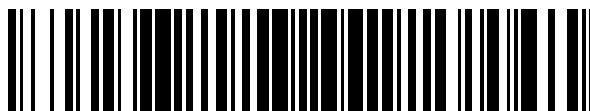


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 898**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009** **E 09162939 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 2264055**

54 Título: **Clonación, expresión de levaduras, purificación y actividad biológica de la región de extensión de la subunidad alfa' de la globulina 7S de soja involucrada en la homeostasis del colesterol de células Hep G2**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2014

73 Titular/es:

INDENA S.P.A. (100.0%)
Via Ortles, 12
20139 Milano, IT

72 Inventor/es:

MORAZZONI, PAOLO;
RIVA, ANTONELLA;
PONZONE, CESARE;
BERLANDA, DAVIDE;
DURANTI, MARCELLO y
CONSONNI, ALESSANDRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 460 898 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

Clonación, expresión de levaduras, purificación y actividad biológica de la región de extensión de la subunidad alfa' de la globulina 7S de soja involucrada en la homeostasis del colesterol de células Hep G2

- 5 La presente invención se refiere a un fragmento α' recombinante de la globulina 7S de soja que corresponde al fragmento hidrófilo N-terminal de la subunidad α' natural que consiste en 142 restos de aminoácidos de dicho lado N-terminal, a un procedimiento para su preparación y a composiciones que lo contienen como un principio activo útil para el control de la homeostasis del colesterol y los triglicéridos.

Antecedentes de la invención

- 10 El papel de las proteínas de soja en la dieta en el control de niveles lipídicos de pacientes hipercolesterolémicos es un tema ampliamente aceptado [1]. En estudios anteriores [2-4], la participación directa de una subunidad de la globulina 7S de soja, la subunidad α' , en la regulación positiva del receptor de LDL se demostró en sistemas *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que los (poli)péptidos biológicamente activos, capaces de modular la homeostasis del colesterol, se producen posiblemente por procesamiento enzimático celular.
- 15 La globulina 7S nativa se compone de tres cadenas polipeptídicas distribuidas al azar, las subunidades α' , α y β [5], codificadas por genes diferentes. Las cadenas maduras α' (Registro N. P11827 de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot) y α (Registro N. P13916 de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot) comparten una región N-terminal extendida de aproximadamente 145 restos de aminoácidos que no se encuentra en la subunidad β (Registro N. P25974 de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot). Basándose en la secuencia de aminoácidos peculiar de la región de extensión α' , esta subunidad se purificó por cromatografía de afinidad metálica y se
- 20 administró por vía oral a ratas hipercolesterolémicas, permitiendo de este modo mostrar sus propiedades tanto hipolipemiantes en plasma como de regulación positiva de receptores hepáticos de β -VLDL [4]. Por otro lado, ya que el peso molecular de la subunidad α' es de aproximadamente 71 kDa [6], parece poco probable que pueda atravesar *in vivo* la barrera intestinal sin modificación alguna.
- 25 Por esta razón, nuestra investigación se ha dirigido a la búsqueda de la secuencia (o secuencias) de aminoácidos de la subunidad α' responsable del efecto farmacológico. Dado que las regiones centrales de las tres subunidades tienen secuencias de aminoácidos más parecidas, es concebible que la actividad biológica resida en uno o más (poli)péptidos de la región de extensión. En principio, las diferencias localizadas, aunque significativas, de aminoácidos entre las regiones de extensión de las cadenas α' y α limitarían el número de péptidos responsables de la actividad biológica.
- 30 A partir de estas declaraciones anteriores, la primera estrategia seguida fue ensayar el efecto de ambos polipéptidos en células Hep G2, obtenidas a partir de la digestión *in vitro* (pepsina/tripsina) de Croksoy^R70, un concentrado de soja que carece de isoflavonas empleado rutinariamente en el tratamiento dietético de pacientes hipercolesterolémicos [7-8], y péptidos sintéticos, que corresponden a secuencias de aminoácidos específicas que difieren entre las subunidades de la globulina 7S de soja, en la modulación del receptor de LDL (LDL-R). Los
- 35 resultados obtenidos en estos estudios indicaron que podría inducirse una regulación positiva de LDL-R marcada en células HepG2 expuestas a productos de digestión enzimática de Croksoy^R70 con un PM que varía de 3.000 a 20.000 Da, así como a un pequeño péptido sintético (2.271 Da) de la globulina 7S de soja que se añadió a las células a una concentración de 10^{-4} M [9]. El estudio obtenido con pequeños péptidos continúa investigándose actualmente y hasta ahora no ha sido concluyente [10].
- 40 La capacidad reductora de colesterol y triglicéridos de las proteínas de soja es un tema consolidado. La dieta de proteína de soja es actualmente la herramienta dietética más potente para tratar a los pacientes hipercolesterolémicos, proporcionando así una oportunidad única para el tratamiento de adultos y sujetos muy jóvenes. Además, se ha establecido claramente que la reducción del colesterol en plasma es mayor en pacientes que tienen un alto grado inicial de colesterolemia [14].
- 45 La hipótesis de que las proteínas reducen de por sí el colesterol en sangre surgió de estudios experimentales que indicaban que un cambio de proteínas animales a vegetales en la dieta activaba el sistema receptor de LDL en el hígado de animales de laboratorio [15], así como en linfomonocitos circulantes de pacientes hipercolesterolémicos [16]. Para identificar los componentes de la proteína de soja responsables del efecto reductor del colesterol, se realizaron estudios *in vitro* con una línea celular de hepatoma humano que es altamente sensible a factores que
- 50 regulan la expresión del receptor de LDL y a la biosíntesis/degradación del colesterol. La subunidad α' purificada de la globulina 7S de soja resultó que regulaba positivamente a los receptores de LDL en células Hep G2 [3] y este descubrimiento se confirmó en ratas alimentadas con altos niveles de colesterol [4]. Aunque estos datos apoyan la hipótesis que la fracción de proteína es responsable del efecto biológico observado, se pueden plantear argumentos del destino biológico *in vivo* de la cadena α' , ya que los péptidos y los aminoácidos se producen normalmente por la
- 55 acción de enzimas proteolíticas gástricas y/o intestinales. Sin embargo, un número creciente de (poli)péptidos de animales y plantas afirma que juegan funciones relevantes de regulación, a menudo atribuidas a efectos anti-oxidantes, anti-proliferativos y anti-inflamatorios [17]. En lo que se refiere a la soja, la evidencia experimental indica claramente la posibilidad de que puedan adsorberse péptidos e incluso pequeñas proteínas compactas, tales como

