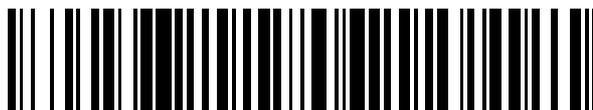


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 856**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2007 E 07842567 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2061313**

54 Título: **Utilización de péptido de soja (lunasina) para reducir la tasa de colesterol total y LDL**

30 Prioridad:

16.09.2006 US 966529 P
17.07.2007 US 7925

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2013

73 Titular/es:

SOY LABS LLC (100.0%)
3337 EMERALD LANE
JEFFERSON CITY, MO 65110, US

72 Inventor/es:

GALVEZ, ALFREDO FLORES

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel

ES 2 427 856 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** Esta invención hace referencia generalmente a composiciones para usar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colesterol en individuos. Más específicamente, esta invención hace referencia a una clase de péptidos que proporcionan a los individuos diversos beneficios relacionados con la salud y a composiciones que los comprenden. Más específicamente, esta invención hace referencia a novedosas composiciones que comprenden péptidos de soja, métodos de usar estas composiciones para reducir los niveles de colesterol total y LDL en individuos y métodos para preparar composiciones que los comprenden.
10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** La enfermedad coronaria (EC) es un importante problema sanitario en los EE. UU. con tasas de mortalidad que superan 1 millón anualmente. Los factores de riesgo incluyen fumar cigarrillos y la hipertensión, pero el colesterol plasmático elevado también ha sido involucrado como el factor de riesgo primario para la EC. Los niveles elevados de colesterol total y colesterol lipoproteína de baja densidad (LDL) contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas y eventualmente a trombosis o infarto de miocardio. Por ello el control de los niveles de colesterol es una parte esencial de las estrategias de prevención y tratamiento para reducir la incidencia, mortalidad y morbilidad de la enfermedad coronaria.
20

[0003] Existe una evidencia epidemiológica sustancial de que los factores dietéticos, tales como el consumo de determinadas proteínas de soja pueden ayudar a controlar los niveles de colesterol y a reducir el riesgo de EC en determinados individuos. Algunos estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de alimentos de soja está relacionado con un riesgo reducido de enfermedad cardiovascular en algunas poblaciones asiáticas **(1)**. Más recientemente, un estudio a gran escala, de 3 años, de un grupo de 75.000 mujeres chinas ha mostrado una relación dosis - respuesta entre la ingesta de alimentos de soja y el riesgo reducido de enfermedad coronaria, especialmente del infarto de miocardio no fatal **(2)**. Los resultados del metaanálisis de 38 estudios clínicos que involucraron 730 voluntarios a estudio, mostraron que la ingesta de proteína de soja estaba asociada con una reducción del 9,3% del colesterol sérico, una reducción del 12,9% en el colesterol LDL sérico, una reducción del 10,5% de los triglicéridos séricos y un incremento no significativo en los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) **(3)**. Los resultados clínicos de los experimentos que involucran proteína de soja han motivado que la Food and Drug Administration (FDA) permita una afirmación sanitaria en las etiquetas de alimentos declarando que 25 gramos de proteína de soja como parte de la dieta diaria baja en grasas saturadas y colesterol puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca.
25
30

35 **[0004]** Los componentes de la soja candidatos que podrían contribuir a su efecto hipocolesterolemico incluyen las proteínas de soja y sus componentes no proteínicos, saponinas e isoflavonas, genisteína y daidzeína. Lamentablemente, el cuerpo de datos experimentales indica que aún no está claro cuál de estos componentes proporciona efectos hipocolesterolemicos. Muchos han propuesto la hipótesis de que las isoflavonas de la soja son las responsables de reducir los niveles de colesterol en animales **(4-6)** y en la especie humana **(7-8)**. Notablemente, estos y otros estudios muestran que las isoflavonas de soja no proporcionan efectos reductores del colesterol. Por ejemplo, en un estudio, cuando extracto de soja rico en isoflavonas fue suministrado a monos cangrejeros en ausencia de proteína de soja no produjo efectos reductores del colesterol **(9)**.
40

[0005] En algunos estudios, cuando simplemente se añadió proteína de soja a la dieta del animal se observaron reducciones significativas en el colesterol **(10)**. El interés acerca de un mecanismo de acción cardioprotector viable atribuible a las isoflavonas **(11-13)** también ha moderado el entusiasmo acerca del papel de las isoflavonas en la reducción del riesgo de EC. Las saponinas, un grupo estructuralmente diferente de glucósidos triterpénicos o esteroideos, también han sido propuestas por su actividad hipocolesterolemica **(14)**. Sin embargo, no hay estudios convincentes en animales o en la especie humana así como mecanismo de acción viable que indique que las saponinas son las responsables de la actividad hipocolesterolemica de la soja. Lo mismo es cierto con las globulinas 7S, una importante proteína de almacenamiento de la soja que se encontró que inhibe la aterosclerosis en ratones pero no mostró efectos hipocolesterolemicos **(15)**.
45
50

[0006] En febrero de 2006, la American Heart Association publicó un informe científico consultivo sobre la proteína de soja, las isoflavonas y la enfermedad cardiovascular analizando recientes datos clínicos publicados desde la alegación sanitaria aprobada por la FDA **(16)**. Entre 19 estudios de isoflavonas de soja, la American Heart Association encontró que las isoflavonas, por término medio, no tienen efecto sobre el colesterol Lipoproteína de Baja Densidad ("colesterol LDL") u otros factores de riesgo lipídicos. El informe concluye que "Una cantidad muy grande de proteína de soja, más de la mitad de la ingesta diaria de proteínas, puede reducir el colesterol LDL en unos pocos puntos porcentuales cuando sustituye a la proteína dietaria de una mezcla de
55

proteínas animales. La evidencia favorece la proteína de soja en vez de las isoflavonas de soja como el nutriente responsable. Sin embargo, en este momento, no se puede descartar la posibilidad de que otro componente del haba de soja pudiera ser el factor activo. Por consiguiente, todavía no está claro qué componente o componentes de la proteína de soja proporcionan los efectos beneficiosos de reducción del colesterol que reducen el riesgo de EC. En consecuencia, los métodos actuales de reducir el colesterol usando proteína de soja han proporcionado resultados variables que ni están enfocados ni son altamente efectivos.

[0007] Un inconveniente adicional para el uso de los productos de soja descritos en las pruebas clínicas anteriores y avalados por la FDA, es la gran cantidad (25 mg/día) de producto de soja que se requiere para obtener un resultado beneficioso. Sería deseable tener una composición más concentrada que hiciera más fácil obtener niveles suficientes de la parte deseada del producto de soja, así como hacer la preparación y el envasado de dichos productos de soja más factibles.

[0008] Aunque US 2003/0027765A1, US 6391848A y US6107287A declaran composiciones farmacéuticas que comprenden lunasina, en particular para el tratamiento del cáncer, existe una necesidad de composiciones mejoradas y métodos relacionados para reducir con efectividad el colesterol total y LDL en individuos. La presente invención proporciona estos y otros beneficios relacionados.

[0009] DEFINICIONES

[0010] Para facilitar una comprensión de la invención, se definen varios términos y frases a continuación. A menos que se definan de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica usada en el presente documento, se pretende que tengan los significados corrientemente entendidos por los versados en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos términos con significados corrientemente entendidos se definen en el presente documento por claridad y/o referencia rápida y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe ser interpretada necesariamente como que representa una diferencia sustancial con la que es generalmente entendida en la técnica. Las técnicas y los procedimientos generales descritos o referenciados en el presente documento son generalmente bien entendidos y corrientemente empleados usando metodología convencional por los versados en la técnica. Según proceda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente se realizan generalmente de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante, a menos que se indique lo contrario.

[0011] Tal y como se usa en este documento, el número singular de los artículos definido e indefinido incluye las referencias al plural a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo “un” inhibidor de la enzima proteasa incluye uno o más inhibidores de la enzima proteasa.

[0012] Tal y como se usan en este documento “ug” es una abreviatura de microgramo y “uM” es una abreviatura de micromol.

[0013] Tal y como se usan en este documento, “actividad biológica” y “bioactividad” hacen referencia a las actividades *in vivo* de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que resultan de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. Actividad biológica, por consiguiente, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas y medidas en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar también dichas actividades.

[0014] Tal y como se usa en este documento, “biológicamente activa” hace referencia a una molécula que tiene las funciones estructurales, reguladoras y/o bioquímicas de una molécula de lunasina que en encuentra naturalmente.

[0015] Tal y como se usa en este documento, una “combinación” hace referencia a cualquier asociación entre dos o entre más elementos.

[0016] Tal y como se usa en este documento, el término “que sufre enfermedad” hace referencia a un sujeto (ej., un humano) que está experimentando una enfermedad particular. No se pretende que la presente invención se limite a signos o síntomas, ni enfermedad particulares. Por consiguiente, se pretende que la presente invención abarque sujetos que están experimentando cualquier rango de enfermedades (ej., desde manifestaciones subclínicas a una enfermedad totalmente desarrollada) en la que el sujeto presenta al menos algunos de los indicios (ej., signos y síntomas) asociados con la enfermedad particular.

[0017] Tal y como se usan en este documento, los términos “enfermedad”, “trastorno” y “estado patológico” se usan intercambiamente para describir un estado, signos y/o síntomas que están asociados con cualquier disfunción del estado normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el desempeño de las funciones normales y puede ser una respuesta a factores medioambientales (tales como malnutrición, peligros industriales o el clima), a agentes infecciosos específicos (tales como vermes, bacterias o virus), a defectos intrínsecos del organismo (tales como diversas anomalías genéticas) o a combinaciones de estos y otros factores.

[0018] Tal y como se usa en este documento, el término “cantidad efectiva” hace referencia a la cantidad de una composición (ej., que comprenda Lunasina) suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Una

cantidad efectiva puede ser administrada en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no está destinada a una formulación o vía de administración particular.

[0019] Tal y como se usan en este documento, los términos “administración” y “administrar” hacen referencia al acto de suministrar un fármaco, profármaco u otro agente, o tratamiento terapéutico (ej., composiciones de la presente invención) a un sujeto (ej., un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*) y/o indicar, instruir o aconsejar el uso de una composición para cualquier finalidad (preferiblemente para el uso descrito en el presente documento). Donde la administración de una o más de las presentes composiciones sea indicada, instruida o aconsejada, dicha indicación, puede ser la que instruya y/o informe al usuario que el uso de la composición puede proporcionar y/o proporcionará uno o más de los beneficios descritos en el presente documento.

[0020] Vías de administración ejemplo al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), la boca (oral), la piel (tópica o transdérmica), la nariz (nasal), los pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, por inyección (ej., intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitonealmente, etc.) y similares.

[0021] La administración que se indique puede comprender, por ejemplo, indicación verbal (ej., a través de la indicación verbal de, por ejemplo, un médico, profesional sanitario, profesional de ventas u organización y/o medios de radio o televisión (es decir, publicidad) o indicación escrita (ej., a través de la indicación escrita de, por ejemplo, un médico u otro profesional sanitario (ej., recetas), profesional de ventas u organización (ej., a través de, por ejemplo, folletos de marketing, panfletos u otra parafernalia instructiva), medios escritos (ej., Internet, correo electrónico u otros medios relacionados con la informática), y/o envases asociados con la composición (ej., una etiqueta presente en un envase que contiene la composición). Tal y como se usa en este documento, “escrito” indica por medio de palabras, imágenes, símbolos y/u otros descriptores visibles. Dicha indicación no necesita utilizar las palabras reales usadas en el presente documento sino, más bien, el uso de palabras, imágenes, símbolos y similares que transmitan el mismo o similar significado que el contemplado en el ámbito de la invención.

[0022] Tal y como se usan en este documento, los términos “coadministración” y “coadministrar” hacen referencia a la administración de al menos dos agente(s) (ej. composición que comprende Lunasina y uno u otros más agentes (ej., un inhibidor de la enzima proteasa) o terapias para un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones se administra un primer agente / terapia antes de un segundo agente / terapia. Los versados en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. La dosificación apropiada para la coadministración puede ser rápidamente determinada por el versado en la técnica. En algunas realizaciones cuando se coadministran agentes o terapias, los respectivos agentes o terapias se administran a dosificaciones inferiores a las apropiadas para su administración aislada. Por consiguiente, la coadministración es especialmente deseable en realizaciones donde la coadministración de los agentes o terapias reduce la dosificación requerida de un agente o agentes potencialmente nocivos (ej. tóxicos) y/o cuando la coadministración de dos o más agentes da lugar a la sensibilización un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes a través de la coadministración del otro agente.

[0023] Tal y como se usa en este documento, el término “tratamiento” o equivalentes gramaticales abarca la mejora y/o reversión de los síntomas de la enfermedad (ej., enfermedad cardíaca). Una composición que produce una mejora en cualquier parámetro asociado con la enfermedad cuando se usa en los métodos de cribado de la invención inmediata puede por consiguiente ser identificada como una composición terapéutica. El término “tratamiento” hace referencia a ambos el tratamiento terapéutico y las medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, los que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen los que ya tienen una enfermedad y/o trastorno (ej., niveles de colesterol elevados) así como aquellos a los que se ha de prevenir una enfermedad y/o trastorno (ej., usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

[0024] Tal y como se usa en este documento, el término “en riesgo de enfermedad”, hace referencia a un sujeto (ej. un humano) que está predispuesto a experimentar una enfermedad determinada. Esta predisposición puede ser genética (ej. una tendencia genética particular para experimentar la enfermedad, tal como trastornos genéticos), o debido a otros factores (ej., edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el medio ambiente, etc.). Por consiguiente, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún riesgo particular ni se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier enfermedad particular.

[0025] Tal y como se usan en este documento, los términos “individuo”, “portador”, “sujeto” y “paciente” hacen referencia a cualquier animal, incluyendo pero no limitados a, animales humanos y no humanos (por ejemplo, sin limitación, primates, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, roedores, aves, peces, crustáceos, etc.) que se estudien analicen, ensayen, diagnostiquen o traten. Tal y como se usan en este documento, los términos “individuo”, “portador”, “sujeto” y “paciente” se usan intercambiamente, a menos que se indique lo contrario.

[0026] Tal y como se usa en este documento, el término “anticuerpo” (o “anticuerpos”) hace referencia a cualquier inmunoglobulina que se una específicamente a un determinante antigénico y se una específicamente a proteínas idéntica o estructuralmente relacionadas con el determinante antigénico que estimuló su producción.

Por consiguiente, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos para detectar el antígeno que estimuló su producción. Los anticuerpos monoclonales se derivan de un solo clon de linfocitos B (es decir, células B), y tienen generalmente estructura homogénea y especificidad antigénica. Los anticuerpos policlonales se originan a partir de muchos clones diferentes de células productoras de anticuerpos y, por consiguiente, son heterogéneos en su estructura y especificidad del epitoma, pero todos reconocen al mismo antígeno. También se pretende que el término “anticuerpo” abarque cualquier inmunoglobulina (ej., IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) obtenida de cualquier origen (ej., de la especie humana, de roedores, primates no humanos, lagomorfos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos, etc.).

[0027] Tal y como se usa en este documento, el término “antígeno” se usa en referencia a cualquier sustancia que se capaz de ser reconocida por un anticuerpo.

[0028] Tal y como se usan en este documento, los términos “Western blot”, “Western inmunoblot”, “inmunoblot” y “Western” hacen referencia al análisis inmunológico de proteína o proteínas, polipéptidos o péptidos que han sido inmovilizados en un soporte de membrana. Las proteínas son resueltas primero por electroforesis en gel de poliacrilamida (es decir, SDS-PAGE) para separar las proteínas, seguido por la transferencia de la proteína desde el gel a un soporte sólido tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Las proteínas inmovilizadas se exponen luego a un anticuerpo que tenga reactividad hacia un antígeno de interés. La unión del anticuerpo (es decir, el anticuerpo primario) se detecta usando un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está típicamente conjugado a un enzima que permite visualizar el complejo antígeno-anticuerpo mediante la producción de un producto de reacción coloreado o catalizando una reacción enzimática luminiscente (ej., el reactivo ECL, Amersham).

[0029] El término “compuesto” hace referencia a cualquier entidad química, farmacéutica, fármaco, y similares que se puede usar para tratar o prevenir una enfermedad, padecimiento, o trastorno de las funciones corporales. Los compuestos comprenden ambos compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Los compuestos incluyen polipéptidos tales como los descritos en el presente documento.

[0030] Tal y como se usa en este documento, el término “tóxico” hace referencia a cualquier efecto perjudicial o nocivo sobre un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del tóxico.

[0031] Tal y como se usa en este documento, el término “composición farmacéutica” hace referencia a la combinación de un agente activo (ej., Lunasina) con un portador, inerte o activo, que hace la composición especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

[0032] Los términos “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable”, tal y como se usan en este documento, hacen referencia a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, ej., reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

[0033] Tal y como se usa en este documento, el término “tópicamente” hace referencia a la aplicación de la composición de la presente invención a la superficie de la piel y células mucosas y tejidos (ej., mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatoria o nasal, y otros tejidos y células que recubren órganos huecos o cavidades corporales).

[0034] Tal y como se usa en este documento, el término “portador farmacéutico aceptable” hace referencia a cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar incluyendo, pero no limitados a, solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (ej., tales como emulsiones aceite / agua o agua / aceite) y varios tipos de agentes humectantes, cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, laurilsulfato sódico, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, desintegradores (ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico) y similares. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservadores. Para ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes. (Ver ej., Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa (1975)).

[0035] El término “gen” hace referencia a una secuencia de ácido nucleico (ej., ADN) que comprende secuencias de código necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (ej., ARNr, ARNt). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia de código de longitud total o por cualquier porción de la secuencia de código tan larga como se retengan la actividad o las propiedades funcionales deseadas (ej., actividad enzimática, unión del ligando, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) de la longitud total o del fragmento. El término también abarca la región de codificación de un gen estructural y las secuencias situadas adyacentes a la región codificada en ambos extremos 5' y 3' durante una distancia de alrededor de 1 kb o más en cada extremo tal que el gen corresponda a la longitud de la longitud total del ARNm. Las secuencias situadas 5' de la región codificada y presentes en el ARNm se refieren como secuencias 5' no traducidas. Las secuencias situadas 3' o posteriores de la región codificada se refieren como secuencias 3' no traducidas. El término “gen” abarca ambas formas ADNc y genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificada interrumpida con secuencias no codificadas denominadas “intrones” o “regiones intermedias” o “secuencias intermedias”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o “desempalman” de la transcripción nuclear o primaria; los intrones por consiguiente están ausentes en el ARN mensajero (ARNm) transcrito. El

ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia u orden de los aminoácidos en un polipéptido incipiente.

