básica derivatizada. La conjugación de ambas proteínas se llevó a cabo por incubación

durante toda la noche a 4 °C con agitación.

Para retirar el conjugado con estequiometría 1:1 del resto de proteína, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión molecular a través de una columna Superdex S-200 (2,6 x 60 cm) equilibrada y eluida con tampón fosfato monosódico 5 mm (pH=7,5) conteniendo 0,14 M de NaCl. La elución se lleva a cabo a un flujo de 2 ml/minuto y se recogen fracciones de 5 ml. Las fracciones 16 a 19 correspondientes a la zona de pesos con estequiometría 1:1 se recogen y almacenan a -80°C.

l) *Toxicidad*

La toxicidad se determinó inyectando la proteína a ratones. Se disolvieron 1250 μ g de proteína en 0,125 ml de una solución 5 mm fosfato monosódico (pH=7,5) conteniendo 0,14 M NaCl. La proteína se inyectó intraperitonealmente en ratones de 32 gramos de peso y se observó el número de supervivientes al cabo de 10 días. En todos los casos la supervivencia fue del 100%, esto es, la nigrina b básica no es tóxica.

Por otra parte, se determinó la toxicidad en células HeLa mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina G y 100 μ g/ml de estreptomycin. La toxicidad se determinó por inhibición de la síntesis de proteínas en estas células estimada por incorporación de aminoácidos marcados (metionina y cisteína) con 35 S. El procedimiento seguido fue el siguiente:

0.5 x 10⁵ células/ pocillo se incubaron en placas de 24 pocillos durante 18 horas con la toxina en medio sin suero. Tras lavar las células con solución de Hank, se incubaron con 0,5 ml por pocillo de medio RPMI 1640 conteniendo 1 μ Ci/ml de L- 35 S Promix durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. La reacción se para por adición de 2 ml de TCA 5%, precipitación del material proteico y solubilización posterior con 0.5 ml de KOH 0.1 N. La determinación de la radiactividad incorporada se realizó de acuerdo con lo espuesto en el apartado f).

La nigrina b básica, a concentraciones de 1 mg/ml, no muestra actividad inhibidora de síntesis de proteínas en células HeLa intactas cultivadas.

Los conjugados contruidos con nigrina b básica y transferrina se ensayaron en síntesis de proteínas llevada a cabo por células HeLa, tal y cual se ha descrito para los ensayos de nigrina b básica. El valor de IC₅₀, resultó ser de alrededor de 320 ng/ml. Esto indica que la conjugación con la transferrina confiere toxicidad a la nigrina b básica.

REIVINDICACIONES

1. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., **caracterizada** porque presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 64000 en ausencia de reductor y 32000 para la cadena B, así como 32000 para la cadena A en presencia de reductor.

2. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha proteína es capaz de interactuar con el ácido ribonucleico y provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares.

3. Proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los conjugados construidos con nigrina b básica y transferrina tienen toxicidad.

4. Procedimiento para la obtención de proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., **caracterizado** porque comprende unas primeras operaciones de extracción, a partir de la corteza de la planta con una solución acuosa a base de cloruro sódico y fosfato monosódico, para obtener un extracto que sea capaz de inhibir la síntesis de proteínas, y purificación del mismo mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular.

5. Procedimiento para la obtención de proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., según reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: a- extraer la corteza de *Sambucus nigra* previamente molida con una solución acuosa de cloruro de sodio y fosfato monosódico. b- filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado. c- acidificar el fluido sobrenadante y aplicarlo a una columna para cromatografía de intercambio iónico, equilibrada con un tampón de acetato sódico y lavar la columna primero con tampón acetato y después con tampón fosfato. d- eluir la columna lavada con tampón fosfato conteniendo cloruro de sodio y recoger la fracción

proteínica. e- dializar la fracción proteínica y aplicarla a una columna de intercambio iónico equilibrada con tampón fosfato, eluir la columna con un gradiente de sal rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo. f- aplicar el segundo de los picos proteicos que presenta inhibición de la biosíntesis de proteínas a una columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con cloruro de sodio y fosfato monosódico, rindiendo el eluato picos proteicos inhibidores de la biosíntesis de proteínas. g- dializar las fracciones correspondientes al segundo pico de inhibición y aplicarlos a una columna de intercambio iónico Mono S, eluir la columna con un gradiente de sal, rindiendo el eluato picos proteicos de los cuales el segundo inhibe la biosíntesis de proteínas y corresponde a la nigrina b básica.

