



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 239 876**

② Número de solicitud: 200301318

⑤ Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 38/56 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.05.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2005**

Fecha de la concesión: **03.05.2006**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Valladolid
Plaza de Santa Cruz, 5 Bajo
47002 Valladolid, ES**

⑱ Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;
Barruso Magdaleno, María Begoña;
Antolín Martín, María del Pilar;
Arias Vallejo, Francisco Javier y
Muñoz Martínez, Raquel**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Proteína musarmina 4 recombinante, gen que la codifica, procedimiento de obtención y aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Proteína musarmina 4 recombinante, gen que la codifica, procedimiento de obtención y aplicaciones.

Proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante, gen que la codifica, procedimiento de expresión en sistema bacteriano, purificación y aplicaciones de dicha proteína de utilidad en la terapia dirigida a células blanco y en la producción de plantas resistentes a hongos, virus y predadores. Se reivindica: 1) la proteína musarmina 4 recombinante; 2) el gen que la codifica; 3) el procedimiento de obtención de la musarmina 4 recombinante; 4) la utilización de la musarmina 4 recombinante en la construcción de conjugados e inmunotoxinas para destruir células blanco; 5) la utilización de la musarmina 4 recombinante en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de cáncer y del SIDA; 6) la producción de proteínas de fusión e inmunotoxinas recombinantes conteniendo la musarmina 4 recombinante y un péptido o proteína que dirija a la proteína de fusión resultante a blancos específicos; 7) la construcción de plantas conteniendo el gen de la musarmina 4 recombinante o parte de el y que sean resistentes a hongos fitopatogénicos, virus vegetales y predadores animales.

ES 2 239 876 B1

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

DESCRIPCIÓN

Proteína musarmina 4 recombinante, gen que la codifica, procedimiento de obtención y aplicaciones.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) las cuales impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucleico y provocan apoptosis. De forma más específica, la presente invención se refiere a la estructura de un gen que codifica a una proteína inactivadora de ribosomas (RIP), a su expresión en la bacteria *Escherichia coli* que permite la producción de una nueva proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante (rMu4) que muestra gran actividad antiribosómica y puede utilizarse para la construcción de conjugados químicos con otras moléculas, en particular proteínas, capaces de dirigir de manera específica o preferente a la musarmina 4 recombinante hacia los blancos correspondientes, que pueden ser células enfermas o relacionadas directa o indirectamente con el cáncer, el sida y otras patologías humanas y en general animales, y puede utilizarse también en la construcción de plantas resistentes a agentes patógenos y predadores.

Estado de la técnica anterior a la invención

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 proteica 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]; Girbés y cols., *Cell.Mol.Biol.* 42, 461-471 [1996]).

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. Ejemplos de RIPs de tipo 2 no tóxicas son la nigrina 1 y la nigrina b (Girbés y cols., *J. Biol. Chem.* 268, 18195-18199 [1993]; Girbés y cols., *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-1186 [1993]; Girbés y cols., *Cell.Mol.Biol.* 42, 461-471 [1996]). Sin embargo las RIPs no tóxicas nigrinas y ebulinas a altas concentraciones presentan una toxicidad parecida a la de ricina a muy bajas concentraciones (Citores y cols. *Cell.Mol.Biol.* 42, 473-476 [1996]). 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 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., *Biotechnology.* 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., *Biotechnology.* 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 ARNr 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, 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* carácter inactivador del virus ARN VIH-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]; Zarlino 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).

El interés enorme de las RIPs reside en que se utilizan para los siguientes objetivos: 1) CONSTRUCCIÓN DE INMUNOTOXINAS PARA TERAPIA DEL CANCER (Vitetta y Uhr, *Annu. Rev. Immunol.* 3,197-212 [1985]; Franke 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]; Zarlino 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 MEDIANTE LA INSERCIÓN DE GENES DE RIPs EN LAS PLANTAS CORRESPONDIENTES (Lodge y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7089-7093 [1993]; Logemann y cols. *Biotechnology* 10, 305-308 [1992]; Zoubenko y cols., *Nature Biotechnology*, 15, 992-996 [1997]).

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 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]).

La utilización de los genes de RIPs monocatenarias para la: construcción de plantas transgénicas resistentes a virus (Lodge y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7089-7093 [1993]) y a hongos (Logemann y cols. *Biotechnology* 10, 305-308 [1992]), confiere al gen de la cadena A de la ebulina una importancia especial en la lucha contra los virus vegetales y hongos fitopatogénicos por un lado y contra virus animales (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]; Zarlino 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), por otro.

Muscari armeniacum Miller contiene proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo 1 denominadas musarminas, de las cuales se ha elucidado su estructura y la de los genes que las codifican (Arias y cols., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 61-78 [2003]).

El uso clínico de las RIPs está limitado por la dificultad para disponer de suficiente cantidad de proteína activa y homogénea, ya que las preparaciones vegetales de partida contienen, por lo general, una mezcla de isoformas. Las RIPs recombinantes pueden ser una solución al problema anterior, pues garantizan una composición fija; además, su potencial terapéutico se puede mejorar introduciendo cambios en su secuencia mediante mutagénesis *in vitro*.

En la expresión heteróloga de las RIPs se han utilizado varios sistemas. Entre ellos, el más empleado es la bacteria *Escherichia coli*. Sin embargo, estas bacterias presentan también varios inconvenientes, como la imposibilidad de realizar en ellas las modificaciones post-traduccionales que tienen lugar en células eucariotas, la falta de un mecanismo eficiente para la liberación de la proteína al medio de cultivo, la capacidad limitada para formar puentes disulfuro y la posible contaminación de la proteína recombinante con endotoxinas bacterianas.

A lo largo de la última década, se han expresado en *Escherichia coli* multitud de RIPs de tipo 1 y algunas cadenas A y B de RIPs de tipo 2. En muchas ocasiones, el vector de expresión incluye un péptido señal que permite la traslocación de la proteína a través de la membrana citoplasmática, para acumularse en el periplasma, o ser secretada, finalmente, al medio. En el diseño de RIPs recombinantes, se ha recurrido a las secuencias señales de las proteínas ompA (Habuka y cols., *J Biol Chem.* 265, 10988-92 [1990]) y peptidato liasa de *Erwinia carotovora* (peIB) (Nolan y cols., *Gene* 134, 223-227 [1993]).

La purificación de estas proteínas se ha efectuado a partir de las distintas fracciones celulares de la bacteria. La obtención de las RIPs recombinantes a partir del periplasma reduce la posibilidad de ataque proteolítico; por otro lado, el entorno oxidante facilita que se establezcan puentes disulfuro, y la liberación del péptido señal genera el verdadero extremo amino terminal de la proteína. Sin embargo, a las ventajas anteriores se contraponen un bajo rendimiento

(Makrides, *Microbiol. Rev.* 60, 512-538 [1996]). Algunas RIPs se han purificado a partir del medio de cultivo, como es el caso de la gelonina, de la que se ha logrado obtener 1 mg/ml de medio en una producción a gran escala en un fermentador (Nolan y cols., *Gene* 134, 223-227 [1993]). Las proteínas recombinantes localizadas en el medio presentan : características similares a las aisladas a partir del periplasma, con la ventaja adicional de que son más abundantes (Makrides, *Microbiol. Rev.* 60, 512-538 [1996]).

Por otra parte, la extracción de las RIPs recombinantes de la fracción soluble total proporciona aún mayor cantidad de proteína; así, se han llegado a purificar 85 mg/l de la cadena A de ricina de este extracto (Li y cols., *Protein Expr. Purif.* 3, 386-394 [1992]). Sin embargo, este método no está exento de inconvenientes, como la mayor susceptibilidad de la proteína al ataque de proteolítico y la imposibilidad de formarse enlaces disulfuro (Makrides, *Microbiol. Rev.* 60, 512-538 [1996]).

Pero, sin duda, el mayor rendimiento en la producción de proteínas recombinantes se logra cuando éstas se acumulan en forma de agregados insolubles, denominados cuerpos de inclusión, en donde, además, están bastante protegidas frente a la degradación por proteasas; por ejemplo, a partir de estos agregados se han obtenido 100 mg/l de la RIP PD-L4 (Del Vecchio Blanco y cols., *FEBS Lett.* 437, 241-245 [1998]). Las principales desventajas de este procedimiento surgen de la necesidad de solubilizar, y replegar posteriormente, la proteína, lo que dificulta la recuperación de RIPs activas.

Una de las mayores limitaciones de este sistema de expresión radica en la dificultad para producir aquellas RIPs que son activas sobre ribosomas de *E.coli*, ya que o resultan letales para la bacteria o bien frenan su crecimiento. En este grupo de proteínas se encuentran, entre otras, la MAP (Kataoka y cols., *J. Biol. Chem.* 266, 8426-8430 [1991]), PAP y la RIP de *Dianthus sinensis* (Cho y cols., *Mol. Cells* 10, 135-141 [2000]). Su producción en la fracción soluble es mínima: así, de MAP se logran recuperar 3,6 µg/l medio (Habuka y cols., *J. Biol. Chem.* 264, 6629-6637 [1989]) y de PAP 1,7 mg/l (Kataoka y cols., *FEBS Lett* 320, 31-4 [1993]). Una estrategia para reducir el efecto tóxico consiste en restringir la expresión del gen de la RIP hasta que las células crezcan suficientemente, y secretar del citoplasma la proteína producida, tal y como se realizó con MAP; aun así, esta RIP siguió interfiriendo sobre el crecimiento de *E.coli*, por lo que sólo se lograron obtener 140 µg/l de proteína a partir del medio de cultivo (Habuka y cols., *J. Biol. Chem.* 265, 10988-10992 [1990]). En otras ocasiones, se ha forzado la sobreexpresión de la RIP a temperaturas elevadas para lograr su agregación rápida en forma de cuerpos de inclusión, evitando su interacción con los ribosomas bacterianos; de este modo, se han producido 10-12 mg/l de PAP (Rajamohan y cols., *Protein Expr. Purif.* 16, 359-368 [1999]).

Las RIPs recombinantes de tipo 1 y las cadenas A recombinantes de las RIPs diméricas mantienen la actividad N-glicosidasa de sus homólogas nativas, y presentan la misma capacidad que aquéllas para inhibir la síntesis proteica, o incluso pueden resultar ligeramente más activas, como la gelonina (Rosenblum y cols., *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 547-555 [1995]). Esta propiedad se cumple también en el caso de que la correspondiente RIP de la planta contuviese restos glucídicos, con lo que se ha comprobado que la glicosilación no afecta la actividad *in vitro* de la cadena catalítica (Eck y cols., *Eur. J. Biochem.* 264, 775-784 [1999]). La citotoxicidad de las proteínas recombinantes en las distintas líneas celulares es también comparable a la de las RIPs nativas (den Hartog y cols., *Eur. J. Biochem.* 269, 1772-1779 [2001]). Estas RIPs mantienen, además, la misma estructura que las silvestres (Legname y cols., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1, 61-68 [1995]), y conservan algunas de sus características específicas, como la actividad anti-HIV en el caso de la PAP (Rajamohan y cols., *Protein Expr. Purif.* 16, 359-368 [1999]) o la capacidad abortiva, en el caso de la tricosantina (Zhu y cols., *Int. J. Peptide Protein Res.* 39, 77-81 [1992]).

También se ha llevado a cabo la expresión de las cadenas B de algunas RIPs de tipo 2, como la ricina (Hussain y cols., *FEBS Lett*, 244, 383-387 [1989]) y la viscumina (Eck y cols., *Eur. J. Biochem.* 265, 788-797 [1999]), donde se ha detectado que la ausencia de YY restos glucídicos provoca cierta alteración en la actividad lectina.

Se han empleado levaduras para obtener cadenas polipeptídicas glicosiladas o proteínas con puentes disulfuro. Tal es el caso de la cadena B de ricina, expresada en *Saccharomyces cerevisiae*, que se aisló como proteína soluble y replegada en una conformación activa (Richardson y cols., *Biochim. Biophys. Acta* 950, 385-394 [1988]). En este mismo sistema, la expresión de algunas RIPs de tipo 1, como la PAP (Hur y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8448-8452 [1995]), o la cadena A de ricina (Frankel, A. y cols., *Mol. Cell Biol.* 9, 415-420 [1989]), resultó letal. Aprovechando este hecho, las *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado para analizar la importancia de aminoácidos concretos en la actividad de la RIP, mediante la selección de mutaciones que inactivan la toxina y permiten, así, el crecimiento de la levadura (Hur y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8448-8452 [1995]).

Otros organismos eucariontes a los que se ha recurrido para la expresión de RIPs son las plantas, sistemas en los que es más factible lograr un procesamiento correcto de las prepro-RIPs, y la glicosilación se asemeja más a la de las proteínas nativas. Además, las células vegetales permiten la asociación adecuada de las cadenas polipeptídicas para originar estructuras complejas, así como el estudio del tráfico intracelular de estas proteínas (Frigerio y cols., *J. Biol. Chem.* 273, 14194-14199 [1998]; Di Cola y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14726-14731 [2001]).