[0036] Tal y como se usan en este documento, los términos “expresión del gen” y “expresión” hacen referencia a los procesos de conversión de la información genética codificada en un gen en ARN (ej., ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) por medio de la “transcripción” del gen (es decir, por medio de la acción de una ARN polimerasa) y para los genes codificadores de proteína, en proteína mediante la “traducción” del ARNm. La expresión del gen se puede regular en muchas etapas del proceso. “Regulación al alza” o “activación” hacen referencia a la regulación que incrementa y/o mejora la producción de los productos de expresión del gen (ej., ARN o proteína), mientras que “regulación a la baja” o “represión” hacen referencia a la regulación que reduce la producción. Las moléculas (ej., factores de transcripción) que están involucradas en la regulación al alza o a la baja se llaman frecuentemente “activadoras” y “represoras”, respectivamente.

[0037] Tal y como se usa en este documento, el término “promotor / secuencia reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto gen ligado operativamente al promotor / secuencia reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia de promotor nuclear y en otros casos, esta secuencia puede también incluir una secuencia de potenciador y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto gen. El promotor / secuencia reguladora puede, por ejemplo, ser uno que exprese el producto gen en una forma específica de tejido.

[0038] Tal y como se usa en este documento, el término “cultivo celular” hace referencia a cualquier cultivo *in vitro* de células. Incluidos en este término están las líneas celulares continuas (ej., con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (ej., células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

[0039] Tal y como se usa en este documento, el término “*in vitro*” hace referencia a un medio ambiente artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un medio ambiente artificial. Los ambientes *in vitro* pueden consistir en, pero no estar limitados a, tubos de ensayo y cultivo celular. El término “*in vivo*” hace referencia al medio ambiente natural (ej., un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen en dentro de un medio ambiente natural.

[0040] Tal y como se usa en este documento, “aminoácido” hace referencia a cualquiera de los aminoácidos presentes de forma natural que tienen las denominaciones estándar listadas en la Tabla 1 que sigue. También hace referencia a aquellos aminoácidos sintéticos conocidos. A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de aminoácidos listadas en esta descripción se listan en el orden desde el término amino al término carboxilo. Tal y como se usa en este documento, las abreviaturas para cualesquiera grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos son acordes con su uso común, abreviaturas reconocidas o la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, a menos que se indique lo contrario (ver *Biochemistry* 11:1726 (1972)). Tal y como se usan en este documento, los restos de aminoácidos están representados por el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente a ellos o por el código de una letra correspondiente a ellos, como se indica en la tabla siguiente:

TABLA 1

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparragina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

[0041] Tal y como se usan en este documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” todos ellos hacen referencia a una secuencia primaria de aminoácidos que están unidos por “enlaces peptídicos” covalentes. En general, un péptido consta de unos pocos aminoácidos, típicamente de 2 a 50 aminoácidos. El término “polipéptido” abarca péptidos y proteínas, en las que el término “proteína” hace referencia típicamente a grandes polipéptidos y el término “péptido” hace referencia típicamente a polipéptidos cortos. En algunas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína es sintético, mientras que en otras realizaciones el péptido, polipéptido o proteína es recombinante o se encuentra de forma natural. Un péptido “sintético” es un péptido que es producido por medios artificiales *in vitro* (es decir, no fue producido *in vivo*). El término “péptido” incluye además aminoácidos modificados (se encuentren de forma natural o no natural), dichas modificaciones incluyendo, pero no limitadas a, fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidización y metilación.

[0042] Un “péptido aislado” es un péptido que ha sido separado sustancialmente de componentes (ej. ADN, ARN, otras proteínas y péptidos, carbohidratos y lípidos) que le acompañan naturalmente en una célula.

[0043] Como se aplica a los polipéptidos, el término “identidad sustancial” significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando gap weights (penalización por creación de hueco) por defecto, comparten al menos el 80% de identidad de la secuencia, preferiblemente al menos el 90% de identidad de la secuencia, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de la secuencia o más (ej., 99% de identidad de la secuencia). Preferiblemente, las posiciones del resto que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

[0044] La frase “funcionalmente equivalente” significa que la variante, análogo o fragmento de un polipéptido retiene una actividad biológica deseada en común con el polipéptido lunasina. En al menos una realización de la presente invención la actividad biológica deseada en común con la lunasina es la actividad biológica relacionada con el control, estabilización o reducción en la producción o niveles existentes de colesterol, colesterol LDL, colesterol total o lípidos. Preferiblemente, una cantidad dada del *análogo*, *variante* o fragmento es al menos 10%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 50, 60, 80, 90, 95 o 99% tan efectivo como una cantidad equivalente de la lunasina encontrada naturalmente de la cual se deriva el *análogo*, *variante* o fragmento. La determinación de la eficacia relativa del *análogo*, *variante* o fragmento se puede llevar a cabo fácilmente utilizando una cantidad prescrita del *análogo*, *variante* o fragmento en el uno o más de los métodos de ensayo de la invención y comparando luego la capacidad del análogo, variante o fragmento con la lunasina encontrada naturalmente en ensayos que midan la capacidad de la muestra para inhibir la acetilación de la histona H3, o para efectuar la expresión de la reductasa HMG Co-A, Sp1 o del receptor LDL.

[0045] El término “análogo” tal y como se usa en este documento con referencia a un polipéptido significa un polipéptido que es un derivado del polipéptido de la invención, cuyo derivado comprende adición, supresión, y/o sustitución de uno o más aminoácidos, tales que el polipéptido retenga sustancialmente la misma función que el polipéptido lunasina identificado a continuación.

[0046] El término “fragmento” hace referencia a una molécula de polipéptido que es un constituyente de la longitud total del polipéptido lunasina y posee actividad biológica cualitativa en común con la longitud total del polipéptido lunasina. El fragmento puede ser derivado de la longitud total del polipéptido lunasina o de forma alternativa puede ser sintetizado por algunos otros medios, por ejemplo síntesis química. Por referencia a “fragmentos” se entiende que abarcan fragmentos de una proteína que son de al menos 5, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 y más preferiblemente al menos 30, 40 o 50 aminoácidos de longitud y que son funcionalmente equivalentes a la proteína de la que son un fragmento.

[0047] El término “variante”, tal y como se usa en este documento, hace referencia a un polipéptido que es producido a partir de un ácido nucleico que codifica la lunasina, pero que difiere de la lunasina de tipo nativo en que es procesado de forma diferente de modo que tiene una secuencia de aminoácidos alterada. Por ejemplo, una variante puede ser producida por un patrón de empalme alternativo del ARN primario transcrito al que produce la lunasina de tipo nativo.

[0048] Análogos y variantes se entiende que abarcan proteínas que tienen secuencias aminoacídicas que difieren de la proteína de la que derivan en virtud de la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos para dar lugar a una secuencia aminoacídica que es preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 80%, particularmente preferible al menos 85, 90, 95, 98, 99 o 99,9% idéntica a la secuencia aminoacídica de la proteína original. Los análogos o las variantes incluyen específicamente variantes polimórficas y análogos interespecies. Los análogos y las variantes de la presente invención además pueden tener cambios “conservadores”, en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares. Un tipo de sustitución aminoacídica conservadora hace referencia a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales conteniendo azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución aminoacídica conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Más raramente, una variante puede tener cambios “no conservadores” (ej., sustitución de una glicina con un triptófano). Variaciones menores similares también pueden incluir supresiones o inserciones de aminoácidos (es decir, adiciones), o ambas. Orientaciones para determinar cuáles y cómo muchos restos aminoacídicos pueden ser sustituidos, insertados o suprimidos sin anular la actividad biológica se pueden encontrar usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTar. Las variantes se pueden ensayar en ensayos funcionales tales como los que se describen en la sección Ejemplos que sigue.

[0049] El término “sustitución de aminoácidos conservadora” tal y como se usa en este documento, hace referencia a una sustitución o reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares dentro de una cadena polipeptídica (secuencia primaria de una proteína). Por ejemplo, la sustitución del aminoácido ácido glutámico (Glu) cargado por el aminoácido ácido aspártico (Asp) cargado similarmente sería una sustitución aminoacídica conservadora.

[0050] Tal y como se usa en este documento, “lunasina” hace referencia al polipéptido lunasina de soja natural, sintética o recombinantemente obtenido que se estipula en (SEQ. ID. 1). La descripción adicional del péptido Lunasina y una evaluación de varios fragmentos y análogos funcionalmente equivalentes aparece en las patentes US 6.107.287, US 6.544.956, la solicitud de patente 2003/0229038 presentada el 22 de noviembre de 2002, patente US 6.391.848, la solicitud de patente US nº 10/252.256, presentada el 23 de septiembre de 2002 y la solicitud de patente US nº 10/302.633 presentada el 22 de noviembre de 2002. Estas descripciones orientarán al versado en la técnica a identificar fragmentos, variantes y análogos funcionalmente equivalentes y biológicamente activos de la lunasina.

[0051] Tal y como se usa en este documento, “enriquecido en lunasina” hace referencia a composiciones que contienen niveles biológicamente activos de lunasina encontrada de forma natural, o de un análogo de lunasina encontrado de forma natural que está a una concentración superior a la que se encuentra la lunasina en el material usado como fuente de lunasina o de análogo. Tal y como se usa en este documento, “extracto de semillas enriquecido en lunasina” hace referencia a composiciones que contienen niveles biológicamente activos de lunasina encontrada de forma natural, o un análogo de lunasina encontrado de forma natural, que esté a una concentración al menos doble de a la que la lunasina se encuentra naturalmente en la semilla origen. Sin limitar la invención a ninguna fuente particular de las composiciones de la presente invención, las composiciones enriquecidas en lunasina se pueden obtener de haba de soja, trigo, cebada, aislados de soja, concentrados de soja u otros productos derivados de la soja, sean o no obtenidos comercialmente.

[0052] Tal y como se usa en este documento, “harina de soja protectora de lunasina” hace referencia a composiciones de harina de soja que comprenden harina de soja y una cantidad de inhibidor de proteasa suficiente para proteger la lunasina, o un análogo, variante o fragmento de la misma, de la digestión completa, en las que las composiciones no tienen niveles de elementos antinutritivos que produzcan un efecto adverso en un individuo que las ingiera.

[0053] Tal y como se usa en este documento, “digerido” hace referencia al tratamiento de un polipéptido con un material digestivo que lo descomponga en sus aminoácidos componentes. Ejemplos de materiales digestivos que se pueden usar son bien conocidos en la técnica, e incluyen sin limitación, pancreatina y otras proteasas tales como tripsina, quimotripsina, pepsina, Proteinasa K, termolisina, trombina, Arg-C proteinasa, Asp-N endopeptidasa, AspN endopeptidasa + N terminal Glu, BNPS-escatol, CNBr, clostripaina, ácido fórmico, glutamil endopeptidasa, ácido iodosobenzoico, Lys-C, LysN, NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico) y peptidasa estafilocócica.

[0054] Tal y como se usa en este documento, “parcialmente digerido biológicamente activo” en relación con un polipéptido hace referencia al tratamiento de un polipéptido con un material digestivo en condiciones que incrementen la actividad biológica del polipéptido.

[0055] La frase "terapia combinada" abarca la administración de una composición de la presente invención conjuntamente con otro agente farmacéutico que esté indicado para el tratamiento o la prevención de un trastorno, como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso por la acción conjunta de estos agentes terapéuticos.

5 **[0056]** Referenciados en este documento están los nombres comerciales de los componentes que incluyen diversos ingredientes utilizados en la presente invención. Los inventores en este documento no pretenden estar limitados por materiales bajo un determinado nombre comercial. En las descripciones en este documento se pueden sustituir y utilizar materiales equivalentes (ej., los obtenidos de un origen diferente bajo un nombre o número de referencia diferente) a los referenciados por nombre comercial.

10 **[0057]** Las composiciones que en este documento pueden comprender, constan esencialmente de, o constan de cualquiera de los elementos como se describen en este documento.

[0058] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, inmunología y cinética de proteínas, que están dentro de la técnica. Dichas técnicas se explican totalmente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1969) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Métodos in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedimientos (A. Doyle, J. B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Métodos in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); y Mass isotopomer distribution analysis at eight years: theoretical, analytic and experimental considerations by Hellerstein and Neese (Am J Physiol 276 (Endocrinol Metab. 39) E 1146-E1162, 1999). Además, los procedimientos que emplean kits y reactivos de ensayo disponibles comercialmente se usarán típicamente con arreglo a los protocolos definidos por el fabricante a menos que se indique lo contrario.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0059] La presente descripción generalmente hace referencia a productos y métodos relacionados que usan péptidos relacionados con la soja para reducir los niveles de colesterol total y LDL en individuos. La invención se define en la reivindicación 1.

35 **[0060]** En una realización, la presente invención proporciona composiciones para usar en métodos para reducir los niveles de colesterol en un individuo, que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el péptido de SEQ ID NO 2 y una variante, fragmento o análogo funcionalmente equivalente de dicho péptido. En determinadas realizaciones, el compuesto se obtiene del haba de soja, trigo o cebada, o produciendo, extrayendo y purificando dicho compuesto usando técnicas de ADN recombinante o por producción sintética del polipéptido. En determinadas realizaciones, el individuo es humano. En determinadas realizaciones, la composición es para ingestión oral y en determinadas realizaciones la composición es en forma de cápsula, tableta, polvo, formulación semisólida, líquido, gel, suspensión o pulverización por aerosol. En determinadas realizaciones, la composición contiene además harina de soja. En determinadas realizaciones la harina de soja es harina de soja protectora de lunasina. En determinadas realizaciones preferidas la composición comprende además inhibidor de quimotripsina. En determinadas realizaciones el compuesto es para administración a dicho individuo a entre 0,05 mg/kg y 50 mg/kg diariamente. En determinadas realizaciones, el individuo está en riesgo por aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio, ataque cardíaco, diabetes, enfermedad coronaria, angina de pecho o angina inestable.

50 **[0061]** En otra realización, esta invención proporciona composiciones para usar en métodos para tratar o prevenir enfermedad cardiovascular que comprenden un compuesto seleccionado del grupo consistente del péptido de SEQ ID NO 2 y una variante, fragmento o análogo equivalente de dicho péptido. En determinadas realizaciones los compuestos se obtienen del haba de soja, trigo o cebada, o produciendo, extrayendo y purificando dicho compuesto usando técnicas de ADN recombinante o mediante producción sintética del polipéptido, o en el que dicha persona es humana. En determinadas realizaciones la composición es para ingestión oral, y en determinadas realizaciones la composición está en forma de cápsula, tableta, polvo, formulación semisólida, líquido, gel, suspensión, o pulverización por aerosol. En determinadas realizaciones, la composición contiene además harina de soja. En determinadas realizaciones preferidas la composición comprende además inhibidor de quimotripsina. En determinadas realizaciones el compuesto es para administración a dicha persona a entre 0,05 mg/kg y 50 mg/kg diariamente. En determinadas realizaciones, el

individuo está en riesgo por aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio, ataque cardíaco, diabetes, enfermedad coronaria, angina de pecho o angina inestable.

5 **[0062]** Aspectos no inventivos hacen referencia a composiciones que comprenden un péptido biológicamente activo parcialmente digerido de SEQ ID NO 1. Por ejemplo, la composición también comprende un inhibidor de quimotripsina. Por ejemplo la composición comprende además harina de soja.

10 **[0063]** Aspectos no inventivos hacen referencia a composiciones que comprenden extractos de semillas y harina de soja enriquecidos en lunasina. Por ejemplo, la proporción en peso del extracto de semillas enriquecido en lunasina y la harina de soja está entre a) 90% de extracto de semillas enriquecido en lunasina a 10% de harina de soja y b) 60% de extracto de semillas enriquecido en lunasina a 40% de harina de soja, preferiblemente 70% de extracto de semillas enriquecido en lunasina a 30% de harina de soja. Por ejemplo, la harina de soja comprende un inhibidor de quimotripsina. Por ejemplo, la lunasina está presente en las composiciones en una concentración de entre 0,05% y 5% en peso de la composición.

15 **[0064]** Aspectos no inventivos hacen referencia a métodos para mejorar la actividad biológica de la lunasina comprenden: a) proporcionar lunasina, y b) digerir parcialmente dicha lunasina. En determinadas realizaciones, la harina de soja está presente mientras se digiere la lunasina.

20 **[0065]** Aspectos no inventivos que hacen referencia a métodos para disminuir o reducir los niveles de colesterol en una persona, comprenden: proporcionar un producto conteniendo un péptido seleccionado del grupo consistente del péptido de SEQ ID NO 2 y un fragmento, variante o análogo funcionalmente equivalente de SAQ ID NO 2; y reivindicar que el producto reduce o mantiene los niveles de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos en una persona que consume la composición. Por ejemplo, el péptido se obtiene del haba de soja, trigo, cebada o produciendo, extrayendo y purificando dicho compuesto utilizando técnicas de ADN recombinante o por producción sintética del polipéptido. Por ejemplo, el individuo es un humano. Por ejemplo, la administración comprende ingestión oral de la composición y la composición está en la forma de una cápsula, tableta, polvo, formulación semisólida, líquido, gel, suspensión, o pulverización por aerosol. Por ejemplo, la composición
25 contiene además harina de soja. Por ejemplo, la composición comprende además inhibidor de quimotripsina. En determinadas realizaciones la composición se administra a entre 25 mg/kg y 100 mg/kg diariamente. Por ejemplo, el individuo está en riesgo por aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio, ataque cardíaco, diabetes, enfermedad coronaria, angina de pecho o angina inestable

30 **[0066]** Aspectos no inventivos hacen referencia a un método de reducir o mantener los niveles de colesterol, comprendiendo: proporcionar a un humano en necesidad de ello una cantidad biológicamente activa del péptido de SEQ ID NO 2.

[0067] Se proporcionan aspectos no inventivos que hacen referencia a un producto conteniendo una cantidad efectiva de péptidos de lunasina que reduce los niveles de colesterol en un individuo que consume el producto.

35 **[0068]** Se proporcionan aspectos no inventivos que hacen referencia a una composición conteniendo una cantidad efectiva de péptidos de lunasina o derivados del péptido de lunasina y uno o más inhibidores enzimáticos que actúan conjuntamente para reducir los niveles de colesterol en un individuo que consume el producto.

40 **[0069]** En aún otro aspecto no inventivo, se proporciona un método para disminuir o reducir los niveles de colesterol en un individuo. El método incluye proporcionar un producto conteniendo una cantidad efectiva de péptidos de lunasina a un individuo y reivindicar que el producto disminuye, reduce o mantiene los niveles de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos en un individuo que consume la composición.