6. Utilización de la proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la proteína.

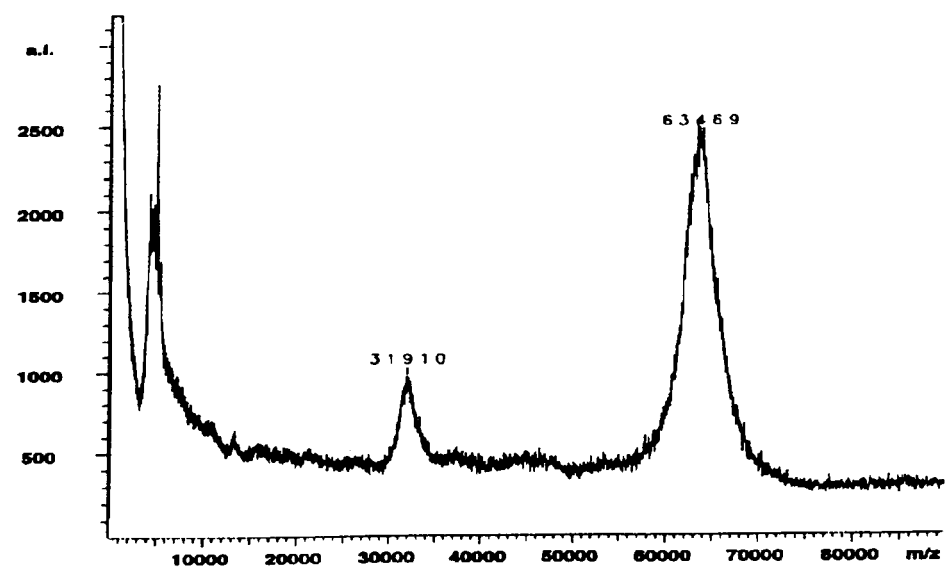
7. Utilización de la proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., para la inactivación in vitro del ácido ribonucleico ribosómico de mamíferos.

8. Utilización de la proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., para la construcción de conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

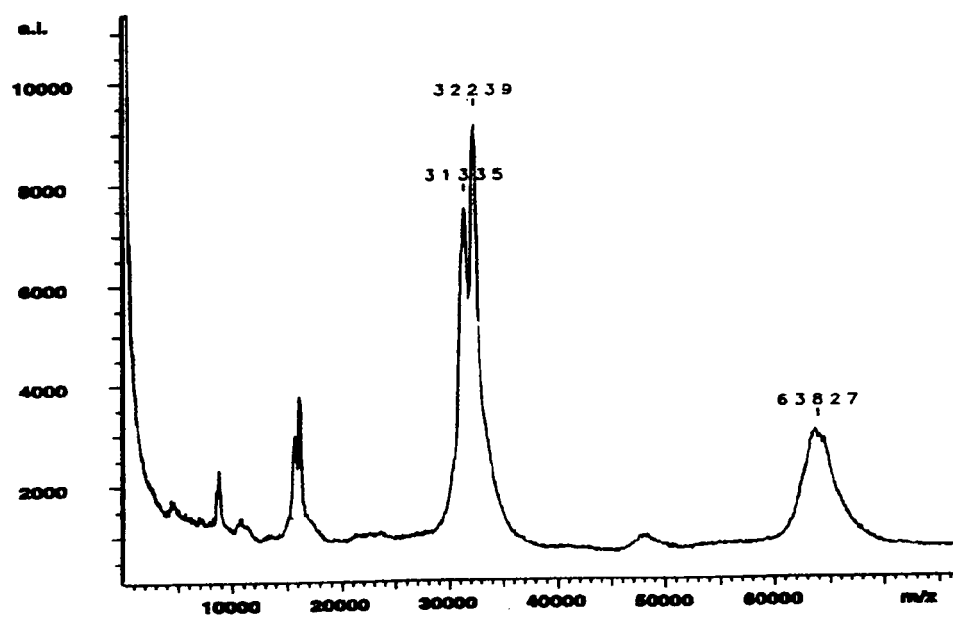
9. Utilización de la proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., para la construcción de conjugados destinados a inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucleico, en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucleico (virus ARN).