La expresión de RIPs en sistemas vegetales se ha empleado tanto para la generación de plantas resistentes a patógenos como para la producción a gran escala de estas proteínas. En el caso de las RIPs de semillas de cereales, como la RIP de la cebada (Logemann y cols., *BioTechnology* 10, 205-308 [1992]) y la RIP b-32 del maíz (Kim y cols., *Molecular Breeding* 5, 85-94 [1999]), se han alcanzado niveles altos de expresión en tabaco transgénico y en cultivo de

arroz. Además, en estos casos, las plantas huésped se conservan fenotípicamente sanas. Finalmente, las RIPs también se pueden producir a partir de cultivos de células vegetales. Así, se han obtenido 30 mg/l de cultivo biotina 1 activa en un cultivo de células de tabaco (Francisco y cols., *Bioconjug. Chem.* 8, 708-713 [1997]).

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere al procedimiento de obtención de la proteína recombinante musarina 4 a partir de las fracciones soluble e insoluble de los extractos proteicos de *Escherichia coli* y a sus aplicaciones en el campo de la construcción de inmunotoxinas conteniendo la musarina 4 recombinante, o un fragmento de la misma, para la terapia sobre células blanco.

El procedimiento general para la obtención de la proteína recombinante y, como ejemplo de su utilización como inmunotoxina de la presente invención, la construcción de la inmunotoxina anti-CD105 humana, comprende varias operaciones divididas en 4 etapas:

1^{era} etapa: Inserción del gen de musarina 4 recombinante en el vector de expresión. A partir del DNA que codifica para la musarina 4 se amplifica un fragmento menor que tras ser clonado y secuenciado se inserta en el vector de expresión bacteriano pET25 (+).

2^a etapa: Expresión de la musarina 4 recombinante en *E. coli*. Con el plásmido recombinante que contiene el gen de la musarina 4 modificado se transforman dos cepas de *E. coli* y se induce la expresión de la proteína recombinante. Se selecciona la cepa más productiva y se aísla la musarina 4 recombinante a partir de las fracciones soluble e insoluble mediante técnicas cromatográficas.

3^a etapa: Preparación de la inmunotoxina conteniendo la musarina 4 recombinante y el anticuerpo 44G4 dirigido contra el antígeno de superficie CD105 humano. Se derivatizan con un agente ligante el anticuerpo monoclonal 44G4 y la musarina 4 recombinante aislada de la fracción soluble. Se conjugan ambas proteínas y la inmunotoxina resultante se purifica por cromatografía y se caracteriza electroforéticamente.

4^a etapa: Estudio de la actividad de la musarina 4 recombinante y de la inmunotoxina. Se analiza la actividad N-glicosidasa de las formas soluble e insoluble de la musarina 4 recombinante, aisladas de las fracciones soluble e insoluble respectivamente, y se cuantifica la capacidad inhibidora de la síntesis proteicas de las mismas, así como de la musarina 4 recombinante derivatizada y de la inmunotoxina. Por último, se cuantifica el efecto citotóxico de la inmunotoxina y la musarina 4 recombinante sobre células de fibroblastos de ratón L929 parentales y transfectadas con el gen de CD105 humana.

Descripción de las figuras

Figura 1

Análisis de la expresión de la musarina 4 recombinante en las cepas BL21(DE3) y BL21(DE3) pLysS. Localización celular de la musarina 4 recombinante en BL21(DE3) pLysS

Panel A (A): SDS-PAGE +2ME al 15% correspondiente a 10 µl de extractos proteicos totales de colonias transformantes inducidas (1-6) o de colonias no transformadas (-). El triángulo negro marca la altura en el gel de la banda correspondiente a la musarina 4 recombinante.

Panel B (B): SDS-PAGE al 15% de 10 µl del extracto proteico total (total), 50 µg de la fracción soluble (soluble) y de una alícuota de los cuerpos de inclusión (c.incl.) de una colonia de BL21(DE3) pLysS recombinante inducida. Se incluye un control negativo (-). Las flechas y los números indican la posición y el tamaño (en kDa) de los marcadores (M).

Panel C (C): Inmunoblot de las muestras anteriores con el policlonal frente a Musarina 2 nativa. Se cargaron 5 µl del extracto total de una colonia inducida (total) y de otra no inducida (t=0), una alícuota de los cuerpos de inclusión y 15 µg de la fracción soluble.

Figura 2

Purificación de la musarina 4 recombinante a partir de la fracción soluble

Panel A (A): Purificación de musarina 4 recombinante mediante CM-Sepharose FF. En el cromatograma la línea discontinua representa el gradiente salino y la barra horizontal señala las fracciones correspondientes a la musarina 4 recombinante.

Panel B (B): Purificación del pico anterior mediante Superdex 75. La barra horizontal señala las fracciones correspondientes a la musarina 4 recombinante.

En la figura se muestran también las SDS-PAGE al 15%(p/v) en condiciones reductoras de 50 µg de la muestra

ES 2 239 876 B1

de partida o extracto soluble acidificado (sol.ac.), 30 μg del pico de CM-Sepharose (CM) (*Panel A*), y 10 μg del pico de Superdex 75 (*Panel B*). Las líneas y los números indican la posición y el tamaño (en kDa) de los marcadores. Se incluyen, asimismo, los western-blot (W.blot) con el policlonal anti-Mu2 nativa correspondientes a las muestras anteriores. Se cargaron 5 μg de sol.ac. y de CM, y 2 μg de S-75.

5
Figura 3

Purificación de la musarmina 4 recombinante procedente de cuerpos de inclusión mediante cromatografía en CM-Sepharose FF

10
Panel A (A): *Perfil cromatográfico del proceso*. La línea discontinua representa el gradiente salino y la barra horizontal señala las fracciones correspondientes a la musarmina 4 recombinante.

15
Panel B (B): *SDS-PAGE al 15% correspondiente a la purificación*. Se cargaron 30 μg de los cuerpos de inclusión de partida solubilizados (c.incl. inicial) y 30 μg del pico correspondiente a la musarmina 4 recombinante en la cromatografía (c.incl.CM). Las líneas y los números indican la posición y el tamaño (en kDa) de los marcadores.

20
Panel C (C): *Inmunoblot con anti-musarmina 2 nativa de las muestras anteriores*. Se cargaron 5 μl de los cuerpos de inclusión iniciales y 2 μg del pico purificado de CM-Sepharose.

20
Figura 4

Separación de la inmunotoxina (44G4-rMu4) formada por el anticuerpo monoclonal 44G4 y la musarmina 4 recombinante por filtración en Sephacryl S-200 Hiloal

25
Las fracciones eluidas se registraron espectrofotométricamente a 280 nm.

30
A y B ($V_e=135-150$ ml) = polímero de anticuerpo y conjugado de alto peso molecular; C= conjugado de bajo peso molecular ($V_e=150-170$ ml); D= anticuerpo libre ($V_e=170-190$ ml); F= trímero de musarmina 4 recombinante ($V_e=200-215$ ml); G= dímero de musarmina 4 recombinante ($V_e=215-235$ ml); H= monómero de musarmina 4 recombinante ($V_e=240-260$ ml).

Las fracciones recogidas se indican mediante una barra horizontal.

35
Figura 5

Electroforesis en condiciones no reductoras de las fracciones resultantes de la cromatografía de la inmunotoxina mAb 44G4-rMu4 en Sephacryl S-200

40
Se utilizaron geles de distintos porcentajes de acrilamida (indicados debajo de cada imagen), según el tamaño de las proteínas objeto de análisis. Las letras en negrita hacen referencia a las regiones del cromatograma (Figura 4). Los volúmenes de elución de estas fracciones, en el caso de las regiones C y D son: C= 150-170 ml, D₁=170-175 ml, D₂=175-180 ml, D₃=180-185 ml. Se analizaron 4 μg de H (*Panel C*), 10 μg de G, F (*Panel B*), 10 μg del monoclonal 44G4, que se emplearon como referencia, y 20 μg de cada una de las fracciones de D-B (*Panel A*). Las líneas y los números indican la posición y el tamaño (en kDa) de los marcadores.

45
Figura 6

Electroforesis en geles de acrilamida de la inmunotoxina mAb 44G4-rMu4

50
Panel A (A): *SDS-PAGE al 7,5% (p/v) en condiciones no*. Se cargaron 35 μg del conjugado. En el lado izquierdo de la fotografía, las flechas y números indican la posición y la estequiometría (mol rMu4:mol 44G4) de los distintos conjugados.

55
Panel B (B): *SDS-PAGE al 18% (p/v) en condiciones reductoras*. Se cargaron 15 μg de la inmunotoxina (IT). Como referencia, se emplearon 10 μg de 44G4 y 4 μg de musarmina 4 recombinante (rMu4). En ambos paneles, las líneas y números a la derecha de las imágenes indican la posición y tamaño (kDa) de los marcadores.

60
Figura 7

Actividad N-glicosidasa de la musarmina 4 recombinante sobre el rRNA de lisado de reticulocitos de conejo

Cada calle corresponde a 7 μg de RNA. (control -)=controles negativos, en los que no se ha incubado con toxina; (rMu4 soluble)=incubación del lisado con musarmina 4 recombinante purificada de fracción soluble; (rMu4 c.incl.solubiliz.)=incubación con musarmina 4 recombinante procedente de cuerpos de inclusión solubilizados y replegados; (SAP-S5)=controles positivos, en los que se ha realizado una incubación con saporina S5. Las flechas y números a la derecha de la imagen indican, respectivamente, la posición y tamaño (nº de bases) de los marcadores

ES 2 239 876 B1

(M). Las flechas a la izquierda de la imagen señalan la liberación del fragmento diagnóstico tras el tratamiento con anilina ácida o marcan la altura de las bandas correspondientes a los rRNA 28S y 18S en el gel.

Figura 8

5

Efecto de la inmunotoxina mAb 44G4-rMu4 sobre la viabilidad celular en fibroblastos de ratón L929

Panel A (A): *Fibroblastos de ratón transfectados con S-endoglina humana (L929-S).*

10

Panel B (B): *Línea parental de fibroblastos de ratón (L929).*

La viabilidad celular está referida a los controles, realizados en ausencia de RIP y de inmunotoxina. Los valores son media de los datos provenientes de tres experimentos distintos \pm SEM. En cada experimento individual cada punto se analiza por triplicado.

15

Modos de realizar la invención

Los varios aspectos de la invención se describen con el siguiente ejemplo que no intenta limitar en modo alguno la invención. El ejemplo se desglosa en las siguientes operaciones divididas en 4 etapas:

20

1^{era} etapa: Inserción del gen de musarmina 4 en el vector de expresión.

comprende las siguientes 14 operaciones:

25

a) Amplificación del ADNc que codifica a la musarmina 4 recombinante por técnicas de PCR.

b) Análisis por electroforesis en geles de agarosa del ADN amplificado por PCR que codifica a la musarmina 4 recombinante.

30

c) Introducción en el vector de clonación del ADN que codifica a la cadena de la musarmina 4 recombinante.

d) Transformación de células de *Escherichia coli* con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica la musarmina 4 recombinante.

35

e) Aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante.

f) Secuenciación de los plásmidos con inserto del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante.

40

g) Producción del fragmento de ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante digerido con las enzimas de restricción Nde I y Hind III.

h) Análisis y purificación del producto de digestión que codifica a la musarmina 4 recombinante por electroforesis en geles de agarosa.

45

i) Producción del vector de expresión digerido con las enzimas NdeI y Hind III.

j) Análisis y purificación del producto de digestión del plásmido pET25(+) por electroforesis en geles de agarosa.

50

k) Inserción del fragmento de ADN de la musarmina 4 recombinante en el vector de expresión pET25(+) digerido.

l) Transformación de células de *Escherichia coli* con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica la musarmina 4 recombinante.

55

m) Aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica para la musarmina 4 recombinante.

n) Transformación de células de *Escherichia coli* con el vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica la musarmina. 4 recombinante.

60

2^a etapa: Expresión de la musarmina 4 recombinante en *E. coli*. con las operaciones siguientes:

a) Estudio sobre la localización celular.

65

b) Producción de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble.

c) Purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble.

ES 2 239 876 B1

d) Producción de la musarina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble.

e) Purificación de la musarina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble.

5 3ª etapa: Preparación de la inmunotoxina 4G4-rmusarina4.

dividida en los siguientes pasos:

a) Derivatización del anticuerpo monoclonal 4G4.

10

b) Derivatización de la RIP musarina 4 recombinante.

c) Reducción de la RIP y reacción de conjugación.

15

d) Determinación de la masa molecular relativa de la inmunotoxina 4G4-musarina 4 recombinante por electroforesis en geles de poliacrilamida.

e) Determinación de la relación molar por densitometría.

20

4ª etapa: Estudio de la actividad de las toxinas e inmunotoxina.

a) Estudio de la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo dirigida por mensajero exógeno.