45 **[0070]** En un aspecto de al menos una realización de la presente invención, la cantidad efectiva de péptidos de lunasina que disminuye los niveles de colesterol en un individuo es 25 mg a 100 mg diariamente, suponiendo de media que la proteína de soja contiene 0,1% de lunasina y que está clínicamente demostrado que al menos 25 g de proteína de soja reducen el colesterol LDL en la especie humana.

[0071] En otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los niveles de colesterol disminuidos en el individuo son los niveles de colesterol LDL y total.

[0072] En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina incluyen péptidos de lunasina o derivados de péptido de lunasina.

50 **[0073]** En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina de obtienen de la soja.

[0074] En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina se obtienen de la soja y de otras plantas que tienen semillas.

55 **[0075]** En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina o derivados de péptido de lunasina se obtienen produciendo, extrayendo y purificando péptidos de lunasina o derivados de péptido de lunasina usando técnicas de ADN recombinante.

[0076] En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina o derivados del péptido de lunasina se obtienen por secuenciación sintética.

[0077] En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, el uno o más inhibidores enzimáticos incluyen uno o más inhibidores de tripsina.

5 **[0078]** En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los ensayos descritos en los ejemplos que siguen se pueden emplear para cribar aislados, concentrados, extractos, análogos, fragmentos y variantes de lunasina para confirmar la actividad deseada antes de usarlos en los métodos de la presente invención. La presente invención abarca métodos para cribar aislados, concentrados y extractos de soja así como variantes, fragmentos y análogos de lunasina para medir la actividad para identificar aquellos con actividad preferida para usar en las composiciones y métodos de la presente invención, a través de los cuales se realiza un experimento similar al descrito en este documento usando análogos, fragmentos o variantes de lunasina en vez de lunasina, por el que se enseña al versado en la técnica métodos sencillos de cribar los niveles de actividad de análogos, fragmentos y variantes de lunasina para usar en la presente invención.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0079] Las características y objetos anteriormente mencionados de la presente declaración llegarán a ser más aparentes con referencia a la siguiente descripción tomada conjuntamente con los dibujos que acompañan en los que números de referencia similares indican elementos similares y en los que:

20 **[0080]** La figura 1 muestra la proteína albúmina 2S codificada por ADNc Gm2S 1 (SEQ ID NO 2). Las flechas indican lugares endoproteolíticos que dan lugar a la subunidad pequeña (lunasina) (SEQ ID NO 2) y la subunidad grande (proteína rica en metionina). Se indican regiones importantes en ambas subunidades.

25 **[0081]** La figura 2 es una fotografía de un análisis Western blot (arriba) y una tabla (abajo) que muestra valores densitométricos que indican los niveles relativos de expresión de la reductasa HMG-CoA en células HepG2 que fueron (CFM+LS (24)) o no fueron (CFM) tratadas con lunasina durante 24 horas antes de incubación en medio libre de colesterol (CFM) durante 24 horas para activar las proteínas ligantes del elemento regulador de esteroides (SREBP). Después de las incubaciones se extrajo la proteína total y se cargaron 10 ug de proteína en geles de Tris-glicina al 10%, se electrotransfirieron sobre membrana de nitrocelulosa y se inmunotifirieron con anticuerpos primarios contra la reductasa HMG-CoA y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas representan la media y la desviación típica de los datos de tres experimentos separados.

30 **[0082]** La figura 3 es una fotografía de un análisis Western blot (arriba) y una tabla (abajo) que muestra valores densitométricos que indican los niveles relativos de expresión del receptor LDL en células HepG2 que fueron (CFM+LS (24)) o no fueron (CFM) tratadas con lunasina durante 24 horas antes de incubación en medio libre de colesterol (CFM) durante 24 horas para activar las SREBP. Después de las incubaciones se extrajo la proteína total y se cargaron 10 ug de proteína en geles de Tris-glicina al 10%, se electrotransfirieron sobre membrana de nitrocelulosa y se inmunotifirieron con anticuerpos primarios contra el receptor LDL y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas representan la media y la desviación típica de los datos de tres experimentos separados.

40 **[0083]** La figura 4 es una fotografía de un análisis Western blot (arriba) y una tabla (abajo) que muestra valores densitométricos que indican los niveles relativos de expresión de SP1 en células HepG2 que fueron cultivadas desde la confluencia en medio de cultivo durante 24 horas antes de sustituir el medio de cultivo con medio de cultivo nuevo (Medio), medio con lunasina (Medio + LS) o medio libre de colesterol con lunasina (CFM + LS) o sin lunasina (CFM). Las muestras se incubaron luego durante 24 o 48 horas como se indica. Después de las incubaciones se extrajo la proteína total y se cargaron 10 ug de proteína en geles de Tris-glicina al 10%, se electrotransfirieron sobre membrana de nitrocelulosa y se inmunotifirieron con anticuerpos primarios contra SP1 y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas representan los datos de un experimento.

50 **[0084]** La figura 5 es una imagen digital de un gel SDS-PAGE teñido con azul Coomassie (I) y una fotografía de un análisis Western blot (II) que muestra muestras de 20 ug de tamaño de proteína de soja extraída de cinco fuentes comerciales diferentes de proteína de soja (A-E) y muestras de 0,25 ug, 0,5 ug y 1,0 ug de lunasina sintética. Cada banda de lunasina 5 kDa está indicada por una flecha.

55 **[0085]** La figura 6 es una fotografía de un análisis Western blot del contenido en proteína, y de particular interés, del contenido en lunasina, de un extracto de semillas enriquecido en lunasina, específicamente un concentrado de soja enriquecido en lunasina formulado (LeSC) harina de soja (SF) y LeSC suplementado con harina de soja (LeSC + SF) (ver Ejemplo 4, a continuación, para la formulación y el desarrollo de LeSC y LeSC + SF) comparados con muestras de lunasina sintética de 0,5 ug, 1,0 ug y 1,5 ug.

[0086] La figura 7 es una fotografía de un análisis Western blot que muestra el efecto de la digestión con pancreatina sobre la actividad biológica de varios extractos, concentrados y aislados de proteína de soja. Se usó un ensayo de histona acetiltransferasa (HAT) para determinar la actividad biológica. Las calles representan: LeSC (A), LeSC + SF (B), LeSC + SF digerido (C), LeSC digerido (D), aislado de proteína de soja digerido (E) y concentrado de soja digerido (F). La histona nuclear de eritrocito de pollo se usó como calle de control negativo y el patrón de histona (Temp-) para el ensayo HAT. La calle de control positivo corresponde al patrón histonas nucleares sin tratar (Untr-) en un ensayo HAT que da lugar a la máxima acetilación de la histona. Señal baja indica que la muestra era bioactiva porque impidió la acetilación de la histona H3. Señal intensa indica que la muestra era inactiva, por consiguiente no tuvo efecto sobre los niveles de acetilación de la histona H3.

[0087] La figura 8 es una fotografía de un análisis Western blot que muestra los efectos de la digestión con pancreatina sobre la actividad biológica del concentrado de soja enriquecido en lunasina en presencia o ausencia de harina de soja. El ensayo de bioactividad HAT se realizó utilizando histonas nucleares extraídas con ácido de células HeLa como patrón / control negativo (temp-) para la reacción HTA catalizada por PCAF. Histonas nucleares de células HeLa tratadas con butirato sódico (NaB) se usaron como control positivo. El efecto inhibidor de la lunasina sintética (+synL) sobre la acetilación de la histona H3 por PCAF se usó para comparar el efecto de LeSC (A), LeSC digerido (A dig), LeSC + SF (B) y LeSC + SF digerido (B dig). Los números bajo la leyenda indican las lecturas densitométricas relativas normalizadas usando la inmunoseñal del patrón histona nuclear HeLa (temp (-)). Números bajos indican actividad biológica.

[0088] La figura 9 es una fotografía de un análisis Western blot que muestra el efecto de la digestión con pancreatina sobre el concentrado de soja enriquecido en lunasina en presencia y ausencia de inhibidores de tripsina y/o quimotripsina. Muestras de concentrado de soja enriquecido en lunasina con inhibidores de tripsina (LeSC + Try) y LeSC con ambos inhibidores de tripsina y quimotripsina (LeSC + Try + Chy) fueron digeridas con pancreatina e inmunotefñidas con anticuerpo de lunasina. Como control se incluyeron lunasina sintética (0,8 ug, 0,4 ug y 0,2 ug) y LeSC sin digerir.

[0089] La figura 10 es una fotografía de un análisis Western blot que muestra los resultados de un ensayo de bioactividad HAT que fue realizado usando histonas nucleares de células eritrocito de pollo como patrón para la reacción HAT catalizada por PCAF (Figura 6). El efecto inhibidor de la lunasina sintética (+synL) en comparación con la máxima acetilación de la histona en el control negativo sin tratar (-synL) sobre la acetilación de la histona H3 por PCAF se usó como control para comparar el efecto de la digestión sobre: concentrado de soja enriquecido en lunasina (LeSC) (A), LeSC con inhibidores tripsina y quimotripsina (B), LeSC con inhibidores tripsina (C). También se incluyeron LeSC sin digerir (D) y LeSC más harina de soja sin digerir (E). Los números bajo la leyenda indican las lecturas densitométricas relativas normalizadas usando la inmunoseñal de la LeSC sin digerir (D). Números bajos indican la presencia de actividad biológica en la muestra.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0090] Esta invención hace referencia generalmente a composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colesterol en individuos. Más específicamente, esta invención hace referencia a una clase de péptidos que proporcionan a los individuos una diversidad de beneficios relacionados con la salud y a composiciones que los comprenden. Más específicamente, la presente invención hace referencia a novedosas composiciones que comprenden péptidos de soja, métodos para usar estas composiciones para disminuir los niveles de colesterol total y LDL en individuos y métodos para elaborar composiciones que los comprendan.

Lunasina

[0091] La lunasina es un componente bioactivo recientemente descubierto en el haba de soja (*glycine max*) con una novedosa propiedad de ligazon a la cromatina y efectos epigenéticos sobre la expresión de genes (17, 18). La lunasina es la pequeña subunidad peptídica de una albúmina 2S específica del cotiledón. La figura 1 muestra la proteína albúmina 2S (SEQ ID NO. 1) y la pequeña subunidad lunasina (SEQ ID NO. 2). El péptido de soja lunasina es estable al calor, soluble en agua y se encuentra en cantidades significativas en preparaciones de proteína de soja seleccionadas y la bibliografía proporciona significativas orientaciones sobre la selección de orígenes de soja y productos de soja para aislar o concentrar la lunasina (19).

[0092] La lunasina se identifica en este documento como un componente activo de la soja que tiene efectos hipocolesterolémicos. También se describen composiciones y métodos de elaborar y utilizar lunasina para, entre otras cosas, la reducción del colesterol.

[0093] Este descubrimiento resuelve varios problemas que, hasta ahora, habían hecho difícil el uso de productos de soja para reducir el colesterol. Como no se había identificado anteriormente el componente activo de la soja

que reduce el colesterol, no se podía seleccionar en los productos de soja. Así pues, anteriormente, una persona tenía necesidad de comer grandes cantidades de soja cada día para ver incluso una pequeña reducción en el colesterol. Ahora se proporcionan composiciones de soja con concentración de lunasina incrementada que permiten dosis menores, eficacia mejorada y resultados más constantes en el tratamiento.

5 **[0094]** Además, se abordan los problemas de procesado y envasado relacionados con el suministro de grandes cantidades de soja a los individuos y ya están disponibles una variedad de formulaciones.

[0095] Los estudios muestran que la lunasina puede entrar en las células epiteliales de los mamíferos a través de su motivo de adherencia celular RGD, unirse preferencialmente a histonas desacetiladas e inhibir la acetilación de la histona H3 y H4 **(20)**. Hay una evidencia creciente de que la transformación celular, las respuestas a las hormonas y los efectos dietarios y medioambientales implican cambios epigenéticos en la expresión del gen, que son modulados por los procesos reversibles de metilación - desmetilación del ADN y la acetilación - desacetilación de la histona **(21-22)**.

15 **[0096]** La lunasina es la primera sustancia natural en ser identificada como un inhibidor de la histona acetilasa, aunque no afecta directamente a la enzima histona acetilasa. Inhibe la acetilación H3 y H4 ligando a residuos de lisina desacetilados específicos en el extremo N terminal de las histonas H3 y H4, haciéndolas indisponibles como sustratos para la acetilación de la histona **(20)**. La elucidación del mecanismo de acción hace a la lunasina una importante molécula en estudios de investigación para entender el papel emergente de la epigenética y las modificaciones de la cromatina en importantes procesos biológicos.

20 **[0097]** El estudio sobre el efecto de la lunasina sobre la carcinogénesis de la próstata en la Universidad de California en Davis, reveló los efectos de la lunasina sobre las modificaciones de la histona H4 y la regulación al alza de los genes quimopreventivos, **(23)**. No obstante, el efecto específico de la lunasina ligada al extremo N terminal de la H3 desacetilada y la inhibición de la acetilación de la histona H3 en sistemas biológicos aún no ha sido investigada.

25 **[0098]** La mayoría del colesterol circulante en la sangre se sintetiza internamente, por ello la producción interna de colesterol está catalizada por la reductasa HMG-CoA (la enzima limitadora de la tasa para la síntesis de colesterol), y la cantidad de receptores LDL en las membranas de la célula hepática son factores importantes para modular los niveles de colesterol LDL **(33)**.

30 **[0099]** Para determinar el efecto biológico específico de la ligazón de la lunasina a la histona H3 desacetilada y la inhibición de la acetilación, se usó como modelo biológico la inducción de genes involucrados en la biosíntesis del colesterol por las proteínas ligantes del elemento regulador de esteroides (SREBP). Este modelo biológico fue escogido porque la activación de las SREBP por el agotamiento del esteroide da lugar a un incremento de la acetilación de la histona H3, pero no de la histona H4, por la enzima histona acetilasa Factor Asociado a CBP/P300 (PCAF) en la cromatina proximal al promotor / secuencias reguladoras de la reductasa HMG-CoA (la enzima limitadora de tasa para la síntesis de colesterol) y los genes receptores LDL **(24)**. Además, la activación de la SREBP da lugar a la captación incrementada de factores correguladores, elemento de respuesta al monofosfato de adenosina cíclico (CREB) al promotor / secuencia reguladora del gen reductasa HMG-CoA, y SP1 al promotor / secuencia reguladora del gen receptor de LDL **(24)**.

40 **[0100]** Nuestros estudios sobre ensayos de histona acetiltransferasa (HAT) *in vitro* (descritos más adelante en el EJEMPLO 8) muestran que la lunasina inhibe significativamente la acetilación de la histona H3 por la enzima histona acetilasa, PCAF. Experimentos de cultivo celular usando células hepáticas HepG2 muestran que la lunasina sintética puede reducir significativamente la expresión de la reductasa HMG-CoA e incrementar la expresión del gen receptor LDL en medios libres de colesterol, (Ejemplo 1, más adelante), de forma similar a los efectos de los fármacos que disminuyen el colesterol, tipo estatina. Nuestros estudios también han mostrado que el incremento en la expresión del receptor LDL coincide con el incremento en la expresión del Sp1 en medios libres de colesterol (Ejemplo 2, más adelante).

50 **[0101]** Sin pretender limitar la presente invención a cualquier mecanismo o modo de acción particular, se propone un mecanismo de acción molecular, basado en los experimentos descritos, que la lunasina reduce la acetilación de la histona H3 por la enzima histona acetilasa, PCAF, requerida para activar la expresión de la reductasa HMG-CoA e incrementa la expresión del receptor LDL. Por consiguiente, la lunasina puede reducir los niveles de colesterol total y LDL 1) inhibiendo la expresión de la reductasa HMG-CoA, cuya actividad enzimática es reducida por los fármacos estatina reductores del colesterol, y 2) incrementando la expresión del receptor LDL que incrementa el aclaramiento del colesterol LDL en la sangre.

55 **[0102]** Además, la actividad biológica de la lunasina, como se muestra en los ejemplos, está apoyada además por los datos epidemiológicos y clínicos a gran escala que vinculan el consumo de proteína de soja con menor colesterol LDL y menor riesgo de enfermedad cardiovascular (3). La identificación de la lunasina como el principal componente de la proteína de soja que le confiere su propiedad reductora del colesterol facilita el camino para optimizar los ingredientes de proteína de soja para maximizar sus beneficios cardiosaludables.

[0103] Datos publicados anteriormente demuestran que el contenido en lunasina en diferentes variedades de soja, concentrados de proteína de soja y aislados de proteína de soja varía significativamente de una

preparación a otra. (19). Sin pretender limitar la presente invención a cualquier mecanismo o modo de acción particular, se desprende de los datos que la lunasina es el único agente bioactivo de la soja con un mecanismo de acción molecular viable que puede explicar la propiedad reductora del colesterol de la proteína de soja (descrito más adelante en los EJEMPLOS 1 y 2). Los datos también ayudan a elucidar los resultados clínicos ampliamente divergentes citados en el informe científico (16) de la American Heart Association. Como ahora sabemos que la lunasina está presente en cantidades variables en diversas preparaciones de proteína de soja (19), parece que los resultados impredecibles con respecto a los efectos reductores del colesterol y la ausencia de efectos dependientes de la dosis en estudios anteriores usando aislados de proteína de soja, incluso aquellos que ensayaron las concentraciones más altas de proteína de soja, probablemente sean debidos a o a la variación en las cantidades de lunasina o a la ausencia de inhibidores de quimotripsina para proteger la lunasina durante la digestión o a una combinación de los dos factores.

[0104] Nuestro sorprendente hallazgo de que la lunasina reduce el colesterol en individuos y es el componente de la soja responsable de reducir el colesterol LDL en las pruebas clínicas (20-30% de reducción) fue descrito cuando se mezcló 50% de harina de soja con 50% de concentrado de proteína de soja (26, 27). Aunque la concentración y actividad biológica de la lunasina en varias fuentes disponibles comercialmente varían, entre las diferentes fuentes de lunasina, los concentrados de proteína de soja han mostrado la mayor producción de lunasina bioactiva en algunos experimentos (ver Ejemplo 4 y referencia (19)). En una realización preferida de la presente invención, el concentrado de proteína de soja es una fuente de lunasina para usar en composiciones y métodos de la presente invención.

[0105] La presencia de harina de soja en una mezcla de proteína de soja tal como la que se usó en las pruebas clínicas mencionadas anteriormente, se muestra aquí para proporcionar protección a la lunasina de la digestión y degradación cuando se ingiere (ver Ejemplo 5). La digestión parcial del extracto de semillas enriquecido en lunasina mezclado con harina de soja también se ha mostrado que incrementa la bioactividad de la lunasina (Ejemplo 6).