el inhibidor de Bowman-Birk, [18], provocando así diversos efectos, que incluyen los anti-cancerígenos, anti-inflamatorios y los radio-protectores [19]. Se ha demostrado que los (poli)péptidos de la soja modificada genéticamente también desencadenan respuestas biológicas, tales como efectos hipotensores [20]. Recientemente, se ha identificado un péptido estimulador de la transcripción de LDL-R (FVVNATSN), que deriva de la cadena β de la globulina 7S, a partir de un hidrolizado de soja preparado por una proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens* y después por síntesis química [21].

En este caso, se detectó un aumento de la transcripción de LDL-R (+148%) en células Hep G2 expuestas al péptido a una concentración de 100 μ M. Otros péptidos derivados de la globulina 11 S han demostrado ejercer una actividad similar pero más baja [21].

El documento WO 03/063608 [24] muestra una subunidad alfa de la globulina 7S de soja truncada, que comprende el lado N-terminal de la subunidad alfa' natural que tiene un peso molecular de 28.000 Da, que se procesa para la preparación de los mismos y las composiciones que contienen el fragmento.

Lovati M. y col. [25] hacen referencia a la actividad biológica de una forma truncada de la subunidad alfa de la globulina 7S de soja (α') en la homeostasis del colesterol celular.

Sería deseable elaborar polipéptidos más cortos manteniendo o incluso mejorando las propiedades biológicas de la proteína de longitud completa.

Descripción de la invención

Ahora se ha descubierto que la denominada Región de Extensión α' del lado N-terminal de la globulina 7S de soja que corresponde a su lado N-terminal, que consiste en 142 restos de aminoácidos del mismo, tiene actividad biológica ventajosa y ha demostrado ser incluso más eficaz en la captación y degradación del LDL en comparación con la cadena α' de tamaño completo.

La invención proporciona por lo tanto dicha Región de Extensión α' , a la cual se hará referencia en lo sucesivo como α' , así como un proceso para su preparación mediante clonación, expresión de levaduras y purificación del polipéptido recombinante que contiene la región de extensión N-terminal de una subunidad α' de la soja.

Para este propósito se llevó a cabo la expresión heteróloga del fragmento N-terminal de la cadena α' . El objetivo se logró en células de levadura de secreción competente de la levadura *Pichia pastoris*. Se purificó el polipéptido recombinante y su actividad biológica se evaluó en células HepG2. Mediante el uso de este enfoque biotecnológico, se pueden obtener cantidades adecuadas del polipéptido recombinante para ensayar en pruebas *in vitro* y también en experimentos *in vivo*.

Descripción de las figuras

Fig. 1 Visión general de la construcción pPICZ α B- α' . La expresión de α' la dirige el promotor inducible por metanol de la AOX (Alcohol-OXidasa) (5'AOX1); el Factor de Acoplamiento α (α -MF) promueve la secreción de la proteína recombinante al medio; AOX1 TT: región de terminación de la transcripción de AOX. El gene *Sh ble* confiere resistencia a la zeocina; Ori pUC: origen de replicación para un alto número de copias del plásmido en *E. coli*. Las otras abreviaturas se refieren a las posiciones de escisión de enzimas restricción; pb: pares de bases.

Fig. 2 Alineamiento de secuencias del polipéptido (α') recombinante y de la subunidad α' de soja de tipo silvestre. Las estrellas indican restos de aminoácidos idénticos en las dos secuencias.

Fig.2A Secuencia del polipéptido recombinante (α') (SEC ID1)

Fig.2B Secuencia de la subunidad α' de soja de tipo silvestre (SEC ID2)

Fig. 3A. SDS-PAGE en condiciones reductoras del cultivo de *Pichia pastoris* recombinante:

Carril M: Marcador de Peso Molecular

Carril 1: Sobrenadante de cultivo precipitado con TCA (sin células) antes de la inducción con metanol.

Carril 2: sobrenadante de cultivo precipitado con TCA (sin células) después de 1 h de inducción con metanol.

Carril 3: sobrenadante de cultivo precipitado con TCA (sin células) después de 8 h de inducción con metanol.

Carril 4: sobrenadante de cultivo precipitado con TCA (sin células) después de 19 h de inducción con metanol.

Carril 5: sobrenadante de cultivo precipitado con TCA (sin células) después de 25 h de inducción con metanol.