25

b) Actividad N-glicosidasa de las proteínas inactivadoras de ribosomas.

c) Cultivo de células animales.

d) Efecto citotóxico de la inmunotoxina 4G4-musarina 4 recombinante y la musarina 4 recombinante.

30

Ejemplo

Primera etapa

35 *Inserción del gen de musarina 4 en el vector de expresión*

a) *Amplificación del ADNc que codifica a la musarina 4 recombinante por técnicas de PCR*

40 El ADNc que codifica el marco de lectura completo de la musarina 4 y el 5'UTR insertado en el vector de clonación pUC18 (Amersham Pharmacia Biotech) se amplificó utilizando como cebadores dos oligonucleótidos sintéticos:

1-. Oligonucleótido del extremo 5' diseñado a partir del aminoácido 21 de la proteína codificada por el gen de la musarina 4 con un extremo 5' que introduce el sitio de corte de la enzima Nde I y 9 nucleótidos más complementarios a la secuencia del gen:

45

5' ATC GTC GCC CAT ATG GCC GGC CAA GAC TTT CTT ACG GTG 3'

2-. Oligonucleótido del extremo 3' antisentido y complementario a la, secuencia posterior al codón de terminación del gen de la musarina 4 que incluye la secuencia de corte de la enzima Hind III:

50

5' AGT GAA AGG TGG CCT AAC GCA TCA AGC TTA AG 3'

55 La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 100 μ l que contenía 100 ng de plásmido, 10 mM Tris·HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM 5'desoxirribonucleótidos trifosfato (5'dATP, 5'dGTP, 5'dCTP, 5'dTTP), 0,5 μ M de cebadores y 5 unidades de Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech). Se realizaron 20 ciclos de las siguientes incubaciones: 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto 10 segundos a 72°C. Finalizados estos ciclos de incubaciones se concluyó la reacción incubando 10 minutos a 72°C y enfriándola a 15°C.

60 b) *Análisis por electroforesis en geles de agarosa del ADN amplificado por PCR que codifica a la musarina 4 recombinante*

65 Para analizar el producto de PCR obtenido en la reacción anterior se realizó un gel que contenía un 1,5% de agarosa en un tampón acuoso de Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA (etilen diamino tetra-acético) 1 mM. A 100 μ l de muestra se le añadieron 20 μ l de una solución que contenía 30% de glicerol y 0,025% de azul de bromofenol. Las muestras se colocaron en el gel y se desarrolló la electroforesis a 70 voltios hasta que el azul de bromofenol recorrió aproximadamente $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel. A continuación se realizó la tinción con una solución que contenía 0,25 μ g/ml de bromuro de etidio durante aproximadamente 30 minutos con agitación. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 254-312 nm. Se obtuvo un único fragmento de ADN de 0,867 kb. El

ES 2 239 876 B1

producto de PCR se purificó cortando la banda correspondiente y mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de fragmento purificado se cuantificó en un gel de agarosa preparado como se indicó anteriormente. El ADN recuperado de este modo se guardó a -20°C hasta su utilización.

5

c) *Introducción en el vector de clonación del ADN que codifica a las cadena de la musarmina 4 recombinante*

El fragmento de ADN purificado se introdujo en el vector de clonación pUC18 de utilizando el sistema “Sure Clone Ligation Kit” de Amersham Pharmacia Biotech. La reacción se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes y llevando a cabo la reacción de ligación en 20 μ l durante 2 horas a 16°C.

10

d) *Transformación de células de Escherichia coli con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica la musarmina 4 recombinante*

La transformación se realizó incubando 100 μ l de células competentes XL1-Blue (Stratagene) con 8 μ l de la reacción de ligación anterior. Todo el proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se sembraron en placas que contenían medio LB-agar (1% bactotripton, 0,5% de extracto de levadura, 1% NaCl y 2% agar), 100 μ g/ml ampicilina, 1,6 mM IPTG y 40 μ g/ml X-gal. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 horas.

20

e) *Aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante*

Se analizaron las colonias blancas de células transformantes mediante técnicas de PCR utilizando cebadores específicos. De aquéllas que rindieron una amplificación del tamaño adecuado se purificó el plásmido recombinante mediante el sistema QIAprep spin Miniprep kit (QIAGEN). A continuación los plásmidos purificados se digirieron con las endonucleasas de restricción Bam HI y Sac I (Boehringer Mannheim), que liberan el inserto. La reacción se realizó en las condiciones que indica el fabricante y los productos se analizaron en un gel del 1% de agarosa/TAE. La tinción del gel con bromuro de etidio permitió visualizar los fragmentos de ADN y se eligieron los plásmidos con un inserto del tamaño adecuado.

30

f) *Secuenciación de los plásmidos con inserto del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante*

Los plásmidos recombinantes correspondientes al gen de la musarmina 4 recombinante se secuenciaron de forma automática en ambos sentidos en el Servicio de Secuenciación de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid). (Secuencia 1).

35

g) *Producción del fragmento de ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante digerido con las enzimas de restricción Nde I y Hind III*

40

Se digirieron 100 μ g del plásmido que contenía el ADN que codifica para la musarmina 4 recombinante en un volumen de 100 μ l que contenía 30 unidades de NdeI, 10 mM Tris-HCl pH=8, 5mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoetanol. La reacción se realizó durante 6h a 37°C. 10 μ l de la mezcla de reacción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa como se indicó anteriormente. Tras calentar la mezcla restante durante 20 minutos a 65°C para inactivar la enzima de restricción se añadieron 5 unidades de Hind III y la reacción se realizó a 37°C durante 12 horas.

45

h) *Análisis y purificación del producto de digestión que codifica a la musarmina 4 recombinante por electroforesis en geles de agarosa*

50

Para analizar el producto de la digestión obtenido en la reacción anterior se realizó un gel que contenía un 1,5% de agarosa en un tampón acuoso de Tris-acetato 40 mM, EDTA (etilen diamino tetra-acético) 1 mM. A 100 μ l de muestra se le añadieron 25 μ l de una solución que contenía 30% de glicerol y 0,025% de azul de bromofenol. Las muestras se colocaron en el gel y se desarrolló la electroforesis a 60 voltios hasta que el azul de bromofenol recorrió aproximadamente $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel. A continuación se realizó la tinción con una solución que contenía 0,25 μ g/ml de bromuro de etidio durante aproximadamente 30 minutos con agitación. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 254-312 nm. El fragmento de ADN correspondiente a 0,827 kb se purificó del gel utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN. La cantidad de fragmento purificado se cuantificó en un gel de agarosa preparado como se indicó anteriormente. El ADN recuperado de este modo se guarda a -20°C hasta su utilización.

60

i) *Producción del vector de expresión digerido con las enzimas Nde I y Hind III*

Se digirieron 7,5 μ g del plásmido pET25(+) (Novagen) en un volumen de 100 μ l que contenía 3 unidades de NdeI y de HindIII, 10 mM Tris-HCl pH 8,5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoetanol. La reacción se realizó durante 5h a 37°C.

65

ES 2 239 876 B1

j) *Análisis y purificación del producto de digestión del plásmido pET25(+) por electroforesis en geles de agarosa*

Para analizar el producto de digestión obtenido en la reacción anterior se realizó un gel que contenía un 1% de agarosa como se indicó anteriormente. Se obtuvo un único fragmento de ADN de 5,4 kb. El producto de digestión se purificó del gel de agarosa como se indicó anteriormente con el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La cantidad de plásmido purificado se cuantificó en un gel de agarosa preparado como se indicó anteriormente. El ADN recuperado de este modo se guarda a -20°C hasta su utilización.

k) *Inserción del fragmento de ADN de la musarina 4 recombinante en el vector de expresión pET25(+) digerido*

La reacción se llevó a cabo en 12 μ l de volumen que contenía 3 unidades de T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech), 50 ng de vector digerido, 55 ng del fragmento de la musarina 4 recombinante, 66 mM Tris-HCl pH=7,6, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 66 ATP. La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a 16°C.

l) *Transformación de células de Escherichia coli con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica la musarina 4 recombinante*

La transformación se realizó incubando 66 μ l de células competentes XL1-Blue (Stratagene) con 8 μ l de la reacción de ligación anterior. Todo el proceso se realizó siguiendo la instrucciones del fabricante. Las células transformadas se sembraron en placas que contenían medio LB-agar (1% bactotripton, 0,5% de extracto de levadura, 1% NaCl y 2% agar) y 100 μ g/ml ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 horas.

m) *Aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica para la musarina 4 recombinante*

Se analizaron las colonias blancas de células transformantes mediante técnicas de PCR utilizando cebadores específicos del vector de expresión. De aquéllas que rindieron una amplificación del tamaño adecuado se purificó el plásmido recombinante mediante el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN.

n) *Transformación de células de Escherichia coli con el vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica la musarina 4 recombinante*

La transformación se realizó incubando 1 ml de células BL21(DE3)pLysS y BL21(DE3) (Novagen) resuspendidas en medio TSS (medio LB suplementado con 10% (p/v) de PEG 3350, 5%(v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂ pH=6,5) con 70 ng del vector de expresión recombinante anterior. Tras incubar las células durante 1 hora a 4°C se calentaron durante 2 minutos a 42°C y volvieron a enfriarse a 4°C. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron durante 45 minutos a 37°C en un incubador orbital a 250 rpm. Las células transformadas se sembraron en placas que contenían medio LB-agar (1% bactotripton, 0,5% de extracto de levadura, 1% NaCl y 2% agar) y 100 μ g/ml ampicilina y 34 μ g/ml de cloranfenicol. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 horas.

Segunda etapa

Expresión de la musarina 4 recombinante en E. coli

a) *Estudio sobre la localización celular*

Se seleccionaron 3 colonias transformantes de cada cepa, y se indujo la expresión de la proteína musarina 4 recombinante durante 4h a 37°C, tal y como describe el manual de instrucciones de los 10 fabricantes del plásmido de expresión. Las fracciones proteicas totales de las bacterias inducidas se analizaron por electroforesis (Figura 1, Panel A), y así se comprobó la presencia de una proteína con Mr en torno a 29 kDa, que no aparecía en las bacterias sin plásmido.

Del mismo modo, se observó que la cantidad relativa de proteína y recombinante expresada resultaba similar en ambas cepas. Teniendo en cuenta lo anterior, y ante la mayor facilidad para lisar las bacterias que poseen lisozima endógena, se optó por la cepa BL21(DE3) pLysS para llevar a cabo la expresión y el posterior aislamiento de la musarina 4 recombinante.

Con el fin de averiguar la localización de la proteína en las bacterias pLysS transformantes inducidas, se procedió a su fraccionamiento, y las fracciones soluble e insoluble se estudiaron por electroforesis (Figura 1, Panel B). Se observó que la proteína recombinante de 29 kDa se localizaba tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble. Esta proteína era reconocida por un policlonal anti-musarina 2 nativa (Arias y cols, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 61-78 [2003]), lo que confirmó que la proteína recombinante se correspondía con musarina 4 recombinante (Figura 1, Panel C). En el experimento se empleó como control negativo el extracto total de las mismas bacterias transformadas pero no inducidas (t=0), en el se detectó una pequeña expresión basal.

A continuación, una vez confirmada la presencia de musarina 4 recombinante en las dos fracciones celulares, se procedió a su aislamiento a partir de ambos extractos.

ES 2 239 876 B1

Producción y purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble

b) Producción de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble

- 5 Se inoculan 500 ml de medio LB con 200 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol con una colonia de la cepa BL21(DE3)pLysS recombinante que contiene el plásmido pET25+Musarmina4, y se incuba durante 11 horas a 27°C con agitación orbital de 250 rpm. Cuando la absorbancia alcanza 0,8 se añade IPTG (isopropiltio- β -galactósido) a una concentración final de 1mM y se incuba en las mismas condiciones durante 5 horas más.
- 10 Se enfría el medio durante 15 minutos a 4°C y se centrifuga a 5000xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en 20 ml de 20 mM fosfato monosódico pH=6,6 mediante agitación fuerte. Las células resuspendidas se congelan a -80°C durante 30 minutos, se descongelan a 37°C y se incuban a 25°C durante 15 minutos. Se somete la solución a tratamiento por ultrasonidos con 3 ciclos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre cada ciclo y a continuación se centrifuga a 27000 xg durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante constituye la fracción proteica
- 15 soluble total.

c) Purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble

- 20 El extracto proteico anterior se acidifica con Acido Acético glacial hasta pH 5. A continuación se somete a centrifugación a 27000xg durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante se carga sobre una columna de 27 ml de CM-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia; Biotech) equilibrada previamente con Acetato sódico 20 mM pH 5. Tras lavar la columna con el mismo tampón se eluye mediante un gradiente 0 salino en el tampón de equilibrado. Se realiza en dos tramos: desde 0 a 70 mM de NaCl a lo largo de 3 volúmenes de columna, y de 70 a 180 mM de NaCl a lo largo de 19 volúmenes de columna (Figura 2, Panel A). Posteriormente, se despegan las proteínas más básicas pasando 3
- 25 volúmenes de columna del tampón de equilibrado con 1 M de NaCl. Tras analizar las fracciones recogidas por Western blotting usando un anticuerpo policlonal de conejo específico de la musarmina 3 nativa se seleccionan las fracciones que reaccionan y se mezclan. Posteriormente se concentra el extracto proteico resultante mediante una membrana YM-10 en el sistema de ultrafiltración AMICON hasta un volumen de 5 ml y se filtra a través de una membrana Millipore Type HA de 0,45 μm .
- 30

La muestra se separa por cromatografía en una columna de Superdex 75 HiLoad 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con tampón Fosfato monosódico 5mM pH 7,5 y NaCl 140 mM. La elución se realiza con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 2 ml/min.