[0106] A continuación se muestra que la harina de soja protege la actividad biológica de composiciones conteniendo lunasina de la reducción de actividad biológica por los efectos de la digestión. También hemos encontrado que los inhibidores de tripsina, y particularmente los inhibidores de quimotripsina encontrados en la harina de soja (34) protegen la actividad biológica de composiciones conteniendo lunasina de los efectos adversos de la digestión. Sin pretender limitar la invención a cualquier mecanismo o modo de acción, se cree que, en los estudios clínicos mencionados anteriormente, la presencia de inhibidores de quimotripsina endógenos en la harina de soja puede haber actuado para proteger la lunasina de la digestión, y hacen el péptido lunasina más biodisponible en el hígado y la sangre de aquellos individuos que participaron en el estudio, proporcionando por ello la mayor tasa de reducción del colesterol LDL.

[0107] El efecto reductor del colesterol de la proteína de soja puede incrementarse aún más desarrollando formulaciones que optimicen la absorción y el suministro correctos de la lunasina al hígado, lo cual es necesario para provocar niveles de colesterol LDL plasmático considerablemente menores en los individuos. Realizaciones preferidas de la invención abarcan composiciones que comprenden lunasina en combinación con harina de soja o quimotripsina o una combinación de las dos, métodos de usar y elaborar dichas composiciones.

[0108] La lunasina es el péptido pequeña subunidad de la albúmina 2S específica de un cotiledón. La Figura 1 muestra la proteína albúmina 2S (SEQ. ID. NO. 1) y la pequeña subunidad lunasina (SEQ. ID. NO. 2). Se ha mostrado que la expresión constitutiva del gen lunasina en células de mamífero perturba la formación cinetócara y perturba la mitosis, dando lugar a la muerte celular (18). Cuando se aplica exógenamente a un cultivo de células de mamífero, el péptido lunasina suprime la transformación de las células normales en focos cancerosos que son inducidos por cancerígenos químicos y oncogenes. Para elucidar su mecanismo de acción quimiopreventivo, hemos mostrado que la lunasina (**a**) es internalizada a través de su motivo de adherencia celular RGD, (**b**) se colocaliza con la cromatina hipoacetilada en los telómeros en la prometafase, (**c**) se une preferencialmente a la histona H4 desacetilada, lo que es facilitado por la presencia de un motivo helicoidal conservado estructuralmente en otras proteínas ligantes de la cromatina, (**d**) inhibe la acetilación de la histona H3 y H4, y (**e**) induce la apoptosis en las células transfectadas E1A (**20**). Basado en estos resultados se ha propuesto un novedoso mecanismo quimiopreventivo en el que la lunasina penetra en el interior del núcleo, se une a las histonas desacetiladas, impide su acetilación e inhibe la expresión del gen como los controlados por el supresor del tumor Rb y el oncogen h-ras.

[0109] Experimentos con microarray demuestran cambios genéticos de mínimos a no negativos usando lunasina. Para determinar los cambios genéticos asociados con el tratamiento de lunasina se evaluaron los perfiles de expresión del gen no tumorigénico (RWPE-1) y tumorigénico (RWPE-2) de células prostáticas tratadas con lunasina sintética usando análisis por microarray. Los resultados muestran que de los 14.500 genes interrogados, 123 genes tuvieron un cambio superior al doble en la expresión en las células expuestas a 2 μ M de lunasina durante 24 horas (**23**). De estos genes, 121 genes fueron regulados al alza en las células RWPE-1 y solamente 2 genes fueron regulados al alza en las células RWPE-2. Ningún gen fue regulado a la baja en células epiteliales no tumorigénicas o tumorigénicas tratadas con 2 μ M de lunasina. Los genes que fueron regulados al alza en las células RWPE-1 incluyen genes que están involucrados en prevenir la formación de cáncer tales como supresión del tumor, proapoptosis, puntos de control de la mitosis y el control de la división celular (**23**).

[0110] Los resultados de microarray de nuestros experimentos también sugieren que la lunasina puede actuar como activador transcripcional de genes que protegen las células normales de la transformación. Estos resultados son opuestos a los anteriores modelos mecanísticos que sugieren que la lunasina previene la transformación de las células normales en tumores inhibiendo la acetilación de las histonas H4 desacetiladas (20). Se cree que el bloqueo de la acetilación de estas histonas da lugar a condensación de la cromatina y el silenciado transcripcional de los oncogenes incluso en ausencia o inactivación de supresores de tumor tales como Rb (proteína del retinoblastoma). En un estudio reciente, sin embargo, células de fibroblastos de ratón 3T3 tratadas con lunasina obtenidas de los Institutos Nacionales Sanitarios (células 3T3 NIH) (tratadas previamente durante 24 horas) transfectadas con el oncogen E1A mostraron un incremento cinco veces en los niveles de proteína p21/WAF1/Cip1, ocho días después de la transfección E1A (28). La proteína p21/WAF1/Cip1 es un potente y universal inhibidor de las quinasas dependientes de la ciclina, que son puntos de control importantes de la progresión del ciclo de la célula (29). Los resultados del microarray no mostraron regulación al alza de p21/WAF1/Cip1 en 24 horas; sin embargo, el gen SP3, un activador transcripcional de p21/WAF1/Cip1 (30), fue regulado al alza por la lunasina a las 24 horas, lo que puede explicar el posterior incremento en la expresión de p21/WAF1/Cip1 en las células 3T3 HIH.

[0111] Además, los resultados de microarray ayudan a explicar el 70% de reducción en la formación de focos observada cuando células C3H/T101/2 tratadas previamente con lunasina se exponen a los cancerígenos químicos dimetilbenzantraceno (DMBA) y MCA (20). Una sola exposición de 24 horas de estas células a tan poco como 125 nM de lunasina fue suficiente para suprimir la formación de focos en los ensayos de carcinogenicidad que duran durante seis semanas (20). El tratamiento previo de 24 horas de las células C3H/T101/2 con lunasina se cree que regula al alza la expresión de los genes quimioprotectores que protegen las células de la transformación inducida por DMBA y MCA.

[0112] El análisis bioinformático de los 121 genes regulados al alza por la lunasina en las células de próstata normales muestran que más del 25% de los genes están localizados de 0 a 2000 bp (alejados 10 nucleosomas) de una isla CpG lo que es altamente significativo de solamente la distribución aleatoria de genes en el genoma. Es posible que la pérdida de la regulación al alza de estos genes quimiopreventivos en la línea celular prostática tumorigénica (RWPE-2) por la lunasina se deba a una metilación incrementada de la citosina e hipoacetilación de la cromatina de las islas CpG, que son características de la carcinogénesis.

[0113] Ensayo de cribado (No forma parte de la invención)

[0114] La invención proporciona además un ensayo *in vitro* que se puede usar para cribar potenciales fuentes de lunasina o análogos, fragmentos o variantes de lunasina para material biológicamente activo útil en los métodos de la presente invención. En una realización de la presente invención, histonas nucleares purificadas de proteínas extractadas con ácido de células HeLa y células eritrocito de pollo así como histona H3 recombinante (disponible comercialmente en Upstate / Millipore) se usaron como patrones en reacciones de histona acetilasa (HAT) usando la enzima histona acetilasa PCAF en presencia o ausencia de lunasina. En una realización preferida de la presente invención, fuentes potenciales de lunasina, o análogos, fragmentos o variantes de lunasina son cribadas como sigue: la histona nuclear patrón y la muestra de lunasina (10:1 p/p) se incuban en hielo durante 5 min y a 25 °C durante 10 min antes de añadir la solución a la mezcla de reacción 1X HAT, 1 uM de acetil CoA y 5 uL de PCAF (basado en la concentración recomendada de Upstate / Millipore). La mezcla se incuba a 30 °C mientras se agita a 250 rpm durante 1 hora. La reacción se detiene añadiendo tampón de parada Laemmli (1:1 v/v) con betamerceptoetanol, se hierve durante 5 minutos y se enfría en hielo durante 15 min. Los productos de la reacción PCAF HAT se corren en SDS-PAGE al 16%, se transfieren a membrana de nitrocelulosa y se inmunotifien con anticuerpos primarios contra la histona H3 diacetilada (Ac-lys 13 + Ac-Lys14 H3) y/o histona H3 Ac-Lys14, seguido por anticuerpo secundario conjugado HRP. Las señales quimioluminiscentes de los complejos anticuerpo pueden ser visualizadas usando reactivos estándar de quimioluminiscencia y se expusieron a película KODAK BioMAX, se revelaron y midieron con densitómetro usando un escáner digital y el programa de software UN-SCAN-IT de Silk Scientific (Orem, Utah)

Este ensayo HAT *in vitro* se puede usar para determinar la actividad biológica de la lunasina (ver Ejemplo 5 y 6) obtenida de diferentes fuentes sin recurrir a los lentos y caros cultivos celulares y/o a experimentos con animales. La activación de la expresión del gen reductasa HMG-CoA por el activador transcripcional SREBP requiere la acetilación de la histona H3 (24) y la capacidad de la lunasina para inhibir la acetilación de la histona H3 da lugar a la expresión reducida de la reductasa HMG-CoA y consecuentemente a la reducida biosíntesis del colesterol en el hígado.

[0115] Fuentes de lunasina.

[0116] Lunasina presente de forma natural se puede encontrar de forma significativa en las semillas de la soja y en fuentes disponibles comercialmente de proteína de soja (19) y sus análogos de otras semillas tales como la cebada (35) y el trigo (36). Debido a la función biológica de la lunasina en la fase de endoreduplicación del ADN del desarrollo de la semilla (18), se espera que la lunasina y sus análogos también se han de encontrar en el endospermo y los cotiledones de otras plantas que tienen semillas (angiospermas).

[0117] Los polipéptidos de la presente invención se pueden obtener de diversas formas que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, sin pretender limitar el ámbito de la invención a cualquier método particular de obtener

los polipéptidos de la presente invención, la lunasina y sus análogos, variantes y fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando procedimientos automatizados comercialmente incluyendo, sin limitación, la química en fase sólida convencional de Merrifield f-Moc o t-Boc, Métodos para la purificación de polipéptidos también son bien conocidos en la técnica incluyendo, sin limitación, la cromatografía de intercambio catiónico y aniónico, la cromatografía de inmunoafinidad y la cromatografía de exclusión por tamaño. Para algunas finalidades es preferible producir el polipéptido en un sistema recombinante.

[0118] Fragmentos de una proteína se pueden producir de diversas formas, ej., por medios recombinantes, por digestión proteolítica, o por síntesis química. Se pueden generar fragmentos internos o terminales de un polipéptido eliminando uno o más nucleótidos de un extremo (para un fragmento terminal) o de ambos extremos (para un fragmento interno) de un ácido nucleico que codifica el polipéptido. La expresión del ADN mutagenizado produce fragmentos de polipéptido. La digestión con endonucleasas "de recorte de extremos" puede generar así ADN que codifican un grupo de fragmentos. Los ADN que codifican fragmentos de una proteína también pueden ser generados por fragmentación aleatoria, digestión de restricción o una combinación de los métodos tratados anteriormente.

[0119] Los fragmentos también pueden ser sintetizados químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la química en fase sólida convencional de Merrifield f-Moc o t-Boc. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden ser divididos arbitrariamente en fragmentos de la longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o divididos en fragmentos solapados de una longitud deseada.

[0120] Las variantes de secuencias aminoacídicas de una proteína se pueden preparar por mutagénesis aleatoria del ADN que codifica una proteína o un dominio o región particular de una proteína. Métodos útiles incluyen la mutagénesis PCR y la mutagénesis de saturación. Una biblioteca de variantes de secuencia de aminoácidos aleatoria también se puede generar por la síntesis de un conjunto de secuencias oligonucleótidas degeneradas. (Métodos para cribar proteínas en una biblioteca de variantes están en otro lugar en este documento).

[0121] Cribado para análogos, fragmentos y variantes de péptidos de lunasina: La presencia y cantidad de péptido de lunasina, sus análogos, fragmentos y variantes se puede determinar inmunotificando Western blots con el anticuerpo lunasina dirigido contra el extremo carboxilo bioactivo del péptido lunasina (ver Ejemplo 3). La bioactividad del péptido lunasina, sus análogos, fragmentos y variantes se puede determinar y analizar cuantitativamente realizando el ensayo HAT *in vitro* como se describe en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 8.

[0122] Fuentes naturales de lunasina.

[0123] La lunasina se encuentra en la naturaleza y puede obtenerse de las semillas de la soja y de fuentes disponibles comercialmente de proteína de soja (**19**) y sus análogos de otras fuentes de semillas tales como la cebada (**35**) y el trigo (**36**). Por ejemplo, sin pretender estar limitado a cualquier método para obtener lunasina, la lunasina se puede extraer de las siguientes fuentes de soja: harina de soja en forma de copos o polvo, concentrados de proteína de soja y aislados de proteína de soja (ver Ejemplo 3).

[0124] Los copos de soja se producen generalmente descascarillando, desengrasando y moliendo las habas de soja y típicamente contienen menos de alrededor del 65% (en peso) de proteína de soja sobre base seca. Los copos de soja también contienen carbohidratos solubles, carbohidratos insolubles como la fibra de soja, y grasa intrínseca de la soja. Los copos de soja pueden ser desengrasados, por ejemplo, por extracción con hexano. Las harinas de soja, grits de soja y soja se producen a partir de los copos de soja triturando los copos en equipo de trituración y molienda tal como un molino de martillos o un molino de chorro de aire al tamaño de partícula deseado. Los materiales triturados son típicamente tratados por el calor con calor seco o húmedo para "tostar" los copos molidos e inactivar los elementos antinutritivos presentes en la soja, incluidos los inhibidores de tripsina Bowman-Birk y Kunitz, y otros inhibidores de proteasas.

[0125] En una realización de la presente invención no se realiza el tostado en condiciones que destruyen la actividad de los inhibidores de proteasa. En una realización preferida de la presente invención el tostado no se realiza durante un tiempo o con un calor suficientes para destruir los inhibidores de quimotripsina. El tratamiento térmico de los copos molidos en presencia de cantidades significativas de agua se evita para prevenir la desnaturalización de la proteína de soja en el material y para evitar los costes asociados con la adición y eliminación del agua del material soja. El material resultante molido, tratado térmicamente, es una harina de soja, grit de soja o soja, dependiendo del tamaño medio de partícula del material. La harina de soja generalmente tiene un tamaño de partícula inferior a unos 150.mu.m. Los grits de soja generalmente tienen un tamaño de partícula de alrededor de 150 a unos 1000.mu.m. La soja generalmente tiene un tamaño de partícula superior a unos 1000.mu.m.

[0126] Los concentrados de proteína de soja típicamente contienen de alrededor del 65% (en peso) a menos de alrededor del 90% (en peso) de proteína de soja sobre base seca, siendo la fibra el principal componente no proteínico. Los concentrados de proteína de soja se elaboran típicamente a partir de copos de soja desengrasados lavando los copos con una solución acuosa de alcohol o una solución acuosa ácida para eliminar los carbohidratos solubles de la proteína y de la fibra.

5 [0127] Los aislados de proteína de soja, también denominados como proteínas de soja aisladas, que son los materiales de proteína de soja más altamente refinados, se procesan para contener al menos 90% (en peso) de proteína de soja sobre base seca y poco o ningún carbohidrato soluble o fibra. Las proteínas de soja aisladas se elaboran típicamente extrayendo la proteína de soja y los carbohidratos solubles en agua de los copos de soja o harina de soja desengrasados con un extractante acuoso alcalino. El extracto acuoso, junto con la proteína soluble y los carbohidratos solubles, se separa de los materiales que son insolubles en el extracto, principalmente la fibra. El extracto se trata luego típicamente con un ácido para ajustar el pH del extracto al punto isoeléctrico de la proteína para precipitar la proteína del extracto. La proteína precipitada se separa del extracto, que retiene los carbohidratos solubles y se seca después de un paso opcional de ajuste del pH.

10 [0128] Extracción de la lunasina y fuentes de composiciones enriquecidas en lunasina.

[0129] Lunasina y composiciones enriquecidas en lunasina se pueden obtener a partir de la fracción albúmina de bajo peso molecular de la proteína de soja junto con los inhibidores de proteasa naturales encontrados en la soja (37, 38). Los procedimientos de extracción de los inhibidores de proteasa de la soja también se pueden usar para extraer la lunasina y obtener composiciones enriquecidas en lunasina.

15 [0130] Hay métodos conocidos en la técnica para extraer los inhibidores de proteasa de la soja. Por ejemplo, ver Konwinski y col., Patente US N° 7.235.269, Kennedy y col., Patentes US N°s 4793996, 5.217.717, 5.505.946, Konwinski y col., Solicitud de Patente US N° 2003/0064,121, presentada el 13 de abril de 2003, Singe, Patente US N° 7.235.269, todas las cuales son por este documento incorporadas por referencia en su totalidad. No obstante, los métodos anteriores para extraer inhibidores de proteasa no se han centrado en optimizar la producción de lunasina. La actividad biológica mejorada de las composiciones de la presente invención se puede obtener cribando previamente el contenido en lunasina del origen del material de partida para la extracción de la lunasina antes de realizar una extracción. En un método preferido de la presente invención las fuentes potenciales de lunasina serán cribadas para determinar la concentración de lunasina antes de ser usadas para los métodos de la presente invención.

20 [0131] Los siguientes ejemplos adicionales de métodos de obtención de composiciones enriquecidas en lunasina no están destinados a limitar la presente invención a cualquier método particular de extraer la lunasina. La harina de soja desengrasada se puede extraer con etanol del 60%, precipitarse con acetona fría, seguida por cromatografía en columna multifásica. Los inhibidores de proteasa son solubles en etanol del 60% (junto con otras proteínas). Los inhibidores de proteasa se precipitan luego con acetona fría, se centrifugan y redisuelven en agua para hacer un extracto bruto para ulterior purificación (37). Una modificación de este procedimiento fue usada por Odani y col. (38) para aislar un extracto de soja que se utilizó como material de partida para ulterior purificación por cromatografía en CM celulosa y DEAE celulosa. En este procedimiento, harina de soja desengrasada se extrajo con etanol al 60% (4:1) en RT antes de añadir 2 volúmenes de acetona fría, el precipitado se redisuelve en agua, se dializa con agua destilada, se ajusta el pH a 4,0 antes de volver a dializar con acetato sódico 5 mM a pH 4,0.

