

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 623**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/US2011/052022**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12128786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11861852 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2686416**

54 Título: **Composiciones y métodos para separar, caracterizar y administrar selenoglicoproteínas solubles**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201113051646

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

17.04.2019

73 Titular/es:

**ALLTECH, INC. (100.0%)
3031 Catnip Hill Pike
Nicholasville, KY 40345, US**

72 Inventor/es:

**KWIATKOWSKI, STEFAN;
POWER, RONAN;
MATNEY, CLAYTON;
GHOROGHCHIAN, PAIMAN, P. y
OSTERTAG, ERIC, M.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 709 623 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

Composiciones y métodos para separar, caracterizar y administrar selenoglicoproteínas solubles

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones de selenio solubles y métodos de producción, separación y purificación de las mismas. En particular la presente invención proporciona métodos para preparar selenoglicoproteínas solubles en agua (por ejemplo, mediante extracción de selenoglicoproteínas de levadura enriquecida con selenio), métodos para suplementar una composición con deficiencia de selenio mediante la mezcla de selenoglicoproteínas solubles en agua con la composición con deficiencia de selenio, composiciones que comprenden las selenoglicoproteínas solubles en agua y métodos para la administración de las mismas.

15 **Antecedentes de la invención**

El selenio es un elemento traza importante para un funcionamiento fisiológico apropiado en seres humanos. El selenio se ingiere a través de la dieta que puede tener un contenido variable de selenio.

El selenio desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del metabolismo fisiológico, crecimiento, salud reproductora, e inmunidad. El selenio se incorpora en diferentes moléculas orgánicas que incluyen, por ejemplo, aminoácidos tales como 1-selenometionina, selenocisteína, y selenocistina. Por lo tanto, el selenio puede ser una parte componente de proteínas, muchas de las cuales son de importancia estructural para el organismo. Además, el selenio es un ingrediente importante en un número de enzimas que influyen en el metabolismo, reproducción, la prevención de cáncer, y defensa inmunitaria en seres humanos (Véase, por ejemplo, Rayman, M Lancet 356: 233-241 (2000)).

Múltiples estudios han intentado revelar los beneficios de salud potenciales que resultan de la ingesta de niveles bajos de selenio. Por ejemplo, bajas concentraciones de una forma inorgánica de selenio, han mostrado ciertos beneficios de salud potenciales (Véase, por ejemplo, Furnsinn *et al.*, Int. J of Obesity and Related Metab. Dis., 19, 458-463 (1995)). Sin embargo, a niveles de dosificación elevados, los efectos beneficiosos se invierten y se manifiesta una toxicidad peligrosa.

La investigación durante las últimas dos décadas ha sugerido que el selenio es eficaz en la reducción de la incidencia del cáncer cuando se proporciona a animales a dosis de solamente 5 a 10 veces por encima de los requisitos nutricionales (Véase, por ejemplo, El-Bayoumy, The role of selenium in cancer prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991). Los estudios de quimioprevención con selenio en sistemas de modelo animal han indicado que este elemento es eficaz para la mayoría de los sistemas, si no todos los sistemas orgánicos, y protege contra efectos carcinogénicos (Véase, por ejemplo, El-Bayoumy, The role of selenium in cancer prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991. tanto los estudios epidemiológicos como los ensayos de suplementa acción también han apoyado su eficacia en la disminución de la incidencia de cánceres del hígado, colon, próstata y pulmón (Véanse, por ejemplo, Yu *et al.*, Biol Trace Elem Res, 56: 117-124 (1997); Clark *et al.*, J Am Med Assoc, 276: 1957-1963 (1996); Yoshizawa *et al.*, J Natl Cancer Inst, 90: 1219-1224, (1998); Brooks, *et al.*, J Urol, 166: 2034-2038, (2001)). Otros estudios no han demostrado efecto beneficioso para la reducción de cánceres con selenio (Véase, por ejemplo, Garland *et al.*, J. Am. Coll Nutr., 12: 400-11 (1993); Ghadirian *et al.*, Cancer Detect Prev, 24: 305-13 (2000)).

Se han examinado múltiples formas de selenio. Estas incluyen selenio inorgánico tal como selenito sódico, y fuentes orgánicas, incluyendo levadura de selenio. Hay una diferencia significativa entre la toxicidad del selenio inorgánico y el orgánico, los compuestos inorgánicos siendo normalmente absorbidos y usados de forma menos eficaz y también siendo más tóxicos que las fuentes orgánicas de selenio.

S. Mc Sheehy *et al.*, Anal. Chem. 2005, 77, 344-349; L. Yang *et al.*, Journal of Chromatography A, 1055 (2004), 177-184; K. Wrobel *et al.*, Anal. Bioanal. Chem (2003), 375, 133-138; C. A. Ponce de Leon *et al.*, Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 602-610; y M. P. Rayman, British Journal of Nutrition (2004), 92, 557-573 describen extracciones de selenometionina en levaduras. S. Kwiatkowski *et al.*, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 115, N.º 2, 2009, 151-158 describen la extracción de glucanos de levadura. El documento US 2009/0214419 divulga polimersomas biodegradables.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones de selenio solubles y métodos de producción, separación y purificación de las mismas.

En particular la presente invención proporciona una composición que comprende selenoglicoproteínas solubles, donde las selenoglicoproteínas solubles contienen dos o más fracciones de las selenoglicoproteínas dependientes del pH, donde las selenoglicoproteínas solubles se obtienen mediante extracción ácida de las selenoglicoproteínas

solubles de levadura enriquecida con selenio y después de exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas, mediante precipitación secuencial dependiente del pH a dos o más valores de pH diferentes de las selenoglicoproteínas solubles, donde las selenoglicoproteínas solubles se generan con un método que comprende: a) proporcionar levadura enriquecida con selenio; b) exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas seguido de centrifugación para generar i) un microgránulo que comprende material insoluble ácido; y ii) una fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas; c) precipitar selenoglicoproteínas de la fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas mediante un aumento del pH de la fase líquida de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 o 6,0; y d) separar las selenoglicoproteínas precipitadas de la fase líquida.

La presente invención también proporciona un método para la preparación de selenoglicoproteínas solubles que comprende: a) proporcionar levadura enriquecida con selenio; b) exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas seguido de centrifugación para generar i) un microgránulo que comprende material insoluble ácido; y ii) una fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas; c) precipitar selenoglicoproteínas de la fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas mediante un aumento del pH de la fase líquida de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 o 6,0; y d) separar las selenoglicoproteínas precipitadas de la fase líquida.

En algunas realizaciones, la exposición de la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas se produce a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, superior a 20-25 °C). De hecho, se puede usar una diversidad de temperaturas que incluyen 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 °C, o más elevadas). En algunas realizaciones, las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones donde el pH es 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, o inferior. En una realización preferente, la exposición de la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas comprende la exposición de la levadura enriquecida con selenio a un pH de 1,5. En algunas realizaciones, la exposición de la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas se produce durante un cierto periodo de tiempo. En algunas realizaciones, las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más horas. En algunas realizaciones, las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas entre una y veinticuatro horas. En algunas realizaciones, las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas entre cinco y diez horas. En una realización preferente, las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas durante ocho horas. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas se crean y/o se mantienen usando tampón ácido y/o la adición de un ácido. Se puede usar cualquier ácido. En algunas realizaciones, el ácido es ácido clorhídrico, aunque se puede usar cualquier ácido. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas se hacen precipitar desde la fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas mediante aumento del pH de la fase líquida. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas precipitadas se separan de la fase líquida mediante centrifugación para formar un microgránulo de las selenoglicoproteínas precipitadas seguido de retirada de la fase líquida de las selenoglicoproteínas precipitadas. En algunas realizaciones, el pH de la fase líquida se eleva a 1,85. En algunas realizaciones, el pH de la fase líquida se eleva a 3,0. En algunas realizaciones, el pH de la fase líquida se eleva a 4,0. En algunas realizaciones, el pH de la fase líquida se eleva a 6,0. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas se hacen precipitar y se separan de la fase líquida en una diversidad de condiciones de pH para generar múltiples fracciones de selenoglicoproteínas solubles dependientes del pH. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una sola fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en condiciones ácidas se usa para crear una primera fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un primer pH (por ejemplo, pH de 1,85), una segunda fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un segundo pH (por ejemplo, pH de 3,0), una tercera fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un tercer pH (por ejemplo, pH de 4,0), y una cuarta fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un cuarto pH (por ejemplo, pH de 6,0). En algunas realizaciones, la precipitación de las selenoglicoproteínas de la fase líquida mediante aumento del pH de la fase líquida comprende múltiples reacciones de precipitación secuencial dependiente del pH de la fase líquida. Una composición que comprende selenoglicoproteínas solubles contiene dos o más fracciones dependientes del pH de selenoglicoproteínas (por ejemplo, selenoglicoproteínas solubles de fase líquida que comprenden el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en condiciones ácidas que se hace precipitar a dos o más valores de pH diferentes). En algunas realizaciones, las levaduras enriquecidas con selenio son levaduras enriquecidas con selenio no viables, secas que contienen un 2 % o menos de selenio inorgánico.

La invención también proporciona composiciones que comprenden selenoglicoproteínas solubles preparadas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición con deficiencia de selenio que comprende selenoglicoproteínas solubles de la invención. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas solubles de la invención se añaden a y/o se mezclan con una composición con deficiencia de selenio. En algunas realizaciones, la adición o la mezcla (por ejemplo, combinación) de selenoglicoproteínas comprende la combinación de selenoglicoproteína y uno u otros tipos más de selenio en la composición. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas solubles de la invención se añaden a y/o se mezclan con composiciones que contienen selenio (por ejemplo, para aumentar y/o suplementar la cantidad total de selenio).

La invención también proporciona una composición que comprende selenoglicoproteínas solubles y un vehículo. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas son una fracción específica de selenoglicoproteínas dependientes

del pH. De hecho se puede usar una diversidad de vehículos que incluyen dendrímeros, polimersomas, nanopartículas, polímeros de liberación lenta, nanocápsulas, y/o polímeros con impresión molecular. En una realización preferente, el vehículo es un polímero de liberación lenta. En otra realización preferente, el vehículo es un polímero con impresión molecular. Además en otra realización preferente, el vehículo es un polimersoma usado para encapsular selenoglicoproteína. De hecho, se puede usar cualquier polimersoma conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el polimersoma comprende copolímero de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO). Se puede usar cualquier copolímero de bloque, incluyendo, por ejemplo poli(etileno) (PEE), poli(butadieno) (PB o PBD), poli(estireno) (PS), y poli(isopreno) (PI). En algunas realizaciones, el polímero comprende copolímero de dibloque de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). En algunas realizaciones, el polimersoma comprende copolímeros de dibloque a base de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL). En algunas realizaciones, el polimersoma comprende un copolímero de bloque que es un copolímero tribloque, tetrabloque, pentabloque, o al menos de seis bloques. En algunas realizaciones, el polimersoma se obtiene a partir del acoplamiento de poli(ácido láctico), poli(glicólido), poli(ácido láctico-coglicólico) y/o poli(3-hidroxitirato) con PEO. Una diversidad de tamaños encuentran su uso en las composiciones y métodos de la invención incluyendo selenoglicoproteínas encapsuladas con polimersoma que tienen un diámetro de aproximadamente 50-300 nm aunque se pueden usar selenoglicoproteínas encapsuladas con polimersoma con un diámetro mayor (por ejemplo, aproximadamente 350 nm, 400 nm, 500 nm o mayor) y menor (por ejemplo, aproximadamente 40 nm, 30 nm, 20 nm, o menor).

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la preparación secuencial de selenoglicoproteínas solubles (SGPs) de SEL-PLEX mediante extracción ácida y posteriores precipitaciones de una realización de la invención.

La Figura 2 muestra un proceso de precipitación de selenoglicoproteínas dependiente del pH de una realización de la invención.

La Figura 3 muestra un mapa de calor que representa los efectos de diferentes tratamientos suplementados con selenio que se describen en las Tablas 3 y 4 del Ejemplo 3 en niveles de expresión genética en músculo esquelético de pechuga de pollo con respecto a un control basal.

La Figura 4 muestra un diagrama de Venn que representa a los diferentes efectos de la fracción de SGP a pH 4,0 y SEL-PLEX en la formación de perfiles de expresión genética en músculo del pecho.

La Figura 5 muestra genes a modo de ejemplo identificados como regulados comúnmente con selenito sódico (SS), SEL-PLEX (SP) y fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0.

La Figura 6 muestra genes a modo de ejemplo identificados como regulados comúnmente con SEL-PLEX (SP) y fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0, pero no con selenito sódico (SS).

La Figura 7 muestra genes a modo de ejemplo identificados como regulados únicamente con la fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0, y no regulados con selenito sódico (SS) o SEL-PLEX (SP).

La Figura 8 muestra un gen a modo de ejemplo identificado como regulado únicamente con la fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0, y no regulado con selenito sódico (SS) o SEL-PLEX (SP).

La Figura 9 muestra un gen a modo de ejemplo identificado como regulado únicamente con la fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0, y no regulado con selenito sódico (SS) o SEL-PLEX (SP).

La Figura 10 muestra un gen a modo de ejemplo identificado como regulado únicamente con la fracción de selenoglicoproteína (SGP) a pH 4,0, y no regulado con selenito sódico (SS) o SEL-PLEX (SP).

La Figura 11 muestra un mapa de calor que representa los efectos de diferentes tratamientos suplementados con selenio que se describen en las Tablas 3 y 4 del Ejemplo 3 en niveles de expresión genética en tejido hepático con respecto a un control basal.

La Figura 12 representa a la liberación de SGP de nanocápsulas a pH 5,1 y pH 7,4 durante un periodo de dos semanas.

La Figura 13 muestra imágenes de Microscopía Electrónica Criogénica de Efecto Túnel (cryo-TEM) de selenoglicoproteína encapsulada con polimersoma a pH 7,4.

Definiciones

Para facilitar una comprensión de la presente invención, un número de términos y expresiones se definen a continuación: Como se usa en el presente documento, todos los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refieren a una secuencia de aminoácidos primaria que se un mediante "enlaces peptídicos" covalentes. En general, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, por lo general de 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término "polipéptido" incluye péptidos y proteínas.

El término "glicoproteína(s)" o "glicopéptido(s)" se refiere a una proteína o péptido que contiene uno o más restos de carbohidrato unidos con enlace covalente a la cadena polipeptídica. El término "selenoproteína(s)" o "selenopéptido(s)" se refiere a una proteína o péptido que contiene uno o más átomos de selenio. Por lo general, los átomos de selenio se incorporan en proteínas dentro de aminoácidos que contienen selenio incluyendo selenocisteína y selenometionina.

El término "selenoglicoproteína(s)", "selenoglicopéptido(s)" o "SGP(s)" se refiere a una glicoproteína o glicopéptidos que incorporan uno o más átomos de selenio. Por lo general, las "selenoglicoproteínas" comprenden en uno o más aminoácidos que contienen selenio. Las "selenoglicoproteínas" pueden comprender un número de carbohidratos en

cualquier número de diferentes formas.

Los términos "muestra" y "muestra de ensayo" se usan en su sentido más amplio e incluye muestras o muestras de ensayo obtenidas a partir de cualquier fuente. Como se usa en el término "muestra" se usa para hacer referencia a muestras biológicas obtenidas a partir de animales (incluyendo seres humanos), e incluye fluidos, sólidos y tejidos. En algunas realizaciones de la presente invención, las muestras biológicas incluyen fluido cerebroespinal (CSF), fluidos seroso, orina y saliva, sangre, y productos de sangre tales como plasma, suero.

Como se usa en el presente documento, los términos "levadura" y "células de levadura" se refieren a microorganismos eucariotas clasificados en el reino Hongos, que tienen una pared celular, membrana celular y componentes intracelulares. Las levaduras no forman un agrupamiento taxonómico o filogenético específico. En la actualidad se conocen aproximadamente 1.500 especies; se calcula que se ha descrito solamente un 1 % de todas las especies de levaduras. El término "levadura" a menudo se toma como un sinónimo para *S. cerevisiae*, pero la diversidad filogenética de las levaduras se muestra mediante su colocación en las divisiones tanto *Ascomycota* como *Basidiomycota*. El término "levadura" incluye levadura de cervecería, levadura de destilería y levaduras de panadería. Las levaduras de gemación ("levaduras verdaderas") se clasifican en el orden *Saccharomycetales*. La mayoría de las especies de levaduras se reproducen asexualmente mediante gemación, aunque algunas se reproducen mediante fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies llegan a ser multicelulares a través de la formación de una cuerda de células de gemación conectadas conocidas como *pseudohyphae*, o *false hyphae*. El tamaño de la levadura puede variar en gran medida dependiendo de la especie, midiendo por lo general 3-4 micrómetros de diámetro, aunque algunas levaduras deben alcanzar más de 40 µm.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "levadura enriquecida con selenio" y "levadura selenizada" se refieren a cualquier levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que se cultiva en un medio que contiene sales inorgánicas de selenio. De hecho, se contempla que la diversidad de sales de selenio son útiles en la presente invención incluyendo, selenito sódico, o seleniato sódico. La selenometionina libre (por ejemplo, no asociada con una célula o levadura) también se puede usar como la fuente de selenio para la levadura enriquecida con selenio ya que la levadura si incorpora esta forma de selenio. Durante el cultivo, debido a la similitud química entre el selenio y el azufre, la levadura incorpora selenio en lugar de azufre en lo que normalmente son compuestos orgánicos que contienen azufre dentro de la célula. Un compuesto que contiene selenio en tales preparaciones de levadura es la selenometionina que se incorpora en polipéptidos/proteínas. La cantidad de selenio celular total presente en forma de selenometioninas en las preparaciones de ese tipo variara, pero puede estar entre un 10 y un 100 %, 20-60 %, 50-75 % y entre un 60 y un 75 %. El resto del selenio orgánico en las preparaciones de levadura selenizada está constituido predominantemente por compuestos intermedios en la ruta para la biosíntesis de selenometionina. Éstos incluyen selenocisteína, selenocistationina, selenohomocisteína y seleno-adenosilselenometionina. La cantidad de sal de selenio inorgánico residual en el producto acabado es generalmente bastante baja (por ejemplo, < 2 %).