- 35 Se recogen las fracciones correspondientes al pico de mayor absorbancia que contiene la musarmina 4 recombinante, se dializan frente a agua tipo 1 y se liofilizan (Figura 2, Panel B). Al final del proceso de purificación, se obtuvieron 10 mg de musarmina 4 recombinante soluble por litro de medio de cultivo.

Producción y purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble

d) Producción de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble

- 45 Se inocularon 500 ml de medio LB con 200 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol con una colonia de la cepa BL21(DE3)pLysS recombinante que contenía el plásmido pET25+Musarmina4, y se incubó durante 11 horas a 27°C con agitación orbital de 250 rpm. Cuando la absorbancia alcanza 0,8 se añade IPTG (isopropiltio- β -galactósido) a una concentración final de 1mM y se incuba durante 6 horas más a 37°C con agitación orbital de 250 rpm.

- 50 Se enfrió el medio durante 15 minutos a 4°C y se centrifugó a 5000xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 20 ml de Tris 10 mM pH 8, NaCl 140 mM mediante agitación fuerte. Las células resuspendidas se congelaron a -80°C durante 30 minutos, se descongelaron a 37°C y se incubaron a 25°C durante 15 minutos. Se sometió la solución a tratamiento por ultrasonidos con 3 ciclos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre cada ciclo y a continuación se centrifugó a 27000xg durante 25 minutos a 4°C. El sedimento constituye la fracción insoluble total.

e) Purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble

La solubilización de la fracción insoluble total se realizó según el procedimiento descrito por Rajamohan y cols. *Protein Expr. Purif.* 16, 359-368 [1999].

- 60 Se lavó el sedimento resuspendiéndolo en 50 ml de 0,5 M NaCl y 2% Triton X-100, posteriormente se centrifugó a 27000xg durante 10 minutos a 4°C y se repitió el lavado anterior. Tras la centrifugación se realizaron dos lavados más, pero esta vez con 0,5 M NaCl exclusivamente y finalmente otros dos lavados con agua tipo I.

- 65 El sedimento se solubilizó con 10 ml de CTAB 1,5%, Tris 50 mM pH 8 durante 14 horas a 25°C en agitación constante. Seguidamente se centrifugó durante 20 minutos a 27000xg y 25°C.

El sobrenadante se separó por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-50 (263 ml de lecho) (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con 20 mM fosfato sódico pH 6,6, 140 mM NaCl

ES 2 239 876 B1

usando el mismo tampón y a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones correspondientes a la proteína se recogen y se centrifugan a 27000xg durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se aplica a una columna de CM-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (27ml de lecho) previamente equilibrada con el tampón anterior. Tras aplicar la muestra se lavó la columna con el mismo tampón y se eluyó la proteína mediante un gradiente salino, utilizando como fase A fosfato monosódico 20 mM pH=6,6 NaCl 140 mM y como fase B fosfato monosódico 20 mM pH=6,6 NaCl 1M, a un flujo de 3 ml/min. El gradiente consiste en dos tramos lineales de 1 y 28 volúmenes de columna, en los que se alcanzan concentraciones del tampón B de 15% (255mM NaCl) y 100% (1M NaCl), respectivamente (Figura 3). Se recogen las fracciones correspondientes al pico de mayor absorbancia que contiene la musarmina 4 recombinante, se dializan frente a agua tipo 1 y se liofilizan. El rendimiento global de la purificación de musarmina 4 recombinante a partir de cuerpos de inclusión fue de 50 mg de proteína por cada litro de medio.

Tercera etapa

Preparación de la inmunotoxina 44G4-rMusarmina4

a) *Derivatización del anticuerpo monoclonal 44G4*

El procedimiento experimental se basa en el utilizado por Thorpe y cols., *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 237-251 [1995]. El anticuerpo monoclonal 44G4 (7,5 mg) se disuelve en borato sódico 50 mM pH=9, a una concentración de 2-4 mg/ml. A continuación, se le añade SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)-propionate) (disuelto en etanol puro a 4 mg/ml) en un exceso molar de 2 respecto al anticuerpo; la mezcla se agita vigorosamente y se deja reaccionar 1 hora a 28°C.

Posteriormente, la muestra se somete a una cromatografía de exclusión en Sephadex G-25 (d=1,6cm, h=26,8 cm, $V_1=54$ ml) para eliminar el exceso de reactivo y la N-hidroxisuccinimida originada. La separación se lleva a cabo a temperatura ambiente, empleando como tampón PBS pH=7,5, a un flujo de 0,8 ml/min. Se recoge el primer pico, que contiene el anticuerpo derivatizado, se cuantifica y se conserva a 4°C hasta su utilización. El número de moles de agente ligante introducidos por mol de anticuerpo es de 1,8.

b) *Derivatización de la RIP musarmina 4 recombinante*

17 mg de la proteína musarmina 4 recombinante extraída de la fracción soluble se disuelven en borato sódico 50 mM pH=9 a 4-5 mg/ml. El procedimiento para su derivatización es análogo al descrito para el anticuerpo. En este caso se utiliza el cociente óptimo determinado de manera experimental que resultó de 2 moles de SPDP por mol de musarmina 4 recombinante, resultando una relación final de agente ligante unido por molécula de musarmina 4 recombinante de 1,8.

c) *Reducción de la RIP y reacción de conjugación.*

Una vez derivatizados el anticuerpo y la RIP, ésta se reduce para poder liberar grupos sulfhidrilos que puedan iniciar la conjugación: en primer lugar, las RIPs se concentran en una membrana de ultrafiltración YM-10 hasta un volumen inferior a 2,5 ml. Más tarde, se lleva a cabo su reducción a temperatura ambiente con DTT 50 mM final durante 30 minutos.

Los productos originados se cargan en una columna de Sephadex G-25 ($V_1=54$ ml), previamente equilibrada con PBS a un flujo de 0,8 ml/min. El pico de proteína eluido en el volumen de exclusión- se recoge sobre el anticuerpo derivatizado en agitación, y la mezcla se mantiene durante 16 horas a temperatura ambiente. En esta reacción, el número de moles de -SH de la RIP derivatizada excede más de 6 veces al número de moles de SH del anticuerpo derivatizado.

Finalizada la conjugación, la inmunotoxina se centrifuga a 20400xg durante 5 minutos a 4°C, para eliminar la fracción de inmunoconjugado que haya podido precipitar, y el sobrenadante se concentra hasta un volumen de 2 ml. A continuación, la muestra se aplica a una columna de Sephacryl S-200 Hiloal 26/60 (Pharmacia) ($V_1=380$ ml), a la que se aplicó un flujo de 1-2 ml/min., previamente equilibrada con PBS pH=7,5 y a temperatura ambiente (Figura 4).

Cuando concluye la purificación, se estudian electroforéticamente las diferentes zonas del cromatograma y se juntan las fracciones correspondientes a la inmunotoxina de bajo peso molecular (Zona C) (Figura 5) y se determina su concentración espectrofotométricamente. Por último, la inmunotoxina se distribuye en alícuotas y se conserva a -80°C.

Con este procedimiento se consiguieron 2,51 mg de inmunotoxina 44G4-musarmina 4 recombinante, lo que supuso un rendimiento del 26% dado como el porcentaje de anticuerpo recuperado.

d) *Determinación de la masa molecular relativa de la inmunotoxina 44G4-musarmina 4 recombinante por electroforesis en geles de poliacrilamida*

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato sódico, (SDS-PAGE) se realiza siguiendo el protocolo para sistemas discontinuos, descrito por Laemmli, *Nature* 227, 680-685 [1970]. Se

ES 2 239 876 B1

emplea un aparato "MiniVE vertical electrophoresis system" de Hoefer con minigeles de 0,75 x 80 x 100 mm, o bien un aparato "Mighty-Small II" (Hoefer) con minigeles de 0,5 x 70 x 80 mm.

5 El porcentaje total de acrilamida (%T) en los geles separadores varía según los tamaños de las proteínas que se intentan separar.

10 Por ejemplo, para proteínas cuyas Mr se encuentran en el rango de 80-220 kDa como las inmunotoxinas se recurre a geles del 7,5% T, y si se trabaja con proteínas de tamaños comprendidos entre 14 y 60 kDa como las RIPs, se utilizan geles del 15%T.

15 Los geles separadores del 15% (15% T, 2,7%C) están formados por una mezcla de acrilamida 14,6% (p/v), bis-acrilamida 0,4% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH=8,8, SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,05% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v). En los geles separadores con otro porcentaje varía sólo la proporción de acrilamida y bisacrilamida respecto al anterior, pero se mantiene el grado de entrecruzamiento (%C) [=g bisacrilamida/(g bisacrilamida + g acrilamida x100)]. Por otra parte, el gel compactador se compone de acrilamida 3,9%, bis-acrilamida 0,1%, Tris-HCl 125 mM pH=6,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,05% y TEMED 0,08%.

20 Las electroforesis se pueden llevar a cabo en condiciones reductoras o no reductoras. En el primer caso, las muestras se incuban durante 5 minutos a 100°C en tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 62,5 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-Mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025%). Cuando la electroforesis se realiza en condiciones no reductoras, se disuelven en un tampón de carga igual al anterior en el que se prescindir de 2-Mercaptoetanol.

25 Las muestras se aplican en los pocillos, y se desarrolla la electroforesis a temperatura ambiente con una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel, utilizando un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se da por concluida cuando el frente marcado por el azul de bromofenol alcanza el final del gel.

30 La tinción se realiza durante 1 hora en una solución de Coomassie Brilliant blue R-250 0,125% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) y, posteriormente, el gel se destiñe con ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v). Ambos procesos se llevan a cabo en agitación.

35 En la determinación del peso molecular relativo se utilizan marcadores de masa molecular conocida. Para geles del 15%, estos marcadores son: seroalbúmina bovina (BSA) (68 kDa), L-glutamato deshidrogenasa (54 kDa), alcohol deshidrogenasa (37 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) e inhibidor de tripsina (20,1 kDa). En el caso de geles del 7,5% se emplean: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa) y fructosa 6-fosfato quinasa (87,2 kDa). La Mr se determina por interpolación.

40 Las fracciones correspondientes a los conjugados de bajo peso (Zona C) se caracterizaron por electroforesis (Figura 6). En ausencia de reductor aparece un conjunto de bandas que provienen de las distintas estequiometrías RIP:Ab (1:1, 2:1, 3:1 y 4:1). Entre los distintos conjugados, predominan aquéllos de composición 1:1 (el mayoritario) y 2:1; por otra parte, se ha comprobado que la presencia del anticuerpo libre es mínima (Figura 6, Panel A). En condiciones reductoras, la inmunotoxina mAb 44G4-musarmina 4 recombinante rinde tres bandas. La superior, de Mr=50kDa, corresponde a la cadena pesada del anticuerpo, la central corresponde a la RIP musarmina 4 recombinante de 28 kDa
45 y la inferior (en torno a 25 kDa) corresponde a la cadena ligera del anticuerpo (Figura 6, Panel B).

e) Determinación de la relación molar por densitometría

50 La relación molar RIP/anticuerpo se ha determinado mediante un análisis densitométrico. Para ello, se realiza una electroforesis del conjugado en un gel de poli-acrilamida al 15% en condiciones reductoras y el gel se tiñe con Coomassie Blue. Una vez desteñido, se fotografía con una cámara digital Kodak. La densitometría de la imagen se efectúa con el programa Scion Image (Scion Corporation), con el que la intensidad de cada banda se traduce en el valor del área bajo la curva que marca su contorno en el densitograma.

55 En el gel se incluyen cantidades conocidas de cada uno de los componentes del conjugado, que servirán como patrones. Para cada uno de ellos se calcula la intensidad relativa de la banda por unidad de masa, dada como el valor del área bajo la curva de intensidad (en unidades²) por cada μ g de proteína. La cantidad (en μ g) de cada uno de los integrantes de la inmunotoxina se halla relacionando el área del pico correspondiente con el cociente u^2/μ g obtenido para su referente interno. Por último, conocidas las masas relativas de las proteínas, se puede calcular la relación molar
60 RIP/anticuerpo, que en este caso resultó de 1,45 moles musarmina 4 recombinante:moles 15 44G4.