25 [0132] Otra forma de obtener lunasina enriquecida es extrayendo la fracción de bajo peso molecular de la proteína de soja (39, 40). En este procedimiento, las proteínas totales se extraen de la harina de soja usando disolvente salino altamente tamponado (tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM, DTT 5 mM). Dializando frente a agua destilada, las albúminas de soja permanecen en solución porque son solubles en agua mientras que las globulinas que son insolubles en agua precipitan. La solución de albúmina se liofiliza y redisuelve en un volumen menor para obtener concentrado de albúmina, que debe contener cantidades significativas del péptido lunasina.

30 [0133] Se puede conseguir purificación adicional de los extractos de soja enriquecidos en albúminas de bajo peso molecular e inhibidor de proteasa por cromatografía de intercambio aniónico o de exclusión molecular y cromatografía de inmunoafinidad. Ejemplos de resinas de intercambio aniónico: Sephadex DEAE, Sephadex QAE, Sepharose DEAE, Sepharose QAE, Sephacel DEAE, Celulosa DEAE, y Celulosa QAE. Ejemplos de resina de exclusión molecular: Sephadex G-25 (separa péptidos de 1-5 kDa), Sephadex G-50 (separa proteínas de 1,5-30 kDa). Se pueden preparar columnas de bioafinidad usando anticuerpos de lunasina para capturar el péptido de lunasina de fracciones de la proteína de soja.

35 [0134] Para los Ejemplos 3 y 4 que siguen, se obtuvo un extracto de semillas enriquecido en lunasina como sigue: concentrado de proteína de soja que se encontró en otro experimento descrito en este documento que contenía lunasina biológicamente activa, se usó como material de partida en una extracción con tampón en un solo paso usando 0,1X PBS seguido por centrifugación para separar el sobrenadante. Se añadieron alrededor de 2 volúmenes de acetona al sobrenadante y el precipitado fue separado por centrifugación con bolsas de filtro antes de secado a vacío para obtener un extracto de semillas enriquecido en lunasina. En determinadas realizaciones de la presente invención, en vez de precipitación con acetona, una variación de este procedimiento es concentrar el sobrenadante después de la extracción con tampón calentando a 75 °C a vacío, hasta 1/1° del volumen original, seguido por liofilización para obtener una forma en polvo de extracto de semillas enriquecido en lunasina.

[0135] Administración

[0136] Las composiciones pueden ser administradas usando varias vías diferentes que incluyen administración oral, administración tópica, administración transdérmica, o inyección directamente en el cuerpo. La administración de composiciones para usar en la práctica de la presente invención puede ser sistémica (es decir, administradas al sujeto como un todo a través de cualquiera de las vías anteriores) o localizada (es decir, administrada al lugar específico de la enfermedad o condición patológica determinada del sujeto, a través de cualquiera de las vías anteriores).

[0137] Los presentes métodos, kits y composiciones también se pueden usar en “terapia combinada” con otra composición o tratamiento que esté indicado para tratar o prevenir un trastorno relacionado con o que se deriva de niveles de colesterol o de lípidos elevados, tales como, por ejemplo, una estatina (ej., lovastatina), un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un antagonista del receptor de la angiotensina II, un antiarrítmico, un anticolésterolémico, un diurético, un agonista del receptor de la dopamina, un antagonista del receptor de la dopamina, o un vasodilatador, que son administrados corrientemente para tratar, prevenir o minimizar los síntomas y las complicaciones relacionadas con este trastorno. Estos fármacos tienen determinados inconvenientes asociados con su uso, algunos de los cuales pueden ser mejorados por una reducción de la dosificación necesaria para conseguir un efecto terapéutico cuando se administran en combinación con composiciones de la presente invención.

[0138] Dosificación

[0139] En una realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona un producto que contiene una cantidad efectiva de péptidos de lunasina que disminuye los niveles de colesterol en un individuo que consume el producto. Se debe apreciar que la cantidad efectiva de lunasina dependerá, al menos en parte, de la talla, el peso, la salud y los objetivos deseados de los individuos que consumen las composiciones. En consecuencia, se cree que en al menos una realización, la cantidad efectiva de lunasina suministrada al individuo es 25 mg/kg a 100 mg/kg diariamente.

[0140] Dependiendo de las necesidades particulares del sujeto individual afectado, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas en varias dosis para proporcionar concentraciones de tratamiento efectivas basadas en las enseñanzas de la presente invención. Factores tales como la actividad de las composiciones seleccionadas, las características fisiológicas del sujeto, la extensión o la naturaleza de la enfermedad o estado patológico del sujeto y el método de administración determinarán lo que constituye una cantidad efectiva de las composiciones seleccionadas. Generalmente, las dosis iniciales se modificarán para determinar la dosificación óptima para el tratamiento del sujeto particular. Se pueden escoger dosificaciones adecuadas teniendo en cuenta cualquiera o todos los dichos factores como la talla, el peso, la salud, la edad y el sexo del humano o individuo, los objetivos deseados del paciente, la gravedad del estado patológico para el que se está administrando la composición, la respuesta al tratamiento, el tipo y la cantidad de otras medicaciones que se dan al paciente que pueden interferir con la composición, o potenciándola o inhibiéndola, y otras consideraciones farmacocinéticas tales como la función hepática y la renal. Estas consideraciones son bien conocidas en la técnica y se describen en los textos normales.

[0141] Una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquier realización de la presente invención se determina usando métodos conocidos a los farmacólogos y clínicos que está ordinariamente versados en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar subjetivamente una cantidad efectiva administrando cantidades crecientes de las composiciones de la presente invención hasta dicho momento en el que el paciente que se trata muestra reducción en los niveles de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos. Los niveles sanguíneos de la composición niveles de colesterol y de lípidos pueden ser determinados usando ensayos biológicos y químicos rutinarios y estos niveles sanguíneos se pueden emparejar con la vía de administración. El nivel sanguíneo y la vía de administración que proporcionan el nivel de reducción de colesterol más deseable se pueden utilizar entonces para establecer una “cantidad efectiva” de la composición farmacéutica para el tratamiento.

[0142] El mismo método de valorar una composición en paralelo con la vía de administración puede usarse para averiguar una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones de la presente invención para tratar cualquiera y todos los trastornos descritos en este documento. Además se pueden usar modelos animales como se describe a continuación para determinar las dosificaciones aplicables para una enfermedad o condición patológica particular. Típicamente, las relaciones dosis - efecto para los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden proporcionar inicialmente orientaciones útiles sobre las dosificaciones correctas para administrar al sujeto.

[0143] En una realización de la presente invención relacionada con la reducción o control de los niveles de colesterol, colesterol LDL o lípidos o la síntesis de colesterol o colesterol LDL, métodos y composiciones de la invención abarcan una dosis de una composición que comprende lunasina, o una variante, análogo o fragmento de lunasina funcionalmente equivalente, de aproximadamente 5 ng a alrededor de 1000 g, o alrededor de 100 ng a alrededor de 600 mg, o alrededor de 1 mg a alrededor de 500 mg, o alrededor de 20 mg a alrededor de 400 mg. Ilustrativamente, una unidad de dosificación de una composición de la presente invención puede contener típicamente, por ejemplo, sin limitación, alrededor de 5 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, o 40 g de una composición de la presente invención. En determinadas realizaciones preferidas de la presente invención, composiciones de la presente invención

contienen alrededor de 2,5 a 100 mg, preferiblemente 5 a 50 mg, más preferiblemente aproximadamente 25 mg de lunasina, o fragmentos, variantes y análogos de lunasina.

[0144] Dosis ejemplo de lunasina, o fragmentos, variantes o análogos de lunasina, acordes con las enseñanzas de la presente invención, varían desde 0,0001 mg a 200 mg, preferiblemente, 2,5 a 100 mg, más preferiblemente 25 mg a 50 mg para la especie humana y otros individuos que tienen un peso medio de 60 kg, aunque se contemplan dosificaciones alternativas como que están dentro del ámbito de la presente invención. En determinadas realizaciones preferidas de la presente invención para composiciones y métodos para la administración tópica, lunasina, o fragmentos, variantes o análogos de la misma, están presentes a un nivel entre 25 ug/mL y 25 mg/mL, más preferiblemente entre 50 ug/mL y 1 mg/mL, más preferiblemente entre 100 ug/mL y 500 ug/mL, incluso más preferiblemente, aproximadamente 250 ug/mL. En determinadas realizaciones preferidas de la presente invención para composiciones y métodos para administración oral, lunasina, o fragmentos, variantes y análogos de la misma, se suministran a un individuo a un nivel de entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal de un individuo, preferiblemente 0,05 mg/kg y 50 mg/kg, más preferiblemente entre 0,5 mg/kg y 2,5 mg/kg, e incluso más preferiblemente entre 0,2 mg/kg y 1,5 mg/kg.

[0145] Una dosis se puede administrar en una a alrededor de cuatro dosis al día, o en tantas dosis al día para producir un efecto terapéutico. La forma de dosificación se puede seleccionar para adaptar la frecuencia de administración deseada usada para conseguir la dosificación especificada, así como la vía de suministro.

[0146] La cantidad de agente terapéutico necesaria para producir un efecto terapéutico se puede determinar experimentalmente basándose en, por ejemplo, la tasa de absorción del agente en el suero sanguíneo, la biodisponibilidad del agente, y la potencia para modular la expresión o acción de la reductasa HMG-CoA y/o del receptor LDL, y vigilando la reducción del colesterol total y LDL. La determinación de estos parámetros está dentro de la técnica.

[0147] Formulaciones

[0148] La invención también concierne a formulaciones que contienen las composiciones de la presente invención. Los productos y las composiciones de la presente invención se pueden usar solos o en alimentos, polvos, barras, cápsulas, batidos y otros productos bien conocidos consumidos por los individuos.

[0149] En una realización referida, las composiciones de la presente invención están junto con un excipiente, diluyente, portador dietario adecuado o con un alimento. En una realización preferida de la presente invención, la formulación está en forma de una píldora, tableta, cápsula, polvo, barra alimenticia o forma de dosificación similar.

[0150] Las formulaciones pueden ser una diversidad de clases, tales como suplementos nutricionales, preparados farmacéuticos, suplementos vitamínicos, aditivos alimentarios o alimentos suplementados con las composiciones de la invención especificadas, preparados líquidos o sólidos, incluidas bebidas, soluciones inyectables estériles, tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas, polvos, gotas, suspensiones, o jarabes, pomadas, lociones, cremas, pastas, geles, o similares.

[0151] Las formulaciones pueden ser envasadas en formas de dosificación convenientes, y también pueden incluir otros ingredientes activos, y/o pueden contener excipientes convencionales, portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables. La inclusión de las composiciones de la presente invención en remedios y tratamientos herbarios es también una parte preferida de la invención.

[0152] Las formulaciones preferidas para aplicaciones tópicas de las composiciones de la presente invención para uso tanto farmacéutico como cosmético, emplearán excipientes que sean adecuados para la aplicación tópica. Las formulaciones tópicas típicamente son geles, bálsamos, polvos, o líquidos, aunque también son deseables formulaciones controladas que liberan cantidades definidas del ingrediente activo en la superficie deseada. Las formulaciones pueden contener materiales que incrementen la permeabilidad de las fracciones activas a través de la epidermis. Dichos penetrantes incluyen, por ejemplo, DMSO, varias sales biliares, surfactantes no tóxicos y similares. Los ingredientes estándar para composiciones cosméticas / farmacéuticas son bien conocidos en la técnica; las formulaciones para la aplicación tópica de productos farmacéuticos que se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa., se incorporan en este documento por referencia. Las formulaciones cosméticas son ampliamente variadas y bien conocidas por los profesionales.

[0153] En una realización preferida de la presente invención, se contemplan composiciones para uso tópico de los ingredientes activos, sea para fines estrictamente cosméticos o farmacéuticos / cosméticos.

[0154] Algunas realizaciones de la presente invención abarcan métodos para tratar una o más de las siguientes enfermedades o condiciones: niveles elevados de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos, un tumor canceroso, cualquier enfermedad asociada con hiperlipidemia, incluyendo sin limitación aterosclerosis, hipertensión, obesidad, diabetes y enfermedades renales, que comprenden tratar un paciente que sufre de una de estas enfermedades o condiciones con composiciones que contienen niveles biológicamente activos de lunasina, o fragmentos, variantes o análogos funcionalmente equivalentes de la misma de acuerdo a los métodos de la presente invención. Otra realización de la presente invención abarca métodos que comprenden tratar,

individuos que desean mantener un nivel particular de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos con niveles biológicamente activos de lunasina, o fragmentos, variantes o análogos funcionalmente equivalentes de la misma de acuerdo a los métodos de la presente invención.

[0155] Aunque el uso principal de los materiales de la invención está destinado a la especie humana, puede haber casos donde se desee el tratamiento en animales domésticos o de granja o en animales de experimentación. De hecho, un aspecto de la invención es el uso de animales de experimentación para confirmar la seguridad y eficacia de las composiciones de la invención. Por consiguiente, los productos destinados para usar en la especie humana pueden ser aplicados a animales de laboratorio tales como ratas, ratones o conejos para confirmar la capacidad del preparado individual para reducir o controlar los niveles de colesterol y garantizar que un preparado individual no es tóxico. El uso de los materiales de la invención en el contexto del control de calidad, como se acaba de describir, es parte de la invención.

[0156] Métodos de mantener o incrementar la actividad biológica de la lunasina.

[0157] En otra realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona una composición conteniendo una cantidad efectiva de péptidos de lunasina o derivados del péptido lunasina y una composición que comprende uno o mas inhibidores de la enzima proteasa que juntos reducen los niveles de colesterol en un individuo que consume la composición.

[0158] Los inhibidores de la enzima proteasa actúan para proteger la lunasina de la digestión, facilitando por ello la absorción y el suministro a las áreas afectadas apropiadas. Ejemplos de inhibidores de la enzima proteasa apropiados incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de pancreatina, tripsina y quimotripsina. Se debe tener en cuenta que el ámbito de la presente invención incluye el uso de la lunasina y fragmentos, análogos y variantes de lunasina con cualquier otra composición o producto que se sepa o se crea que facilita la absorción o suministro de la lunasina en un individuo.

[0159] En aún otra realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona un método para disminuir o reducir los niveles de colesterol en un individuo. El método incluye proporcionar un producto que contiene una cantidad efectiva de péptidos de lunasina a un individuo y reivindicar que el producto disminuye, reduce o mantiene los niveles de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos en un individuo que consume la composición. Debe saberse que la presente invención incluye reivindicar que el producto disminuye, reduce o mantiene los niveles de colesterol, colesterol total, colesterol LDL o lípidos en un sujeto que consume la composición en una variedad de formas, incluyendo pero no limitadas a, mediante la sugerencia o declarándolo explícitamente a través de medios escritos, verbales o electrónicos.

[0160] En un aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina se obtienen de la soja. En otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina se obtienen de otras plantas que tienen semillas o una combinación de soja y otras plantas que tienen semillas. Plantas que tienen semillas que contienen cantidades suficientes de lunasina son bien conocidas en la técnica.

[0161] En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina o derivados del péptido lunasina se obtienen produciendo, extrayendo y purificando péptidos de lunasina o derivados del péptido lunasina usando técnicas de ADN recombinante u obteniendo de otro modo péptidos de lunasina aislados. En aún otro aspecto de al menos una realización de la presente invención, los péptidos de lunasina o derivados del péptido lunasina se obtienen por producción sintética del polipéptido. Estos métodos de obtención de lunasina son bien conocidos en la técnica.

[0162] Digestión parcial de la lunasina.

[0163] Un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que en vez de reducir o destruir la actividad biológica de la lunasina, la digestión parcial de la lunasina puede mejorar o incrementar realmente la actividad biológica de la lunasina. (Ver la Figura 8 y el Ejemplo 6, que siguen). Por consiguiente, una realización preferida de la presente invención abarca péptidos de lunasina biológicamente activos parcialmente digeridos.

[0164] La digestión parcial de la proteína de soja enriquecida en lunasina mezclada con harina de soja (LeSC + SF) por la enzima digestiva pancreatina incrementa la bioactividad del péptido lunasina (Figura 8). Esto tiene aplicación práctica en la preparación de extracto de semillas enriquecido en lunasina para aplicaciones tópicas.

[0165] Se ha mostrado que la lunasina sintética reduce la formación de tumores de piel en ratones cuando se aplica tópicamente usando etanol como sistema de aplicación (20). Usando lunasina biológicamente activa parcialmente digerida en una formulación tópica con un excipiente apropiado, es posible incrementar la eficacia de la lunasina para aplicaciones tales como reducir la formación de tumor y cáncer de piel, queratosis actínica, rosácea, manchas etarias y solares y otras enfermedades de la piel asociadas con la división y proliferación celular anormal. Esta formulación también se puede usar para aplicación tópica de lunasina para reducir los niveles de colesterol y para tratar otras enfermedades relacionadas con el colesterol, tales como, sin limitación, aterosclerosis, hipertensión, obesidad y diabetes.

[0166] Se ha mostrado que la presencia de harina de soja protege la actividad biológica de la lunasina durante la digestión. (Ver Ejemplo 5). Sin pretender limitar la presente invención a cualquier mecanismo o modo de acción

particular, se cree que la presencia de harina de soja durante la digestión protege la lunasina de la digestión total, pero permite la digestión parcial que incrementa la actividad biológica de la lunasina.

[0167] Una realización de la presente invención es un péptido de lunasina, fragmento, variante o análogo del mismo parcialmente digerido. Una realización preferida de la presente invención es un péptido de lunasina, fragmento, variante o análogo del mismo parcialmente digerido en combinación con harina de soja. Otra realización preferida de la presente invención es un péptido de lunasina, fragmento, variante o análogo del mismo parcialmente digerido en una formulación apropiada para aplicación tópica. Otra realización preferida de la presente invención es un método de tratar enfermedades de la piel que comprende aplicar tópicamente un péptido de lunasina, análogo, variante o fragmento del mismo parcialmente digerido a un paciente que necesite dicho tratamiento.

[0168] Se debe entender que la discusión, realizaciones y ejemplos precedentes meramente presentan una descripción detallada de determinadas realizaciones preferidas. Será evidente a los versados ordinariamente en la técnica que se pueden hacer diversas modificaciones y equivalentes sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

[0169] Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan para ilustrar mejor la presente invención. Los ejemplos no pretenden limitar el ámbito de la presente invención y no deben ser así interpretados. Otros procedimientos y adaptaciones serán evidentes al ordinariamente versado en la técnica a la vista de estos mecanismos de reacción y las estructuras de las composiciones acordes a la invención. Dichos procedimientos se considera que están dentro del ámbito de la presente invención. Las cantidades son en partes en peso o porcentajes en peso a menos que se indique de otro modo.