Como se usa en el presente documento, el término "SEL-PLEX" se refiere a una levadura enriquecida con selenio no viable, seca (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* de número de registro CNCM 1-3060, Colección Nacional De Cultivos De Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, París, Francia) cultivada en un sistema de cultivos semicontinuo que proporciona cantidades crecientes de molasas de caña y sales de selenio de una manera que minimizar los efectos perjudiciales de las sales de selenio sobre la tasa de crecimiento de la levadura y permite una incorporación óptima de selenio inorgánico el material orgánico celular. El selenio inorgánico residual se elimina (por ejemplo, usando un proceso de lavado riguroso) y no supera un 2 % del contenido de selenio total.

Como se usa en el presente documento, la expresión "selenio orgánico" se refiere a cualquier compuesto orgánico donde el átomo de selenio se conecta directamente a un átomo de carbono.

Como se usa en el presente documento, el término "selenio inorgánico" generalmente se refiere a cualquier sal de selenio (por ejemplo, selenito sódico, seleniato sódico) en la que el selenio está en un estado de oxidación -2, +4 y +6.

Como se usa en el presente documento, los términos "hospedador", "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal humano y animales (por ejemplo, primates, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, aves, pescados, crustáceos) que se estudia, analiza, somete a ensayo, diagnostica o se trata. Como se usa en el presente documento, los términos "hospedador", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente, a menos que se indique de otro modo.

Como se usa en el presente documento, el término "p/p" ("peso/peso") se refiere a la cantidad de una sustancia dada en una composición en una base de peso. Por ejemplo, una alimentación para animales que comprende un 0,02 % en p/p de suplemento alimentario dietético se refiere a que la masa suplemento alimentario dietético es de un 0,02 % de la masa total de la alimentación para animal (por ejemplo, 200 gramos de composición de suplemento alimentario dietético en 999,800 gramos de alimentación para animal).

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la retirada de componentes de una muestra. Por ejemplo, las paredes de la célula de levadura se purificaron mediante la retirada de los

componentes de la pared celular de un componente que no es levadura (por ejemplo, componentes de la membrana plasmática y/o componentes intracelulares de la levadura); también se purifican mediante la retirada de contaminantes u otros agentes distintos a la pared celular de la levadura. la retirada de componentes de la pared celular de un componente que no es levadura y/o contaminantes de la pared celular de un componente que no es levadura da como resultado un aumento del porcentaje de la pared celular de la levadura o componentes de la misma en una muestra.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición (por ejemplo, que comprende selenoglicoproteínas de la presente invención eficiente para proporcionar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una molécula o componente que está disponible para un organismo que alcanza la circulación sistémica. Cuando una molécula o componente se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es bastante elevada. Sin embargo, cuando una molécula o componentes se administra a través de otras rutas (tal como por vía oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a una absorción incompleta y metabolismo del primer paso). En un entorno nutricional, biodisponibilidad se refiere a las tasas de absorción y uso de un nutriente. Por ejemplo, diferentes formas del mismo nutriente pueden tener diferentes biodisponibilidades.

Como se usa en el presente documento, los términos "alimentación", "productos alimentarios", "alimentación para animal", y "piensos" se refieren a material o materiales que son consumidos por animales y proporcionan energía y/o nutrientes a la dieta de un animal. Los ejemplos incluyen Ración Total Mixta (TMR), forraje(s), microgránulo(s), concentrado(s), mezcla o mezclas previa(s) coproducto(s), grano(s), grano de destilería(s), molasas, fibra(s), cereal(es) en silo(s), hierba(s), heno, grano(s), hojas, harina, compuesto o compuestos soluble(s), y suplemento(s).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "suplemento alimentario", "suplemento dietético", "composición para suplemento dietético", se refieren a un producto alimentario formulado como un suplemento dietético o nutricional que se va a usar como parte de una dieta humana o animal, por ejemplo como una adición a la alimentación para animal.

Como se usa en el presente documento, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de administrar un fármaco, profármaco, u otro agente, o tratamiento terapéutico (por ejemplo, composiciones de la presente invención) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*, tejidos y órganos). Las vías de y saquen a modo de ejemplo para el cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalador), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, podía subcutánea, por vía intratumoral, por vía intraperitoneal).

Como se usa en el presente documento, los términos "co-administración" y "co-administrar" se refieren a la administración de al menos dos agente(s) (por ejemplo, composición que comprende selenoglicoproteínas de la invención y uno u otros agentes más -- por ejemplo, un antibiótico, un agente terapéutico (por ejemplo, fármaco o agente farmacéutico), u, otro compuesto biológicamente activo) o terapias para un sujeto. En algunas realizaciones, la co-administración de dos o más agentes o terapias es simultánea. En otras realizaciones, un primer agente/terapias se administra antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la materia entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. La dosificación apropiada para la co-administración la puede determinar fácilmente alguien con experiencia en la materia. En algunas realizaciones, cuando se co-administran agentes o terapias, los respectivos agentes o terapias se administran a dosificaciones más bajas que las que son apropiadas para su administración solos. Por lo tanto, la co-administración es especialmente deseable en realizaciones en las que la co-administración de los agentes o terapias disminuye la dosificación necesaria de un agente o agentes potencialmente nocivos (por ejemplo, tóxico), y/o cuando la co-administración de dos o más agentes da como resultado la sensibilización de un sujeto a efectos beneficiosos de uno de los agentes a través de co-administración del otro agente.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o equivalentes gramaticales incluye la mejora y/o reversión de los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, enfermedad neurodegenerativa). Un compuesto que causa una mejora en cualquier parámetro asociado con enfermedad cuando se usa en los métodos de identificación sistemática de la presente invención se puede identificar de ese modo, un compuesto terapéutico. El término "tratamiento" se refiere tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Por ejemplo, los sujetos que se pueden beneficiar del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen los que ya tienen una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, enfermedad neurodegenerativa, diabetes o faltare o pérdida de función cognitiva) así como aquellos en los que se va a prevenir una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

Como se usa en el presente documento, la expresión "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está predispuesto a experimentar una enfermedad en particular. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética en particular a experimentar la enfermedad, tal como trastornos

hereditarios), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el entorno).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "que padece la enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está experimentando una enfermedad en particular. La presente invención incluye sujetos que está experimentando cualquier gama de enfermedades (por ejemplo, desde manifestación sub-clínica la enfermedad en estado avanzado) donde el sujeto presenta al menos alguno de los indicios (por ejemplo, signos y síntomas) asociados con la enfermedad en particular.

10 Como se usa en el presente documento, los términos " enfermedad" y "afección patológica" se usan indistintamente para describir un estado, signos, y/o síntomas que están asociados con cualquier alteración del estado normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el remito de las funciones normales, y puede ser una respuesta a factores ambientales (tales como (radiación, malnutrición, riesgos industriales, o clima), a agentes infecciosos específicos (tales como gusanos, bacterias, o virus), a defecto inherente del organismo (tal como diversas anomalías genéticas), o a combinaciones de estos y otros factores.

15 El término "compuesto" se refiere a cualquier entidad química, farmacéutica, fármaco que se puede usar para tratar o prevenir una enfermedad, dolencia, náuseas, o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Se puede determinar que un compuesto es terapéutico mediante identificación sistemática usando los métodos de identificación sistemática de la presente invención. Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico que se ha mostrado (por ejemplo, a través de ensayos en animales o experiencia anterior con administración a seres humanos) que es eficaz en un tratamiento de este tipo.

25 Como se usa en el presente documento, el término "kit" se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla que el kit puede incluir reactivos tales como nutrientes y fármacos así como medios de administración.

30 Como se usa en el presente documento, el término "tóxico" se refiere a cualquier efecto perjudicial o nocivo en un sujeto, una célula, o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del agente tóxico.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo (por ejemplo, composición y comprende selenoglicoproteínas) con un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso en diagnóstico, preventivo y/o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

40 Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refieren a composiciones que no producen esencialmente reacciones adversas, por ejemplo, reacciones tóxicas, alérgicas, o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "por vía tópica" se refiere a aplicación de las composiciones de la presente invención a la superficie de la piel y células y tejidos mucosales (por ejemplo, mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatoria, o nasal, y otros tejidos y células que revisten los órganos huecos o cavidades corporales).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales que incluyen solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tal como en forma de emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y diversos tipos de agentes humectantes, todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, lauril sulfato sódico, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón). Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Los ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes se describen, por ejemplo, en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975). En algunas realizaciones, un producto alimentario (por ejemplo, material y/o tratamiento dietético) actúa como un vehículo (por ejemplo, de una composición de selenoglicoproteína composition de la invención).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal (por ejemplo, obtenida por reacción con un ácido o una base) de un compuesto de la presente invención que es fisiológicamente tolerada por el sujeto diana (por ejemplo, un sujeto mamífero, y/o células, tejidos u órganos *in vivo* o *ex vivo*). Las "sales" de los compuestos de la presente invención se pueden obtener a partir de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. los ejemplos de ácidos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, ácido bencenosulfónico. Otros ácidos, tales como oxálico, o que por sí mismos no sean farmacéuticamente aceptables, se pueden usar en la preparación de sales útiles como compuestos intermedios para obtener los compuestos de la invención sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de bases incluyen hidróxidos de metal alcalino (por

ejemplo, sodio), hidróxidos de metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amoniaco, y compuestos de fórmula NW_4^+ , donde W es alquilo C_{1-4} . Los ejemplos de sales incluyen: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención combinados con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ , y NW_4^+ (donde W es un grupo alquilo C_{1-4}). Para uso terapéutico, se contempla que las sales de los compuestos de la presente invención son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también encuentran uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Para uso terapéutico, se contempla que las sales de los compuestos de la presente invención son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, el término "secar" se refiere a secar por pulverización, liofilizar, secar al aire, secar a vacío o cualquier otro tipo de proceso que reduzca o elimine el líquido en una sustancia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secar por pulverización" se refiere a un método usado comúnmente para secar una sustancia que contienen líquido usando gas caliente para evaporar el líquido para reducir o eliminar líquido en la sustancia. En otras palabras, el material se seca por medio de pulverización o atomización en una corriente de aire seco calentado.

Como se usa en el presente documento, el término "liofilizar" y el término "liofilización" y el término "criodesecación" se refieren a la retirada de un disolvente de la materia en un estado congelado mediante sublimación. Esto se consigue congelando el material que se va a secar por debajo de su punto eutéctico y a continuación proporcionando el calor latente de sublimación. El control preciso de vacío y entrada de calor permite el secado desde el estado congelado sin retrofusión del producto. En la aplicación práctica, el proceso se acelera se controla de forma precisa en condiciones de presión reducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polvo de flujo libre seco" se refiere a un polvo seco de flujo libre, por ejemplo un polvo que se puede verter en un contenedor, bolsa, recipiente, etc, sin impedimento de grumos grandes.

Como se usa en el presente documento, el término "moler" se refiere a reducir el tamaño de partícula por impacto, cizallamiento, o desgaste por frotamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "lavar" se refiere a la retirada o limpieza (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo, agua destilada, tampón, o disolvente) o mezcla) de impurezas o componente no deseado soluble de una preparación (por ejemplo, una pared celular de levadura) se puede lavar para retirar los componentes de la pared celular que no es de levadura de la muestra).

Como se usa en el presente documento, el término "polimersoma" se refiere a vesículas que se ensamblan a partir de polímeros sintéticos en solución acuosa (por ejemplo, que se pueden usar para encapsular un material). Los polimersomas se pueden preparar usando copolímeros de bloque sintético anfifílico para formar la membrana de la vesícula, y tienen radios que varían de 50 nm a 5 μ m o más. La mayoría de los polimersomas contienen una solución acuosa en su núcleo y son útiles para encapsular y proteger moléculas sensibles, tales como fármacos, enzimas, otras proteínas y péptidos así como fragmentos de ADN y ARN. La membrana del polimersoma proporciona una barrera física que aísla el material encapsulado de materiales externos, tales como los que se encuentran en sistemas biológicos. Los ejemplos de polimersomas que encuentran usan realizaciones de la invención, así como sus síntesis, se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 7.867.512, 7.682.603, y 6.835.394.

Como se usa en el presente documento, el término "residuo" se refiere a materiales no deseados o que no se usan.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agua residual" es cualquier agua cuya calidad se ha visto afectada de forma adversa por influencia antropogénica.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El selenio es un elemento traza implicado en la regulación de aspectos del mecanismo de defensa antioxidante en todos los tejidos vivos por interacción con el glutatión (GSH) del organismo y sus enzimas antioxidantes que contienen Se principales, glutatión peroxidasa (GPX) y tioredoxina reductasa (Véase, por ejemplo, Goehring *et al.*, J. Anim. Sci. 59, 725-732 (1984); Gerloff *et al.*, J. Anim. Sci. 70, 3934-3940 (1992)). El glutatión y la GPX tienen la

capacidad de proteger la integridad de enlaces insaturados de fosfolípidos de membrana mediante la extinción de ataques de radicales libres capaces de iniciar y propagar la oxidación de los lípidos (Véase, por ejemplo, Meister y Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760 (1983); Deleve y Kaplowitz, *Pharm. Ther.* 52, 287-305 (1991); Palmer y Paulson, *Nutr. Rev.* 55, 353-361 (1997)).

El selenio también se ha asociado con una reducción del riesgo de cáncer en varios estudios epidemiológicos (Véase, por ejemplo, Salonen *et al.*, *Am. J. Epidemiol.* 120: 342-349 (1984); Willett *et al.*, *Lancet* 2: 130-134 (1983); Virtamo *et al.*, *Cancer* 60: 145-148 (1987)). Se ha mostrado que diversos compuestos de selenio de origen natural y sintético inhiben el desarrollo tumoral en estudios con animales en una amplia gama de dosificaciones (Véase, por ejemplo, Ip, *J. Nutr.* 128: 1845-1854 (1998)). Aunque la mayoría de los estudios con animales han usado dosis farmacológicas de selenio (>2 mg/kg) en la quimioprevención del cáncer (Véase, por ejemplo, Ip, *J. Nutr.* 128: 1845-1854 (1998)), también se ha mostrado que la deficiencia de selenio aumentar la carcinogénesis de mama (Véase, por ejemplo, Ip y Daniel, *Cancer Res.* 45: 61-65 (1985) y de piel inducida por UVB (Véase, por ejemplo, Pence *et al.*, 102: 759-761 (1994)).

Las proteínas de la pared celular de la levadura se conectan a polisacáridos de la pared celular mediante enlace químico, y en un orden para liberar proteínas de la pared celular de la levadura en solución, y es necesario romper estos enlaces. La práctica convencional para extracción de proteínas de la pared celular de la levadura es romper los enlaces usando hidrólisis alcalina (pH 11,5, 80 °C) antes de centrifugar para separar proteínas de polisacáridos de glucano que son insolubles en agua.

Los experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la invención se realizaron en un intento de extraer selenoglicoproteínas usando la práctica convencional de hidrólisis alcalina. Estos intentos para extraer selenoglicoproteínas de la pared celular de la levadura usando hidrólisis alcalina fracasaron. Más tarde se supo que el fallo en la extracción de selenoglicoproteínas de la pared celular de la levadura usando hidrólisis alcalina se debió a la destrucción de las selenoglicoproteínas. Los intentos posteriores de extracción de selenoglicoproteínas se realizaron mediante un procedimiento de hidrólisis alcalina modificada (pH 11,5, 60 °C). Estos intentos tampoco lograron extraer selenoglicoproteínas de la pared celular de la levadura. Los métodos habituales de extracción de proteína de levadura alcalina no funcionaron al intentar extraer selenoglicoproteínas de la levadura. Por lo tanto, se realizaron experimentos adicionales durante el desarrollo de realizaciones de la invención que intentaron extraer selenoglicoproteínas mediante una extracción ácida (pH 5, 80 °C). Como se describe en el presente documento, el método de extracción ácida fue satisfactorio; las selenoglicoproteínas no se destruyeron y la extracción fue posible.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona nuevos métodos para obtener selenoglicoproteínas (SGPs), composiciones de selenoglicoproteína (SGP) (por ejemplo, obtenidas mediante métodos de extracción ácida (por ejemplo, fracciones de selenoglicoproteína dependientes de pH), composiciones que comprenden selenoglicoproteínas encapsuladas (SGP's). En particular, los experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la invención demuestran que las composiciones (por ejemplo, que comprenden SGP (por ejemplo, aisladas mediante un método de la invención)) y métodos de la invención se pueden usar para proporcionar selenio biológicamente disponible a un sujeto (por ejemplo, aumentando de ese modo el contenido de selenio del tejido y/o músculo dentro del sujeto (por ejemplo, conduciendo de ese modo a una estabilización y/o mejora de la salud de un sujeto)). En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para obtener SGP's, composiciones que comprenden SGP's encapsuladas (por ejemplo, polimersoma encapsulado). En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones que comprenden SGPs y métodos para preparar, producir, purificar, aislar, extraer, y/o caracterizar las mismas.