65

ES 2 239 876 B1

Cuarta etapa

Estudio de la actividad de las toxinas e inmunotoxina

5 a) *Estudio de la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo dirigida por mensajero exógeno*

10 La capacidad inhibidora de las RIPs y de sus conjugados se estudia en un sistema acelular de síntesis de proteínas, el lisado de reticulocitos de conejo, preparado en el laboratorio del prof. Girbés, siguiendo el protocolo de Pelham y Jackson., *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256 [1976]. Se comparan las cantidades de proteína sintetizada en presencia de distintas concentraciones de RIP o conjugado con la producida en ausencia de las toxinas (control), que supone el 100% de la síntesis proteica. Cada concentración se analiza por duplicado, como mínimo, y en el experimento se incluyen, al menos, cuatro controles en los que la toxina es sustituida por agua. La contribución de las señales inespecíficas se calcula haciendo una medida de una muestra no tratada con toxina, en la que se omite la incubación a la temperatura a la que tiene lugar la síntesis. Este valor (blanco) se resta de los valores de las demás medidas.

20 La actividad de las toxinas en estos sistemas se caracteriza por su IC_{50} , que se define como la concentración de RIP o de inmunotoxina (referida a la RIP) que causa el 50% de inhibición de la síntesis proteica. Este valor se obtiene mediante regresión lineal de la función que relaciona el porcentaje de síntesis con el logaritmo de la concentración de la proteína estudiada.

En el ensayo con la inmunotoxina, ésta se reduce previamente con DTT 50 mM, a 37°C durante 30 minutos, para separar los componentes del conjugado y que la RIP pueda ejercer su efecto.

25 Con este método, la tasa de síntesis proteica en el lisado se calcula tomando como referencia la producción de luciferasa de *Photinus pyralis* (luciérnaga americana), enzima sintetizada gracias a un sistema acoplado de transcripción-traducción del cDNA que la codifica (Langer y cols., *Anal. Biochem.* 243, 150-153 [1996]). Este cDNA está clonado en un plásmido (“Luciferase T7 control DNA”, Promega), bajo el control del promotor de la T7 RNA polimerasa.

30 A su vez, la cantidad de luciferasa generada se relaciona con su actividad, fácilmente medible. Esta enzima cataliza la oxidación de la luciferina, y el proceso va acompañado de la emisión de una ráfaga de luz en todas las longitudes de onda, que decae rápidamente.

La intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de luciferasa en el rango de 10^{-16} M a 10^{-8} M.

35 La reacción de síntesis de proteínas se lleva a cabo en un volumen total de 10 μ l, que contiene 5 μ l de lisado, 4 U de T7 RNA polimerasa, 6,4 U de inhibidor de RNasas, 0,25 μ g de plásmido con el gen de la luciferasa clonado, 0,5 μ l de tampón x20 (NTPs 8 mM cada uno; espermidina 4 mM; Tris-HCl pH=7,8 200 mM; KCl 560 mM; MgCl₂ 20 mM; aminoácidos 40 μ M cada uno), agua tipo I estéril hasta, 8 μ l y 2 μ l de toxina.

40 En primer lugar, se prepara una única mezcla de reacción con todos los componentes indicados excepto la toxina. Esta preparación se incuba durante 10 minutos a 30°C para que finalice la traducción de los mRNAs endógenos del lisado y se liberen los ribosomas que están unidos a través de los mensajeros formando polisomas (“run-off”).

45 El proceso anterior se detiene poniendo la mezcla en hielo.

50 A continuación, se añaden a cada tubo con toxina 8 μ l de la mezcla anterior, y se incuba durante 30 minutos a 30°C para que se realice la biosíntesis de la luciferasa. Transcurrido este tiempo, la reacción se bloquea con 25 μ l de agua a temperatura ambiente, que se mezclan por pipeteo. Inmediatamente, se extraen 25 μ l de esta mezcla y se juntan con 25 μ l de reactivo de luciferina (Promega) a temperatura ambiente, contenidos en viales de vidrio.

55 La emisión se detecta con un luminómetro 1254-001 Luminova, de Bio-Orbit, sensible al rango de espectro de 185 a 680 nm. La medida se realiza durante 10 segundos tras una espera inicial de 2 segundos, tiempo en que se estabiliza el tubo fotomultiplicador del aparato.

El resultado es dado en “unidades relativas de luz”, que

Proteína	IC_{50} (ng/ml)	IC_{50} (M de RIP)
musarmina 4 recombinante soluble	1.4	$0,5 \times 10^{-10}$ M
musarmina 4 recombinante insoluble	8.2	$2,8 \times 10^{-10}$ M
musarmina 4 recombinante derivatizada	4	$1,4 \times 10^{-10}$ M
44G4-musarmina 4 recombinante	25	$8,9 \times 10^{-10}$ M

ES 2 239 876 B1

corresponde a la intensidad de luz liberada por una muestra durante un período determinado.

En la tabla se resumen los valores de los IC₅₀ de la musarmina 4 recombinante aislada de la fracción soluble, de la fracción insoluble, derivatizada con SPDP y formando parte de la inmunotoxina con el anticuerpo monoclonal 44G4.

b) Actividad N-glicosidasa de las proteínas inactivadoras de ribosomas

La actividad N-glicosidasa de las RIPs recombinantes se comprueba con la aparición del llamado “fragmento de Endo” (Endo y cols., *J. Biol. Chem.* 262, 5908-5912 [1987]).

En primer lugar, se incuban 70 μ l de lisado de reticulocitos de conejo con 0,4 μ g de la RIP, durante 15 minutos a 37°C, en una solución con un volumen total de 80 μ l que contiene 20 mM Tris-HCl (pH=7,8), 50 mM KCl, 5 mM DTT y 2mM de acetato de magnesio. La reacción se detiene añadiendo 2 μ l de EDTA 0,5 M pH=8 y 500 μ l de 0,5% SDS/50 mM Tris-HCl pH=7,6. El RNA se extrae 3 veces con 500 μ l de fenol saturado con Tris-HCl 10 mM pH=7,8 1mM EDTA; a continuación, se precipita con 2,5 vol. de etanol absoluto frío y 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH=5,2, y se mantiene 2 horas a -80°C. El RNA precipitado se recupera por centrifugación a 13000xg durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se lava con etanol al 70% frío, se deja secar al aire y, finalmente, se disuelve en 10 μ l de agua/DEPC.

Para provocar la liberación del fragmento diagnóstico, la muestra se incuba con 1 vol. de anilina 2 M pH=4,5 durante 10 minutos a 0°C, en oscuridad. El proceso se para por dilución con 200 μ l de agua/DEPC, y la anilina se retira realizando dos extracciones con 200 μ l de éter. El RNA se recupera por precipitación con etanol, según se ha descrito con anterioridad, y su concentración se determina por medida espectrofotométrica tras ser resuspendido en agua/DEPC.

La electroforesis del RNA se realiza en condiciones desnaturalizantes, en un gel de poliacrilamida al 5% [4,85% (p/v) de acrilamida y 0,15% (p/v) de bisacrilamida] con urea 7M, preparado según Sallustio y Stanley, *J Biol Chem.* 265, 582-588 [1990]. En cada pocillo se aplican 7 μ g de RNA disueltos en tampón de carga (sacarosa 130 mg/ml, urea 7M, TBEx1, azul de bromofenol 0,4 μ g/ml), que se han hervido previamente durante 90 segundos. Para desarrollar la electroforesis, se utiliza como tampón de cámara TBE, y se aplica una intensidad de corriente fija de 12 mA durante 130 minutos. Finalmente, el gel se tiñe con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 20 minutos y el RNA se visualiza con luz ultravioleta.

En la Figura 7 se observa la aparición del fragmento diagnóstico en las muestras incubadas con las musarminas, y tratadas, a continuación, con anilina. Esta actividad es común tanto a la proteína aislada de fracción soluble como a la obtenida de cuerpos de inclusión.

c) Cultivo de células animales

Los cultivos celulares de L929 (parentales y transfectadas con S-endoglina CD105) se mantienen en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera y con los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml); en el caso de la línea transfectada (L929-S), al medio de cultivo se añaden 400 μ g/ml de geneticina.

Las células se incuban a 37°C bajo atmósfera de 5% en CO₂ en un incubador Heraeus BB16. Estas líneas celulares crecen en monocapa y tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 horas. Antes de que adquieran confluencia, las células se subcultivan, para lo cual es necesario despegarlas del soporte mediante tripsinización en condiciones estériles. Se procede de la siguiente manera: en primer lugar, se retira el medio con una pipeta y se añade un volumen suficiente de tripsina/EDTA (0,05% tripsina y 0,02% EDTA en medio HBSS), que cubra la monocapa celular. A continuación, el frasco se introduce en el incubador a 37°C durante aproximadamente 5 minutos; después, se bloquea la tripsinización añadiendo un volumen apropiado de medio con suero, en el que se resuspenden las células. Se centrifugan durante 5 minutos a 300xg en una centrífuga ALC 4236, y se resuspende el sedimento de células en el medio adecuado. Seguidamente, se calcula la concentración de las suspensiones mediante el recuento de células en una cámara de Neubauer, en la que se añade una dilución al 50% (v/v) de éstas en azul de Trypan, un colorante que tiñe sólo las células inviables. Por último, se realizan las siembras a una concentración aproximada de 1x10⁴ células/ml, y el medio se renueva cada 3-4 días, cuando se observa un descenso en su pH.

Toda manipulación de las células se lleva a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo vertical HVR 2448 de Holtel LamiAir.

d) Efecto citotóxico de la inmunotoxina 44G4-musarmina 4 recombinante y la musarmina 4 recombinante

Para determinar la viabilidad celular se utiliza un método colorimétrico basado en la reducción y rotura de la sal de tetrazolio WST-1 por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. Como producto de esta reacción se genera formazán, un compuesto coloreado y soluble en el medio de cultivo celular, que se cuantifica espectrofotométricamente.

En este ensayo se utiliza una placa de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se añaden 3x10³ células resuspendidas en 0,1 ml del medio de cultivo apropiado. Las células se incuban durante 24 horas y, después, se sustituye el medio por otros 0,1 ml/pocillo de medio fresco.

ES 2 239 876 B1

Posteriormente, se lleva a cabo la adición de 5 μl /pocillo de las toxinas y conjugados correspondientes, diluidos en medio sin suero, y la placa se incuba durante 3 horas más. A continuación, se retira el contenido de los pocillos, se lava cada uno con 100 μl de medio sin suero y se vuelven a llenar con 100 μl de medio con suero.

- 5 Las células se incuban durante 72 horas y, transcurrido ese tiempo, se añaden 10 μl /pocillo del reactivo WST-1. Se deja desarrollar el color durante 1 hora, tras lo cual se procede a la medida con un lector de E.L.I.S.A. (Pasteur Diagnostic, mod. LP400/560) utilizando un filtro que permita medir a 450 nm (muestra) y a 620 nm (referencia). La lectura final es la diferencia entre ambas $A_{\text{final}} = A_{450} - A_{620}$.
- 10 Cada concentración de proteínas se ensaya en tres pocillos. A cada punto se le resta la contribución de la absorbancia del medio de cultivo y del WST-1 (blanco).

En cada experimento, se emplean como controles, al menos, 6 pocillos en los que se ha seguido el procedimiento anterior, a excepción del tratamiento con la toxina. Los valores de la absorbancia de estos pocillos se tomarán como 100% de viabilidad celular.