EJEMPLOS

[0170] Se proporcionan los siguientes ejemplos para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no se han de interpretar como que limitan el ámbito de la misma.

EJEMPLO 1

[0171] **Experimentos que demuestran que la Lunasina disminuye los niveles de colesterol LDL y total.** La disminución del colesterol sérico por fármacos con estatina se consigue inhibiendo competitivamente la reductasa HMG-CoA, la enzima reguladora en la vía metabólica del organismo para sintetizar el colesterol. Reduciendo la síntesis endógena de colesterol, las estatinas también hacen que las células hepáticas regulen al alza la expresión del receptor LDL, dando lugar a un incremento del aclaramiento de la lipoproteína de baja densidad (LDL) del torrente sanguíneo (25). En 1985, Michael Brown y Joseph Goldstein recibieron el Premio Nóbel de Medicina por su trabajo de clarificación de este mecanismo de disminución del LDL.

[0172] La regulación transcripcional de la reductasa HMG-CoA y del receptor LDL está controlada por la proteína ligante del elemento regulador de esteroides -1 y -2 (SREBP). Esta proteína se une al elemento regulador de esteroides (SRE) situado en el extremo 5' de los genes reductasa y receptor LDL. Cuando la SREBP está inactiva, se une a ER o membrana nuclear. Cuando los niveles de colesterol bajan, se libera SREBP de la membrana por proteólisis y migra al núcleo, donde se liga al SRE para regular al alza la transcripción de la reductasa HMG-CoA y del receptor LDL (24, 25).

[0173] En cultivo celular de células hepáticas HepG2, es posible activar la SREBP e incrementar la expresión de la reductasa HMG-CoA y del receptor LDL eliminando el colesterol del medio de cultivo. Esto se puede conseguir exponiendo las células a medio sin suero durante 24 horas (31, 32).

[0174] Los siguientes experimentos relacionados fueron realizados para evaluar el efecto de la lunasina sobre la expresión de la reductasa HMG-CoA y la expresión del receptor LDL.

[0175] En el primer experimento, células HepG2 (1×10^6) fueron tratadas con o sin 10 μ M de lunasina sintética en DMEM con 10% de FBS durante 24 horas antes de sustituir el medio de cultivo con medio sin colesterol para activar la SREBP. Después de 24 horas, se extrajo la proteína total y 10 μ g de proteína se cargaron en geles con 10% de Tris-glicina, se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa, y se inmunotifirieron con anticuerpos primarios contra la reductasa HMG-CoA y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas se obtienen por escaneo digital y el software Un-Scan It, y representan la media y la desviación típica de tres experimentos separados. Los resultados se muestran en la Figura 2.

[0176] En el segundo experimento, células HepG2 (1×10^6) fueron tratadas con o sin 10 μ M lunasina sintética en DMEM con 10% de FBS durante 24 horas antes de sustituir el medio de cultivo con medio sin colesterol para

activar la SREBP. Después de 24 horas, se extrajo la proteína total y 10 ug de proteínas se cargaron en geles con 10% de Tris-glicina, se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa, y se inmunotifieron con anticuerpos primarios contra el receptor LDL y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas se obtuvieron por escaneo digital y el software Un-Scan It, y representan la media y la desviación típica de tres experimentos separados. Los resultados se muestran en la Figura 3.

[0177] Las Figuras 2 y 3 muestran la regulación al alza de la reductasa HMG-CoA (98% de incremento) y del receptor LDL (34% de incremento) cuando células HepG2 se cultivan en medio sin colesterol durante 24 horas. Sin embargo cuando se añade lunasina al medio sin colesterol, la expresión de la reductasa HMG-CoA se reduce más de un 50% (Figura 2), mientras que la expresión del receptor LDL se ha incrementado más del 60% (Figura 3).

[0178] Este efecto de la lunasina es similar a los fármacos con estatina que reducen la síntesis endógena de colesterol inhibiendo la actividad de la reductasa HMG-CoA, lo que da lugar a incremento de la expresión del receptor LDL. No obstante, aunque no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier mecanismo o modo de acción preciso, el modo de acción de la lunasina se cree que difiere de los fármacos con estatina en que parece inhibir la expresión de la reductasa HMG-CoA a nivel transcripcional, en vez de inhibir su actividad enzimática. Al igual que los fármacos con estatina, la lunasina regula al alza la expresión del gen receptor LDL. Nuevamente, aunque no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier mecanismo o modo de acción preciso, el efecto contrapuesto de la lunasina sobre estos dos genes controlados por la SREBP se puede explicar por la inclusión selectiva de diferentes factores de transcripción correguladores a dos secuencias promotor / regulador separadas reguladas por el colesterol.

EJEMPLO 2

[0179] Efecto de la lunasina sobre la expresión del coactivador Sp1

[0180] A diferencia de la reductasa HMG-CoA, la activación por la SREBP del receptor LDL por la disminución de esteroides requiere un incremento de la inclusión del coactivador Sp1 a un sitio adyacente a la SREBP en la secuencia promotor / regulador del gen receptor LDL (**25**). Como se muestra en la Figura 3, la regulación al alza del receptor LDL por la lunasina (LS) en medio sin colesterol puede ser debida a una disponibilidad e inclusión incrementados del coactivador Sp1 a la secuencia promotor / regulador del receptor LDL. Para comprobar esta hipótesis, se determinó el nivel de Sp1 en medio de cultivo tratado con lunasina y medio sin colesterol mediante análisis Western usando anticuerpo Sp1, como sigue: células HepG2 (1×10^6) se cultivaron a partir de la confluencia en DMEM con 10% de FBS durante 24 horas antes de sustituir el medio de cultivo con medio de cultivo nuevo o medio sin colesterol (para activar la SREBP) y tratado con, o sin 10 uM de lunasina sintética. Después de 24 horas, se extrajo la proteína total de cada tratamiento y 10 ug de proteína se cargó en geles con 10% de Tris-glicina, se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa, e inmunotifieron con anticuerpos primarios contra Sp1 y actina (para mostrar igual carga de proteínas). Los valores densitométricos de las manchas se obtuvieron por escaneo digital y el software Un-Scan It y representan los datos de un experimento. Los resultados se muestran en la Figura 4.

[0181] La Figura 4 muestra que los niveles de Sp1 en medio de cultivo control y tratado con lunasina no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, los niveles de Sp1 aumentaron en el medio sin colesterol un 23%, en comparación con el medio de cultivo. La adición de lunasina al medio sin colesterol incrementó adicionalmente los niveles de Sp1 casi un 60%, lo que refleja estrechamente el incremento en los niveles de receptor LDL en el medio sin colesterol tratado con lunasina.

[0182] Los datos de estos experimentos indican que el incremento en la expresión del receptor LDL por la lunasina en medios reducidos en esteroides podría ser atribuido al incremento de disponibilidad del coactivador transcripcional Sp1. También, la inhibición de la expresión de la reductasa HMG-CoA por la lunasina disminuye los niveles intracelulares de colesterol que mantienen activada la SREBP, dando lugar a la regulación al alza de la expresión del receptor LDL. Por consiguiente, los datos muestran que la lunasina inhibe la expresión de la reductasa HMG-CoA, la enzima reguladora en la vía metabólica del organismo para sintetizar el colesterol, y al mismo tiempo incrementa la expresión del receptor LDL, dando lugar a un incremento del aclaramiento de la lipoproteína de baja densidad (LDL) del torrente sanguíneo, que disminuirá el colesterol total y LDL en un individuo.

[0183] La mayoría del colesterol circulante en los individuos se sintetiza internamente, 1000 mg/día en promedio, en comparación con 200-300 mg/día de la ingesta intestinal en la dieta de una persona. Por consiguiente la producción interna de colesterol, catalizada por la reductasa HMG-CoA y la cantidad de receptores LDL en las membranas de las células hepáticas, es el factor aislado más importante para modular los niveles de colesterol en los individuos. En consecuencia, estos experimentos demuestran que una cantidad efectiva de lunasina reduce ambos niveles de colesterol LDL y total en un individuo.

EJEMPLO 3

[0187] La lunasina se puede extraer de fuentes comerciales de proteína de soja. La lunasina se ha encontrado en cantidades significativas en fuentes comerciales de proteína de soja (19) y sus análogos en otras fuentes de semillas tales como cebada (4) y trigo (5). Para identificar fuentes preferidas para la materia prima de partida que se puede usar para obtener extracto de semillas enriquecido en lunasina, se cribaron varios productos de proteína de soja disponibles comercialmente para la presencia de lunasina.

[0185] El procedimiento usado fue como sigue: muestras de aproximadamente 500 mg de proteína de soja (**A-E**) obtenidas de diferentes fuentes comerciales (Solae, St. Louis, MO) se disolvieron en 50 mL de tampón fosfato acuoso (pH 7,2) agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos y la fracción acuosa se separó y colocó en tubos separados. Se midieron las concentraciones de proteína mediante el ensayo Bradford y alrededor de 20 µg de proteína total se cargaron en dos geles de Tris-Tricina al 16% de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California). Uno de los geles SDS-PAGE (**I**) fue teñido con azul Coomassie y desteñido antes de la formación de imagen digital. La banda de lunasina de 5 kDa está indicada por una flecha. El otro (**II**) se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo policlonal de lunasina purificado por afinidad (Pacific Immunology, (Ramona, California) seguido por anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado con HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Las inmunoseñales de la lunasina (indicadas por flechas) se detectan usando el kit Western blotting ECL de Amersham.

[0186] Los resultados aparecen en Figura 5. En la fotografía queda claro que la concentración de lunasina varía radicalmente de un origen a otro. Este ensayo es una herramienta útil para identificar fuentes de lunasina natural para usar en las composiciones y métodos de la presente invención. El concentrado de soja (muestra A en la Figura 5) que contenía la mayor parte de lunasina se usó como material de partida en un procedimiento de extracción con tampón para producir un extracto de semillas enriquecido en lunasina al que se hace referencia como un "concentrado de soja enriquecido en lunasina" o "LeSC" en los siguientes ejemplos y en las figuras a las que hacen referencia.

EJEMPLO 4

[0187] Concentrado de soja enriquecido en lunasina (LeSC) formulado y LeSC suplementado con harina de soja (SF) contienen cantidades significativas de lunasina. Este experimento evaluó la cantidad de lunasina en el concentrado de soja enriquecido en lunasina (LeSC) y en el LeSC suplementado con harina de soja. Obsérvese que en determinadas realizaciones de la presente invención, se obtiene extracto de semillas enriquecido en lunasina de aislado de soja o de otros productos de soja en vez de del concentrado de soja.

[0188] Concentrado de soja enriquecido en lunasina fue producido identificando primero preparados de proteína de soja comercialmente disponibles que contienen cantidades significativas de lunasina por análisis Western blot usando anticuerpo policlonal de lunasina, como se describe en el Ejemplo 3. El concentrado de proteína de soja identificado como conteniendo la mayor parte de lunasina se usó como material de partida en un procedimiento de extracción con tampón (0,1 X PBS pH 7,2) en un paso seguido por centrifugación para separar el sobrenadante. Al sobrenadante se añadieron dos volúmenes de acetona y se separó el precipitado por centrifugación con bolsas de filtro antes de secarlo al vacío para obtener el concentrado de soja enriquecido en lunasina.

[0189] Los trabajos para hacer la lunasina más resistente a la digestión excesiva no deseada, mejorar su biodisponibilidad, y retener su bioactividad cuando se ingiere, dieron lugar al descubrimiento de al menos una de las realizaciones preferidas de la presente invención, una composición que comprende extracto de semillas enriquecido en lunasina y harina de soja.

[0190] En al menos una realización de la presente invención, las composiciones de la presente invención que comprenden lunasina obtenida de forma natural se pueden optimizar para usarse en métodos particulares de la presente invención variando la cantidad de proteína total y el contenido en lunasina, que se puede controlar mediante la cantidad de concentrado de soja usado, y variando la cantidad de protección de la lunasina de la digestión, lo que se puede controlar mediante la cantidad de harina de soja usada.

[0191] Para artículos basados en alimentos a veces es deseable limitar la cantidad de inhibidores de proteasa en un producto. Por ejemplo, la solicitud de patente U.S. N° 20070092633, presentada el 26 de abril de 2007, incorporada en este documento por referencia, enseña que parte del procesamiento estándar de algunos productos de soja incluye tratamiento térmico para inactivar elementos antinutricionales tales como los inhibidores Bowman-Birk y Kuntz. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, una composición que comprende lunasina y harina de soja se optimiza por medio de métodos de preparación descritos en este documento o conocidos al versado en la técnica, para tener un nivel de inhibidores de proteasa

suficiente para proteger la actividad biológica de la lunasina durante la digestión pero no suficiente para tener niveles de elementos antinutricionales que sean indeseables para el uso oral.

[0192] Ensayos clínicos sobre una mezcla 50:50 de concentrado de soja y harina de soja dieron lugar a un 20-30% de reducción del colesterol LDL (26, 27). Esos ensayos clínicos fueron realizados sin el conocimiento de que la lunasina es un elemento activo en el concentrado de soja para reducir el colesterol LDL, y por ello no controlaron el nivel de lunasina presente en la mezcla. La presente invención enseña métodos mejorados para determinar la concentración de lunasina en los materiales de partida y productos finales de la presente invención, para maximizar la concentración de lunasina y por ello la actividad de composiciones de tratamiento en aplicaciones relacionadas con el colesterol. En al menos una realización preferida de la presente invención la proporción de harina de soja a extracto de semillas enriquecido en lunasina está entre 10:90 y 50:50, más preferiblemente entre 20:80 y 40:60, más preferiblemente aproximadamente 30:70 harina de soja: concentrado de soja. En una realización preferida de la presente invención, la proporción de harina de soja a extracto de semillas enriquecido en lunasina es la que proporciona una concentración biológicamente activa de lunasina y también suficiente protección de la digestión por la harina de soja.

[0193] En los siguientes diversos experimentos, harina de soja (SF) fue añadida al concentrado de soja de partida (a una mezcla 30:70 p/p) antes de extracción con tampón con 0,1 x PBS pH 7,2 y precipitación con acetona para producir concentrado de soja enriquecido en lunasina más harina de soja (LeSC + SF).

[0194] El procedimiento de análisis Western blot usado en este experimento fue como sigue: aproximadamente 20 ug de proteína total de LeSC, SF y el LeSC+SF sufrieron electroforesis en geles de Tris-Tricina al 16% y se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa. Las transferencias fueron incubadas con anticuerpo policlonal de lunasina seguido por anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP antes de detectar las inmunoseñales de lunasina con el kit ECL. Ambos, LeSC y LeSC + SF contenían cantidades significativas de lunasina, como se muestra en la Figura 6.

EJEMPLO 5

[0195] El extracto de semillas enriquecido en lunasina combinado con harina de soja retiene la bioactividad aun cuando se digiere con enzimas digestivas.

[0196] La actividad biológica de LeSC (**A**), LeSC + SF (**B**), LeSC + SF digerido (**C**), LeSC digerido (**D**), aislado de proteína de soja digerido (**E**) y concentrado de soja digerido (**F**) se midieron usando el ensayo histona H3 acetiltransferasa (HAT) (ver Ejemplo 8). Alrededor de 100 mg de proteína total de LeSC, LeSC + SF, aislado de proteína de soja y concentrado de soja fueron digeridos mezclando pancreatina (Sigma Life Sciences, Saint Louis, Missouri) al 1:1 (p/p) e incubando durante 30 min a 40 °C. Para confirmar que el ensayo HAT funciona, se incluyó tratamiento con lunasina sintética (**+synl₁**). La lunasina sintética redujo la acetilación de la histona H3 por la enzima histona acetilasa, PCAF, usando histonas nucleares aisladas de eritrocito de pollo (Upstate/Millipore, Billerica, MA) como patrón para el ensayo HAT. Alrededor de 10 ug de muestra de proteína se incubaron con 1 ug de histonas nucleares antes de sufrir la reacción HAT con enzima PCAF y sustrato acetil CoA. Los productos de reacción se corrieron en geles de Tris-Tricina al 16% y se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa. Las transferencias fueron incubadas con anticuerpo primario contra H3 acetilada (desacetilada en histona 14 e histona 10) y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP antes de detectar las señales usando el kit ECL. Señales bajas indicaron que el péptido lunasina era bioactivo porque impidió la acetilación de la histona H3. Señales intensas indicaron que el péptido lunasina había sido digerido e inactivado, no teniendo por ello efecto sobre los niveles de acetilación de la histona H3. Los resultados se muestran en la Figura 7.

[0197] Hubo una reducción significativa en la acetilación H3 en presencia de lunasina sintética en comparación con el control sin tratar. Ambos, el LeSC (**A** en la Figura 7) y el LeSC + SF (**B** en la Figura 7) fueron capaces de reducir significativamente la acetilación H3 por la PCAF, indicando que la lunasina encontrada en ambos extractos de proteína de soja es biológicamente activa. La digestión con pancreatina del LeSC + SF (**C** en la Figura 7) redujo la actividad biológica pero no en la medida observada cuando se digirió el LeSC solo (**D** en la Figura 7). Al igual que el LeSC, el aislado de proteína de soja y el concentrado de soja que contienen cantidades significativas de lunasina, no mostraron actividad biológica de la lunasina después de la digestión con pancreatina (E y F en la Figura 7). Estos resultados indican que el LeSC + SF formulado protege la lunasina en cierta medida de la digestión con pancreatina, y permite a la lunasina retener su actividad biológica.

EJEMPLO 6

[0198] La digestión parcial del LeSC + SF formulado incrementa la actividad biológica de la lunasina. Se realizó un experimento de confirmación para determinar la actividad biológica del LeSC y LeSC + SF digeridos y sin digerir usando un patrón de histona nuclear diferente. Esta vez usamos las histonas nucleares extraídas de

células tumorales HeLa. A diferencia de las células eritrocito de pollo, las histonas nucleares de células HeLa tratadas con butirato sódico están disponibles comercialmente (Upstate/Millipore, Piscataway, NJ), y se pueden usar como control positivo para la acetilación de la histona. Las histonas nucleares aisladas de células HeLa sin tratar se usaron como control negativo (niveles bajos de acetilación de la histona) y como patrón para el ensayo HAT.