La invención también proporciona composiciones de selenio soluble (por ejemplo, SGPs) y métodos de producción, y purificación de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona SGPs solubles (Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1-2 que describen la generación de (por ejemplo, separación y caracterización de) fracciones de SGP dependientes del pH) (Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3-4). En algunas realizaciones, la invención proporciona selenio (por ejemplo, selenio orgánico (por ejemplo, fracción de SGP dependiente del pH de SEL-PLEX u otra levadura enriquecida con selenio)) en una forma soluble. En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición de selenio soluble (por ejemplo, selenio orgánico) con bajo contenido de fibra. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones y métodos para sistemas de administración de selenio orgánico solubles (por ejemplo, selenoglicoproteínas encapsuladas con polimersoma, nanocápsulas, polímeros).

La levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), que crece en medio que contienen selenio (por ejemplo, selenio inorgánico (por ejemplo, selenito sódico (Na_2SeO_3))) metabólica de selenio (por ejemplo, selenio inorgánico) e incorpora selenio en lugar de azufre en cisteína y metionina, proporcionando proteínas que contienen selenoaminoácidos (SeCys y SeMet) (Demirci *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 47, 2496-2500 (1999)., Demirci & Pometto. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2491-2495 (1999), Ouerdane & Mester. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11792-11799, (2008)). ALLTECH, Inc. (Nicholsville, KY, USA) produce levadura enriquecida con selenio secada por pulverización comercializada con el nombre SEL-PLEX como un suplemento nutricional alimenticio y alimentario, que contiene "selenio orgánico" (Véase, por ejemplo, Korhola *et al.*, *Res.* 18, 65-68, (1986)). La concentración mínima de selenio en SEL-PLEX es de 1500 ppm y las proteínas son los vehículos exclusivos del mismo (Véase, por ejemplo, Surai.

Nottingham University Press 2002, 234-236 (2002), Kelly & Power. J. Dairy Sci. 78, 237-242 (1995), McSheehy *et al.*, Analyst 130, 35-37 (2005)). En la levadura existen dos combinaciones de proteínas: proteínas presentes dentro de la célula de levadura y proteínas asociadas con el manano de la pared celular de la levadura (Véase, por ejemplo, Sedmak. Publicación de Sol. de Patente de Estados Unidos Pub. N.º: US 2006/0263415.). Aproximadamente un 17,0 % en peso de SEL-PLEX comercial es soluble en agua, y este material contiene menos de un 6,5 % del selenio total que está presente en SEL-PLEX. Los estudios de alimentación de pollos en los que se usaron SEL-PLEX y selenito sódico como las fuentes de selenio, indicaron una transferencia de selenio mucho mejor en un músculo de pechuga de pollo con SEL-PLEX. Para administración oral de SEL-PLEX se descubrieron una diversidad de bio-actividades (Véase, por ejemplo, Rayman. The Lancet 356, 233-241 (2000), McKenzie Trends in Immunology 19, 342-345 (1998), Tapiero. Biomedicine & Pharmacotherapy 57, 134-144 (2003), Combs & Grey Pharmacol. Ther. 79, 179-192 (1998), Clark *et al.*, J. Am. Med. Assoc. 276, 1957-1963 (1996)).

En algunas realizaciones, la invención proporciona separación, y caracterización física y química de selenoglicoproteínas solubles (SGP's) de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que crece en medio que contienen selenio (por ejemplo, selenio inorgánico (por ejemplo, selenito sódico)), y su participación activa en el suministro de "selenio orgánico" a los tejidos (por ejemplo, humano o, animal, pollo, etc.), mediante alimentación del sujeto con alimento (por ejemplo, pienso) suplementado con o que de otro modo contiene la SGP de la invención (Véanse, por ejemplo los Ejemplos 1-4). La invención proporciona administración dirigida al tejido, por vía intravenosa, oral, y/o transdérmica de componentes de selenio soluble, activos (por ejemplo, fracciones de SGP dependientes del pH de una levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)). En algunas realizaciones, la invención proporciona formas de liberación lenta de sistemas de suministro de "selenio orgánico" (por ejemplo, nanocápsulas, esferas de polímero, y SGP's encapsuladas con polimersoma) (Véanse, por ejemplo los Ejemplos 5-9). En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende SGP's encapsulada con polimersoma. En algunas realizaciones la invención proporciona un aumento del suministro y mejora de la biodistribución de SGP's al encapsular SGP's dentro de polimersomas a base de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL).

Se ha descrito la separación de diversos componentes de las células de levadura mediante extracción de la pared celular de componentes intracelulares de células de levadura (Véase, por ejemplo, Otero *et al.*, J. Chem. Tech. Biotechnol. 66, 67-71 (1996)). Estas técnicas de separación no se han aplicado a la extracción de levadura de selenio secada por pulverización. Las condiciones alcalinas, convencionales (pH 9,0-14,0) usadas en la técnica para extracción de glicoproteínas a partir de levadura (Véase, por ejemplo, Roberge *et al.*, J. Agric. Food Chem. 51, 4191-4197 (2003)) fallaron porque los sustituyentes de SeH o SeMe se eliminaron de los aminoácidos selenocistina o selenometionina. En otras palabras, los sustituyentes deseados se descompusieron y como resultado el selenio que estaba presente en la SGP original se perdió durante el intento de extracción en condiciones alcalinas cuando se aplicaba a la extracción de selenoproteínas que contienen levadura (Véase, por ejemplo, Tabla 12 del Ejemplo 8).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones de selenoglicoproteína (por ejemplo, que comprenden una fracción de selenoglicoproteínas dependiente del pH que se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para producir, purificar, aislar, extraer, separar, precipitar, y/o caracterizar selenoglicoproteínas (por ejemplo, de levadura enriquecida con selenio).

II. Extracción, separación, purificación y uso

En algunas realizaciones de la invención, el selenio soluble se obtiene en forma de selenoglicoproteínas (SGPs). En algunas realizaciones, las SGP's se extraen a partir de una fuente general de selenoproteínas (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)). En algunas realizaciones, la extracción y/o purificación de las SGP's comprende una o más etapas de extracción/precipitación dependientes del pH (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1 y 2). En algunas realizaciones, la extracción y/o purificación de las SGP's comprende una o más etapas de fraccionamiento dependientes del pH. En algunas realizaciones la invención proporciona extracción ácida de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) para utilizar las SGP (por ejemplo, sin desnaturalizar y/o destruirlas SGP's). En algunas realizaciones, la invención proporciona esa precipitación de SGP's dependiente del pH a partir de un extracto ácido (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1-2) que produce un aumento del contenido de selenoglicoproteínas, disminución del contenido de fibras no digeribles, y una concentración elevada de selenio (por ejemplo, una concentración de selenio que es más elevada que la presente en SEL-PLEX). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona SGP extraído de levadura enriquecida con selenio donde el contenido de selenio de la SGP es mayor que el contenido de selenio del material a partir del cual se extrajo la SGP (por ejemplo, en % en p/p, ppm). En algunas realizaciones, la invención proporciona selenio en forma de una fracción de SGP dependiente del pH (por ejemplo, fracciones a pH 4,0 o pH 6,0) de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) que presenta el mismo nivel o un nivel altamente similar de biodisponibilidad cuando se administra a un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de selenio a partir de la fuente precursora de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) (Véase, por ejemplo, Ejemplo 3, Tabla 5).

En algunas realizaciones, las SGP's se extraen a partir de una fuente general de selenoproteínas (por ejemplo, células de levadura enriquecidas con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)). En algunas realizaciones, una parte de las selenoproteínas en una fuente de selenoproteína comprende las SGP's (por ejemplo, 0,1 %... 0,2 %... 0,5 %...

1,0 %... 2,0 %... 5,0 %... 10 %... 20 %... 50 % o más SGP). En algunas realizaciones, una fuente de selenoproteína comprende células (por ejemplo, células de levadura) que se han cultivado en presencia de medios que contienen Se (por ejemplo, medios ricos en Se). En algunas realizaciones, las células que contienen Se (por ejemplo, células de levadura) se procesan para extraer, aislar, y/o unificar selenoproteínas dando como resultado una fuente de selenoproteína o composición rica en selenoproteína (por ejemplo, composición rica en SGP). En algunas realizaciones, una muestra que comprende selenoproteínas y SGP se enriquece con SGP.

En algunas realizaciones, una fuente de selenoproteína o composición rica en selenoproteína (por ejemplo, fuente de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) se somete a una o más etapas para producir aislar, purificar, separar, y/o extraer las SGP. En algunas realizaciones, una fuente de selenoproteína se mezcla (por ejemplo, en un vehículo líquido (por ejemplo, agua, tampón, sal)) para producir una suspensión, mezcla, lisado y/o solución de proteína. En algunas realizaciones, la fuente de selenoproteína (por ejemplo, fuente de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) se mezcla a temperatura elevada (por ejemplo, por encima de la temperatura de congelación, por encima de la temperatura ambiente, 30 °C... 40 °C... 50 °C... 60 °C... 70 °C... 80 °C... 90 °C o superior). En algunas realizaciones, la fuente de selenoproteína (por ejemplo, fuente de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) se mezcla a pH bajo (por ejemplo, condiciones ácidas (por ejemplo, pH 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5). En algunas realizaciones, la fuente de selenoproteína (por ejemplo, fuente de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) se mezcla suavemente, se mezcla rápidamente, se mezcla minuciosamente, se mezcla vigorosamente. En algunas realizaciones, la fuente de selenoproteína (por ejemplo, fuente de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) se mezcla pH bajo (por ejemplo, condiciones ácidas (por ejemplo, pH 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5) y temperatura elevada (por ejemplo, por encima de la temperatura de congelación, por encima de la temperatura ambiente, 30 °C... 40 °C... 50 °C... 60 °C... 70 °C... 80 °C... 90 °C, o superior)). En algunas realizaciones, el pH de la mezcla se mantiene mediante la adición de ácido o base.

En algunas realizaciones, la mezcla que contiene selenoproteína se centrifuga para separar las fases líquidas/solubles y sólidas/insolubles. En algunas realizaciones, se seleccionó una velocidad de la centrifugadora que es suficiente para separar las fases. En algunas realizaciones, la fase líquida comprende SGP solubles. En algunas realizaciones, el pH de la fase líquida se ajusta (por ejemplo, se aumenta) para precipitar una parte de las SGP. En algunas realizaciones, el pH de la fracción líquida se aumenta de forma ligera a moderada (por ejemplo, el pH presenta un aumento de 0,1... 0,2... 0,5... 1,0... 2,0) para precipitar las SGP que eran solubles al pH original, pero no al pH elevado. En algunas realizaciones, el pH de la fracción líquida se aumenta de forma significativa (por ejemplo, el pH presenta un aumento de 1,0... 2,0... 3,0... 4,0... 5,0... 6,0) para precipitar una gran parte de las SGP que eran solubles al pH original. En algunas realizaciones, las selenoglicoproteínas se hacen precipitar y se separan de la fase líquida en una diversidad de condiciones de pH para generar múltiples fracciones de selenoglicoproteínas solubles dependientes del pH. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una sola fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en condiciones ácidas se usa para crear una primera fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un primer pH (por ejemplo, pH de 1,85), una segunda fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un segundo pH (por ejemplo, pH de 3,0), una tercera fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un tercer pH (por ejemplo, pH de 4,0), y una cuarta fracción de selenoglicoproteínas solubles que precipita a un cuarto pH (por ejemplo, pH de 6,0). En algunas realizaciones, la precipitación de las selenoglicoproteínas de la fase líquida mediante aumento del pH de la fase líquida comprende múltiples reacciones de precipitación secuencial dependiente del pH de la fase líquida.

En algunas realizaciones, las SGP precipitadas se separan de la fracción líquida con el pH ajustado por centrifugación (por ejemplo, a una velocidad suficiente como para producir fases líquidas y sólidas separadas). En algunas realizaciones, las SGP que se han separado de la fase líquida se liofilizan para producir una fracción sólida de SGP. En algunas realizaciones, el proceso para aumentar el pH de la fase líquida y centrifugación para aislar la fracción de SGP se repite para producir fracciones de SGP de diferentes solubilidades (por ejemplo, soluble por debajo de pH 1,5... soluble por debajo de pH 2... soluble por debajo de pH 3... soluble por debajo de pH 4... soluble por debajo de pH 5... soluble por debajo de pH 6). En algunas realizaciones, la fase líquida que permanece después de la retirada de la fracción final de SGP encuentra utilidad como un componente de medios de crecimiento para células usadas en producción adicional de selenoproteínas o SGP. La lista inicial la composición que comprende selenoglicoproteínas solubles contiene dos o más fracciones dependientes del pH de selenoglicoproteínas (por ejemplo, selenoglicoproteínas solubles de fase líquida que comprenden el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en condiciones ácidas que precipitan a dos o más valores de pH diferentes).

En una realización preferente, el proceso de extracción de SGP a partir de una fuente de selenoproteína (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) y fraccionamiento dependiente del pH de la mezcla de SGP's (Véanse, por ejemplo, las Figuras 2 y 3) comprende dos etapas (Véanse por ejemplo, los Ejemplos 1-2, Figuras 1 y 2). En la primera etapa, una suspensión de levadura enriquecida con selenio en HCl 0,3 N (pH 1,5) se agita y se calienta a 80 °C durante 8 horas. El pH de la mezcla se mantiene a pH 1,5 por adición de HCl concentrado durante la primera hora de la estación. Después de ocho horas, la mezcla se centrifuga, y la fase líquida se separa. El pH de la solución se ajusta a 1,85, mediante la adición de NaOH 2,0 N y las SGP's que tienen solubilidad limitada a este pH precipitan a partir de la solución y se separan de los líquidos (pH 1,85) con la segunda centrifugación y a continuación se liofilizan para producir una fracción sólida de SGP de pH 1,85. En algunas

realizaciones, los líquidos (pH 1,85) se mezclan con los sólidos (pH 1,5) a partir de la primera centrifugación, que da como resultado un cambio del pH de la mezcla a pH 1,6. La mayoría de las SGP's solubles a pH 1,6, se transfieren a la fase líquida, sin aumento de los volúmenes de las corrientes residuales creadas dentro de esta etapa del proceso. El producto secundario principal de esta etapa del proceso son sólidos de la segunda centrifugación. La corriente de sólidos residuales constituye aproximadamente un 56,5 % en peso de la levadura enriquecida con selenio tomará para extracción y contiene material valioso de pared celular de levadura de selenio que contiene: un 38,91 % de proteína y 2477 ppm de selenio. En algunas realizaciones, estos sólidos se usan (por ejemplo, solos o en combinación con otro material (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio)) como un suplemento nutricional ecológico en dietas para animales. En la segunda etapa (Véase, por ejemplo, la Figura 3), la fase líquida (pH 1,6) de la segunda centrifugación (VÉASE FIG. 2) se transfiere a una mezcladora y el pH se ajusta a pH 3,0 mediante la adición de NaOH 2,0 N y las SGP's que tienen solubilidad limitada a este pH precipitan a partir de la solución y se separan de los líquidos (pH 3,0) con la tercera centrifugación y por último se liofiliza para producir una fracción sólida de SGP de pH 3,0 (Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1-2 y las Figuras 2 y 3). La fase líquida (pH 3,0) de la tercera centrifugación se transfiere a una mezcladora y el pH se ajusta a pH 4,0 mediante la adición de NaOH 2,0 N y las SGP's que tienen solubilidad limitada a este pH precipitan a partir de la solución y se separan de los líquidos (pH 4,0) mediante la cuarta centrifugación y por último se liofiliza para producir una fracción sólida de SGP de pH 4,0. La fase líquida (pH 4,0) de la cuarta centrifugación se transfiere a una mezcladora y el pH se ajusta a pH 6,0 mediante la adición de NaOH 2,0 N y las SGP's que tienen solubilidad limitada a este pH precipitan a partir de la solución y se separan de los líquidos (pH 6,0) mediante la quinta centrifugación y a continuación se liofiliza para producir una fracción sólida de SGP de pH 6,0. la única corriente residual producida en la segunda etapa del proceso es la corriente de agua residual, que contiene un 13,4 % en peso de sólidos (en comparación con el peso de la levadura enriquecida con selenio usada en la estación) fuera de lo cual la fracción de proteína constituye aproximadamente un 13,3 % en peso, de cloruro sódico para un 3,6 % en peso y los mono- y oligosacáridos glucosa y manosa constituyen más de un 80 % en peso. Esta corriente de "agua residual" de pH 6,0 y concentración de selenio de 242 ppm se puede reciclar o de otro modo volver a usar para la preparación de un nuevo lote de levadura de selenio (por ejemplo, usada en medios de crecimiento).

En algunas realizaciones, las SGP's precipitadas a pH 4,0 presentan un suministro de selenio superior (por ejemplo, para tejido muscular) en comparación con la levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) y un suministro muy superior cuando se compara con formas inorgánicas de selenio (por ejemplo, selenito sódico) (Véase, por ejemplo el Ejemplo 3). Además, las fracciones de selenoglicoproteína dependientes del pH (por ejemplo, pH 6,0) tienen una composición diferente a la de la levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) y permiten el suministro de cantidades similares de selenio aunque requiere una cantidad mucho menor de material de partida (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio).

En algunas realizaciones, un procedimiento de extracción de SGP comprende 4 o menos etapas de ajuste de pH y centrifugación del procedimiento que se ha mencionado anteriormente (por ejemplo, 1 etapa de ajuste del pH y centrifugación, 2 etapas de ajuste del pH y centrifugación, 3 etapas de ajuste del pH y centrifugación, 4 pH etapas de ajuste del pH y centrifugación).