Fig. 3B. SDS-PAGE en condiciones reductoras de las etapas de purificación de α' :

Carril M: Marcador de Peso Molecular

Carril 1: polvo liofilizado de caldo de fermentación

Carril 2: fracción eluida de NaCl 150 mM con celulosa DEAE

Carril 3: fracción eluida de NaCl 250 mM con celulosa DEAE

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora en detalle en la siguiente sección experimental:

Materiales y procedimientos

5 **Cepas de levaduras, bacterianas y productos químicos.** Se utilizó la cepa *Pichia pastoris* X33 (TS) (Invitrogen, San Diego, CA) para la expresión de levaduras. La cepa bacteriana utilizada para manipulaciones genéticas fue *E. coli* XL1-Blue (Invitrogen, San Diego, CA). Las enzimas de restricción Pst I y Xba I se adquirieron en Roche (Indianapolis, IN), la Sac I en Fermentas (Ontario, Canadá), la Taq ADN polimerasa se adquirió en Invitrogen (San Diego, CA). La zeocina se adquirió en Invivogen (San Diego, CA). Los oligonucleótidos para la PCR se obtuvieron en Primm (Milano, Italia). La peptona, triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron en Becton Dickinson and Company (Sparks, MD). La glucosa y el sorbitol se adquirieron en Sigma (St. Louis MO). Las membranas de diálisis se adquirieron en Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA). La resina DEAE se adquirió en Whatman (Maidstone, Inglaterra). La resina de NiNTA se adquirió en Qiagen (Hilden, Alemania). La columna simétrica C4 para HPLC se adquirió en Waters (Milford, MA).

15 Otros productos químicos fueron de calidad reactiva de Sigma (St. Luis, MO) o de Merck (Darmstadt, Alemania).

Medios y condiciones de cultivo. La cepa *P. pastoris* X33 se cultivó en medio completo de YPD (Levadura Peptona Dextrosa) (peptona al 2%, extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%). Se seleccionaron transformantes Mut⁺ en placas que contenían YPD, agar al 1,5%, zeocina 100 mg/ml. Todos los cultivos de levadura se mantuvieron a 30 °C. Para la detección de la proteína heteróloga, los transformantes Zeo^r-Mut⁺ se cultivaron a una densidad óptica de 5 a 600 nm en medio YPS (Levadura Peptona Sorbitol) (peptona al 2%, extracto de levadura al 1%, sorbitol al 2%). Después se añadió metanol a una concentración final de 1%. Todos los transformantes bacterianos se seleccionaron en placas en medio LB (Luria-Bertani) de bajo contenido en sal que contenía zeocina (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5%, agar al 1,5%, zeocina 25 mg/ml). Todos los cultivos bacterianos se mantuvieron a 37 °C.

25 **Construcción del vector de expresión génico ea'.** El gen ea' se amplificó mediante PCR en un molde de ADN del plásmido de expresión de *Pichia pastoris* (pPICZaB) que contiene un inserto (ta') que comprende la secuencia de interés (ea'). Se diseñó el oligonucleótido 5'-GAAAAGATAGATTAAAGCTGCAGTGGAGGAAG-3' para generar el sitio de restricción PstI en el extremo 5' del gen ea'. Esta mutación produjo una inserción de restos de alanina en la posición N-terminal de ea'. Se diseñó un segundo oligonucleótido 5'-CCCTTCTTATTCTTTCTAGATCATGGTCTCTTTGAGACTC-3' para generar el sitio de restricción XbaI en el extremo 3' del gen ea'. Ambos oligonucleótidos se disolvieron en agua estéril mQ. La mezcla de reacción de la PCR consistió en cebadores 0,5 mM, dNTPs 0,8 mM (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), molde 30 ng (pPICZaB /ta'), Taq ADN polimerasa 2,5 U, tampón de PCR (composición final: KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 8,4 y agua estéril mQ a un volumen final de 25 ml). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer Geneamp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corp., Wellesley, MA) usando las siguientes condiciones: inicio a 94 °C durante 10 min; 30 ciclos a 94 °C durante 40 s, a 60 °C durante 40 s, a 72 °C durante 20 s; extensión final a 72 °C durante 10 min y se mantuvo a 4 °C. El producto de la PCR de 465 bp se sometió a digestión enzimática para dar una construcción de tamaño completo de 423 pb y se clonó en el vector pPICZaB lo que produjo la construcción pPICZaB-ea' y se transformó en células XL1-Blue de *E. coli*. Se seleccionaron clones positivos en un medio LB semisólido que contenía tetraciclina y zeocina. Uno de estos clones se secuenció por Primm (Milano, Italia) para asegurar que no se producía ninguna mutación en la secuencia de la construcción pPICZaB-ea'. Veinte µg de la construcción pPICZaB-ea' y 30 µg del vector de expresión pPICZaB (control negativo) se linealizaron por digestión con la enzima de restricción SacI y después se purificó.

45 **Transformación de pPICZaB-ea' en el genoma de *P. pastoris*.** Células de levadura de tipo silvestre (ts) se transformaron por electroporación con 20 µg linealizados de la construcción pPICZaB-ea' y 30 µg linealizados del vector pPICZaB en un aparato electroporador 2510 Eppendorf (Hamburgo, Alemania) configurado a 1,5 kV. En primer lugar, los transformantes se seleccionaron sembrando en placas con YPD que contenían 100 mg/ml de zeocina. Con el fin de verificar la integración de nuestra construcción en el genoma de *P. pastoris* transformado, se usó el Mini Kit de Dneasy Plant (QIAGEN, Hilden, Alemania) para extraer ADN genómico. El ADN genómico se usó como molde para verificar la inserción de la construcción en el sitio del promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) mediante PCR usando los cebadores 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). La mezcla de reacción de la PCR consistía en cebadores 0,5 mM, dNTPs 0,25 mM, 100 ng para el molde genómico, Taq ADN polimerasa 2,5 U, tampón de PCR (composición final como anteriormente). La reacción de la PCR se realizó usando las siguientes condiciones: inicio a 94 °C durante 10 min; 30 ciclos a 94 °C durante 40 s, a 60 °C durante 40 s, a 72 °C durante 20 s; la extensión final a 72 °C durante 10 min y se mantuvo a 4 °C.