[0199] El ensayo de bioactividad HAT se realizó usando histonas nucleares extraídas con ácido de células HeLa (Upstate/Millipore) como patrón (control **temp** (-)) para la reacción HAT catalizada por PCAF. Histonas nucleares de células HeLa tratadas con butirato sódico (**NaB**) se usaron como control positivo ya que el NaB es un inhibidor de la histona desacetilasa que se sabe que incrementa la acetilación de la histona. El efecto inhibitorio de la lunasina sintética (+synL) sobre la acetilación de la histona H3 por la PCAF se usó para comparar el efecto del concentrado de soja enriquecido en lunasina (**A**), LeSC digerido (**A dig**), LeSC + SF (**B**) y LeSC + SF digerido (**B dig**). LeSC y LeSC + SF fueron digeridos parcialmente añadiendo pancreatina a 1:0,5 (p/p) e incubando a 38 °C durante 15 min. Los números bajo la leyenda indican las lecturas densitométricas relativas normalizadas usando la inmunoseñal del patrón (**temp**). Números bajos indican presencia de actividad biológica de la lunasina.

[0200] Los resultados se muestran en la Figura 8. Se vio reducción significativa en la acetilación H3 en presencia de la lunasina sintética. El LeSC (A) y LeSC + SF (B) no digeridos mostraron niveles reducidos de acetilación H3, indicando que la lunasina natural encontrada en estos extractos de soja era biológicamente activa. La digestión parcial de LeSC (A Dig) dio lugar a la pérdida de actividad biológica.

[0201] Sorprendentemente, la digestión parcial del LeSC +SF dio lugar a un incremento de la actividad biológica en vez de a una reducción. Aunque no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier mecanismo preciso, se cree que la lunasina está ligada covalentemente a proteínas complejas de elevado peso molecular y que, con la protección de la harina de soja, la digestión parcial solamente rompe estos enlaces y libera, pero no destruye, la lunasina bioactiva en la solución. En una realización preferida de la presente invención, la lunasina es parcialmente digerida antes del uso. En otra realización preferida de la presente invención, la harina de soja está presente cuando la lunasina se digiere parcialmente.

[0202] El LeSC + SF fue parcialmente digerido mezclándolo con solución de pancreatina (10 ug/mL de agua destilada) recientemente preparada en una proporción 1:0,5, (p/p). La mezcla se incubó a 38 °C durante 15 min antes de inactivar las proteasas y enzimas digestivas hirviendo durante 5 min y luego enfriando en hielo. En estas condiciones de digestión la lunasina en el extracto de soja LeSC fue digerida e inactivada (Figura 8 Calle A dig) mientras que la de LeSC + SF era más biológicamente activa (Figura 8 Calle B dig). Sin embargo, las condiciones para la digestión parcial del LeSC + SF han de ser determinadas empíricamente analizando el contenido en lunasina de los productos de la digestión (Figura 6) y la actividad biológica usando el ensayo HAT (Figura 8).

[0203] Variaciones en las fuentes de las enzimas pancreatina y proteasa, la antigüedad del enzima proteasa, o las condiciones de incubación pueden dar lugar a variabilidad en las condiciones de digestión. Por ejemplo, el uso de preparados de pancreatina de un mes de antigüedad para la digestión parcial dio lugar a la degradación y pérdida de actividad de la lunasina en condiciones de incubación similares descritas anteriormente. Por ello, en una realización preferida de la presente invención, rangos aceptables para la concentración de y tiempo de incubación con las enzimas proteasa se determinaron usando un ensayo tal como el ensayo HAT usado anteriormente para evaluar la actividad biológica de las composiciones tratadas. En una realización preferida de la presente invención enzimas pancreatina recientes, incubados a 38 °C durante 10 minutos. Para cada ug del extracto de lunasina usar 0,5 ug de pancreatina.

EJEMPLO 7

[0204] Los inhibidores de quimotripsina (Chy) protegen la bioactividad de la lunasina. Para determinar qué inhibidores de proteasa encontrados en la soja protegen la lunasina de la digestión, inhibidor de tripsina de haba de soja y tripsina + inhibidores de quimotripsina se obtuvieron de Sigma y se mezclaron con LeSC en una proporción 1:1 p/p. Las mezclas fueron digeridas con pancreatina, y los productos de la digestión se inmunotifieron con anticuerpo de lunasina.

[0205] Los detalles del experimento son como sigue. LeSC + inhibidores de tripsina de haba de soja (1:1 p/p) (Sigma) y LeSC + tripsina e inhibidores de quimotripsina (1:1 p/p) (Sigma) fueron digeridos con pancreatina (1:1 p/p) incubando a 38°C durante 15 min. Los productos de la digestión y el LeSC fueron analizados por análisis Western blot (Figura 9) usando anticuerpo primario de lunasina y lunasina sintética como controles estándar.

[0206] El ensayo de bioactividad HAT fue realizado usando histonas nucleares de células eritrocito de pollo (Upstate/Millipore) como patrón para la reacción HAT catalizada por la PCAF (Figura 10). El efecto inhibitorio de la lunasina sintética (+synL) sobre la acetilación de la histona H3 por la PCAF comparado con el control negativo sin tratar (- synL) se usó para comparar el efecto de LeSC digerido (A), LeSC digerido + try + chy (B), LeSC digerido + try (C), LeSC sin digerir (D) y LeSC sin digerir +SF (E). Los números bajo la leyenda indican las

lecturas densitométricas relativas normalizadas usando la inmunoseñal del LeSC sin digerir (D). Números bajos indican la presencia de actividad biológica de la lunasina.

[0207] Los resultados en las Figuras 9 y 10 muestran que en la muestra de LeSC + tripsina + inhibidores de quimotripsina la lunasina estuvo mejor protegida de la digestión que en la muestra de LeSC + inhibidor de tripsina. Igualmente en los ensayos HAT para determinar la actividad biológica de la lunasina, la digestión de LeSC + tripsina + inhibidores de quimotripsina fue significativamente más bioactiva que LeSC + inhibidor de tripsina (Figura 10). La digestión con pancreatina del LeSC dio lugar a la pérdida de actividad biológica. Estos resultados indican que la presencia de inhibidores de quimotripsina con extracto de semillas enriquecido en lunasina ayuda a ambos, proteger la actividad biológica de la lunasina y ayuda a proteger la lunasina de la digestión excesiva.

EJEMPLO 8

[0208] Ensayo de cribado para determinar la actividad biológica de la lunasina.

[0209] Histonas nucleares purificadas de células eritrocito de pollo se usaron como patrones en reacciones histona acetilasa (HAT) usando enzima histona acetilasa PCAF, en presencia o ausencia de alrededor de 2-10 uM de lunasina. El patrón histona nuclear y los concentrados de soja enriquecidos en lunasina (LeSC y LeSC + SF) se mezclaron (10:1 p/p) e incubaron en hielo durante 5 min y 25 °C durante 10 min antes de añadir la mezcla a mezcla de reacción 1X HAT, 1 uM de acetil CoA y 5 uL de PCAF (basándose en la concentración recomendada de Upstate/Millipore). La mezcla de reacción se incubó a 30 °C con agitación a 250 rpm durante 1 h. La reacción se detuvo añadiendo tampón de paro Laemmli (1:1 v/v) con betamercaptoetanol, e hirviendo durante 5 min antes de enfriar en hielo durante 15 min. Los productos de la reacción PCAF HAT se corrieron en SDS-PAGE al 16%, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se inmunotifieron con anticuerpos primarios contra histona H3 desacetilada (Ac-Lys 13 + Ac-Lys14 H3) seguido por anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP. Las señales quimioluminiscentes de los complejos anticuerpo se visualizaron usando reactivos estándar de quimioluminiscencia y se expusieron a película Kodak BioMAX, se revelaron y se midieron las manchas densitométricas usando un escáner digital y el programa de software UN-SCAN-IT de Silk Scientific (Orem, Utah). La Figura 7, Calles A y B muestran la reducción de la acetilación H3 en las mezclas de reacción tratadas con LeSC y LeSC + SF comparadas con el control sin tratar, que indican que este procedimiento de cribado puede determinar la actividad biológica de los extractos de semillas enriquecidos en lunasina y otras composiciones que comprenden lunasina o fragmentos, análogos o variantes de lunasina. En la misma Figura 7, también se determinó que la digestión del LeSC (Calle D) eliminó la actividad biológica pero no la del LeSC + SF (Calle C) que muestra solamente una reducción parcial de la actividad biológica. EJEMPLO 9

[0210] La actividad *in vivo* de de las composiciones actualmente descritas, así como el tratamiento la utilización de kits y métodos de tratamiento, puede determinarse opcionalmente por uno u otro de los siguientes procedimientos.

[0211] Perros macho (beagles, de entre alrededor de 9 a alrededor de 14 kilogramos, de 1 a 4 años de edad) se alimentaron con un pienso para perros estándar suplementado con 5,5% de grasa y 1 % de colesterol. Se extrajeron muestras de sangre iniciales de perros en ayunas antes de empezar el estudio para obtener valores de referencia del colesterol plasmático. Los perros se distribuyeron aleatoriamente en grupos de cinco animales con niveles de colesterol plasmático similares. Los animales se dosificaron de acuerdo con un método de tratamiento descrito en este documento inmediatamente antes del suministro de la dieta durante siete días. Se obtuvieron muestras de sangre 24 horas después de la última dosis para determinar el colesterol plasmático. Los niveles de colesterol plasmático se determinaron mediante una modificación del método colesterol oxidasa usando un kit disponible comercialmente.

[0212] En un procedimiento alternativo opcional, hámsteres se separaron en grupos de seis y se les suministró una dieta controlada en colesterol conteniendo 0,5% de colesterol durante siete días. Se controló el consumo de dieta para determinar la exposición al colesterol dietario. Los animales se dosificaron de acuerdo con un método de tratamiento descrito en este documento una vez al día empezando con el inicio de la dieta. La dosificación es por sonda oral. A todos los animales moribundos o en malas condiciones físicas se les practicó la eutanasia. Después de siete días, los animales son anestesiados por inyección intramuscular (IM) de ketamina y sacrificados por decapitación. La sangre se recoge en tubos vacutainer que contienen EDTA para analizar los lípidos plasmáticos y se extirpa el hígado para analizar los lípidos tisulares. El análisis de lípidos se realiza mediante procedimientos publicados (ej., Schnitzer-Polokoff y col., Comp. Biochem. Physiol., 99A, 4 (1991), pp. 665-670 y los datos se registran como porcentaje de reducción de lípidos frente al control.

[0213] La especificación, ejemplos y datos anteriores proporcionan una descripción completa de la fabricación y uso de las composiciones de la invención. Aunque los productos, composiciones y métodos relacionados se han descrito en términos de lo que se considera actualmente que son las realizaciones más prácticas y preferidas, se pretende cubrir diversas modificaciones y disposiciones similares incluidas dentro del espíritu y el ámbito de las

reivindicaciones. La presente declaración incluye cualquiera y todas las realizaciones de las siguientes reivindicaciones.

[0214] Referencias

[0215] Las referencias numéricas incorporadas anteriormente corresponden a la siguiente lista de artículos y resúmenes publicados.

5

1. Adlercruz H & Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* 29: 95-120 (1997).

10

2. Zhang X., Shu XO, Gao YT, Yang G., Li O, Li H, Jin F & Zheng W. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J. Nutr.* 133: 2874-2878 (2003).

3. Anderson JW, Johnstone BM & Cook-Newell ME. Meta-analysis of effects of soy protein intake on serum lipids in humans. *N Eng J Med* 333: 276-282 (1995).

15

4. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL et al. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* 126: 43-50 (1996).

5. Arjmandi BH, Khan DA, Juma S & Svanborg A. The ovarian hormone deficiency-induced hypercholesterolemia is reversed by soy protein and the synthetic isoflavone, ipriflavone. *Nutr. Res.* 17: 885-894 (1997).

20

6. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BU6 mice but not LDL-receptor deficient mice. *J. Nutr.* 128: 954-959 (1998).

25

7. Crouse JR, Morgan T, Terry JG. A randomizing trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 159: 2070-2076 (1999).

8. Wong WW, Smith EO, Stuff JE. Cholesterol lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 68: 1385S-1389S (1998).

30

9. Greaves KA, Parks JS, Williams JK & Wagner JD. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J. Nutr.* 129: 1585-1592 (1999).

35

10. Verrillo A, Teresa de A, Giarrusso PC. Soybean protein diets in the management of type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 54: 321 (1985).

40

11. Kris-Etherton P & West SG. Soy protein with or without isoflavones: in search of a cardioprotective mechanism of action. *Am J Clin Nutr* 81: 5-6 (2005).

12. Anthony MS. Phytoestrogens and cardiovascular disease: Where's the meat? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1245-1257 (2002).

45

13. Vega-Lopez S, Yeum K-J, Leckler JL. Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am J Clin Nutr* 81: 43-49 (2005).

14. Oakenfull DG & Sidhu GS. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolemia? *Eur J Clin Nutr* 44: 79-88 (1990).
- 5 15. Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS & Anthony MS. Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J. Nutr.* 134: 511-516 (2004).
16. Sacks FM, Lichtenstein A., Van Horn L., Harris W., Kris-Etherton P. & Winston M. Soy protein, isoflavones and cardiovascular health. An American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*. On-line publication, Feb. 21, 2006.
- 10 17. Galvez, A.F., Revilleza, M.J.R. & de Lumen, B.O. A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA. *Plant Physiol* 114:1 567 (1997).
18. Galvez, A.F. & de Lumen, B.O. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotech.* 17: 495-500 (1999).
- 15 19. de Mejia EG, Vasconez M., de Lumen BO & Nelson R. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein and isoflavone products. *J Agric Food Chem* 52: 5882-5887 (2004).
- 20 20. Galvez, A.F. Chen, N., Macasieb, J., & de Lumen, B.O. Chemopreventive property of a soybean peptide. *Cancer Res.* 61 7473-7478 (2001).
21. De Pinho, R.A. The cancer-chromatin connection. *Nature* 391: 533-536 (1998).
- 25 22. Kuzmin I. & Geil L. DNA methylation and chromatin modifications in cancer and development. *Int Arch Biosci* 2001: 1047-1056 (2001).
23. Magbanua M, Dawson K, Huang L, Malyj W, Gregg J, Galvez A & Rodriguez RL. Nutrient - Gene Interactions Involving Soy Peptide and Chemopreventive Genes in Prostate Epithelial Cells, in *Nutritional Genomics - Discovering the Path to Personalized Nutrition*, J. Kaput and R. L. Rodriguez eds., Wiley and Sons, New Jersey (2005).
- 30 24. Bennett MK & Osborne TF. Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: Increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *PNAS* 97: 6340-6344 (2000).
- 35 25. Brown MS & Goldstein JL. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. *Atherosclerosis Suppl* 5: 57-59 (2004).
- 40 26. Sirtori CR, Gatti E, Mantero O, Conti F., et al. Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 32:1645-1658 (1979).
27. Descovich GC, Ceredi C., Gaddi A., Benassi MS, et al., Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hyper-cholesterolaemic patients. *Lancet* 2: 709-712 (1980).
- 45 28. Lam, Y., Galvez, A., and de Lumen, B.O. Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition & Cancer*, 47: 88-94 (2003).

29. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? Trends in Cell Biology, 13: 65-70, (2003).
- 5 30. Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. European Journal of Biochemistry, 238: 1-27 (1996).
31. Mullen E, Brown RM, Osborne TF & Shay NF. Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. J. Nutr. 134: 2942-2947 (2004).
- 10 32. Gherardi E., Thomas K, Le Cras TD, Fitzsimmons C, Moorby CD & Bowyer DE. Growth requirements and expression of LDL receptor and HMG-CoA reductase in HepG2 hepatoblastoma cells cultured in a chemically defined medium. J Cell Sci. 103 :531-539 (1992).
- 15 33. Brown MS & Goldstein JL. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. Atherosclerosis Suppl 5: 57-59 (2004).
34. Di Pietro CM & Liener IE. Soybean protease inhibitors in foods. Journal of Food Science 54: 606-609 (1989).
- 20 35. Jeong HJ, Lam Y & de Lumen BO. Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. J Agric Food Chem. 50: 5903-5908 (2002).
36. Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS et al. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. Cancer Lett. 255: 42-48 (2007).
- 25 37. Fratalli V. Soybean inhibitors. III. Properties of a low molecular weight soybean protease inhibitor. J Biol Chem 274:280 (1969).
38. Odani et al. Amino acid sequence of a soybean (Glycine max) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure) J Biol Chem 262: 10502-10505. (1987).
- 30 39. Kho, CJ. and de Lumen, B.O. Identification and isolation of methionine-cysteine rich protein fraction in soybean seed. Plant Foods for Human Nutrition 38: 287-296 (1988).
- 35 40. Revilleza M.J., Galvez A.F., Krenz D. C. and de Lumen B.O. An 8 kDa methionine-rich protein from soybean (Glycine max) cotyledon: Identification, purification and N-terminal sequence. J Agric Food Chem 44: 2930-2935 (1996).

LISTADO DE SECUENCIAS

40

[0216]

<110> Galvez, Alfredo F

45

<120> Products and Methods using soy Peptides to Lower Total and LDL Cholesterol Levels in a Mammal

ES 2 427 856 T3

<130> 9 SoyL.8 PCT

<140> PCT/US07/78584

<141> 2007-09-15

5

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

10

<210> 1

<211> 157

<212> PRT

<213> Glycine max

15

<400> 1

Met Thr Lys Phe Thr Ile Leu Leu Ile Ser Leu Leu Phe Cys Ile Ala
1 5 10 15
His Thr Cys Ser Ala Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser Cys Arg
20 25 30
Lys Gln Leu Gln Gly Val Asn Leu Thr Pro Cys Glu Lys His Ile Met
35 40 45
Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
50 55 60
Asn His Ile Leu Arg Thr Met Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ile Arg Arg
65 70 75 80
Asn Glu Gly Lys Asp Glu Asp Glu Glu Glu Gly His Met Gln Lys Cys
85 90 95
Cys Thr Glu Met Ser Glu Leu Arg Ser Pro Lys Cys Gln Cys Lys Ala
100 105 110
Leu Gln Lys Ile Met Glu Asn Gln Ser Glu Glu Leu Glu Glu Lys Gln
115 120 125
Lys Lys Lys Met Glu Lys Glu Leu Ile Asn Leu Ala Thr Met Cys Arg
130 135 140
Phe Gly Pro Met Ile Gln Cys Asp Leu Ser Ser Asp Asp
145 150 155

<210> 2

<211> 43

ES 2 427 856 T3

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 2

5

Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser Cys Arg Lys Gln Leu Gln Gly
1 5 10 15

Val Asn Leu Thr Pro Cys Glu Lys His Ile Met Glu Lys Ile Gln Gly
20 25 30

Arg Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
35 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo consistente del péptido de SEQ ID NO 2 y una variante, fragmento o análogo funcionalmente equivalente de dicho péptido para uso en el tratamiento de altos niveles de colesterol en un individuo.
2. Una composición para el uso acorde a la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de enfermedad cardiovascular en un individuo que sufre de o está en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho compuesto se obtiene del haba de soja, trigo o cebada.
- 15 4. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho compuesto se obtiene produciendo, extrayendo y purificando dicho compuesto usando técnicas de ADN recombinante, o en la que dicho compuesto se obtiene por producción sintética del polipéptido.
5. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho individuo es de la especie humana, y especialmente en la que la composición se proporciona para ingestión oral.
- 20 6. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición está en la forma de una cápsula, tableta, polvo, formulación semisólida, líquido, gel, suspensión, o pulverización por aerosol.
7. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición comprende además inhibidor de quimotripsina y/o harina de soja.
- 25 8. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho compuesto es suministrado para administración a entre 0,05 mg/kg y 50 mg/kg diariamente.
- 30 9. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho individuo está en riesgo de aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio, ataque cardíaco, diabetes, enfermedad coronaria, angina de pecho o angina inestable.