III. Alimentación para animales

Alimentación para animales se refiere a cualquier producto alimentario usado para alimentar a ganado domesticado (por ejemplo, vacuno, cabras, ovejas, caballos, aves, búfalos, alpacas, llamas, burros, mulas, conejos, pollos, gansos, pavos o cerdos). Los alimentos para animales a menudo incluyen heno, paja, cereales en silos, piensos comprimidos y granulados, aceites y relaciones mixtas, y también granos y legumbres germinados. La industria mundial de alimentación para animal consumió 635 millones de toneladas de pienso en 2006, con una tasa anual de crecimiento de aproximadamente un 2 %. El uso del campo agrícola para cultivar productos alimentarios en lugar de alimento para seres humanos puede ser controvertido; algunos tipos de alimentación, tal como maíz (Maíz), también pueden servir como alimento humano, aunque otros tales como la hierba no pueden servir. Además de proporcionar una fuente de energía a los animales, los piensos para animales también proporcionan nutrientes (por ejemplo, selenio) usados por el cuerpo.

Las composiciones nutricionales (por ejemplo, composiciones de selenio soluble (por ejemplo, SGPS) permiten una generación de composiciones para alimentación para animal que comprenden selenio (por ejemplo, concentraciones elevadas de selenio con respecto a las composiciones de pienso convencionales (por ejemplo, selenio soluble)) que disminuye los costes globales, aumentara la conversión del pienso y mantiene y/o mejora la calidad de los productos animales (por ejemplo, carne, huevos, productos lácteos, etc.) obtenidos a partir del ganado que recibe los mismos en comparación con los piensos convencionales.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético comprende las SGP's que se pueden combinar con y/o incorporar en un alimentación para animal y se pueden administrar a (por ejemplo, dar en forma de alimento a) un animal para proporcionar efectos equivalentes o superiores en el rendimiento del crecimiento en el animal (por ejemplo, en comparación con dietas de alimentación para animales con otras formas de suplemento de selenio (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)). En algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético de la invención aumenta la cantidad de selenio circulante

(por ejemplo, situada en la sangre y/o suero) en un sujeto (por ejemplo, ser humano o animal) que recibe la composición. En algunas realizaciones, en las composiciones de selenio soluble de la invención (por ejemplo, SGP) está biodisponible una mayor proporción de selenio administrado que en otras formulaciones de selenio (por ejemplo, selenito sódico o levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)). Es decir, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden selenoglicoproteínas que contienen una proporción más elevada y/o proporción de selenio que se pone a disposición (por ejemplo, biodisponible) para un sujeto en comparación con otras formas de selenio (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio) lo que significa que son necesarias cantidades menores de una composición que comprende la selenoglicoproteína de la invención (por ejemplo, para obtener cantidades similares de biodisponibilidad). En algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético (por ejemplo, que comprende las SGP de la invención) aumenta la cantidad de selenio (por ejemplo, situado en el músculo u otro tejido) en un sujeto (por ejemplo, ser humano o animal) que recibe la composición. En algunas realizaciones, la administración de las SGP y/o selenio soluble da como resultado un aumento de la biodisponibilidad de selenio para suero, tejido adiposo, tejido muscular.

En algunas realizaciones, un método para aumentar la eficacia con la que un animal usa los nutrientes en una dieta para alimentar al animal comprende la provisión al animal una dieta que comprende una composición de suplemento dietético, donde la composición de suplemento aumenta la capacidad del animal para profesar y usar Los nutrientes presentes en su dieta. En algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético aumenta la cantidad de antioxidantes circulantes (por ejemplo, selenio localizado en la sangre y/o suero) en un sujeto que recibe la composición. En algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético aumenta la cantidad de antioxidantes (por ejemplo, selenio localizado en tejido adiposo, músculo, etc.) en un sujeto que recibe la composición.

IV. Agentes farmacéuticos, nutricéuticos y suplementos

La FDA ha establecido los niveles de selenio nutricionales (Véase 21 C.F.R. 101.9 (c)(8) (iv), enero de 1994). Los seres humanos y los animales pueden antagonizar de forma segura a cantidades limitadas de formas tanto inorgánicas como orgánicas de selenio y pueden convertir el selenio no metilado en derivados mono- o di- o trimetilados, de los cuales los más tóxicos son los derivados monometilados. (Véase, por ejemplo, Bedwal, R. S., *et al.*, Medical Hypotheses, 41 (2): 150-159 (agosto de 1993)). La FDA ha adoptado las Ingestas Diarias de Referencia (RDI) de 70 microgramos de selenio para mujeres en periodo de lactancia y RDI de 55 microgramos para adultos que no están en periodo de lactancia. Se ha informado que la dosificación de selenio de 600 microgramos al día es segura. (Véase, por ejemplo, Ferris G. M. Lloyd, *et al.*, App. Clin. Biochem., 26: 83-88 (1989). A aproximadamente esta dosificación, la actividad normal de la enzima glutatión reductasa convierte de forma segura a la selenoglutión en seleniuro de hidrógeno en el hígado y eritrocitos y por último se secreta. Por lo tanto, a tales dosificaciones más bajas, el cuerpo es capaz de estabilizar y secretar de forma segura es el año que está presente en una forma metálica libre. Sin embargo, al igual que con muchos elementos traza (por ejemplo, selenio), a niveles de dosificación o concentraciones más elevados los efectos beneficiosos se invierten y se manifiesta una toxicidad peligrosa. (Véase, por ejemplo, Furnsinn, C. *et al.*, Internat'l J. of Obesity and Related Metab. Dis., 19 (7): 458-463 (1995)).

La administración de selenio en la forma natural implica una solución de compromiso científica y médica porque, cuando se administra en concentraciones relativamente bajas, el selenio proporciona efectos de salud beneficiosos, sin embargo, a concentraciones más elevadas, de selenio presenta una toxicidad espectacular de modo que los beneficios potenciales de salud se pierden y la tóxica se convierte en la preocupación principal.

Como se ha descrito anteriormente, ciertas formas de selenio (por ejemplo, SGP, selenio soluble en agua) proporcionan efectos beneficiosos a un sujeto. La evidencia ha demostrado que las formas orgánicas de selenio (por ejemplo, selenometionina y levadura enriquecida con selenio) pueden ser menos tóxicas y mejor absorbidas que las formas inorgánicas (Véase, por ejemplo, Mahan, Proceedings of the 15th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido, pp. 523-535 (1999). Sin embargo, en algunas realizaciones, se usan múltiples formas de selenio en combinación con otras (por ejemplo, para proporcionar efectos beneficiosos para la salud de un sujeto). Las fuentes naturales de selenio incluyen, pero no se limitan a, levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, selenizada).

En ciertas realizaciones preferentes, las SGP (por ejemplo, obtenidas a partir de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX), como se describe en los Ejemplos 1-2) son la forma de selenio elegida para las formulaciones y composiciones de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden selenio soluble en agua y/o SGP proporcionan una forma de selenio más biológicamente disponible en comparación con otras formas de selenio. Sin embargo, también se pueden usar otras formas de selenio, incluyendo derivados o modificaciones de selenio soluble en agua y/o SGP, SEL-PLEX, u otras formas de levadura enriquecida con selenio, selenometionina, selenocisteína, un compuesto de selenito, un compuesto de seleniato, o derivados, sales, o modificaciones de los mismos. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferentes, cada una de estas formas de selenio se puede usar como un componente de una formulación. Como alternativa, cada una de las formas de selenio que se han descrito anteriormente puede estar relacionada (por ejemplo, química o físicamente) con un fármaco o agente terapéutico para formar un derivado de fármaco de selenio. De hecho, una composición o

formulación puede comprender múltiples formas de selenio (por ejemplo, SGPs y SEL-PLEX, o Sod-sel y selenio soluble en agua).

5 Otras formas de selenio que encuentran en uso en diversas realizaciones de la presente invención se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} 6.911.550, 6.197.295, 5.221.545, 6 y 6,576,233, y en las solicitudes de Patente de Estados Unidos N.^{os} 20010043925, 20050069594, 20050089530, y 20080107755.

10 Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y/o de suplemento (por ejemplo, producto alimentario y/o composición o tratamiento dietético) que comprenden una o más formas de selenio (por ejemplo, SGPs, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), etc.), solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, otro u otros agentes terapéuticos, nutriente(s) y/o minerales; y se puede administrar en cualquier vehículo estéril biocompatible, incluyendo solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua que se pueda proporcionar.

15 Los métodos encuentran uso en el tratamiento (por ejemplo, por vía profiláctica o terapéutica) de enfermedades (por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, etc.) o en la alteración de estados fisiológicos. El selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua, SGPs)) se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente) por vía intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica. Para la administración intracelular de compuestos se pueden usar métodos convencionales (por ejemplo, administración a través de liposomas). Los métodos de ese tipo son bien conocidos por las personas con experiencia habitual en la materia. Las formulaciones son útiles para administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. En algunas realizaciones, las composiciones (por ejemplo, SGPs y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden las mismas) se administran por vía oral.

25 Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera pueden depender de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y la interacción con otros fármacos que se están administrando de forma simultánea.

30 Por consiguiente, en algunas realizaciones las composiciones y/o formulaciones que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs,) se administran a un sujeto solo, o en combinación con otras formas de selenio, fármacos, moléculas pequeñas, o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte. En otras realizaciones, las composiciones que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs) se administran solas a sujetos individuales que padecen una enfermedad o afección. En otras realizaciones, las composiciones que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs,) se administran solas a sujetos individuales para la promoción de la salud general o la salud de un sistema corporal. Las composiciones que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs) solas o en combinación con una u otras formas más de selenio se pueden añadir a una bebida o alimento nutricional (por ejemplo, ENSURE, POWERBAR), una multivitamina, productos nutricionales, productos alimentarios, etc., para el consumo diario.

45 Dependiendo de la diana que se busca alterar con el tratamiento (por ejemplo, la expresión genética asociada con el envejecimiento, y/o la regulación de la expresión genética asociada con el cáncer y/o el crecimiento o metástasis tumoral), estas composiciones farmacéuticas, suplementos, y/o nutracéuticas se formulan y administran por vía sistémica o por vía local. Las técnicas para formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral o transmucosal; así como la administración parenteral, incluyendo la administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal.

50 Para inyección, las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs, etc.) se formulan en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente tamponada. Para la administración tisular o celular, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera particular que se va a permear. Los agentes penetrantes de ese tipo generalmente se conocen en la técnica.

60 En otras realizaciones, las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs, etc.) se formulan usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Los vehículos de ese tipo permiten que las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs,) se formulen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones para ingestión oral o nasal por parte de un paciente que se va a tratar.

65 Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones donde los principios activos (por ejemplo, composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs) están contenidos

en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Por ejemplo, una cantidad del agente farmacéutico puede ser la cantidad que altera la expresión de un gen específico (por ejemplo, KTLG, GRB2, DNAJ3, TGFB1, MAPK8, C1R, UBE4A, SMPX, USP22, y/o PTP4A1). La determinación de las cantidades eficaces está bien dentro de la capacidad de las personas con experiencia en la materia.

5 Las SGP dependientes del pH y las composiciones que las comprenden se pueden usar en la prevención y/o el tratamiento terapéutico del cáncer (por ejemplo, para prevenir o retardar la progresión y/o metástasis del cáncer/tumor). Por ejemplo, en una realización preferente, una fracción de SGP dependiente del pH de una levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) se administra a un sujeto para regular la expresión (por ejemplo, de una manera deseada) de un gen asociado con el crecimiento y/o metástasis del cáncer). Como se describe en el presente documento, se ha identificado que ciertas fracciones solubles de SGP tienen propiedades biológicas (por ejemplo, la capacidad de regular la expresión génica) de la cual se obtuvo que el material precursor de la fracción de SGP, soluble (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX)) no tiene (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 4 y las Figuras 7-11). En una realización preferente, la fracción de SGP dependiente del pH de una levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) es una fracción dependiente del pH 4,0, aunque otras fracciones (por ejemplo, pH 3,0, pH 6,0, etc.) también encuentran no son las composiciones y métodos de la invención.

20 Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble (por ejemplo, selenio soluble en agua), SGPs, etc.) pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, o soluciones.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar de una manera que sea conocida por sí misma (por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización).

30 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

35 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante combinación de los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los agentes auxiliares adecuados, si se desea, núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son los rellenos de carbohidratos o proteínas, tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata; celulosa tal como metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas que incluyen arábigas y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden agregar agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilo pirrolidona reticulada, goma de agar, ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

40 Se proporcionan núcleos de gragea con revestimientos adecuados tales como soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. A los comprimidos o revestimientos de grageas se les pueden añadir colorantes o pigmentos para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, (es decir, dosificación).

45 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos mezclados con un relleno o aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

50 Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden preparar, se pueden colocar en un recipiente apropiado y se pueden etiquetar para el tratamiento de una afección indicada. Para composiciones o formulaciones que contengan selenio, las afecciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de afecciones relacionadas con el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer, enfermedad neurodegenerativa y/o función cognitiva).

60

65

La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal y se puede formar con muchos ácidos, que incluyen, pero no se limitan a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferente puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, sacarosa al 0,1 %-2 %, manitol al 2 %-7 % a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 que se combina con tampón antes de su uso.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. A continuación, preferentemente, la dosificación se puede formular en modelos animales (en particular modelos murinos) para conseguir un intervalo de concentración circulante deseable.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad que mejora o previene síntomas de una patología o afección (por ejemplo, mediante la alteración de la expresión génica). La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz para un 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Son preferentes los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales adicionales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación de los compuestos de ese tipo se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación usada, sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

La dosificación exacta puede ser elegida por un sujeto o por un médico en vista del paciente a tratar. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado (por ejemplo, alteración de la expresión genética en un sujeto). Los factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad de la patología; edad, peso y género del paciente; dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación o combinaciones de fármacos, sensibilidad a la reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas o una vez al mes, en función de la semivida y la tasa de eliminación de la formulación particular.

En algunas realizaciones, el selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGPs,) se administra a una dosis diaria de entre 25 y 600 μg al día (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, y/o SGP se administra a un sujeto de un modo tal como para proporcionar entre 25 y 600 μg de selenio al sujeto cada día). En realizaciones preferentes, el selenio se administra a una dosis diaria de entre 50 y 200 μg al día. En otras realizaciones preferentes, el selenio se administra a una dosis diaria de entre 100 y 200 μg al día. Se pueden usar dosis fuera del intervalo de 25 y 600 μg . En algunas realizaciones, una dosis única de selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGPs) se administra una vez al día. En otras realizaciones, cada día se pueden administrar 2, 3, 4, o más dosis (por ejemplo, una vez por la mañana y una vez por la noche, o una vez cada 4 a 6 horas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGPs, etc.) se administra a un sujeto en tres dosis separadas, más de tres dosis separadas, dos dosis separadas, o menos de dos dosis separadas. En algunas realizaciones preferentes, la dosis diaria se administra en una cápsula de liberación prolongada. En algunas realizaciones preferentes, la dosis diaria es entre 25-75 μg de selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGPs). En otras realizaciones preferentes, la dosis diaria es de 200 μg de selenio (por ejemplo, selenio orgánico, levadura selenizada, SEL-PLEX, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGPs).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo botánica y a las membranas mucosas, incluyendo la administración vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que las composiciones y formulaciones que comprenden selenio son particularmente útiles para administración oral.

Las composiciones y formulaciones (por ejemplo, que contienen SGP) farmacéuticas, nutricéuticas, y/o de suplementos que contienen selenio para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, agentes espesantes.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables agentes espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como mejoradores de la penetración, compuestos vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas, nutricéuticas, y/o de suplemento incluyen, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una diversidad de componentes que incluyen líquidos formados previamente, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

10 Las formulaciones farmacéuticas, nutricéuticas, y/o de suplemento, que se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Las técnicas de ese tipo incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o
15 ambos, y a continuación, si fuera necesario, se le da forma al producto.

En algunas realizaciones, las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP) se pueden formular en cualquiera de las muchas formas de dosificación posibles, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como nanopartículas de liberación prolongada (por ejemplo, nanocápsulas), vesículas, liposomas, polímeros (por ejemplo, polímeros con impresión molecular (MIP), polímeros de liberación lenta biodegradables, polímeros policatiónicos. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos, y las suspensiones acuosas pueden
20 contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener agentes estabilizantes. En una realización, las composiciones farmacéuticas y/o de suplementos se pueden formular y usar como espumas. Las espumas incluyen formulaciones tales como emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque básicamente estas formulaciones son de naturaleza similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final.

Las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP) pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales, compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, agentes de opacidad, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, los materiales de ese tipo, cuando se añaden, no deben interferir de forma indebida con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromas y/o sustancias aromáticas que no interactúan de forma perjudicial con el ácido o ácidos nucleicos de la formulación.

45 En algunas realizaciones, se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas, nutricéuticas, y/o de suplemento que contienen (a) una o más formas de selenio (por ejemplo, SGP (por ejemplo, fracción de SGP dependiente del pH), selenio soluble, selenio soluble en agua, SEL-PLEX) y (b) uno u otros agentes más (por ejemplo, nutrientes, minerales, terapéuticos, etc.).