Selección de clon transformante. Se cultivaron dieciocho transformantes Zeo⁺ y un transformante que contenía el vector de expresión pPICZaB (control negativo) en 50 ml de medio YPS a 30 °C en una incubadora con agitación

(180 rpm) a una $DO_{600} = 5$. La fase inductora se desencadenó al añadir metanol a una concentración final al 1% y se prolongó durante 24 horas. Se examinaron alícuotas de los sobrenadantes para la expresión de *ea'* mediante SDS-PAGE. El clon transformante con la expresión más alta de *ea'* se seleccionó para la producción a escala de fermentador de la proteína recombinante.

Expresión de *ea'*: escala de fermentador. Para la producción masiva, el clon seleccionado se cultivó en un fermentador de 14 l (Chemap, Suiza), de acuerdo a las "Directrices de proceso de fermentación de *Pichia*" de Invitrogen (Versión B, 053002). El cultivo de inóculo se preparó en medio YNB (2,0 g de KH_2PO_4 ; 10,0 g de $(NH_4)_2SO_4$; 1,0 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g de NaCl; 0,2 g de $CaCl_2$; 10,0 g de Glicerol al 100%; KOH a un pH de 5,2; agua destilada hasta 1,0 l) en matraces de agitación sin deflectores. Después de la incubación durante aproximadamente 24 horas a 30 °C a 250 rpm, se usó 1,0 l de cultivo de siembra para inocular el fermentador, preparado con 8,5 l de Medio Basal Salino (227 ml de H_3PO_4 al 85%; 7,9 g de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$; 155 g de K_2SO_4 ; 127 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 35 g de KOH; 340 g de Glicerol al 100%; agua destilada hasta 8,5 l; pH ajustado a 5,0 con NH_4OH después de la esterilización). Ambos medios de cultivo citados se complementaron con biotina e inositol (1 mg/l cada uno). El Medio Basal Salino también se complementó con Solución Salina Traza modificada con PTM_1 (2,5 ml de H_2SO_4 al 96%; 243 mg de $CoC_2O_4 \cdot 2H_2O$; 3,0 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 44,5 mg de KI; 1,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 100 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 10 mg de H_3BO_3 ; 32,5 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 10 g de $ZnCl_2$; agua destilada hasta 500 ml).

El crecimiento de los microorganismos y la expresión de la proteína heteróloga se obtuvieron a través de un proceso de tres etapas. Una primera fase de crecimiento discontinuo (glicerol como fuente de C) de aproximadamente 24 horas seguida de una fase de alimentación discontinua (glicerol como fuente de C limitante) de aproximadamente 4 horas. Durante estas primeras dos fases, el pH se mantuvo a 5,0 mediante la adición de NH_4OH al 20 %. Una vez consumido todo el glicerol, se inicia una alimentación con metanol para desencadenar la expresión de la proteína *ea'* y el pH se cambia a 6,0 mediante la adición de NH_4OH al 20 %. La fase de alimentación discontinua con metanol dura aproximadamente 24 horas. Durante estas dos fases de alimentación discontinua el oxígeno disuelto (% de OD) se mantiene estable al 30 % mediante una fina regulación electrónica de la velocidad del agitador (rpm), mientras que la tasa de aireación (vvm) aumenta manualmente de manera progresiva. Cada pocas horas, se comprueba la condición limitante de la fuente de C siguiendo el nivel del % de OD: su valor debería mostrar un fuerte incremento después de una parada repentina de alimentación con metanol, y viceversa, un rápido descenso después de su reanudación. Cada pocas horas, se extraen muestras en condiciones asépticas del fermentador para realizar los siguientes análisis: Densidad Óptica (λ 600 nm), % de biomasa celular (peso húmedo) esterilidad, observación al microscopio, SDS-PAGE.

Purificación de *ea'*: procesamiento aguas abajo del caldo de fermentación. Aproximadamente 9,2 l de cultivo se vierten desde el fermentador y se enfría con hielo. Todas las operaciones posteriores se realizan a +4 °C. Todo el cultivo se separa por centrifugación (Centrikon T-124, Kontron Instruments) a $3.000 \times g$ durante 30 min; la biomasa (sedimento) se descarta; aproximadamente 7,5 l de sobrenadante se aclaran por filtración en profundidad en Zetaplus 30SP (Cuno) y posteriormente se microfiltran en un filtro de 0,22 μm (Millipak 100, Millipore). El filtrado aclarado se concentra por ultrafiltración en una membrana de polietersulfona, LPM (Límite de Peso Molecular) 10 kDa (filtro Omega, Pall). El concentrado, de aproximadamente 300 ml, se somete a diafiltración frente a 3,0 l de Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 y finalmente se liofiliza. Con este procedimiento se obtuvieron 34,5 g de polvo liofilizado, lo que muestra un grado bastante bajo de proteínas contaminantes en SDS-PAGE y que tienen un contenido total de proteína de aproximadamente 25 % p/p (Ensayo de Proteínas de Bradford, Albúmina de Suero Bovino como patrón de calibración).

Purificación de *ea'*: purificación cromatográfica.