La inmunotoxina 44G4-musarina 4 recombinante causa el 50% de la muerte celular en L929-S a una concentración de $1,5 \times 10^{-9}$ M, y es 3 órdenes de magnitud más tóxica para estas células que la toxina aislada, que presenta un $IC_{50} = 1,4 \times 10^{-6}$ M (Figura 8). Por otra parte, el inmunoconjugado es inocuo en fibroblastos de ratón no transfectados con endoglina humana manteniéndose prácticamente el 100% de la viabilidad celular cuando las células se tratan con $1,4 \times 10^{-7}$ M de inmunotoxina. Por lo tanto, esta inmunotoxina es altamente específica sobre las células blanco. Asimismo, en la línea parental, la conjugación con el anticuerpo disminuye la toxicidad de la musarina recombinante, que aislada provocaría el 50% de muerte

Proteína	IC50	
	L929	L929-S
44G4-musarina 4 recombinante	$>10^{-7}$ M	$1,5 \times 10^{-9}$ M
musarina 4 recombinante	$2,2 \times 10^{-6}$ M	$1,4 \times 10^{-6}$ M

35 celular a una concentración de $2,2 \times 10^{-6}$ M. Actividad (IC_{50}) de la inmunotoxina 44G4-musarina 4 recombinante y la musarina 4 recombinante libre en distintas líneas celulares:

En la tabla se resumen los valores de los IC_{50} de la musarina 4 recombinante y de la inmunotoxina con el anticuerpo monoclonal 44G4 sobre las líneas celulares L929 y L929-S transfectada con el gen de la proteína CD105 humana.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante, **caracterizada** por la secuencia de aminoácidos SEQ ID n° 2.
2. Gen que codifica la proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** por la secuencia de nucleótidos SEQ ID n° 1.
- 10 3. Gen que codifica la proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante de acuerdo a la reivindicación 2, **caracterizado** por ser un polinucleótido obtenido por síntesis química.
- 15 4. Gen que codifica la proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** por ser un polinucleótido que contiene la secuencia o parte de la secuencia SEQ ID n° 1.
- 20 5. Gen de acuerdo a la reivindicación 4, **caracterizado** por una secuencia de ADN que codifica la musarmina 4 recombinante y otras proteínas funcionalmente activas.
6. Gen de acuerdo a la reivindicación 5, **caracterizado** por una secuencia de ADN que codifica la musarmina 4 recombinante y a péptidos y proteínas con propiedades de unión a ligandos específicos.
- 25 7. Gen de acuerdo a la reivindicación 6, **caracterizado** por una secuencia de ADN que codifica la musarmina 4 recombinante y a péptidos y proteínas con propiedades de unión a ligandos que son antígenos de superficie de células cancerosas.
- 30 8. Gen de acuerdo a la reivindicación 6, **caracterizado** por una secuencia de ADN que codifica la musarmina 4 recombinante y a péptidos y proteínas con propiedades de unión a ligandos que son antígenos de superficie celular de células infectadas por virus, en particular el virus responsable del SIDA.
- 35 9. Procedimiento para la obtención del gen que codifica la proteína inactivadora de ribosomas musarmina 4 recombinante que comprende las etapas: a) amplificación del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante por técnicas de PCR; b) análisis por 14 electroforesis en geles de agarosa del ADN amplificado por PCR que codifica a la musarmina 4 recombinante; c) introducción en el vector de clonación del ADN que codifica a la cadena de la musarmina 4 recombinante; d) transformación de células de *Escherichia coli* con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante; e) aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante; f) secuenciación de los plásmidos con inserto del ADN que codifica a la musarmina 4 recombinante.
- 40 10. Procedimiento de expresión del gen que codifica la musarmina 4 recombinante **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: a) producción del fragmento de ADN que codifica para la musarmina recombinante digerido con las enzimas de restricción Nde I y Hind III; b) inserción del fragmento de ADN de la musarmina 4 recombinante en el vector de expresión pET25(+) digerido; c) transformación de células de *Escherichia coli* con el vector recombinante que contiene el ADN que codifica para la musarmina 4 recombinante; d) aislamiento y análisis de las colonias con plásmidos recombinantes del ADN que codifica para la musarmina 4 recombinante; e) transformación de células de *E. coli* con el vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica la musarmina 4 recombinante; f) producción y purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción soluble citoplasmática; g) producción de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble de los cuerpos de inclusión citoplasmáticos; h) purificación de la musarmina 4 recombinante a partir de la fracción insoluble por renaturalización de los cuerpos de inclusión con un detergente y replegamiento por cromatografía de filtración en gel y posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico.
- 50 11. Procedimiento de obtención de la proteína inactivadora de ribosomas denominada musarmina 4 recombinante, que consiste en la inserción del gen de la musarmina 4 de acuerdo a las reiv. 2-8, en un vector de expresión e introducción del vector en una célula adecuada.
- 55 12. Procedimiento de acuerdo a la reiv. 11 en que la célula transformada es un microorganismo.
13. El microorganismo obtenido por el procedimiento de la reiv. 12.
- 60 14. Procedimiento de acuerdo a la reiv 11, en que la célula transformada es una célula eucarionte.
15. La célula huésped obtenida por el procedimiento de la reiv. 14.
- 65 16. Utilización del gen de acuerdo a las reiv 2-8, que codifica la proteína inactivadora de ribosomas musarmina 4, en la obtención de proteínas de fusión denominadas inmunotoxinas recombinantes, con afinidad por blancos específicos para la terapia del cáncer y SIDA por medio de los procedimientos de las reiv 10, 11, 12 y 14.

ES 2 239 876 B1

17. Utilización del gen de acuerdo a las reiv 2-8, que codifica la proteína inactivadora de ribosomas musarmina 4, en la obtención de plantas transgénicas resistentes a hongos fitopatogénicos, virus animales y predadores animales.
- 5 18. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la inactivación “*in vitro*” de ribosomas de cualquier origen sensibles a la proteína.
19. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la inactivación “*in vitro*” del ácido ribonucleico de mamíferos.
- 10 20. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la inactivación del ácido ribonucleico de plantas.
21. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la construcción de inmunotoxinas. y conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación de ribosomas de organismos eucariontes.
- 15 22. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la construcción de inmunotoxinas y conjugados con otras especies químicas destinados a promover la apoptosis de las células blanco y de las células dependientes de ellas.
- 20 23. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de los distintos tipos de cáncer.
24. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de enfermedades de mamíferos provocadas o mantenidas por virus y en particular los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de la hepatitis C.
- 25 25. Utilización de la proteína denominada musarmina 4 recombinante, obtenida por la expresión del gen de las reiv 2-8, en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de enfermedades de mamíferos y plantas en que dichas proteínas se empleen modificadas químicamente por alquilación y/o tiolación.
- 30 26. Una composición para el tratamiento terapéutico que comprende como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado, inmunotoxina o proteína obtenido por expresión del gen de las reiv 2-8, sola o como parte de una mezcla.
- 35 27. La composición de la reiv 26, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
28. La composición de las reiv 26,27 para su utilización en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas.
- 40 29. La composición de las reiv 26,27 para su utilización en el tratamiento contra la neovasculatura. tumoral.
30. La composición de las reiv 26,27 para su utilización en el tratamiento contra la angiogénesis asociada a enfermedades distintas de las neoplásicas.
- 45 31. Composición de acuerdo a reiv 26-30, en la que el brazo de conexión química es N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)-propionato o cualquier otro reactivo aceptable y con la misma finalidad.