50 Los métodos pueden implicar la administración conjunta de compuestos que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, etc.) descritos en el presente documento con uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, agente terapéutico para el cáncer, agente terapéutico para el Alzheimer), antioxidante, etc.). De hecho, un aspecto adicional es proporcionar métodos para mejorar las terapias y/o composiciones farmacéuticas, nutricéuticas, y/o de suplemento mediante la administración conjunta de una composición que comprende selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP (por ejemplo, fracción de SGP dependiente del pH)) de la presente invención con una composición farmacéutica, nutricéutica y/o de suplemento preventiva o terapéutica. En los procedimientos de administración conjunta, los agentes se pueden administrar de forma simultánea o de forma secuencial. En una realización, los compuestos que se describen en el presente documento se administran antes que el otro u otros agentes activos. Las formulaciones y modos de administración pueden ser cualquiera de los que se han descrito anteriormente. Además, los dos o más agentes coadministrados se pueden administrar cada uno usando diferentes modos o diferentes formulaciones. En algunas realizaciones, una composición de la invención se administrar en forma conjunta con un tratamiento para el
60 cáncer.

65 Por consiguiente, en algunas realizaciones, una composición que contiene una o más formas de selenio (por ejemplo, SGP (por ejemplo, fracción de SGP dependiente del pH), selenio soluble, selenio soluble en agua, SEL-

- PLEX) se administra por vía sistémica o por vía local para inhibir la proliferación de células tumorales y la angiogénesis, y/o para inducir la muerte de células tumorales en pacientes con cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición que comprende una fracción de SGP dependiente del pH (pH 4,0) de una levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, SEL-PLEX) se administra a un sujeto en condiciones tales que la expresión de uno o más genes asociados con cáncer/crecimiento tumoral y/o metástasis está regulada (por ejemplo, regulada de forma positiva o de forma negativa) de una manera beneficiosa en el sujeto (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Las composiciones se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intratecal, por vía intraperitoneal así como por vía oral. Además, se pueden administrar solas o en combinación con fármacos antiproliferativos.
- 5
- 10 Un ejemplo es cuando una composición que contiene una o más formas de selenio está unida con enlace covalente a un vehículo de orientación o a un agente farmacéutico activo. La unión covalente se puede realizar con uno cualquiera de los muchos compuestos de reticulación disponibles en el mercado.
- 15 Por ejemplo, las composiciones de ese tipo se pueden proporcionar en combinación con vehículos, diluyentes, adyuvantes y excipientes líquidos, geles o sólidos, fisiológicamente tolerables.
- 20 Estas preparaciones terapéuticas se pueden administrar a mamíferos para uso veterinario, tal como a animales domésticos o criados en granjas, y uso clínico en seres humanos de una manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosificación requerida para la eficacia terapéutica variará de acuerdo con el tipo de uso y modo de administración, así como los requisitos particulares de los hospedadores individuales.
- 25 Las composiciones de ese tipo se preparan generalmente como soluciones o suspensiones líquidas, o en formas sólidas. Las formulaciones orales para el cáncer por lo general incluyen tales aditivos normalmente usados tales como aglutinantes, cargas, vehículos, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, tampones y excipientes como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, o polvos, y contienen un 1 %-95 % de principio activo, preferentemente un 2 %-70 %.
- 30 Las composiciones también se preparan como agentes inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección.
- 35 Las composiciones a menudo se mezclan con diluyentes o excipientes que son fisiológicamente tolerables y compatibles. Los diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o agentes de taponamiento de pH.
- 40 Una amplia gama de agentes terapéuticos encuentran uso con la presente invención. Por ejemplo, es adecuado cualquier agente terapéutico que se pueda coadministrar con una composición que contenga una o más formas de selenio de la invención.
- 45 Algunas realizaciones proporcionan la administración, a un sujeto, de una cantidad eficaz de una composición que contiene una o más formas de selenio y al menos un agente anticáncer (por ejemplo, un agente anticáncer convencional, tal como medicamentos quimioterapéuticos, y/o terapia de radiación).
- 50 Los mecanismos de agentes anticáncer adecuados para su uso incluyen, agentes que inducen la apoptosis, agentes que inducen/causan daño a ácido nucleico, agentes que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, agentes que influyen en la formación de microtúbulos y agentes que influyen en la síntesis o estabilidad de la proteína.
- 55 Las clases de agentes anticáncer adecuados para uso en composiciones y métodos incluyen: 1) alcaloides, que incluyen inhibidores de microtúbulos (por ejemplo, Vincristina, Vinblastina y Vindesina), estabilizantes de microtúbulos (por ejemplo, Paclitaxel (Taxol), y Docetaxel), e inhibidores de la función de la cromatina, que incluyen, inhibidores de la topoisomerasa, tales como, epipodofilotoxinas (por ejemplo, Etopósido (VP-16), y Tenipósido (VM-26)), y agentes que se dirigen a la topoisomerasa I (por ejemplo, Camptotecina e Isirinotecán (CPT-11)); 2) agentes covalentes de unión al ADN (agentes alquilantes), que incluyen mostazas de nitrógeno (por ejemplo, Mecloretamina, Clorambucilo, Ciclofosfamida, Ifosfamida, y Busulfán (Myleran)), nitrosoureas (por ejemplo, Carmustina, Lomustina, y Semustina), y otros agentes alquilantes (por ejemplo, Dacarbazina, Hidroximetilmelamina, Tiotepa, y Mitocicina); 3) agentes de unión a ADN no covalentes (antibióticos antitumorales), que incluyen inhibidores de ácido nucleico (por ejemplo, Dactinomicina (Actinomicina D)), antraciclina (por ejemplo, Daunorrubicina (Daunomicina, y Cerubidina), Doxorubicina (Adriamicina), es Idarrubicina (Idamicina)), antracenodionas (por ejemplo, análogos de antraciclina, tales como, (Mitoxantrona)), bleomicinas (Blenoxane), y plicamicina (Mitramicina); 4) antimetabolitos, que incluyen, antifolatos (por ejemplo, Metotrexato, Folex, y Mexato), antimetabolitos de purina (por ejemplo, 6-Mercaptopurina (6-MP, Purinetol), 6-Tioguanina (6-TG), Azatioprina, Aciclovir, Ganciclovir, Clorodesoxiadenosina, 2-Clorodesoxiadenosina (CdA), y 2'-Desoxicoformicina (Pentostatina)), antagonistas de pirimidina (por ejemplo,
- 60
- 65

floropirimidinas (por ejemplo, 5-fluorouracilo (Aduvicio), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd) (Floxuridina)), y arabinósidos de citosina (por ejemplo, Cytosar (ara-C) y Fludarabina); 5) enzimas, incluyen, L-asparaginasa e hidroxiaurea; 6) hormonas, que incluyen, glucocorticoides, tales como antiestrógenos (por ejemplo, Tamoxifeno), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo, Flutamida), e inhibidores de la aromataza (por ejemplo, anastrozol (Arimidex)); 7) compuestos de platino (por ejemplo, Cisplatino y Carboplatino; 8) anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos anticáncer, toxinas, y/o radionúclidos; 9) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFN- α) e interleuquinas (por ejemplo, IL-2)); 10) inmunoterapia adoptiva; 11) factores de crecimiento hematopoyético; 12) agentes que inducen la diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido all-trans-retinoico); 13) técnicas de terapia genética; 14) técnicas de terapia antisentido; 15) vacunas tumorales; 16) terapias dirigidas contra las metástasis tumorales (por ejemplo, Batimistat); y 17) otros inhibidores de la angiogénesis.

A un sujeto se le puede administrar una cantidad eficaz de una composición que contiene una o más formas de selenio de la invención y al menos un agente anticáncer convencional que induce apoptosis y/o evita la proliferación de células cancerosas. En algunas realizaciones preferentes, el sujeto tiene una enfermedad caracterizada por metástasis. Una cantidad eficaz de una composición que contiene una o más formas de selenio y un taxano (por ejemplo, Docetaxel) se le puede administrar a un sujeto que tiene una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión de proteínas de la familia de proteína(s) Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

Los taxanos (por ejemplo, Docetaxel) son una clase eficaz de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. (Véase por ejemplo, K. D. Miller y G. W. Sledge, Jr. *Cancer Investigation*, 17: 121-136 (1999)). Se cree que la muerte celular mediada por taxano se realiza a través de la estabilización de microtúbulos intercelulares y la posterior inducción de la ruta apoptótica. (Véase por ejemplo, S. Haldar *et al.*, *Cancer Research*, 57: 229-233 (1997)). En algunas otras realizaciones, el cisplatino y el taxol se contemplan específicamente para su uso con una composición que contiene una o más formas de selenio de la presente invención. En algunas realizaciones, cualquier producto farmacéutico que se usa habitualmente en un contexto de terapia contra el cáncer encuentra uso en la presente invención. Los agentes anticáncer convencionales que son adecuados para la administración con las composiciones que se divulgan que contienen una o más formas de selenio incluyen, adriamicina, 5-fluorouracilo, etopósido, camptotecina, metotrexato, actinomicina-D, mitomicina C, o más preferentemente, cisplatino. En algunas realizaciones, los tratamientos terapéuticos comprenden adicionalmente uno o más agentes que reticular directamente los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) para facilitar el daño al ADN lo que conduce a agentes antineoplásicos sinérgicos. Por ejemplo, se pueden usar agentes tales como cisplatino y otros agentes alquilantes del ADN. Los agentes que dañan el ADN también incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis y segregación cromosómica. Tales compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina. Estos compuestos se usan ampliamente en entornos clínicos para el tratamiento de neoplasias y se administran mediante inyecciones de bolo por vía intravenosa en dosis que varían de 25-75 Mg/M^2 a intervalos de 21 días para adriamicina, a 35-50 Mg/M^2 para etopósido por vía intravenosa o duplicar la dosis intravenosa por vía oral.

Los agentes que alteran la síntesis y fidelidad de los precursores y subunidades de ácidos nucleicos también causan daño en el ADN y encuentran uso como agentes quimioterapéuticos en la presente invención. Se han desarrollado una serie de precursores de ácido nucleico. Son particularmente útiles los agentes que se han sometido amplios ensayos y están disponibles con facilidad. Como tales, los agentes como 5-fluorouracilo (5-FU) son usados preferentemente por el tejido neoplásico, lo que hace que este agente sea útil para orientarse hacia las células neoplásicas. Las dosis administradas pueden variar de 3 a 15 mg/kg/día, aunque otras dosis pueden variar considerablemente de acuerdo con diversos factores que incluyen el estadio de la enfermedad, la disposición de las células para la terapia y la cantidad de resistencia a los agentes.

En realizaciones preferentes, los agentes anticáncer (por ejemplo, los factores anti-angiogénicos que se discuten en el presente documento) son aquellos susceptibles de administración conjunta con una composición que contiene una o más formas de selenio o que están asociados de otro modo con la composición que contiene una o más formas de selenio de manera que se pueden administrar a un sujeto, tejido o célula sin pérdida de fidelidad del efecto anticáncer. Para obtener una descripción más detallada de los agentes terapéuticos contra el cáncer tales como un complejo de platino, verapamilo, podofilotoxina, carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, bisulfano, nitrosurea, adriamicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido etopóxido (VP16), tamoxifeno, taxol, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato y otros agentes anticáncer similares, las personas con experiencia en la materia se refieren a cualquier número de manuales instructivos, incluyendo la referencia del Physician's Desk y a "Pharmaceutical Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, novena edición, Eds. Hardman *et al.*, 1996.

60 V. Antioxidantes

Los antioxidantes se pueden coadministrar con composiciones o formulaciones de la presente invención. De hecho, se contempla que una diversidad de antioxidantes son útiles en la presente invención, incluyendo difenilaminas alquiladas, fenilendiaminas N-alquiladas, fenil-.alfa.-naftilamina, fenil-.alfa.-naftilamina alquilada, dimetil quinolinas, trimetildihidroquinolinas y composiciones oligoméricas obtenidas a partir de los mismos, agentes fenólicos impedidos, hidroquinonas alquiladas, tiodifenil éteres hidroxilados, alquilidibisfenoles, tiopropionatos,

ditiocarbamatos metálicos, 1,3,4-dimercaptotiadiazol y derivados, compuestos de cobre solubles en aceite Naugalube.RTM. 438, Naugalube 438L, Naugalube 640, Naugalube 635, Naugalube 680, Naugalube AMS, Naugalube APAN, Naugard PANA, Naugalube TMQ, Naugalube 531, Naugalube 431, Naugard BHT, Naugalube 403, y Naugalube 420, ácido ascórbico, tocoferoles incluyendo alfa-tocoferol, antioxidantes solubles en agua tales como compuestos de sulfhidrilo y sus derivados (por ejemplo, metabisulfito sódico y N-acetil-cisteína), ácido lipoico y ácido dihidrolipoico, resveratrol, lactoferrina, derivados del ácido ascórbico (por ejemplo, palmitato de ascorbilo y polipéptido de ascorbilo), hidroxitolueno butilado, retinoides (por ejemplo, retinol y palmitato de retinilo), tocotrienoles, ubiquinona, extractos que contienen flavonoides e isoflavonoides y sus derivados (por ejemplo, genisteína y diadzeína), extractos que contienen resveratrol, semilla de uva, té verde, corteza de pino, propóleo, Irganox1010, 1035, 1076, 1222 (fabricado por Ciba Specialty Chemicals Co., Ltd.), Antigene P, 3C, FR, Sumilizer GA-80 (fabricado por Sumitomo Chemical Industries Co., Ltd.), beta-caroteno, licopeno, vitaminas C, E y A, y otras sustancias.

En algunas realizaciones, la administración de una composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio soluble, SGP) a un sujeto cambia los perfiles de expresión genética (por ejemplo, TGFB1, MAPK8, C1R, UBE4A, SMPX, USP22, y PTP4A1) en el sujeto. En algunas realizaciones, la administración de una composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio soluble, SGP) a un sujeto reduce el nivel de daño en el ADN (por ejemplo, en tejido cerebral (por ejemplo, neocórtex), tejido muscular, tejido adiposo, etc.) de un sujeto.

En algunas realizaciones, se puede proporcionar un método para reducir la sensibilidad de las células a la citotoxicidad por H₂O₂ que comprende la administración de una composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) a las células.

Además se puede proporcionar un método para reducir los radicales superóxido en un sujeto (por ejemplo, en un sujeto que está experimentando estrés oxidativo) para comprender la administración de una composición (por ejemplo, un suplemento nutricional) que contiene selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX, etc.) al sujeto. Además, en algunas realizaciones, los sujetos que reciben determinadas composiciones que comprenden selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX, etc.) presentan un aumento de la capacidad para enfrentarse al estrés oxidativo. En algunas realizaciones, los sujetos que reciben una composición que comprende selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX, etc.) presentan un aumento de la capacidad para enfrentarse al exceso oxidativo debido a la capacidad de las formas seleccionadas de selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX, etc.) para alterar (por ejemplo, reducir) en nivel de radicales superóxido en el sujeto radicales.

VI. Vehículos

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la administración de selenio (por ejemplo, selenoglicoproteína) a través de uno o más vehículos que incluyen nanopartículas (por ejemplo, nanocápsulas), vesículas, liposomas, polímeros (por ejemplo, polímeros con impresión molecular (MIP), polímeros de liberación lenta, polímeros policatiónicos, y/o polimersomas. En algunas realizaciones, un vehículo de selenio proporciona administración, orientación, y/o liberación temporalizada de compuestos que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble en agua, SGP) en sujeto (por ejemplo, ser humano o animal). En algunas realizaciones, los vehículos (por ejemplo, polímero de liberación lenta, nanocápsula, MIP, polimersomas) mejoran la administración de los compuestos que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) a un sujeto. En algunas realizaciones, los vehículos (por ejemplo, polímero de liberación lenta, nanocápsula, MIP, polimersomas) aumentan la biodisponibilidad de compuestos que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) a un sujeto.

Se puede usar una diversidad de vehículos que incluyen dendrímeros, polimersomas, nanopartículas, polímeros de liberación lenta, nanocápsulas, polímeros con impresión molecular y/u otro tipo de vehículo (por ejemplo, uno cualquiera de los vehículos que se describen en el presente documento). En una realización preferente, el vehículo es un polímero de liberación lenta. En otra realización preferente, el vehículo es un polímero con impresión molecular. Además en otra realización preferente, el vehículo es un polimersoma usado para encapsular selenoglicoproteína. Se puede usar cualquier polimersoma conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el polimersoma comprende copolímero de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO). Sin embargo, la invención no se limita de ese modo. se puede usar cualquier copolímero de bloque, que incluye, por ejemplo poli(etileno) (PEE), poli(butadieno) (PB o PBD), poli(estireno) (PS), y poli(isopreno) (PI). En algunas realizaciones, El polímero comprende copolímero de dibloque de poli(ε-caprolactona) (PCL). En algunas realizaciones, el polimersoma comprende copolímeros de dibloque a base de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ε-caprolactona) (PEO-b-PCL). En algunas realizaciones, el polimersoma comprende un copolímero de bloque que es un copolímero de tribloque, tetrabloque, pentabloque, o al menos de seis bloques. En algunas realizaciones, el polimersoma se obtiene a partir del acoplamiento de poli(ácido láctico), poli(glicólido), poli(ácido láctico-coglicólico) y/o poli(3-hidroxibutirato) con PEO. Una diversidad de tamaño se encuentra en uso en las composiciones y métodos de la invención incluyendo selenoglicoproteínas encapsuladas con polimersoma que tienen un diámetro de 50-300 nm aunque se pueden usar selenoglicoproteínas encapsuladas con polimersoma con un diámetro mayor (por ejemplo, 350 nm, 400 nm, 500 nm o mayor) y menor (por ejemplo, 40 nm, 30 nm, 20 nm, o menor).