Para la electroforesis en gel de alto rendimiento, se usó el sistema NuPAGE® Pre-Cast Gel (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos del proveedor. Dos gramos de polvo liofilizado se disolvieron en 150 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,50 y se cargaron en una columna de celulosa DEAE (6 $\times$ 10 cm, Whatman, Maidstone, RU) equilibrada con el mismo tampón. La elución de las proteínas retenidas se realizó con el mismo tampón que contenía NaCl 150 y 250 mM respectivamente. La fracción eluida con NaCl 0,25 M (300 ml) mostró el mayor contenido de *ea'*. La solución se concentró a 100 ml mediante secado por congelación y después se dializó con una membrana de 6000-8000 Da a 4 °C durante 24 horas con agua milliQ ultrafiltrada y después se liofilizó. Se obtuvieron aproximadamente 370 mg de proteína.

Con el fin de verificar la homogeneidad de proteínas, se cargó aproximadamente 1 mg de proteínas en una columna Simétrica C4 (4,6 $\times$ 250 mm) de fase inversa. Se usó el tampón A (agua ultrafiltrada y ácido trifluoroacético al 0.1 %) y el tampón B (acetonitrilo al 100% + ácido trifluoroacético al 0.1 %).

Técnicas electroforéticas. Se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol al (2%) en geles de poliacrilamida al 12%, de acuerdo con la ref. 11, usando una célula mini-Protean II (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie.

Cultivos celulares. La línea celular de hepatoma humano establecido (HepG2) se obtuvo en la American Type Culture Collection (Rockville, MD). El medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, el suero fetal de ternero, la tripsina-EDTA (1x), la penicilina (10^5 U/L), la estreptomycin (100 g/l), el tampón de tricina (1 mmol/l, pH 7,4) y las soluciones

de aminoácidos no esenciales (100x) eran de GIBCO (Madison, WI). Las placas de Petri eran de COSTAR (Cambridge, MA). Los filtros eran de Millipore (Bedford, MA). El Coomassie de proteínas más el kit de ensayo de Proteínas se adquirió en Pierce (Rockford, IL, Estados Unidos.). El 125 Iodo, sin transportador, en NaOH 100 mmol/l, era de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Las columnas de Sephadex G25 (PD10) eran de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). El kit de LDH y MTT eran de Sigma Diagnostics (Milano-Italia). Los restantes productos químicos eran de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania). Las células se cultivaron en monocapas en placas de Petri de 90 mm de diámetro, y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire al 95%, CO₂ al 5% en MEM complementado con suero fetal de ternero (FCS) al 10%, solución de aminoácidos no esenciales (1%, v/v), penicilina (10⁵ U/l), estreptomycin (0,1 g/l), tampón de tricina (20 mmol/l, pH 7,4), NaHCO₃ (24 mmol/l) y piruvato sódico (0,11 g/l). Para los experimentos diseñados para evaluar la modulación del receptor de LDL, las células se sembraron en placas de plástico de 35 mm (3-5 x 10⁵ células) y se usaron justo antes de alcanzar la confluencia. En todos los experimentos de cultivo celular, el medio se cambió cada 2-3 días. Con el fin de evaluar la viabilidad celular, los medios de cultivo de las células expuestas a ea' a diferentes concentraciones se ensayaron mediante el ensayo de sales de metiltetrazolio (MTT), esencialmente como se describe en la ref. 9. La filtración enzimática celular se determinó midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), usando un kit de diagnóstico cinético (LDH/LD) (Sigma Diagnostics). Se aisló LDL (1,019 ≤ d ≤ 1,063 g/l) por ultracentrifugación preparativa secuencial [12] de plasma de voluntarios normolipidémicos clínicamente sanos. Las lipoproteínas se marcaron de acuerdo con el procedimiento de McFarlane modificado por Bilheimer y col. [13], y previamente descrito [3]. Se esterilizaron 125 I-LDL por filtración (filtros Millipore, tamaño de poro de 0,45 µm) y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Se preparó suero humano deficiente en lipoproteínas (LPDS) como se describe anteriormente [9].

Captación y degradación de 125 I-LDL. Se preincubaron las monocapas de células a 37 °C durante 24 h en MEM complementado con LPDS 5g/100g para regular positivamente los receptores de LDL [2], en presencia/ausencia de ea' a diferentes concentraciones indicadas en la Tabla o con 3,5 µmol/l de la subunidad α' purificada o con 1,0 µmol/l de simvastatina. Se añadió después una concentración fija (7,5 mg/l) de 125 I-LDL al medio y la incubación continuó durante otras 5 h a 37 °C. Se evaluó la captación específica (unión+ internalización) y la degradación de 125 I-LDL como se notificó anteriormente [2].

Análisis estadísticos. Las diferencias en la captación celular y en la degradación de LDL después de la incubación de células con ea' a diferentes concentraciones se determinaron mediante ANOVA seguido por el ensayo de Dunnett. Los valores se expresan como medias ± DT; valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Expresión de ea' en *Pichia pastoris*. La estructura del plásmido que se usó para transformar células de *Pichia pastoris* se muestra en la **Figura 1**. La secuencia del inserto y su alineación con la subunidad α' se muestran en la **Figura 2**. Como se menciona en Materiales y Métodos, la única diferencia entre los polipéptidos recombinante y de tipo silvestre consiste en que el primer resto de aminoácido N-terminal que, por razones técnicas, era una alanina en la cadena recombinante. El clon que muestra la mayor producción de polipéptido recombinante, según se juzgó por análisis de SDS-PAGE del medio de cultivo (no se muestra), se seleccionó para la producción masiva. La **Figura 3A** muestra el análisis electroforético del sobrenadante del cultivo de levadura antes (carril n.1) y después de la inducción con metanol durante 1 - 8 - 19 y 25 horas (carril n.2, n.3, n.4, n.5). Como se muestra, aparece una banda clara a un peso molecular aparente de aproximadamente 20 kDa, como consecuencia de la inducción.