50

55

60

65

Figura 1

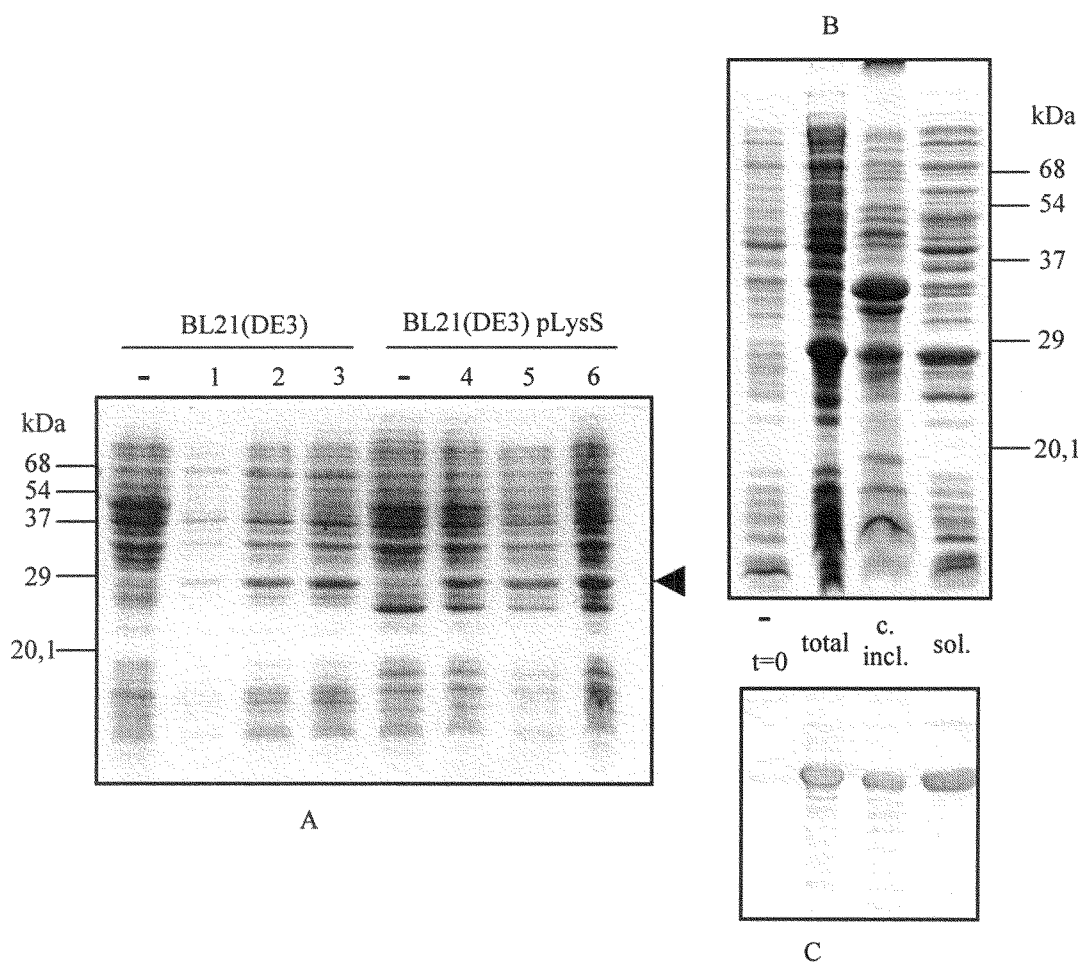


Figura 2

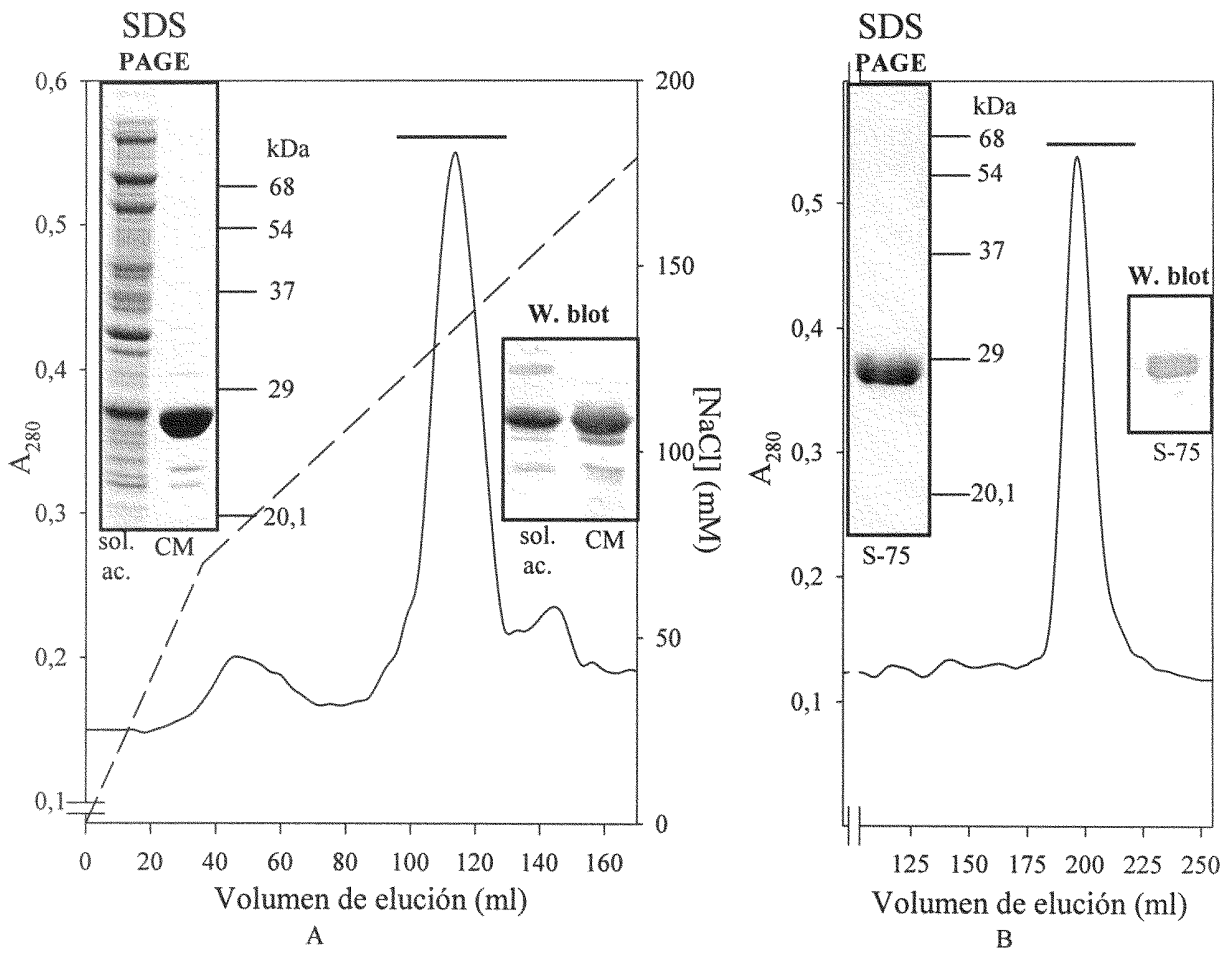


Figura 3

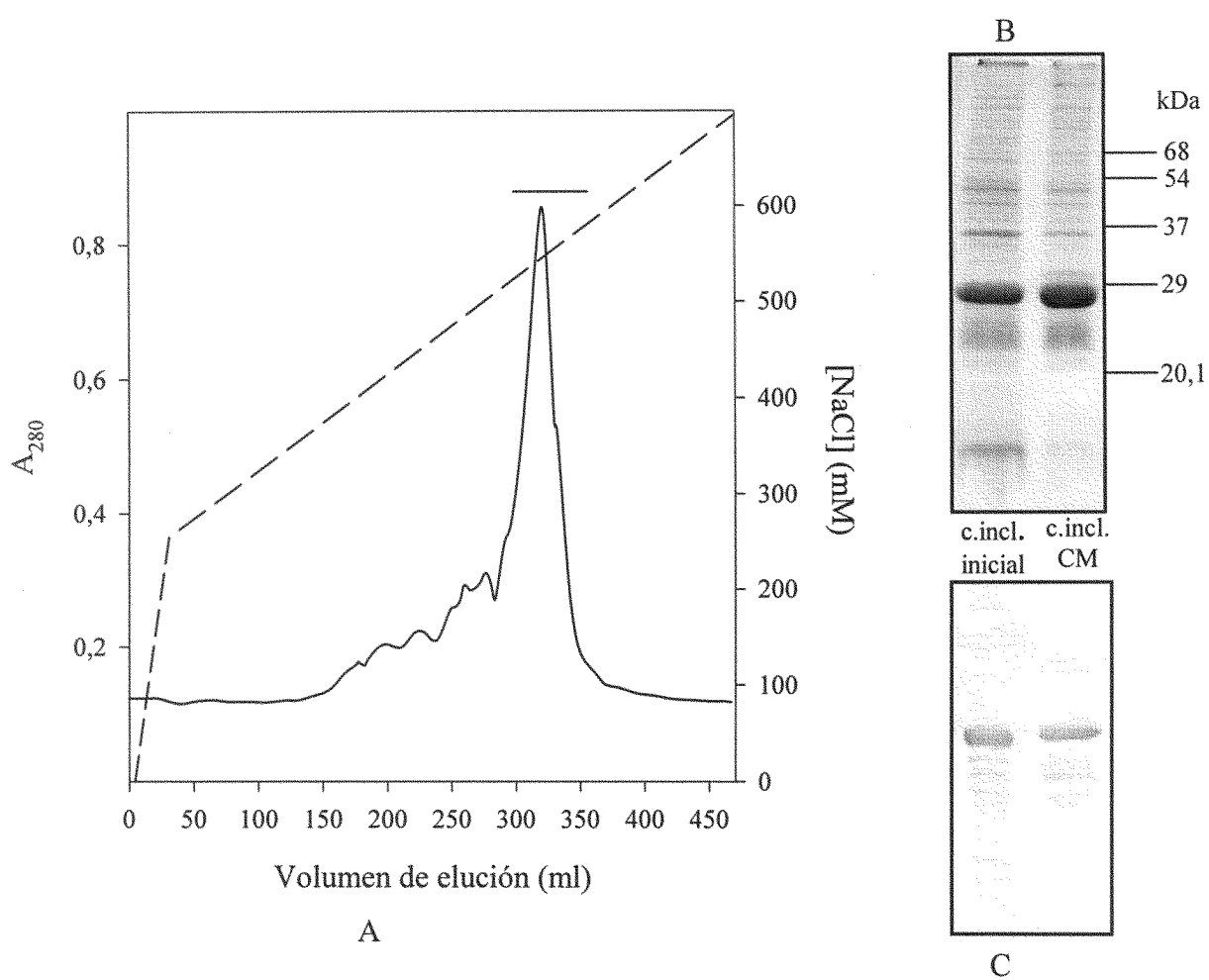


Figura 4

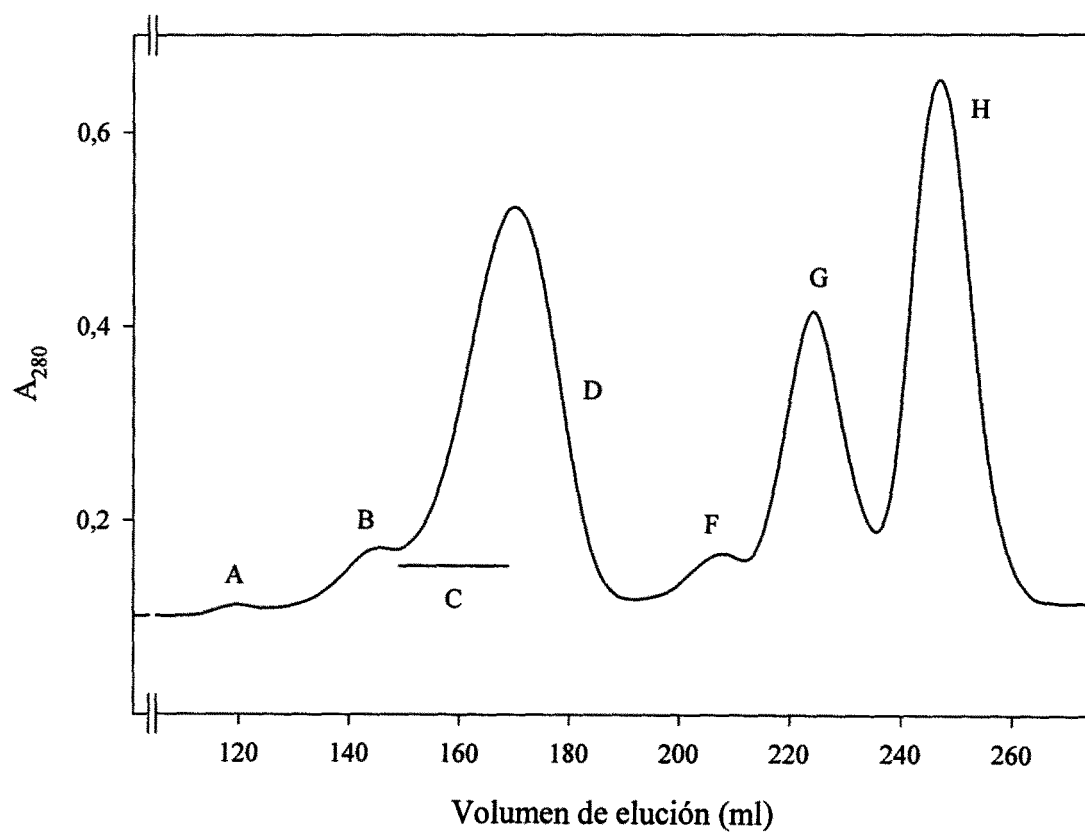


Figura 5

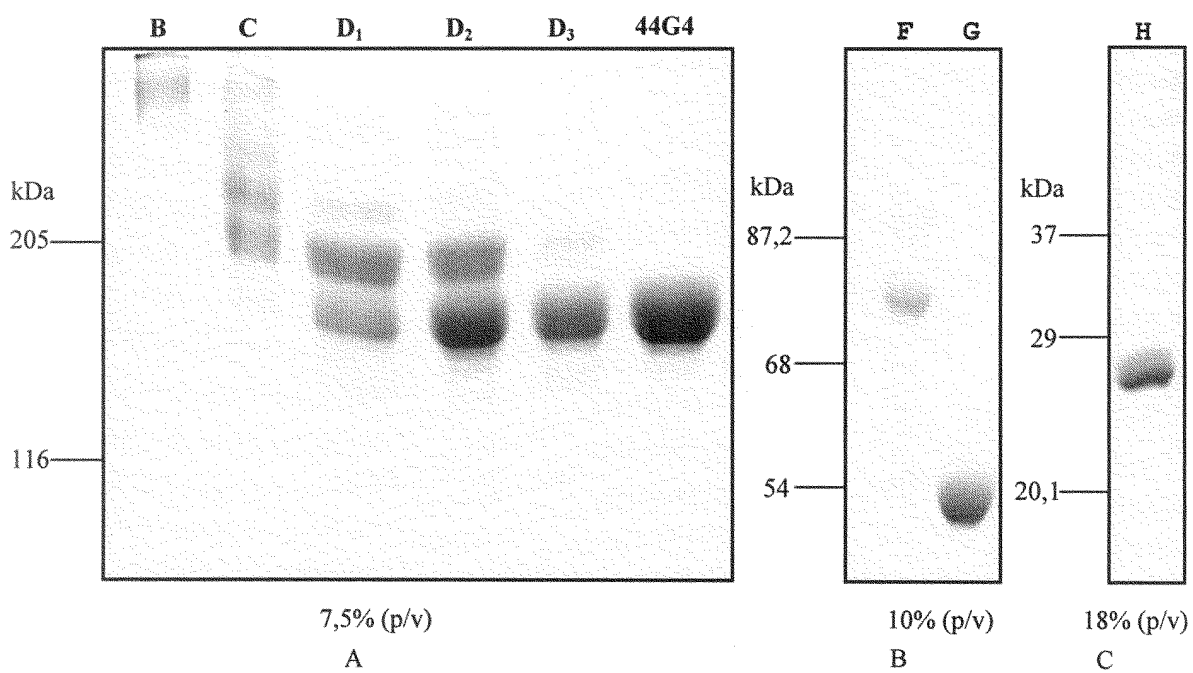


Figura 6

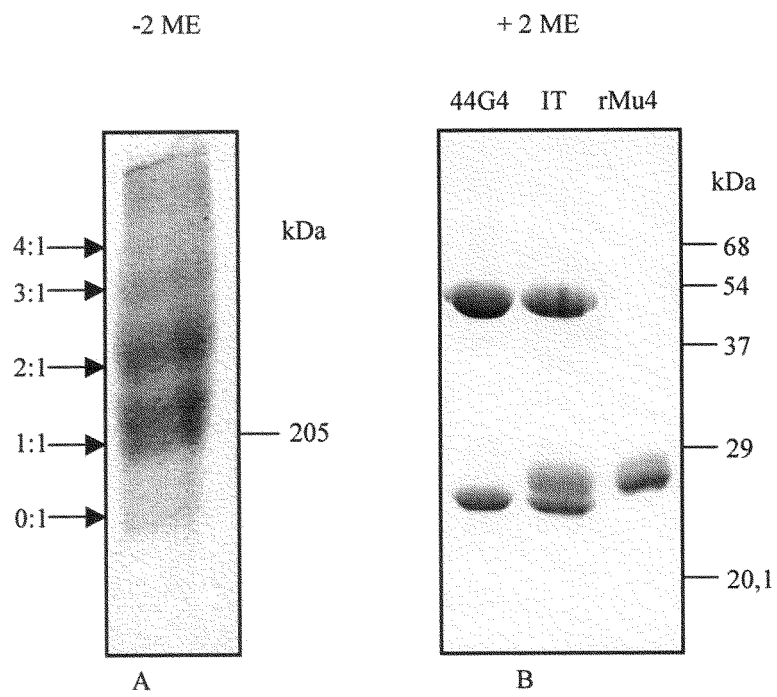


Figura 7

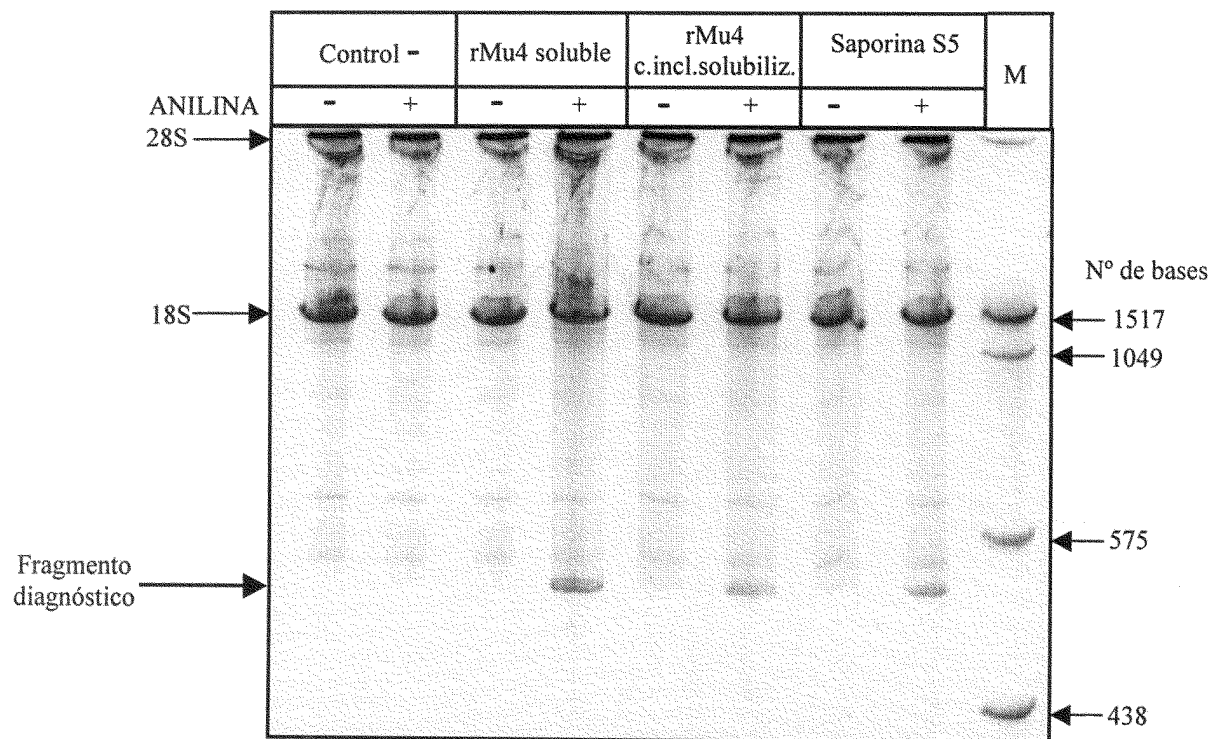
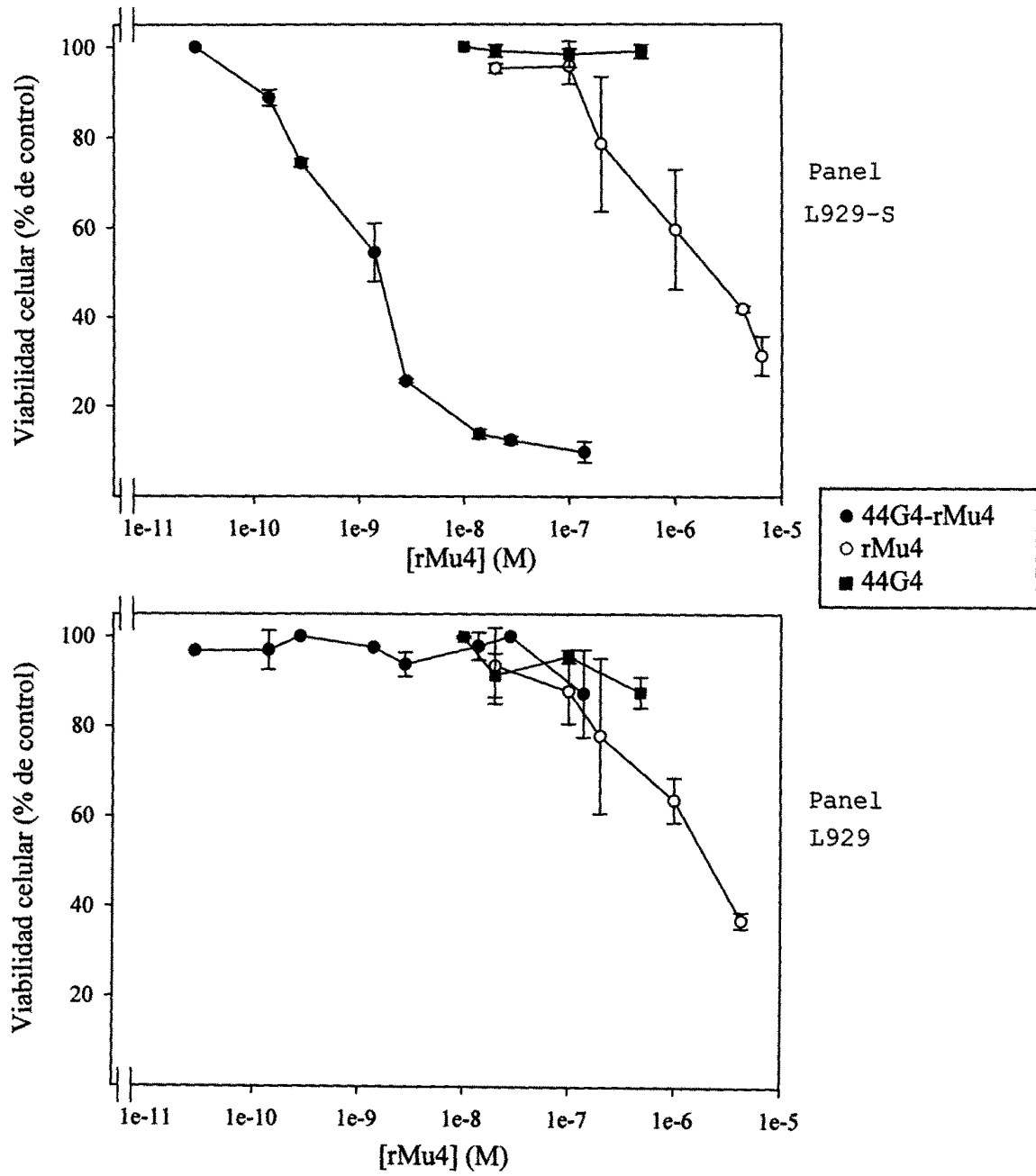


Figura 8



ES 2 239 876 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Girbés Juan, Tomás
 Barriuso Magdaleno, Begoña
 5 Antolín Martín, Pilar
 Arias Vallejo, Francisco J
 Muñoz Martínez, Raquel

<120> GEN QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA INACTIVADORA DE RIBOSOMAS DENOMINADA MUSAR-
 10 MINA 4 RECOMBINANTE, EXPRESIÓN EN SISTEMA BACTERIANO, PROCEDIMIENTO PARA LA
 OBTENCIÓN DE LA MUSARMINA 4 RECOMBINANTE Y APLICACIONES DE DICHA PROTEÍNA DE
 UTILIDAD EN LA TERAPIA DIRIGIDA A CÉLULAS BLANCO Y EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS
 RESISTENTES A HONGOS, VIRUS Y PREDADORES.

<130> Musarmina 4 recombinante
 15

<140>
 <141>

<160> 2
 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 832
 <212> ADN
 <213> MUSCARI ARMENIACUM
 30

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(828)
 35

<400> 1

40 cat atg gcc ggc caa gac ttt ctt acg gtg cag ttc aca gag acg ctc 48
 Met Ala Gly Gln Asp Phe Leu Thr Val Gln Phe Thr Glu Thr Leu
 1 5 10 15

45 aac acc gtc acc ctc aac cgc gct act tat aac gca acg atc acc agg 96
 Asn Thr Val Thr Leu Asn Arg Ala Thr Tyr Asn Ala Thr Ile Thr Arg
 20 25 30

50 ctc cgc aat cgg ctg gct caa aca tac gtg cct agc gtg ccg aac cta 144
 Leu Arg Asn Arg Leu Ala Gln Thr Tyr Val Pro Ser Val Pro Asn Leu
 35 40 45

55 ccg gtg ctg ccc gtc tac aac cag ata caa ccc cct caa ggg ttc gac 192
 Pro Val Leu Pro Val Tyr Asn Gln Ile Gln Pro Pro Gln Gly Phe Asp
 50 55 60

60 atc gtc ctg atc ggc gac ctc ggc cat acg acc acc ctg aga ttc cgc 240
 Ile Val Leu Ile Gly Asp Leu Gly His Thr Thr Thr Leu Arg Phe Arg
 65 70 75

65 cgc gac aac ctc tac ttg gtg ggc tac aac cag gcg ggc acc tgg ctc 288
 Arg Asp Asn Leu Tyr Leu Val Gly Tyr Asn Gln Ala Gly Thr Trp Leu
 80 85 90 95

70 gag ttc ggc agg gcc ggc gat cca cag ttc atc cgg ggc tcc cag ttc 336
 Glu Phe Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gln Phe Ile Arg Gly Ser Gln Phe
 100 105 110

ES 2 239 876 B1

ctg gga ttc acc ggc agc tac atc gag ctg gaa cgg ctt ggc ggc agc 384
 Leu Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Ile Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gly Ser
 115 120 125

5

gtg acg ggc atg gag atc aac cag gcc agg ctc ata acc gcc gta cag 432
 Val Thr Gly Met Glu Ile Asn Gln Ala Arg Leu Ile Thr Ala Val Gln
 130 135 140

10

caa ctc gcc cgc ccc agc act aac gct gtg agg gca aga gcg ttg gtc 480
 Gln Leu Ala Arg Pro Ser Thr Asn Ala Val Arg Ala Arg Ala Leu Val
 145 150 155

15

gtg gtg atc cag atg ttc agt gag gcc gcc cgg ttc atc tcc gtc tcc 528
 Val Val Ile Gln Met Phe Ser Glu Ala Ala Arg Phe Ile Ser Val Ser
 160 165 170 175

20

gac tac ttc gct tcc aac ctc gcc acg cct aac gca aag ctg ccc gca 576
 Asp Tyr Phe Ala Ser Asn Leu Ala Thr Pro Asn Ala Lys Leu Pro Ala