En algunas realizaciones, la presente invención comprende nanocápsulas y esferas de MIP de liberación controlada de SGP para proporcionar un suministro continuo y seguro de selenio orgánico (por ejemplo, polímeros con impresión molecular (MIPs), polímeros de liberación lenta) en comparación con otras formas de selenio (por ejemplo, levadura enriquecida con selenio, SEL-PLEX, o cápsulas o píldoras de dosis individuales de selenio inorgánico). En algunas realizaciones, se usan solubles en agua, soluble, y/o SGPs para encapsulación y administración eficaces de selenio a través de los métodos de administración avanzados en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas (por ejemplo, nanocápsulas), vesículas, polímeros (por ejemplo, polímeros con impresión molecular (MIPs), polímeros de liberación lenta), y/o polimersomas). En alguna realización, los métodos de administración avanzada en el presente documento mejoran la biodisponibilidad del selenio encapsulado (por ejemplo, SGPs o selenio soluble). En algunas realizaciones, los métodos de administración avanzada en el presente documento proporcionan liberación lenta (por ejemplo, 12 horas, 24 horas, 2 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 10 semanas) de selenio en una solución, un sujeto, suero.

En algunas realizaciones, la invención proporciona polímeros de liberación lenta como un vehículo para composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP) de la presente invención. Como vehículos se pueden usar polímeros de liberación lenta, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), o polímeros policatiónicos, tales como, polietilenimina (PEI). En algunas realizaciones, los polímeros de liberación lenta proporcionan una administración controlada de composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX). En algunas realizaciones, la administración controlada se produce cuando un polímero (por ejemplo, PEI), ya sea natural o sintético, se combina con criterio con una composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) y opcionalmente otros agentes activos o inactivos de un modo tal que la composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) se libera desde el material de una manera diseñada previamente. La liberación de la composición que contiene selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) puede ser constante durante un periodo de tiempo largo, puede ser cíclica durante un periodo de tiempo largo, o la puede desencadenar el entorno otros sucesos externos. En algunas realizaciones, el control de la administración proporciona una terapia más eficaz. En algunas realizaciones, el control de la administración elimina el potencial tanto de sub- como de sobredosificación. Otras ventajas del uso de sistemas de administración controlada pueden incluir el mantenimiento de los niveles de selenio dentro de un intervalo deseado, la necesidad de administraciones menores, y aumento del cumplimiento por parte del paciente.

En algunas realizaciones, la invención proporciona polimersomas como vehículos para composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) de la presente invención. En algunas realizaciones, los polimersomas se preparan usando copolímeros de bloques sintéticos anfífilos para formar la membrana de la vesícula, y tienen radios que varían de 50 nm a 10 µm o más (Véase, por ejemplo, Discher *et al.*, Journal of Physical Chemistry B (2002), 106 (11), 2848-2854). En algunas realizaciones, los polimersomas contienen una solución acuosa en su núcleo y son útiles para encapsular y proteger moléculas, tales como composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) y opcionalmente uno o más fármacos, enzimas, otras proteínas y péptidos, y fragmentos de ADN y ARN. En algunas realizaciones, la membrana del polimersoma proporciona una barrera física que aísla el material encapsulado de materiales externos, tales como los que se encuentran en sistemas biológicos. En algunas realizaciones, los polimersomas permiten una liberación temporalizada de los contenidos dentro de su núcleo (por ejemplo, composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX)). En algunas realizaciones, el uso de polímeros sintéticos para construir polimersomas permite que los diseñadores manipulen las castristas de la membrana y por lo tanto el control de la permeabilidad, tasas de liberación, estabilidad y otras propiedades.

En una realización, las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP) s de la presente invención se pueden encapsular dentro de polimersomas a base de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(s-caprolactona) (PEO-b-PCL). Aunque para la práctica de la invención no es necesaria una comprensión de un mecanismo, y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción en particular, en algunas realizaciones, el PEO proporciona la estabilidad química y mecánica *in vitro* mejorada por el vehículo resultante, aumento de la *in vivo* biodisponibilidad y prolongación de las semividas en circulación sanguínea. El PCL, un biomaterial implantable bien conocido, forma la membrana del polimersoma, y facilita la degradación *in vivo* completa y segura del producto resultante por hidrólisis de sus enlaces éster.

En otra realización, las composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenoglicoproteínas) de la presente invención se pueden encapsular en polimersomas sintetizados a partir de mezclas o derivados puros de otros polímeros de bloque biodegradables obtenidos a partir del acoplamiento de poli(ácido láctico), poli(glicólido), poli(ácido láctico-coglicólico) o poli(3-hidroxitirato) con PEO.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona nanocápsulas (Couvreur *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2002; 19 (2): 99-134) como vehículos para composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) de la presente invención (Véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.498.045). En algunas realizaciones, las nanocápsulas proporcionan

la liberación controlada de composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) después de biodegradación de la nanocápsula. En algunas realizaciones, las nanocápsulas tienen semividas de biodegradación de 2 a 100 horas (por ejemplo, 2 horas... 4 horas... 6 horas... 12 horas... 24 horas... 48 horas... 96 horas). En algunas realizaciones, las nanocápsulas biodegradables de la invención son adecuadas para la liberación controlada de composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) y opcionalmente una diversidad de otros agentes terapéuticos encapsulados, que incluyen macromoléculas, en circulación *in vivo* de un sujeto después de administración al mismo. Las composiciones de nanocápsula de la presente invención son además adecuadas para encapsular concentraciones terapéuticamente eficaces de composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP) y proporcionan la misma circulación *in vivo* de un receptor. En algunas realizaciones, una nanocápsula que encapsula composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) es una membrana que comprende, por ejemplo, un copolímero de polímero de ácido poliláctico y polietilenglicol. En algunas realizaciones, las nanocápsulas se forman por la polimerización interfacial de un monómero o la nanodeposición interfacial de un polímero formado previamente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona polímeros con impresión molecular como vehículos para composiciones que contienen selenio (por ejemplo, selenio orgánico, selenio soluble, selenio soluble en agua, SGP, SEL-PLEX) de la presente invención (Mosbach. Trends in Biochemical Sciences, Vol. 7, pp. 92-96, 1994., Wulff. Trends in Biotechnology, Vol. 11, pp. 85-87, 1993., Andersson, *et al.*, Molecular Interactions in Bioseparations (Ngo. T. T. ed.), pp. 383-394.), documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.959.050.

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones y aspectos preferentes de la presente invención.

EJEMPLO 1

30 **A. Preparación secuencial de selenoglicoproteínas solubles de SEL-PLEX mediante extracción ácida y precipitaciones posteriores**

Un reactor de tres bocas de 4 l (extractor N.º 1, Véase la Figura 1) equipado con un aparato de agitación mecánica, un termómetro, y una manta eléctrica se cargó con 3 l de H₂O desionizada y 50 ml de HCl 0,3 N. El reactor se calentó por encima de 50 °C y se añadieron 600 g de SEL-PLEX a 1600 ppm en porciones a la vez que se agitaba. Después de aproximadamente una hora, la temperatura alcanzó 80 °C y el pH de la mezcla era 2,23. El pH se redujo a 1,5 mediante la adición de 13,5 ml de HCl 0,3 N. El recipiente de reacción se mantuvo con calentamiento y agitación durante 7 h. El pH de la mezcla se comprobó aproximadamente cada hora para asegurar el nivel de pH remanente a 1,5. La mezcla de reacción posterior ácida (pH 1,5) se distribuyó en cuatro tarros para centrifugadora de 1 l y se centrifugó (centrifugadora N.º 1, Véase la Figura 1) a 4000 RCF durante 20 min a 8 °C. El sobrenadante (pH 1,5) y los microgránulos sólidos se recogieron. El sobrenadante se añadió a un reactor de 3 bocas de 3 l (mezcladora N.º 1, Véase la Figura 1) en un baño con hielo (4 °C), y equipado con un embudo de goteo que contenía NaOH 2 N, un aparato de agitación mecánica y un electrodo de pH. Se añadió NaOH 2 N gota a gota a la solución a la vez que se agitaba hasta que el pH de la mezcla alcanzó 1,85. Durante la adición de NaOH, se formó un precipitado de color blanco. La agitación continuó durante 30 min y la mezcla se centrifugó de nuevo (centrifugadora N.º 2, Véase la Figura 1) formando un sobrenadante y un microgránulo de selenoglicoproteína. El microgránulo de selenoglicoproteína se recogió y se liofilizó (aparato de liofilización N.º 1, Véase la Figura 1) proporcionando 1,635 g de precipitado de color blanco. El sobrenadante a pH 1,85 y el microgránulo formado con pH 1,5 se añadieron a un recipiente de reacción (mezcladora N.º 2, Véase la Figura 1) y se colocó en un baño de hielo-agua (4 °C). La mezcla se agitó durante 30 minutos y a continuación se centrifugó (centrifugadora N.º 3, Véase la Figura 1 y la Figura 2), formando sólidos residuales húmedos y un sobrenadante a pH 1,6, usado posteriormente para generar los SGPs mediante posterior precipitación dependiente del pH (por ejemplo, fracciones de SGP a pH 3,0, pH 4,0 y pH 6,0 como se describe a continuación).

55 **B. Precipitación de selenoglicoproteínas dependiente del pH**

El sobrenadante de pH 1,6 se puso en un reactor (mezcladora N.º 3, Véase la Figura 2) y se añadió NaOH 2 N a la solución a la vez que se agitaba hasta que el pH de la mezcla alcanzó 3,0. La agitación continuó durante 30 minutos más y la mezcla se centrifugó (centrifugadora N.º 4, Véase la Figura 2) formando un sobrenadante y un microgránulo de selenoglicoproteína. El microgránulo de selenoglicoproteína a pH 3,0 (SGP a pH 3,0) se recogió y se liofilizó (aparato de liofilización N.º 2, Véase la Figura 2) proporcionando una fracción precipitada de color gris claro. El sobrenadante de pH 3,0 se puso en un reactor (mezcladora N.º 4, Véase la Figura 2) y se añadió NaOH 2 N a la solución hasta que el pH de la solución aumentó a 4,0. La agitación continuó durante 30 minutos más y la mezcla se centrifugó (centrifugadora N.º 5, Véase la Figura 2) formando un sobrenadante y un microgránulo de selenoglicoproteína. El microgránulo de selenoglicoproteína a pH 4,0 (SGP a pH 4,0) se recogió y se liofilizó (aparato de liofilización N.º 3, Véase la Figura 2) proporcionando la fracción precipitada de color gris claro. El sobrenadante

de pH 4,0 se puso en un reactor (mezcladora N.º 5, Véase la Figura 2) y se añadió NaOH 2 N a la solución hasta que el pH de la solución aumentó a 6,0. La agitación continuó durante 30 minutos más y la mezcla se centrifugó (centrifugadora N.º 6, Véase la Figura 2) formando un sobrenadante y un microgránulo de selenoglicoproteína. El microgránulo de selenoglicoproteína a pH 6,0 (SGP a pH 6,0) se recogió y se liofilizó (aparato de liofilización N.º 4, Véase la Figura 2) proporcionando la fracción precipitada de color gris claro. Las fracciones precipitadas posteriores que se habían formado se recogieron por centrifugación. En la corriente de agua residual de pH 6,0 de la última centrifugación contenía algunos seleno-péptidos, oligosacáridos manosa y glucosa (por ejemplo, que se pueden usar en la preparación de medios de crecimiento de levadura u otro material nutriente). El proceso no produjo residuos tóxicos y es ecológico.

EJEMPLO 2

Separación y caracterización de SGP soluble

El microgránulo que contiene residuos sólidos a pH 1,5 formado por la extracción ácida de SEL-PLEX se lavó con el sobrenadante a pH 1,85 de la segunda extracción (VÉASE el Ejemplo 1) para reducir el volumen de agua Usado en el proceso, y para disolver la mayor parte de las SGP's atrapadas dentro del microgránulo. Los residuos sólidos que siguieron la tercera centrifugación a pH 1,6 contienen una cantidad significativa de selenio y se pueden mezclar con un lote recién preparado de levadura de selenio antes de su secado mediante pulverización, usando completamente el material que se tomó para la extracción.

Se hizo un promedio del selenio total, porcentaje de concentración de proteína, y el peso de cada una de las fracciones de SGP después de tres extracciones posteriores a partir de SEL-PLEX (Véase la Tabla 1). Las fracciones de SGP extraídas constituían de un 2,0 a un 2,5 % en peso de SEL-PLEX y de un 4,3 a un 5,75 % de selenio total que estaba presente en el SEL-PLEX extraído previamente.

Había una correlación positiva entre el pH de las fracciones de SGP y el peso de la proteína, siendo lo inverso cierto a la concentración de selenio total (Véase la Tabla 1).

El promedio del peso de la proteína para las fracciones de SGP varió de aproximadamente un 65 a un 90 % en peso, y la concentración de selenio para el mismo conjunto de fracciones varió en el intervalo de aproximadamente 2900 ppm a 4900 ppm. Las fracciones de SGP contenían de un 4 a un 37 % en peso de componente de carbohidrato.

Tabla 1. El promedio de los resultados de tres extracciones posteriores de 600 g de SEL-PLEX

pH de la fracción	Concentración de Se [ppm]	Peso de la proteína [%]	Peso [g]
1,85	4887	65,55	1,635
3,0	3836	76,04	5,652
4,0	3250	87,74	3,634
6,0	2915	91,81	1,757

La electroforesis en gel de la fracción de SGP a pH 1,5 formada por la extracción ácida de SEL-PLEX reveló que las bandas que correspondían a proteínas de alto peso molecular o proteínas que portaban un componente de carbohidrato grande estaban ausentes. La distribución de tamaño similar, con dominio de fracciones de bajo peso molecular, se detectó usando electroforesis de capilaridad y las proteínas de bajo peso molecular de 5,1 kDa a 12,2 kDa comprendían más de un 90 % de las mezclas.

La cromatografía de exclusión por tamaño de tres fracciones de SGP a pH 3,0, 4,0, y 6,0 en gel BIO-RAD P10 (tiempos de retención hasta 6 horas) y en gel BIO-RAD P30 (tiempo de retención de menos de una hora), dio como resultado un pico inicial con el tiempo de retención de 5-10 minutos y un pico posterior, ancho, con el tiempo de retención de 35-60 minutos. El pico inicial contenía significativamente más proteína: de un 64,74 a un 75,24 %, y una concentración de selenio significativamente más elevada: de 2972 a 4252 ppm. El contenido de proteína en el pico posterior fue mucho más baja: de un 31,66 a un 54,95 % y la concentración de selenio era significativamente menor: de 1193 a 1858 ppm. Este tipo de cromatografía puede proporcionar SGP's con un contenido elevado de Se a partir de fracciones en bruto, y puede mostrar una baja homogeneidad del componente de carbohidrato en estas mezclas.

La cromatografía de exclusión por tamaño sobre resina SUPERDEX Peptide 10/300 GL (AMERSHAM Biosciences; intervalo de fraccionamiento 7,0-100 kDa) usando AcONH_4 0,1 M (pH 7,5) de diversos péptidos de digestión trípica de SEL-PLEX, ha producido conjuntos de pico similares para muestras de SGP (10-100 kDa y > 100 kDa) y un patrón de elución completamente diferente para la muestra de SEL-PLEX. Solo los picos "iniciales", con el tiempo de elución inferior a 20 min, contenían selenio. Los eluyentes que contienen selenio se recogieron, se liofilizaron y se analizaron usando las técnicas SEC ICP MS, MALDI TOF MS y nano ESI MS/MS. Los resultados eran complementarios y permitieron la detección, identificación y secuenciación de péptidos que contienen selenio. La

identificación de proteínas detectadas se obtuvo mediante búsqueda en la base de datos SwissProt (Véase la Tabla 2).

Tabla 2. Seleno-péptidos y selenoproteínas identificados a partir de digestión trípica de extracto de SEL-PLEX.

Fracción de SEC analizada	Masa del péptido detectado (⁸⁰ Se) [M + H] ⁺ , Th	Secuencia peptídica identificada	Proteína	Masa molecular de la proteína (kDa)
2	653,39 701,42	GSDTMRSVSPIRSEQ ID NO: 1 GSDTSeMRSVSPIR SEQ ID NO: 2	Ylr 190 wp	42
3	637,39 685,41	SGMSKK SEQ ID NO: 3 SGSeMSKK SEQ ID NO: 4	Fosfatidilinositol 4 quinasa alfa	89
2	587,33 635,35	EVIGIDPSSAMLSIAEK SEQ ID NO: 5 EVIGIDPSSASeMLSIAEK SEQ ID NO: 6	Yhr209wp	34
3	637,39	ASeMIVR SEQ ID NO: 7	Ribonucleasa III	77
1 y 2	402,10	DYSeMGA AK SEQ ID NO: 8	HSP 12	12
1 y 2	489,55	SIVPLSeMDR SEQ ID NO: 9	HSP 10	10
1 y 2	504,03	SeMGHDQSGTK SEQ ID NO: 10	SIP 18	18

5 La naturaleza más sorprendente de este método fue que la composición de proteína de diversas fracciones obtenidas mediante separaciones cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño) diferentes fracciones de SGP a partir de precipitación dependiente del pH, era la misma o muy similar, de acuerdo con métodos electroforéticos (electroforesis en gel y electroforesis por capilaridad) que se han aplicado. Como se describe en el presente documento, la extracción de selenoglico-proteínas de levadura enriquecida con selenio fue satisfactoria a un pH bajo (por ejemplo, 1,5). Aunque para la práctica de la invención no es necesaria la comprensión de un mecanismo y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción en particular, en algunas realizaciones, en las condiciones ácidas usadas para extracción de SGP, los núcleos de la proteína no se hidrolizan de forma significativa y sobreviven en su mayor parte en su forma original. En algunas realizaciones, las fracciones de selenoglicoproteína dependientes del pH de SEL-PLEX (por ejemplo, SGP a pH 3,0, SGP a pH 4,0, SGP a pH 6,0) se generan y administran (por ejemplo, sí mismas o en combinación con otro agente) a un sujeto (por ejemplo, para administrar selenio orgánico a un sujeto (por ejemplo, a través de una vía oral)).