Purificación de ea'. La purificación de ea' se logró por métodos cromatográficos. Se recogieron muestras de cada etapa y se analizaron mediante SDS-PAGE. Los efectos de las etapas de purificación en la homogeneidad de los polipéptidos identificados se muestran en la **Figura 3-B**. Un grado muy bajo de contaminación por proteína de levadura ya se consiguió en el medio de cultivo, pero las etapas cromatográficas adicionales eliminaron las principales proteínas contaminantes y permitieron la recuperación del polipéptido recombinante en una forma casi homogénea. El análisis de la secuencia N-terminal de esta banda confirmó que este polipéptido de 20 kDa correspondía a la cadena ea'. La pureza de esta muestra se juzgó adecuada para los ensayos de células.

Actividad biológica de ea'. La adición de la subunidad α' purificada, como control positivo, y su forma α' truncada a células HepG2 produjo un aumento significativo en la captación y la degradación mediada por el receptor de LDL en comparación con las células no tratadas, como se presenta en la siguiente Tabla.

Tabla. Efecto de α' y su forma truncada (ea') en la captación y en la degradación de LDL por células^{1,2} HepG2

Tipo de muestra	Concentración ³	Captación		Degradación	
	µmol/l	ng125I-LDLI mg proteína celular	%	ng125I-LDLI mg proteína celular	%
LPDS ⁴	-	94 ± 5,1	100	80 ± 4,3	100
7S α" subunidad	3,5	154 ± 9,1*	164	128 ± 4,8*	160

(continuación)

Tipo de muestra	Concentración ³	Captación		Degradación	
	μmol/l	ng125I-LDLI mg proteína celular	%	ng125I-LDLI mg proteína celular	%
ea'	0,5	113 ± 7,1*	120	100 ± 10*	125
	1,0	138 ± 9,2*	146	118 ± 9,3*	148
	2,0	169 ± 6,7**	179	157 ± 8,7**	196
Simvastatina	1,0	188 ± 10**	200	143 ± 7,9**	179

¹ Los datos son medias ± DT de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por cuadruplicado. *P< 0,05 frente a LPDS y **P<0,001 frente a LPDS.

² Las monocapas confluentes de células HepG2 se preincubaron durante 24 h a 37°C en un medio esencial mínimo con LPDS al 5%, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de polipéptido recombinante (α') o subunidad α' purificada (7S α') o simvastatina. Después de la adición de ¹²⁵I-LDL (7,5 mg/l de medio), las células se incubaron durante 5 h más.

⁴LPDS, suero deficiente en lipoproteínas.

Los resultados mostraron que la modulación de LDL era dependiente de la dosis con ea' y que la concentración más alta fue similar a la de control positivo, simvastatina. En ninguna concentración de ea' hubo evidencia alguna de toxicidad celular, según se determina por los ensayos de MTT y de LDH (no mostrados).

Se ha encontrado por lo tanto, de acuerdo con la invención, que la secuencia de aminoácidos capaz de inducir la respuesta biológica se encuentra en el dominio de extensión N-terminal de la cadena α'. Además, se encontró que el fragmento hidrófilo N-terminal ejerce sus efectos a concentraciones en el orden de magnitud a los de la simvastatina, un fuerte fármaco hipolipidémico. Este efecto podría deberse, al menos parcialmente, a la interacción *in vitro* entre el fragmento anterior y la tioredoxina, una pequeña proteína multifuncional con un disulfuro ditiol activo por redox en la secuencia del sitio activo conservado Cys-Gly-Pro-Cys, según lo presentado por los presentes inventores [3]. Este hallazgo podría explicar la fase última más larga de la oxidación del LDL inducida por óxido cúprico observada en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol que contiene proteína de soja frente a la encontrada en conejos alimentados con la misma dieta, pero que contiene caseína como fuente de proteína [22].

Los datos obtenidos son particularmente interesantes porque muestran, por primera vez, que el fragmento hidrófilo N-terminal de la cadena α' de la globulina 7S de soja es activa en un modelo *in vitro* a concentraciones menores de 10 μM, que son similares a las presentadas por la simvastatina. Además, el uso de una proteína recombinante excluye cualquier participación de otros componentes proteicos y no proteicos de la soja, que incluyen isoflavonas, para los que se han descrito una ausencia de beneficios claros y posible toxicidad [23].

La invención proporciona alimentos y composiciones funcionales con efectos beneficiosos sobre diversas enfermedades, que incluyen hiperlipidemia y enfermedad cardiovascular, para su uso en solitario o en combinación con fármacos en terapias hipolipemiantes, es decir, estatinas, tales como simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, lovastatina.

Las composiciones de la invención se preparan usando excipientes y procedimientos convencionales. La dosificación del polipéptido recombinante de la invención dependerá de diversos factores, tales como el peso, la edad y el sexo del paciente y la determinará fácilmente el médico tratante en función de las características farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas del polipéptido. Sin embargo, en general, dicha dosificación variará de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg, de una vez a tres veces al día.