 180 185 190

25

tgg atg atg agg gat ctt cag aag aac tgg gct ctc att tct cgg gat 624
 Trp Met Met Arg Asp Leu Gln Lys Asn Trp Ala Leu Ile Ser Arg Asp
 195 200 205

30

gtc ctc agg tgg gat gct aga ccc agc tat aac atc ggg cgg ttc acc 672
 Val Leu Arg Trp Asp Ala Arg Pro Ser Tyr Asn Ile Gly Pro Phe Thr
 210 215 220

35

atc aac ggg aat cgc ata acc gac ttc cta cgg ctg cgc ccc tat tta 720
 Ile Asn Gly Asn Arg Ile Thr Asp Phe Leu Arg Leu Arg Pro Tyr Leu
 225 230 235

40

ggc atc ctc tac cgg tct acg gcc gac cgg ttt tct acc agt ctc tac 768
 Gly Ile Leu Tyr Arg Ser Thr Ala Asp Pro Phe Ser Thr Ser Leu Tyr
 240 245 250 255

45

gag gag atg aag acc ggt ctt gag ttt gcg gca cgt cgc ttt gga ccc 816
 Glu Glu Met Lys Thr Gly Leu Glu Phe Ala Ala Arg Arg Phe Gly Pro
 260 265 270

50

gtg atg gtc gct taag 832
 Val Met Val Ala
 275

<210> 2

<211> 275

55 <212> PRT

<213> MUSCARI ARMENIACUM

60

65

ES 2 239 876 B1

<400> 2

5 Met Ala Gly Gln Asp Phe Leu Thr Val Gln Phe Thr Glu Thr Leu Asn
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Asn Arg Ala Thr Tyr Asn Ala Thr Ile Thr Arg Leu
 20 25 30
 10 Arg Asn Arg Leu Ala Gln Thr Tyr Val Pro Ser Val Pro Asn Leu Pro
 35 40 45
 Val Leu Pro Val Tyr Asn Gln Ile Gln Pro Pro Gln Gly Phe Asp Ile
 15 50 55 60
 Val Leu Ile Gly Asp Leu Gly His Thr Thr Thr Leu Arg Phe Arg Arg
 65 70 75 80
 20 Asp Asn Leu Tyr Leu Val Gly Tyr Asn Gln Ala Gly Thr Trp Leu Glu
 85 90 95
 25 Phe Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gln Phe Ile Arg Gly Ser Gln Phe Leu
 100 105 110
 Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Ile Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gly Ser Val
 115 120 125
 30 Thr Gly Met Glu Ile Asn Gln Ala Arg Leu Ile Thr Ala Val Gln Gln
 130 135 140
 35 Leu Ala Arg Pro Ser Thr Asn Ala Val Arg Ala Arg Ala Leu Val Val
 145 150 155 160
 Val Ile Gln Met Phe Ser Glu Ala Ala Arg Phe Ile Ser Val Ser Asp
 165 170 175
 40 Tyr Phe Ala Ser Asn Leu Ala Thr Pro Asn Ala Lys Leu Pro Ala Trp
 180 185 190
 45 Met Met Arg Asp Leu Gln Lys Asn Trp Ala Leu Ile Ser Arg Asp Val
 195 200 205
 Leu Arg Trp Asp Ala Arg Pro Ser Tyr Asn Ile Gly Pro Phe Thr Ile
 210 215 220
 50 Asn Gly Asn Arg Ile Thr Asp Phe Leu Arg Leu Arg Pro Tyr Leu Gly
 225 230 235 240
 55 Ile Leu Tyr Arg Ser Thr Ala Asp Pro Phe Ser Thr Ser Leu Tyr Glu
 245 250 255
 Glu Met Lys Thr Gly Leu Glu Phe Ala Ala Arg Arg Phe Gly Pro Val
 260 265 270
 60 Met Val Ala
 275
 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 239 876

② Nº de solicitud: 200301318

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/29, 15/52, 9/22, C07K 14/415, A61K 38/56, A61P 31/18, 35/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ARIAS, F.J. et al. "Musarmins: three single-chain ribosome-inactivating protein isoforms from bulbs of <i>Muscari armeniacum</i> L. and Miller". INT. J. BIOCHEM. CELL BIOL. Vol. 35, nº 1, enero 2003, páginas 61-78, todo el documento.	1-31
A	ES 2115520 A1 (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 16.06.1998, todo el documento.	1-31

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 nº:

Fecha de realización del informe

26.08.2004

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1