EJEMPLO 3

20

Comparación de biodisponibilidad

25 Los pollos se alimentaron durante dieciocho días con siete tratamientos dietéticos diferentes (Véanse las Tablas 3 y 4) para comparar la biodisponibilidad del selenio a partir de la precipitación de SGP's dependiente del pH a partir de extracto ácido de SEL-PLEX por medición del contenido de selenio crudo de pechuga de pollo:

Tabla 3. Especificación de composición y nutrientes de dieta basal

Ingrediente	%
Maíz	57,80
Harina de soja (48 %)	35,00
Aceite de maíz	3,20
Caliza	1,30

Ingrediente	%
Fosfato dicálcico	1,80
Sal	0,45
Mezcla de Vit-Min (sin Se)	0,25
DL-Metionina	0,20
Total	100
Nutriente	
ME, kcal/kg	300
CP, %	21,5
Ca, %	1,00
P disponible, %	0,45
Lisina, %	1,21
Metionina, %	0,54
Met + Cys, %	0,89
Na, %	0,20

Tabla 4. Tratamientos dietéticos

Tratamiento	Ingredientes
1 (Control)	Dieta basal de maíz-soja sin suplemento de Se
2 (SS)	Basal + 0,3 ppm de Se como selenito sódico
3 (SP)	Basal + 0,3 ppm de Se como SEL-PLEX
4 (pH 1,85)	Basal + 0,3 ppm de Se como fracción precipitada a pH 1,85
5 (pH 3,0)	Basal + 0,3 ppm de Se como fracción precipitada a pH 3,0
6 (pH 4,0)	Basal + 0,3 ppm de Se como fracción precipitada a pH 4,0
7 (pH 6,0)	Basal + 0,3 ppm de Se como fracción precipitada a pH 6,0

5 Como se muestra en la Tabla 5, las dietas de alimentación para pollos suplementadas con fracción de SGP a pH 4,0
o pH 6,0 acumulaban casi la misma cantidad de deposición de selenio en tejido de músculo de pechuga de pollo en
comparación con pollos alimentados con la dieta suplementada con SEL-PLEX (SP). En comparación con el control,
el nivel de Se en el tejido en pollos alimentados con la dieta de SP y los alimentados con la fracción de dietas
suplementadas con SGP a pH 4,0 o pH 6,0 era dos veces tan elevada como la de los pollos que recibieron piensos
suplementado con selenito sódico. Por lo tanto, la invención proporciona, en algunas realizaciones, que SP, así
10 como fracciones de SGP hermanas de SP (por ejemplo, pH 4,0 y pH 6,0) están biodisponibles cuando se
administran a un sujeto (por ejemplo, en algunas realizaciones, SP, SGP a pH 4,0 o SGP a pH 6,0 son más (por
ejemplo, 2 veces o más) biodisponibles que el selenio inorgánico (por ejemplo, selenito sódico) cuando se
administra a un sujeto (por ejemplo, tal como se pone en evidencia mediante la administración de selenio al tejido
del sujeto)).

15

Tabla 5. Efectos de fuentes dietéticas de Se en la concentración de Se en el músculo

Tratamiento	Se, ppm
1 - Control	98,9 ^e
2 - SS	137,3 ^d
3 - SP	327,6 ^a
4 - pH 1,85	214,8 ^c

Tratamiento	Se, ppm
5 - pH 3,0	257,7 ^D
6 - pH 4,0	326,6 ^a
7 - pH 6,0	305,4 ^a

* Los valores con diferentes letras indican que los resultados son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

EJEMPLO 4

A. Efectos de diferentes fuentes dietéticas de selenio en el perfil de expresión genética en el músculo de pechuga de pollos para consumo

5

El tejido de músculo de pechuga de pollos a que se hace referencia en el Ejemplo 3 se usó para evaluar similitudes y diferencias en los perfiles de expresión genética provocados por los siguientes tratamientos dietéticos: Tratamiento 1 - basal (Control); Tratamiento 2 - Control + 0,3 ppm de selenio sódico (SS); Tratamiento 3 - Control + 0,3 ppm de SEL-PLEX; Tratamiento 6 - 0,3 ppm de fracción de SGP extraída a partir de SEL-PLEX (SP) a pH 4,0. La fracción de SGP a pH 4,0 se analizó por qué dio como resultado niveles casi idénticos de deposición de selenio en tejido de pechuga de pollo en comparación con el obtenido con SP (Véase la Tabla 5). Como tal, los experimentos se realizaron durante el desarrollo de realizaciones de la invención con el fin de determinar si los animales que recibían la fracción de SGP a pH 4,0 experimentaban efectos similares *in vivo* (por ejemplo, cambios en la expresión genética) observados en animales alimentados con SP, o si existían diferencias mensurables, significativas.

10

15

Animales y Toma de Muestras de Tejido:

20

A los 18 días de edad, cinco pollos de cada grupo de tratamiento (que se han descrito anteriormente y en las Tablas 3 y 4) se seleccionaron de forma aleatoria y sacrificaron mediante asfixia con argón, seguido de dislocación cervical. Las muestras de tejido de pechuga de pollo (1 gramo) se retiraron rápidamente y se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron.

25

Análisis de Micromatriz:

30

El ARN total se aisló a partir de tejido congelado usando el reactivo TRIZOL (INVITROGEN, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se purificó usando un kit RNEASY (QIAGEN, Valencia, CA). El ARN total se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm y la integridad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de las bandas 28S y 18S.

35

La formación de perfiles de micromatriz se realizó usando la Matriz de Genoma de Pollo Genechip de AFFYMETRIX (Santa Clara, CA) siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante.

Los datos se procesaron y cada conjunto de sondas se etiquetó, P (presente), M (marginal) o A (ausente) basándose en la proporción de fuerza de señal con respecto a ruido usando el algoritmo de resumen de expresión MAS5.0 de AFFYMETRIX.

Análisis bioinformático:

40

Para calificar y normalizar los datos de la micromatriz y para realizar análisis de patrón estadístico y de expresión genética se usó GeneSpring GX 10.0 (Silicon Genetics, Redwood, CA).

45

Para minimizar la posibilidad de hallazgos erróneos, los conjuntos de sondas con intensidad de señal baja (etiquetados como 'Ausente' por el algoritmo MAS5.0) se excluyeron del análisis adicional. Los perfiles de expresión genética filtrados a continuación se sometieron a ANOVA de una dirección para identificar los conjuntos de sondas que se expresaban de forma diferencial entre grupos y fue seguido por un ensayo *post hoc* para determinar los genes que cambiaban de forma significativa con los tratamientos con selenio cuando se comparaban con el Control. Se consideró que solamente iban a cambiar los genes que se diferenciaban de los del Control ($P \leq 0,05$) y que tenían un factor de cambio de intensidad de señal correspondiente (FC) $\geq 1,2$.

50

55

Con el fin de representar visualmente los efectos de tratamientos dietéticos en los perfiles de expresión genética en tejido de músculo de pechuga de pollo, 693 genes que se identificaron como expresados diferencialmente (ANOVA, $P < 0,05$) se sometieron a agrupamiento jerárquico sin supervisar basándose tanto en matrices como en genes. Como se ha descrito con detalle anteriormente, la fracción de SGP de pH 4,0 se obtuvo directamente a partir de SP, y los grupos de tratamiento dietético que recibieron SP o la fracción de SGP de pH 4,0 presentaban niveles casi idénticos de deposición de selenio (biodisponibilidad) en tejido de músculo de pechuga de pollo (Véase la Tabla 5,

mencionada anteriormente). Por lo tanto, se esperaba que ambos grupos de tratamiento con selenio (SP y fracción de SGP a pH 4,0) pudieran presentar cambios en la expresión genética idénticos o altamente similares. Sin embargo, y de forma bastante sorprendente, un efecto dietético evidente en los perfiles de expresión genética se observaron entre los dos grupos de tratamiento (Véase la Figura 3). De forma específica, se observaron diferencias espectaculares entre los perfiles de expresión genética del grupo de tratamiento de SP en comparación con el grupo de tratamiento con la fracción de SGP a pH 4,0, donde la mayoría de los genes analizados respondieron de diferentes formas a los dos grupos de tratamiento. Esta gran variación en los perfiles de expresión genética ocasionados por el tratamiento con SP con respecto al tratamiento con la fracción de SGP a pH 4,0 era totalmente inesperada y proporciona conocimientos no disponibles hasta ahora con respecto a la biología de los elementos traza.

Por ejemplo, 693 genes regulados de manera diferencial ($P < 0,05$, ANOVA) se sometieron a agrupamientos jerárquicos y supervisar basándose tanto en matrices como en genes. En el mapa de calor que se muestra en la Figura 3, perfiles de expresión genética normalizada se muestran en colores que reflejan los cambios de la expresión en comparación con el valor medio de cada gen; los colores blanco, negro o gris representan disminución, aumento o ningún cambio en el nivel de la intensidad de la expresión, respectivamente. El dendrograma en la parte superior del mapa de calor refleja el alcance de la similitud en los perfiles de expresión entre tratamientos, mientras que el dendrograma en el lado izquierdo representa las diferencias en los patrones de expresión de genes individuales, a través de todos los tratamientos. Las longitudes de los dendrogramas que se muestran en la Figura 3 corresponden al nivel de diferencias entre hojas de grupo (un dendrograma corto indica un nivel de similitud elevado).

Los diferentes efectos de fracción de SGP a pH 4,0 y SP en los perfiles de expresión genética en músculo de pechuga de pollo se analizaron adicionalmente mediante comparación del número de genes que cambiaron de forma significativa ($P < 0,05$, $FC > 1,2$) con la fracción de SGP a pH 4,0 (pH 4), SP y selenito sódico (SS), tal como se representa el diagrama de Venn que se muestra en la Figura 4. Había 198, 173, y 283 genes que cambiaron de forma significativa con SP, pH 4 y SS, respectivamente. Solamente había 21 genes regulados comúnmente con los tres grupos de tratamiento con Se, y 46 regulados tanto con SP como con la fracción de SGP a pH 4,0. Había 152 y 127 genes que cambiaban únicamente con SP o con la fracción de SGP a pH 4,0, respectivamente.

Por ejemplo, varios genes que se habían identificado como regulador diferencial o comúnmente en tejido de músculo de pechuga de pollo como resultado de diversos cargamentos con selenio se muestran en las Figuras 5-7.

Se cree que el factor de crecimiento transformante, beta-inducido (TGFBI 68 kDa) está implicado en interacciones de célula-matriz, adhesión, migración y diferenciación celular. Las mutaciones de este gen se han relacionado con varias formas de distrofias corneales. La proteína quinasa 8 activada por mitógeno, (MAPK8, también conocida como JNK1) es un miembro de la familia de MAP quinasas. Las MAP quinasas actúan como un punto de integración para múltiples señales bioquímicas, y están implicadas en una gran diversidad de procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. MAPK8 también desempeña un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo celular, respuesta inmunitaria, así como metabolismo de carbohidratos y proteínas a través de rutas de señalización de insulina. Se sabe que durante la activación de MAPK8 se puede inducir resistencia a la insulina a través de fosforilación de sustrato 1 receptor de Insulina (IRS1).

La Figura 5 proporciona ejemplos de genes (por ejemplo, TGFBI y MAPK8) que se regulaban comúnmente con SS, SP y fracción de SGP a pH 4,0. La Figura 6 proporciona ejemplos de genes (por ejemplo, componente 1R de complemento (C1R), y factor de ubiquitinación E4A (UBE4A)) regulado comúnmente por SP y fracción de SGP a pH 4,0, pero no por SS. El componente de complemento 1R (C1R) es una proteína implicada en la cascada del complemento del sistema inmunitario innato y retirada de patógenos. La modificación de proteínas con ubiquitina es un mecanismo celular importante para orientación anómalo o para degradación de proteínas de vida corta. UBE4A codifica una ubiquitina ligasa de tipo U-caja que se describe como un factor de ubiquitinación E4. Se cree que UBE4A tiene papeles en procesos bioquímicos diferentes distintos a la ubiquitinación, incluyendo crecimiento y/o diferenciación.

La Figura 7 proporciona ejemplos de genes (por ejemplo, proteína de músculo pequeño, relacionada con el cromosoma X (SMPX) y peptidasa específica de ubiquitina (USP22)) que estaban reguladas de forma única por la fracción de SGP a pH 4,0. La proteína de músculo pequeño, relacionada con el cromosoma X (SMPX) es una proteína pequeña que se expresa de forma específica en el músculo estriado y desempeña un papel importante en la contracción muscular. La peptidasa 22 específica de ubiquitina (USP22) es un gen implicado en procesos catabólico es de proteína dependiente de ubiquitina. Se ha mostrado que USP22 es un regulador positivo del crecimiento tumoral. El aumento de la expresión de USP22 está relacionado con la progresión del cáncer. La capacidad para reducir o producir supresión genética de la expresión de USP22 puede proporcionar la inhibición del crecimiento y tumoral y/o progresión del cáncer. Por ejemplo, la reducción de la expresión de USP22 puede regular de forma negativa la expresión de Mdm2 y ciclina E, dando como resultado la expresión regulada de forma positiva de p53 y p21, conduciendo una parada del ciclo celular e inhibición de la proliferación de células tumorales de vejiga humana.

Un examen adicional del patrón de expresión genética único provocado por la fracción de pH 4,0 en el tejido muscular proporciona evidencias adicionales del uso terapéutico potencial de las formas clínicas de selenio en esta fracción (por ejemplo, para prevenir o disminuir la progresión y/o metástasis tumoral).

5 Por ejemplo, el gen KITLG (ligando c-KIT) codifica el ligando del receptor de tirosina-quinasa que es un factor pleiotrópico que actúa en el útero en el desarrollo de células germinales y neuronales y hematopoyesis; se cree que los procesos reflejan un papel en la migración celular. Recientemente, se han descubierto variaciones en el gen KITLG que se cree que se asocian con un mayor riesgo de cáncer testicular (Kanetsky *et al.*, 2009). Además, la sobreexpresión del receptor relacionado de KITLG, el producto del gen oncogénico KIT, se ha documentado en el
10 carcinoma de células renales cromóforas y se sabe que la expresión de KITLG y KIT está involucrada en la transformación de los fibroblastos NIH3T3 y en la tumorigénesis del cáncer de pulmón de células microcíticas (Yamazaki *et al.*, 2003).

De forma sorprendente, se observó que el tejido muscular del sujeto al que se le administró la fracción de pH 4,0 regulaba significativamente de forma negativa el gen KITLG, pero su nivel de expresión no se vio afectado por los
15 otros tratamientos con selenio, incluyendo SP, el material precursor para la fracción de pH 4,0 (Véase, por ejemplo, la Figura 8).

La metástasis es la causa principal de muerte en la mayoría de los cánceres humanos y es un proceso de múltiples etapas en el que las células del tumor primario migran a través de la matriz extracelular, entran en la circulación a través de los vasos sanguíneos recién formados (angiogénesis tumoral) y se diseminan a sitios distantes (extravasación), donde la proliferación comienza de nuevo.

La proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2) es una molécula fundamental en la transducción de señales intracelulares. Es fundamental para la progresión del ciclo celular y la motilidad basada en actina y, en consecuencia, para procesos más complejos tales como morfogénesis epitelial, angiogénesis y vasculogénesis. Estas funciones importantes hacen que Grb2 sea una diana terapéutica para estrategias diseñadas para prevenir la propagación de tumores sólidos a través de la invasión local y la metástasis. De hecho, en la actualidad se está haciendo un gran esfuerzo para encontrar maneras de bloquear o antagonizar Grb2 porque se considera que esto
25 puede representar una estrategia antimetastásica eficaz (Giubellino, Burke y Bottaro, 2008).

Como se muestra en La Figura 9, Grb2 se reguló significativamente de forma negativa en pH 4,0 - animales tratados con respecto a control y otros tratamientos con selenio, incluido selenito sódico y el material de selenio precursor para pH 4,0; Sel-Plex.

La actividad anticarcinogénica potencial de la fracción de pH 4,0 no se limita a la regulación negativa de genes importantes asociados con el cáncer. Por ejemplo, se ha observado que la reducción de la expresión de ADNAJ3 en células de cáncer de mama mejora su migración al permitir que los niveles de interleuquina-8 aumenten (Kim *et al.*, 2005). Este y otros resultados sugieren fuertemente que el aumento de los niveles de Tid1 (DNAJA3) en células cancerosas regula de forma negativa su motilidad y capacidad para producir metástasis.

DNAJA3 se reguló fuertemente de forma positiva en tejido muscular en experimentos como respuesta selenio a pH 4,0 (Figura 10), pero permaneció sin respuesta, con respecto a las condiciones de control, en tejido muscular de animales que recibieron las otras fuentes de selenio.

45 **B. Efectos de diferentes tratamientos con selenio en perfiles de expresión genética hepática de pollos para consumo**

En un esfuerzo para caracterizar aún más los efectos inesperados de la expresión génica diferencial de SP y fracción de SGP a pH 4,0 y para determinar si la regulación de la expresión se extendió a otros tejidos, se realizaron estudios de expresión genética como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4 (a). En lugar de tejido muscular de la pechuga de pollo, se recogió tejido hepático y se analizó de los mismos pollos mencionados en el Ejemplo 3. Además de los grupos de tratamiento suplementados con SS, SP y la fracción de SGP a pH 4,0, los perfiles de expresión genética hepática de pollos de tratamiento adicional (fracción de SGP a pH 1,85 (pH 1,85), fracción de
50 SGP a pH 3,0 (pH 3), y fracción de SGP a pH 6,0 (pH 6) también se caracterizaron y compararon con el grupo de tratamiento de control.