REFERENCIAS

1. Sirtori CR. y col., Curr Atheroscler Rep. 2001; 3: 47-53.
2. Lovati MR. y col., J Nutr. 1992; 122: 1971-8.
3. Manzoni C. y col., J Nutr. 2003; 133: 2149-55.
4. Duranti M. y col., J Nutr. 2004; 134: 1334-39.
5. Thanh, VH. y col., Biochim Biophys Acta. 1976; 439: 326-38.
6. Maruyama N. y col., J Agric Food Chem. 1999; 47: 5278-84.
7. Sirtori CR. y col., Nutr Metab Cardiovasc Dis. 1998; 8: 334-40.
8. Lovati MR. y col., J Agric Food Chem. 1998; 46: 2474-80.
9. Lovati MR. y col., J Nutr. 2000; 130: 2543-2549.

10. Lovati MR. y col., Faseb J. 2006; LB 391: 86.
11. Laemmli UK. Nature. 1970; 227: 660-5.
12. Havel RY. y col., J Clin Invest. 1955; 34: 1345-53.
13. Bilheimer DW. y col., Biochim. Biophys. Acta 1972; 260: 212-21.
- 5 14. Sirtori CR. y col., Brit J Nutr. 2007; 97: 816-22.
15. Lovati MR. y col., Nutr Metab Cardiovasc Dis. 1991; 1: 18-24.
16. Lovati MR. y col., J Clin Invest. 1987; 80: 1498-502.
17. Kitts DD. y col., Curr Pharm Des. 2003; 9: 1309-23.
18. Wan XS. y col., Nutrition and Cancer. 2002; 43:167-73.
- 10 19. Clemente A. y col., Recent Progress in Medicinal Plants. 2008; 20:397-417.
20. Matoba N. y col., FEBS Lett. 2001; 497: 50-4.
21. Cho SJ. y col., J Agric Food Chem. 2008; 56: 4372-6.
22. Castiglioni S. y col., Atherosclerosis. 2003; 171: 163-70.
- 15 23. Sirtori CR. y col., Drug Safety 2001; 24: 665-82.

REIVINDICACIONES

1. Fragmento hidrófilo N-terminal de la subunidad α' de la Globulina 7S de soja que consiste en 142 restos de aminoácidos de dicho lado N-terminal.
- 5 2. El fragmento hidrófilo N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la SEC ID 1.
3. Un procedimiento de preparación del fragmento hidrófilo N-terminal de la Globulina 7S de soja de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la clonación, la expresión en *Pichia pastoris* y la purificación del polipéptido recombinante.
- 10 4. Composiciones que comprenden, como principio activo, el fragmento hidrófilo N-terminal de la globulina 7S de soja de las reivindicaciones 1 o 2 en mezcla con un vehículo adecuado.