10. Utilización de la proteína inactivadora de ribosomas, denominada nigrina b básica, de la planta *Sambucus nigra* L., para la construcción de conjugados con otras especies químicas para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

Anexo 1. Espectroscopía de masas

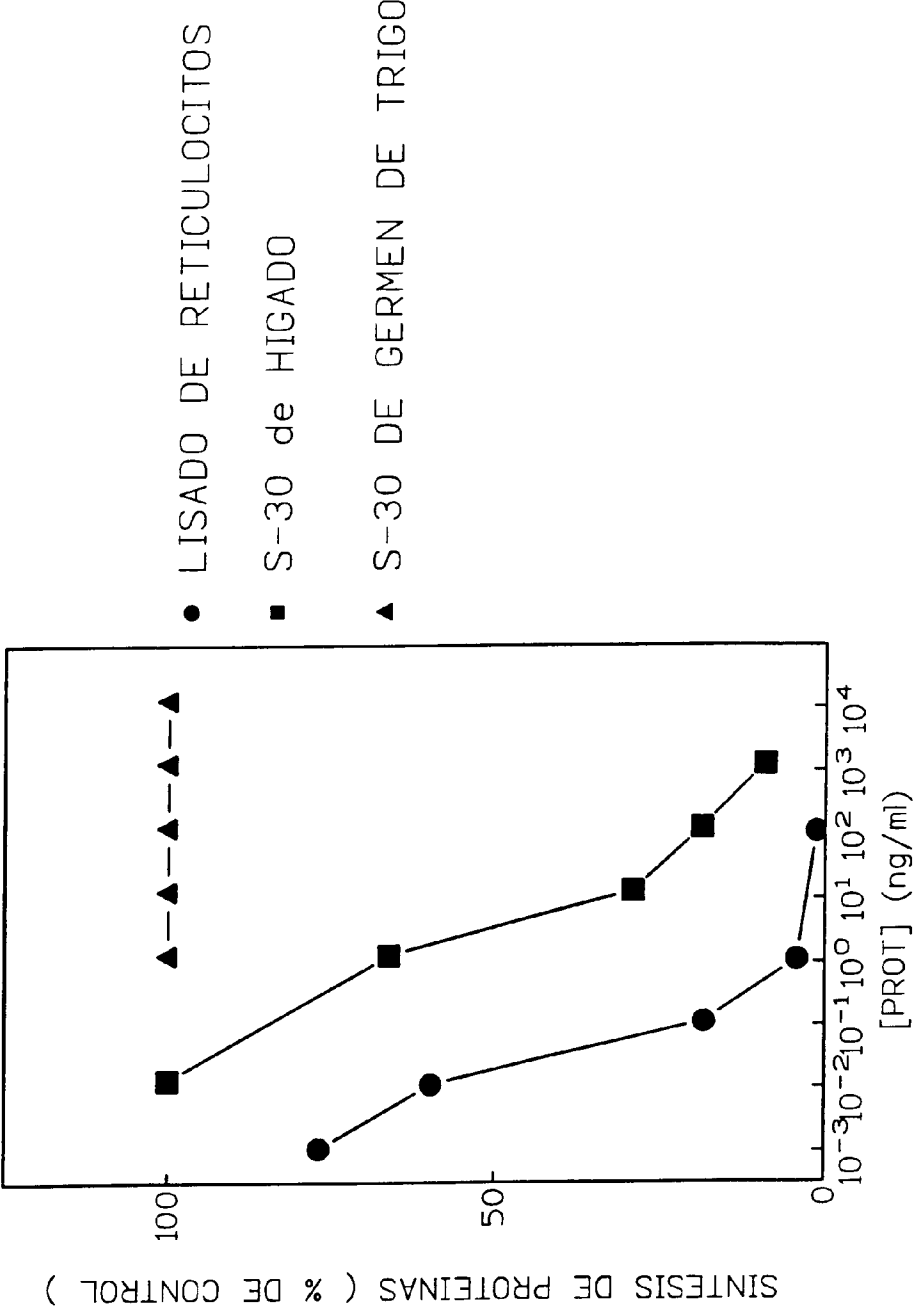


nigrina b básica en ausencia de reductor

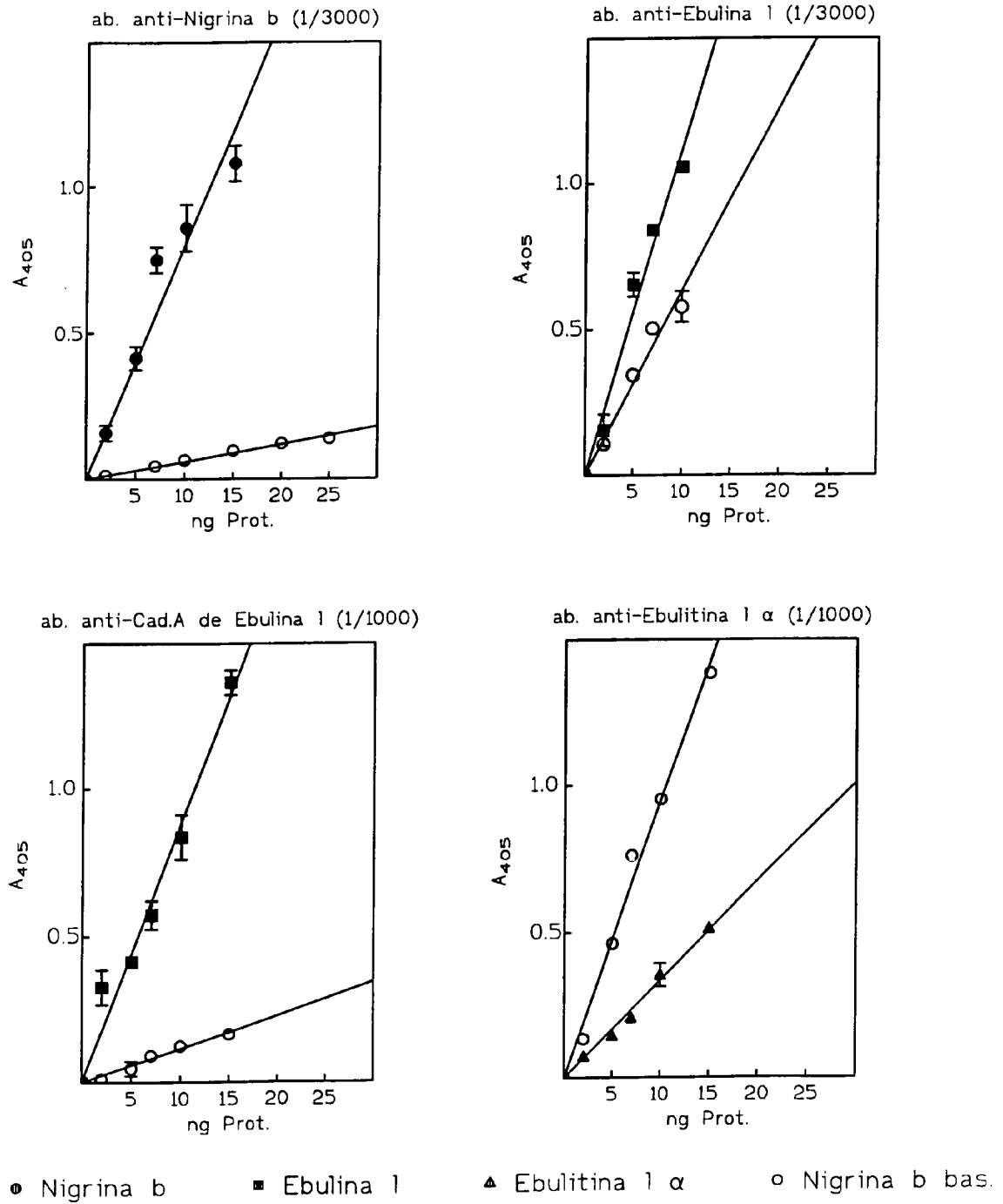


nigrina b básica en presencia de DTT

ANEXO 2. CURVAS DE INHIBICION DE SINTESIS DE PROTEINAS



ANEXO 3. E.L.I.S.A.





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 125 175
⑫ N.º solicitud: 9602245
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9420540 A1 (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 15.09.1994, ejemplos 1,2; reivindicaciones.	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 30.11.98	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: 2 125 175 A1

⑫ Número de solicitud: 9602245

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

C07K 14/415

A61K 38/46

CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE

Pág./INID	Errata	Corrección
1, ⑤	... y preparación.	... y su utilización.