FIGURA 2

EXPRESIÓN DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN MEDIOS SIN COLESTEROL TRATADOS CON LUNASINA

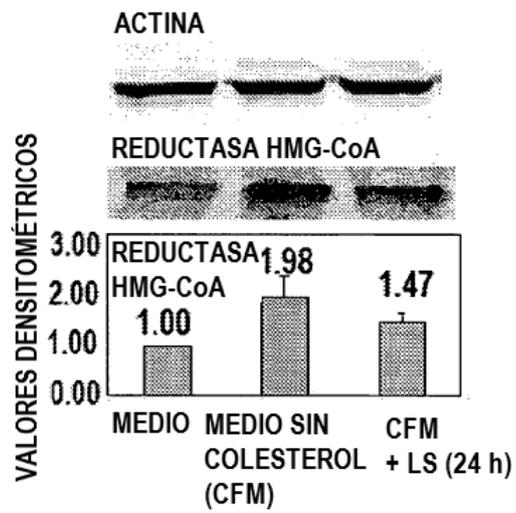


FIGURA 3

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR LDL EN MEDIO SIN COLESTEROL
TRATADO CON LUNASINA

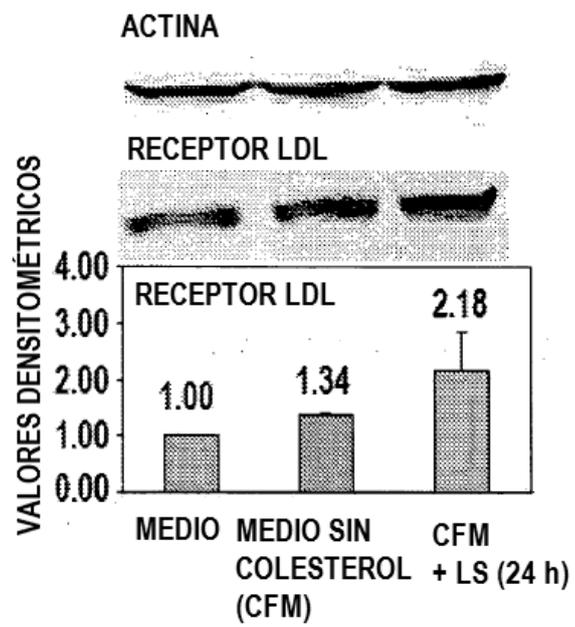


FIGURA 4

EXPRESION DE SP1 EN MEDIO DE CULTIVO TRATADO CON LUNASINA
Y MEDIO SIN COLESTEROL

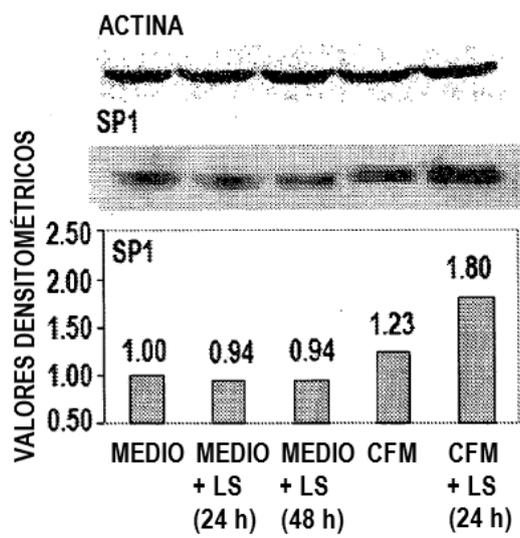


FIGURA 5

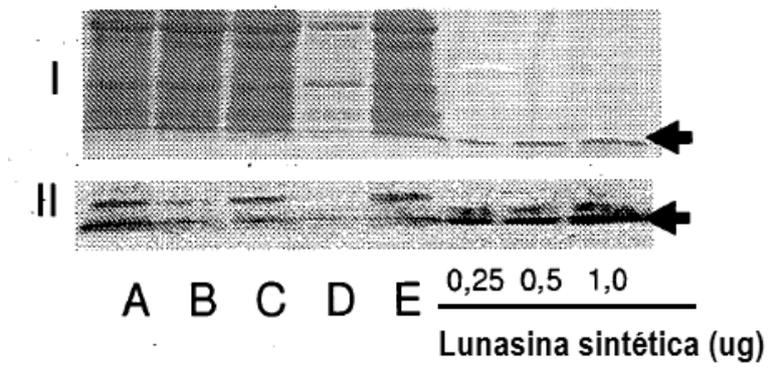


FIGURA 6

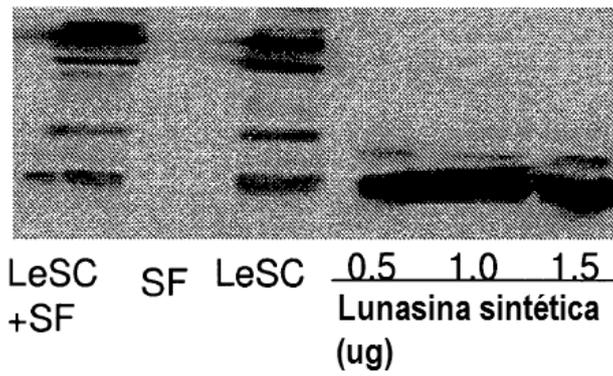
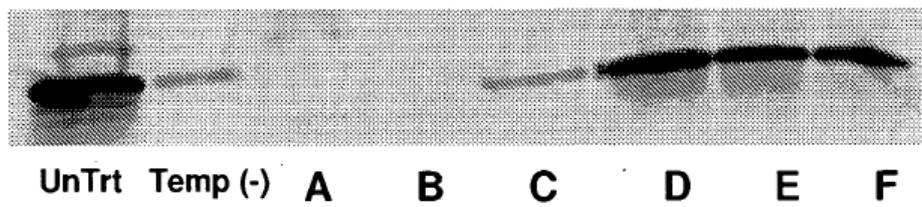
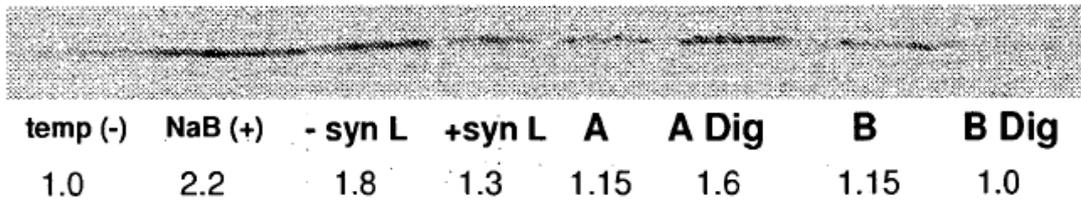


FIGURA 7



A = LeSC
B = LeSC + SF
C = LeSC + SF digerido
D = LeSC digerido
E = SPI digerido
F = SC digerido

FIGURA 8



A = LeSC
 B = LeSC + SF

FIGURA 9

Inmunotinción de lunasina

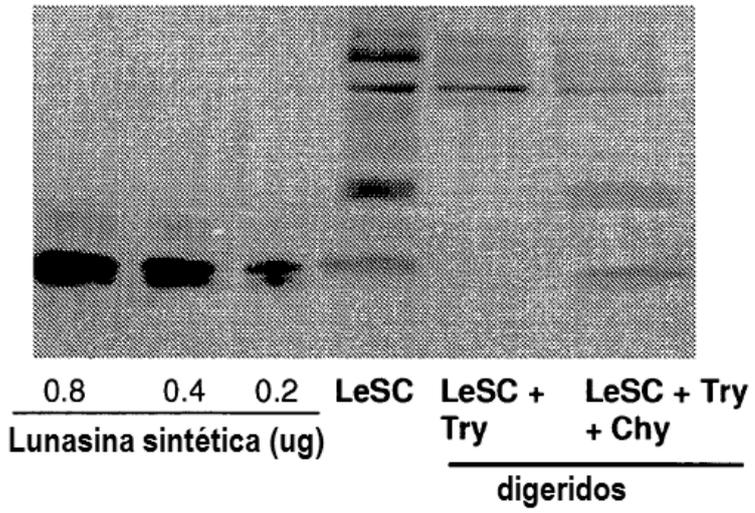
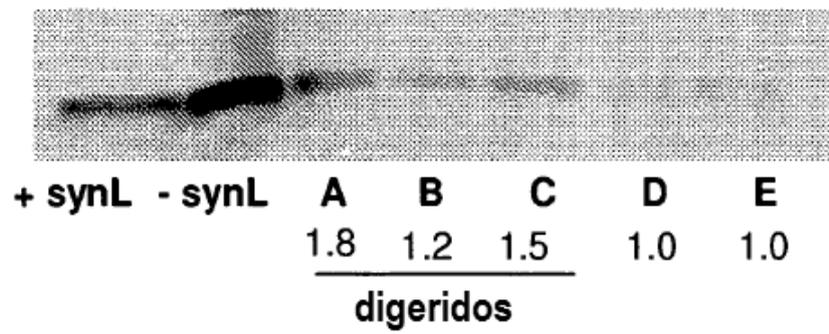


FIGURA 10

Ensayo de bioactividad



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es solamente para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aun cuando se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO renuncia a cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030027765 A1 [0008]
- US 6391848 A [0008]
- US 6544956 A [0008]
- US 6107287 A [0008] [0050]
- US 6544956 B [0050]
- US 20030229038 A [0050]
- US 6391848 B [0050]
- US 25225602 A [0050]
- US 30263302 A [0050]
- US 7235269 B, Konwinski [0130]
- US 4793996 A, Kennedy [0130]
- US 5217717 A [0130]
- US 5505946 A [0130]
- US 20030064121 A, Konwinski [0130]
- US 20070092633 A [0191]
- US 0778584 W [0216]

Bibliografía no patente citada en la descripción

- *Biochemistry*, 1972, vol. 11, 1726 [0040]
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0058]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0058]
- *Methods in Molecular Biology*. Humana Press [0058]
- *Cell Biology: A Laboratory Notebook*. Academic Press, 1988 [0058]
- *Animal Cell Culture*. 1987 [0058]
- *Introduction to Cell and Tissue Culture*. Plenum Press, 1998 [0058]
- *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. J. Wiley and Sons, August 1993 [0058]
- *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc, [0058]
- *Handbook of Experimental Immunology* [0058]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. 1987 [0058]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987 [0058]
- *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. 1997 [0058]
- *Current Protocols in Immunology*. 1991 [0058]
- *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, 1999 [0058]
- **HELLERSTEIN ; NEESE**. *Am J Physiol. Endocrinol Metab.*, 1999, vol. 276 (39), E1146-E1162 [0058]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, [0152]

- **SCHNITZER-POLOKOFF et al.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, vol. 99A (4), 665-670 [0212]
- **ADLERCRUZ H ; MAZUR W.** Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.*, 1997, vol. 29, 95-120 [0215]
- **ZHANG X. ; SHU XO ; GAO YT ; YANG G. ; LI O ; LI H ; JIN F ; ZHENG W.** Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J. Nutr.*, 2003, vol. 133, 2874-2878 [0215]
- **ANDERSON JW ; JOHNSTONE BM ; COOK-NEWELL ME.** Meta-analysis of effects of soy protein intake on serum lipids in humans. *N Eng J Med*, 1995, vol. 333, 276-282 [0215]
- **ANTHONY MS ; CLARKSON TB ; HUGHES CL.** Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.*, 1996, vol. 126, 43-50 [0215]
- **ARJMANDI BH ; KHAN DA ; JUMA S ; SVANBORG A.** The ovarian hormone deficiency-induced hypercholesterolemia is reversed by soy protein and the synthetic isoflavone, ipriflavone. *Nutr. Res.*, 1997, vol. 17, 885-894 [0215]
- **KIRK EA ; SUTHERLAND P ; WANG SA.** Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BU6 mice but not LDL-receptor deficient mice. *J. Nutr.*, 1998, vol. 128, 954-959 [0215]
- **CROUSE JR ; MORGAN T ; TERRY JG.** A randomizing trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.*, 1999, vol. 159, 2070-2076 [0215]
- **WONG WW ; SMITH EO ; STUFF JE.** Cholesterol lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, 1998, vol. 68 (1), 385S-1389S [0215]
- **GREAVES KA ; PARKS JS ; WILLIAMS JK ; WAGNER JD.** Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J. Nutr.*, 1999, vol. 129, 1585-1592 [0215]
- **VERRILLO A ; TERESA DE A ; GIARRUSSO PC.** Soybean protein diets in the management of type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 1985, vol. 54, 321 [0215]
- **KRIS-ETHERTON P ; WEST SG.** Soy protein with or without isoflavones: in search of a cardioprotective mechanism of action. *Am J Clin Nutr*, 2005, vol. 81, 5-6 [0215]
- **ANTHONY MS.** Phytoestrogens and cardiovascular disease: Where's the meat?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, vol. 22, 1245-1257 [0215]
- **VEGA-LOPEZ S ; YEUM K-J ; LECKLER JL.** Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am J Clin Nutr*, vol. 81, 43-49 [0215]
- **OAKENFULL DG ; SIDHU GS.** Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia?. *Eur J Clin Nutr*, 1990, vol. 44, 79-88 [0215]
- **ADAMS MR ; GOLDEN DL ; FRANKE AA ; POTTER SM ; SMITH HS ; ANTHONY MS.** Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J. Nutr.*, 2004, vol. 134, 511-516 [0215]
- **SACKS FM ; LICHTENSTEIN A. ; VAN HORN L. ; HARRIS W. ; KRIS-ETHERTON P ; WINSTON M.** Soy protein, isoflavones and cardiovascular health. An American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, 21 February 2006 [0215]
- **GALVEZ, A.F. ; REVILLEZA, M.J.R. ; LUMEN, B.O.** A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA. *Circulation*, 1997, vol. 114, 1-567 [0215]
- **GALVEZ, A.F. ; LUMEN, B.O.** A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotech.*, 1999, vol. 17, 495-500 [0215]

- **MEJIA EG ; VASCONEZ M. ; LUMEN BO ; NELSON R.** Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein and isoflavone products. *J Agric Food Chem*, 2004, vol. 52, 5882-5887 [0215]
- **GALVEZ, A.F. ; CHEN, N. ; MACASIEB, J. ; LUMEN, B.O.** Chemopreventive property of a soybean peptide. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 7473-7478 [0215]
- **DE PINHO, R.A.** The cancer-chromatin connection. *Nature*, 1998, vol. 391, 533-536 [0215]
- **KUZMIN I. ; GEIL L.** DNA methylation and chromatin modifications in cancer and development. *Int Arch Biosci*, 2001, vol. 2001, 1047-1 056 [0215]
- Nutrient - Gene Interactions Involving Soy Peptide and Chemopreventive Genes in Prostate Epithelial Cells. **MAGBANUA M ; DAWSON K ; HUANG L ; MALYJ W ; GREGG J ; GALVEZ A ; RODRIGUEZ RL.** Nutritional Genomics - Discovering the Path to Personalized Nutrition. Wiley and Sons, 2005 [0215]
- **BENNETT MK ; OSBORNE TF.** Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: Increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *PNAS*, 2000, vol. 97, 6340-6344 [0215]
- **BROWN MS ; GOLDSTEIN JL.** Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. *Atherosclerosis*, 2004, vol. 5, 57-59 [0215]
- **SIRTORI CR ; GATTI E ; MANTERO O ; CONTI F. et al.** Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.*, 1979, vol. 32, 1645-1658 [0215]
- **DESCOVICH GC ; CEREDI C. ; GADDI A. ; BENASSI MS et al.** Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hyper-cholesterolaemic patients. *Lancet*, 1980, vol. 2, 709-712 [0215]
- **LAM, Y.; GALVEZ, A. ; LUMEN, B.O.** Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition & Cancer*, 2003, vol. 47, 88-94 [0215]
- **COQUERET, O.** New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment?. *Trends in Cell Biology*, 2003, vol. 13, 65-70 [0215]
- **BRUZZONE, R. ; WHITE, T. W. ; PAUL, D. L.** Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, 1996, vol. 238, 1-27 [0215]
- **MULLEN E ; BROWN RM ; OSBORNE TF ; SHAY NF.** Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *J. Nutr.*, 2004, vol. 134, 2942-2947 [0215]
- **GHERARDI E. ; THOMAS K ; LE CRAS TD ; FITZSIMMONS C ; MOORBY CD ; BOWYER DE.** Growth requirements and expression of LDL receptor and HMG-CoA reductase in HepG2 hepatoblastoma cells cultured in a chemically defined medium. *J Cell Sci.*, 1992, vol. 103, 531-539 [0215]
- **DI PIETRO CM ; LIENER IE.** Soybean protease inhibitors in foods. *Journal of Food Science*, 1989, vol. 54, 606-609 [0215]
- **JEONG HJ ; LAM Y ; LUMEN BO.** Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J Agric Food Chem.*, 2002, vol. 50, 5903-5908 [0215]
- **JEONG HJ ; JEONG JB ; KIM DS et al.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett.*, 2007, vol. 255, 42-48 [0215]
- **FRATALLI V.** Soybean inhibitors.III. Properties of a low molecular weight soybean protease inhibitor. *J Biol Chem*, 1969, vol. 274, 280 [0215]
- **ODANI et al.** Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure. *J Biol Chem*, 1987, vol. 262, 10502-10505 [0215]

- **KHO, C.J. ; LUMEN, B.O.** Identification and isolation of methionine-cysteine rich protein fraction in soybean seed. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1988, vol. 38, 287-296 [0215]
- **REVILLEZA M.J. ; GALVEZ A.F. ; KRENZ D.C. ; LUMEN B.O.** An 8 kDa methionine-rich protein from soybean (*Glycine max*) cotyledon: Identification, purification and N-terminal sequence. *J Agric Food Chem*, 1996, vol. 44, 2930-2935 [0215]