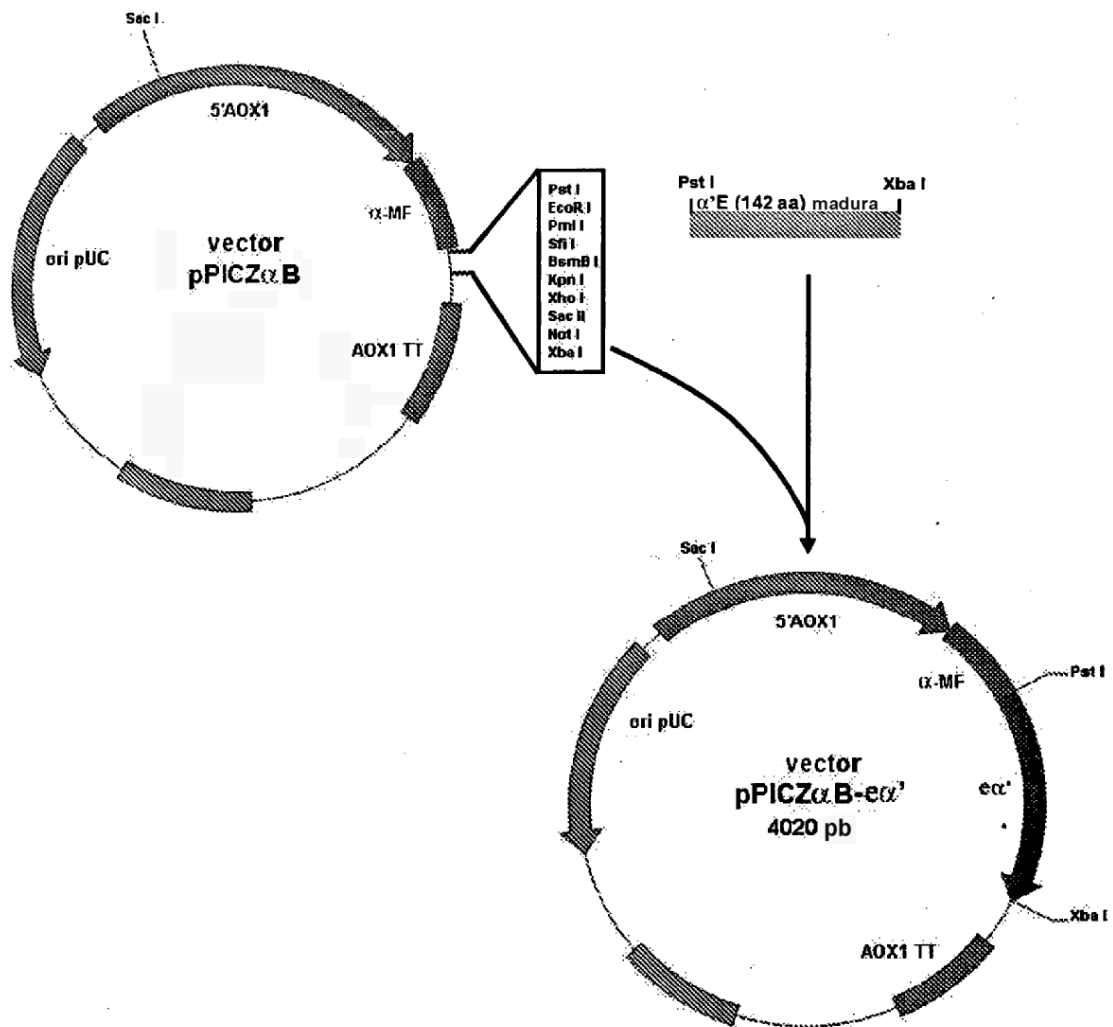


Figura 1

Figura 2

α' e AVEEEEECEEGQIPRPRPQHPERERQQHGEKEEDEGEQPRPFFPRPRQPHQEEEHEQKE 60
 α' -VEEEEECEEGQIPRPRPQHPERERQQHGEKEEDEGEQPRPFFPRPRQPHQEEEHEQKE 59

α' e EHEWHRKEEKHGGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEEKHEWQHKEKHQKESEEEEEEDQ 120
 α' EHEWHRKEEKHGGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEEKHEWQHKEKHQKESEEEEEEDQ 119

α' e DEDEEQDKESQSEGESQREP----- 142
 α' DEDEEQDKESQSEGESQREPRRHKNKNPFHFNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRQ 179

α' e -----
 α' QLQNLRDYRILEFNSKPNTLLPHHADADYLIVILNGTAILTLVNNDDRDSYNLQSGDAL 239

α' e -----
 α' RVPAGTTFYVVPDNDENLRMIAGTTFYVVPDNDENLRMITLAIPVKNKGRFESFFLSS 299

α' e -----
 α' TQAQQSYLQGFSKNILEASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESVIVEISKKQIRE 359

α' e -----
 α' LSKHAKSSSRKTISSEDKPFNLGSRDPIYSNKLGLFEITQRNPQLRDLDFVLSVDMNE 419

α' e -----
 α' GALFLPHFNSKAIVVLVINEGEANIELVGIKEQQQRQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFV 479

α' e -----
 α' IPAGYPVMVNATSDLNFFAFGINAENNQRNFLAGSKDNVISQIPSQVQELAFPRSAKDIE 539

α' e -----
 α' NLIKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGPLSSILRAFY 577

Figura 2 A α' e (SEC ID 1)

```

AVEEEEECEEGQIPRPRPQHPERERQQHGEKEEDEGEQPRPFFPRPRQPHQEEEHEQKE 60
EHEWHRKEEKHGGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEEKHEWQHKEKHQKESEEEEEEDQ 120
DEDEEQDKESQESEGSESQREP----- 142

```

Figura 2 B α' (SEC ID 2)

```

-VEEEEECEEGQIPRPRPQHPERERQQHGEKEEDEGEQPRPFFPRPRQPHQEEEHEQKE 59
EHEWHRKEEKHGGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEEKHEWQHKEKHQKESEEEEEEDQ 119
DEDEEQDKESQESEGSESQREPRRHKNKNPFHFNSKRFTLTKNQYGHVRLQRFNKRISQ 179
QLQNLRDYRILEFNSKPNTLLPHHADADYLIVILNGTAILTLVNNDDRDSYNLQSGDAL 239
RVPAGTTFYVNPNDNENLRMIAGTTFYVNPNDNENLRMITLAIPVNKPGRFESFFLSS 299
TQAQQSYLQGFNSKINILEASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESVIVEISKQIRE 359
LSKHAKSSSRKTISSEDKPFNLGSRDPIYSNKLGLFEITQRNPQLRDLVDVFLSVVDMNE 419
GALFLPHFNSKAIIVLVINEGEANIELVGIKEQQQRQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFV 479
IPAGYPVMVNATSDLNFFAFGINAENNQRNFLAGSKDNVISQIPSQVQELAFPRSAKDIE 539
NLIKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGPLSSILRAFV 577

```

Fig. 3 - Panel A

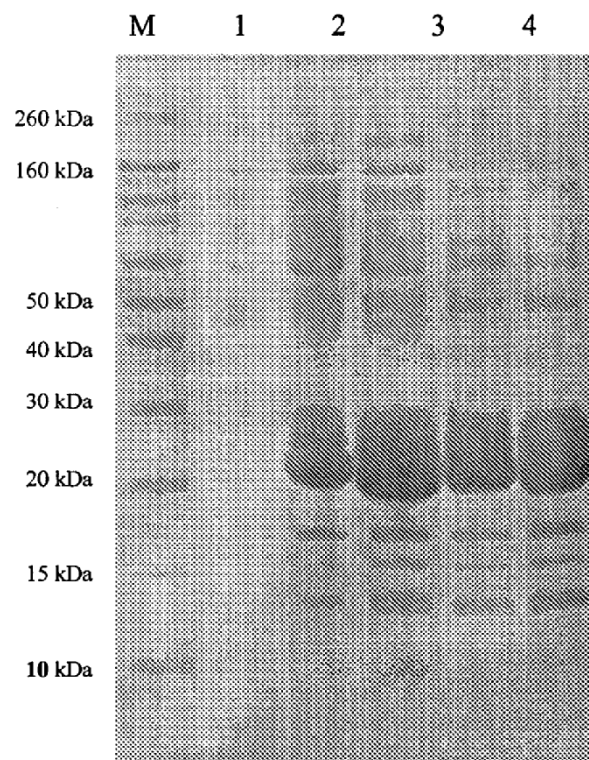


Fig. 3 - Panel B