Siguiendo el mismo protocolo experimental al que se ha hecho referencia en el Ejemplo 4(A), el análisis de los perfiles de expresión genética hepática de los sujetos de cada grupo de tratamiento identificó 1520 genes que cambiaron de forma significativa con los diferentes tratamientos dietéticos ($P < 0,01$, ANOVA). Un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de estos genes se muestra en la Figura 11 y proporciona evidencia adicional de que el tratamiento con diferentes fuentes de selenio provoca un gran grado de variación en la capacidad de regular la expresión genética. El mapa de calor de La Figura 11 muestra los perfiles de expresión genética normalizada en colores que reflejan los cambios en la expresión en comparación con el valor medio de cada gen; los colores blanco, negro o gris representan disminución, aumento o sin cambio en el nivel de intensidad de la expresión, respectivamente. El dendrograma en la parte superior del mapa de calor refleja la extensión de la similitud

en los perfiles de expresión entre los tratamientos, mientras que el dendrograma en el lado izquierdo representa las diferencias en los patrones de expresión de genes individuales en todos los tratamientos. Las longitudes de los dendrogramas que se muestran en la figura corresponden al nivel de disimilitud entre las hojas agrupadas (un dendrograma corto indica un nivel de similitud más elevado).

5 Las diferencias entre SP y fracción de SGP a pH 4,0, así como la de fracción de SGP a pH 3,0 y la fracción de SGP a pH 6,0, fueron espectaculares, con solo unos pocos genes regulados comúnmente por tratamiento oscuras cada una de las fuentes de selenio. En general, los efectos del tratamiento con la fracción de SGP a pH 1,85 en la expresión genética se encuentran entre SP y los otros grupos de tratamiento con SGP (Véase la Figura 11). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona ese tratamiento con (por ejemplo, dietas que contienen y/o administración de) SEL-PLEX con respecto al tratamiento con (por ejemplo, dietas que contienen y/o administración de) fracciones de SGP extraídas de SEL- PLEX, que da como resultado diferentes actividades biológicas a pesar de que las diferentes fuentes de selenio muestran efectos similares en términos de biodisponibilidad de selenio.

15 EJEMPLO 5

Encapsulación en polimersoma de selenoglicoproteínas

20 Una mezcla de SGP a 1:1 que precipitó a pH 4,0 y 6,0 (Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2) se encapsuló en polimersomas. La concentración de selenio de la mezcla fue de 3,054 ppm y contenía un 79,96 % en peso de proteína.

25 Para generar polimersomas encapsulados en selenoglicoproteína, la mezcla se disolvió en tampones acuosos de pH 5,1, 6,2 y 7,4, y la suspensión se mezcló durante una noche en una plataforma de agitación. La SGP no disuelta se retiró por centrifugación. Para preparar polimersomas, el copolímero de dibloque a base de PEO(2k)-b-PCL(12k) se disolvió en un disolvente orgánico (por ejemplo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, o dimetilsulfóxido) para producir polímero PEO-b-PCL 1 mM en solución orgánica. A continuación la solución se depositó sobre una tira rugosa de TEFLON (con un grosor de 1" x 1" x 1/16" aproximadamente) y se colocó en el fondo de un vial de vidrio, con el lado áspero hacia arriba. El disolvente se evaporó a vacío a temperatura ambiente durante 24-48 horas, dando como resultado una película seca de copolímeros que pesaban 1-10 mg.

35 Estas películas se hidrataron a continuación con 2-3 ml de una solución acuosa que contenía una proporción de selenoglicoproteínas a 1:1 a pH 4,0 y pH 6,0, y a continuación se sometieron a sonicación en un baño de ultrasonidos a 20-100 Hz durante 1-2 h . Después de completar la sonicación, los viales se sometieron inmediatamente a agitación vorticial durante 1-2 minutos para formar polimersomas que encapsulan las selenoglicoproteínas en el núcleo acuoso de las vesículas de polímero a base de PEO-b-PCL. A continuación, los polimersomas se extruyeron rápidamente a través de una membrana de policarbonato del tamaño de poro deseado usando una extrusora LIPOSOFAST para obtener un diámetro promedio deseado de los polimersomas, en este caso, en intervalos de 50-300 nm. Los polimersomas extruidos se inyectaron a continuación en un casete de diálisis para el intercambio de solución contra un tampón iso-osmótico de pH 7,4 durante 24 horas, de modo que todas las selenoglicoproteínas no encapsuladas se retiraron.

45 Una muestra de selenoglicoproteína encapsulada en polimersoma a pH 7,4 se preparó con una concentración inicial de selenoglicoproteína de 10 mg/ml y se sometió a diálisis contra el tampón PBS iso-osmótico. Se tomaron imágenes de esta muestra con cryo-TEM con aumentos de 21.000x y 52.000x para obtener una identificación visual de la encapsulación satisfactoria de selenoglicoproteína dentro de los polimersomas (Véase la Figura 13). Cryo-TEM permite la obtención de imágenes de muestras de ensayo a temperaturas criogénicas en sus estados nativos de hidratación, lo que evita cualquier cambio conformacional indeseable. Generalmente, se observaron polimersomas esféricos uniformes de tamaños de aproximadamente 100 nm o ligeramente más pequeños en la muestra de la que se tomaron las imágenes. En algunos casos, se observaron agregados aproximadamente esféricos de material amorfo además de polimersomas. Estos agregados pueden estar compuestos por selenoglicoproteína liberada desde el núcleo del polimersoma y que precipita adicionalmente debido a la diferencia en el pH desde el interior hacia el exterior del polimersoma en el momento en que se toman las imágenes de las muestras.

55 Las selenoglicoproteínas encapsuladas en polimersoma a pH 5,1, 6,2 y 7,4 se caracterizaron adicionalmente por medición de la concentración de selenio (Véase la Tabla 6). Se liofilizó un ml de cada muestra de selenoglicoproteína encapsulada en polimersoma, formando un precipitado de polvo de color blanco que a continuación se pesó e inspeccionó con aumentos de 200. las cantidades completas de selenoglicoproteínas encapsuladas en polimersoma se disolvieron usando ácidos concentrados: ácidos perclórico, nítrico y clorhídrico, a una temperatura entre 100 °C y 175 °C. Las soluciones se diluyeron hasta 50 ml usando agua desionizada (DI) y se analizaron usando un instrumento y metodología MILLENIUM EXCALIBUR.

Tabla 6. Resultados de encapsulación

Formulaciones	pH de encapsulación	Nanocápsulas (mg)	Concentración de Se (ppm)
	Control negativo (sin selenio)	8,0	0,02
1	5,1	4,6	46,5
2	6,2	3,3	39,6
3	7,4	8,4	32,2

EJEMPLO 6**5 Liberación de selenoglicoproteínas a partir de nanocápsulas:**

La liberación de selenoglicoproteína (SGP) de las formulaciones de nanocápsula N.º 1 y 3 de la Tabla 6 que se ha mencionado anteriormente, preparadas con 10 mg/ml de suspensión de SGP y dializadas frente a tampones de pH 7,4 y 5,1 respectivamente, se monitorizó durante un período de 14 días a 37 °C. Para monitorizar la liberación de selenoglicoproteínas a partir de la selenoglicoproteína encapsulada en nanocápsula, se usaron suspensiones dializadas concentradas mediante centrifugación en membrana (tubos de centrifugadora con límite de corte de peso molecular de 300 kD). Las suspensiones concentradas se dividieron en alícuotas en tampones iso-osmolares (pH de 5,1 o 7,4) y se mantuvieron a 37 °C con N = 2 muestras para cada punto de tiempo. Para evaluar el % de liberación de selenoglicoproteína de las nanocápsulas, las muestras se centrifugaron para separar las nanocápsulas intactas en cada momento. Para determinar qué nanocápsulas se separaban de forma eficaz efectivamente de la muestra de selenoglicoproteína, se realizaron mediciones de dispersión dinámica de luz en vesículas separadas (fracción retenida) y solución libre (fracción filtrada) para medir los tamaños de partículas. La absorbancia UV de la solución libre se midió a 280 nm y el % de liberación de selenoglicoproteínas se calculó como $(A_{Ejemplo} - A_{inicial}) / (A_{final} - A_{inicial})$, donde $A_{inicial}$ es la absorbancia en el día 0, y A_{final} es la absorbancia al final del estudio cuando las muestras se solubilizaron para producir una liberación completa (Véase la Figura 12). Durante un periodo de 14 días, aproximadamente un 70 % de la SGP a pH 5,1 se liberó de la nanocápsula en estado estacionario; mientras que aproximadamente un 50 % se liberó a pH 7,4. Se cree que la tasa de liberación inicial de las SGP a un pH más bajo se debe a la hidrólisis de la membrana de la nanocápsula catalizada por ácido, seguida por una difusión constante de selenoglicoproteínas a través de la membrana de las nanocápsulas. Estos perfiles de liberación son notablemente similares a los de la doxorrubicina, un agente terapéutico para el cáncer, encapsulada dentro de polimersomas a base de PEO-b-PCL (Véase, por ejemplo, Ghoroghchian *et al.*, *Macromolecules*, 2006, 39 (5), 1673-1675). Estos datos confirman que la encapsulación de selenoglicoproteínas incluso en una concentración de carga relativamente elevada no afecta al patrón de liberación de una manera negativa.

30 EJEMPLO 7**Preparación de polímeros de liberación lenta de SelenoGlicoProteínas (SGP)**

Síntesis del polímero A. Una mezcla de SGPs a 1:1 precipitadas a pH 4,0 y 6,0 (Véase el Ejemplo 5) se usó en la preparación de polímeros de liberación lenta de SGP. 150 mg de SGP se disolvieron en 2 ml de ácido metacrílico y 1 ml de agua DI. Se aplicó una cierta cantidad de calentamiento para acelerar la disolución. Una muestra de 0,5 ml de la solución se puso en un vial de 5 ml que contenía 10 mg de AIBN, se sometió a agitación vorticial durante 1 minuto y el aire del tubo se retiró al vacío y se reemplazó por nitrógeno. Los contenidos del tubo se polimerizaron colocando el tubo en un horno de laboratorio calentado a 70 °C durante 2 h. El tubo se rompió y el polímero se cortó en secciones finas y se secó a alto vacío.

Síntesis del polímero B. Una mezcla de: 0,064 ml de ácido metacrílico, 0,091 ml de metacrilato de 2-hidroxiethyl, 1,427 ml de dimetacrilato de etilenglicol y 10 mg de AIBN se colocaron en un vial de 5 ml y se agitó con una barra de agitación magnética, seguido de 75 mg de SGP disueltos en una mezcla de 1,5 ml de ácido acético y 0,75 ml de agua DI. El aire en el vial se reemplazó con nitrógeno y el vial se cerró herméticamente y se colocó en un baño de aceite a 70 °C durante cuatro horas. El vial se rompió y el monolito de polímero se trituró en polvo en un mortero de porcelana. Las fracciones volátiles se retiraron del polímero a alto vacío.

Liberación de SGP con el tiempo. El mismo protocolo de liberación lenta de SGP se aplicó a cada uno de los polímeros (A y B). Se pusieron $333,7 \pm 0,1$ mg de polímero en un tubo de centrifugadora de 15 ml que contenía 5 ml de tampón citrato (pH 5,0) y el tubo se agitó suavemente durante cuatro horas. A continuación los tubos se centrifugaron y el sobrenadante se recogió mientras que los microgránulos de polímero se lavaron con dos volúmenes de 8 ml de agua DI y se liofilizó. Se extrajeron ~21 mg de la muestra liofilizada para el análisis de Se. Las extracciones de SGP se repitieron dos veces más. Se registraron los pesos de las muestras. Todas las muestras perdieron peso durante estos tratamientos (Véanse las Tablas 8 y 9).

Tabla 8

Miligramos de polímero para liberación				
Polímero	Inicial	Después del 1 ^{er} Lavado	Después del 2 ^o Lavado	Después del 3 ^{er} Lavado
A	333,6	271,4	235,6	207,8
B	333,6	301,6	281,1	254

Tabla 9

Miligramos de polímero extraídos para análisis de Se				
Polímero	Inicial	Después del 1 ^{er} Lavado	Después del 2 ^o Lavado	Después del 3 ^{er} Lavado
A	21,1	20,5	20,9	20,6
B	20,6	20,5	20,6	20,8

- 5 Para calcular la concentración de la SGP liberada, la absorbancia UV a 280 nm de los sobrenadantes se midió y se comparó con la curva de calibración de SGP preparada en el mismo tampón (Véase la Tabla 10).

Tabla 10.

Polímero A				
	abs	ml en 2 ml de dilución	mg de SGP'S/ml en solución original	mg de SGP liberada durante intervalo
1 ^{er} lavado	0,298	0,1	0,781	3,907
2 ^o lavado	0,349	0,5	0,183	0,913
3 ^{er} lavado	0,353	No diluido	0,046	0,231
Polímero B				
	abs	ml en 2 ml de dilución	mg de SGP'S/ml en solución original	mg de SGP liberada durante intervalo
1 ^{er} lavado	0,35	0,25	0,366	1,831
2 ^o lavado	0,572	No diluido	0,074	0,372
3 ^{er} lavado	0,251	No diluido	0,033	0,165

- 10 La espectroscopía de absorción atómica (usando método e instrumento EXCALIBUR) se aplicó para medir la concentración de Se residual en el polímero de liberación lenta (Véase la Tabla 11).

Tabla 11

Muestra	Concentración de Se en Polímero A (ppm)	Concentración de Se en Polímero B (ppm)
Muestra original	318,6	127,1
Después del 1 ^{er} lavado	268,8	116,1
Después del 2 ^o lavado	222,3	108,7
Después del 3 ^{er} lavado	215,3	92,3

- 15 De acuerdo con las mediciones de concentración de Se en los microgránulos del residuo, se liberó un 36,08 % de SGP a partir del Polímero A, después de lavados de 4 horas, triples (12 horas en total). Durante el mismo tratamiento, un 30,11 % de SGP se liberó del Polímero B.

EJEMPLO 8**Extracción alcalina de proteínas de levadura intracelular**

200,0 g de SEL-PLEX se mezclaron con 1 l de hidróxido sódico 0,1 M a pH 11,5 y se calentó a 60 °C durante 8 horas. a continuación la mezcla se centrifugó a 14.000x g/10 min/10 °C formando un sobrenadante y un microgránulo. El microgránulo se lavó dos veces con 400 ml de agua DI y se liofilizó, dando como resultado un peso de 54,5 g (Véase la Tabla 12). El sobrenadante a pH 11,5 y los lavados que se usaron se mezclaron en conjunto. El pH se redujo a 6,6 mediante neutralización usando ácido clorhídrico concentrado. Durante la neutralización se formaron pequeñas trazas de un precipitado y de un sobrenadante transparente. El precipitado se separó mediante centrifugación y el sobrenadante se concentró usando dispositivos AMICON de ultrafiltración de 10 kDa. El concentrado se lavó con dos porciones de 100 ml de agua DI y se liofilizó, proporcionando 64,0 g de un sólido de color marrón. Las fracciones filtradas restantes se combinaron (volumen total 21) y se analizaron para concentración de selenio. La fracción precipitada separada se analizó para Selenio y nitrógeno/proteína (VÉASE la Tabla 12).

15 **Tabla 12: Extracción alcalina**

	Peso (g)	Se (ppm)	Proteína (% en p)	Se total (mg)	Se (%) del total
SEL-PLEX	200,0	1600	37,0	320,0	100,0
Microgránulo después de extracción a pH 11,5	54,5	760	2,9	41,4	12,9
Fracción concentrada a pH 6,6 PM > 10 kDa	64,0	1918	52,9	122,8	38,3
Fracción filtrada 2 l PM < 10 kDa	NA (no analizado)	1909	NA	155,8	48,7

El análisis de la fracción filtrada indicó una pérdida de masa de un 40,7 % y una pérdida de selenio de un 48,7 % que no se recuperó mediante ultrafiltración a través de membrana de 10 kDa. Las eliminaciones β -nucleófilas/térmicas de MeSe-1 y HSe-1 y formas oxidadas de estos grupos funcionales a partir de péptidos que contenían selenio, dio como resultado la degradación de la estructura química original de las SGP's y pérdida de masa de selenio en la fracción filtrada. El proceso de producción que se lleva a cabo comúnmente en la técnica genera un aumento del volumen y una elevación de la concentración de selenio en la fracción filtrada que da como resultado una corriente residual que puede ser nociva puede tener efectos perjudiciales (por ejemplo, nociva para el medio ambiente). por el contrario, los métodos de la presente invención proporcionan extracción ácida y fraccionamiento dependiente del pH de las SGP's a partir de levadura enriquecida con selenio (por ejemplo, en un proceso comercial a gran escala). En condiciones de temperatura variable, se encontró que la técnica tradicional/convencional que usa hidrólisis alcalina no funcionaba en la extracción de selenoglicoproteínas a partir de células de levadura. Como se describe en el presente documento, se descubrió que la extracción de las SGP's a partir de células de levadura usando extracción ácida era satisfactoria.

Referencias

1. Demirci A., Pometto III A. L. 'Enhanced Organically Bound Selenium Yeast Production By Fed-Batch Fermentation' J. Agric. Food Chem. 47, 2496-2500 (1999).
2. Demirci A., Pometto III A. L. 'Production of Organically Bound Selenium Yeast by Continuous Fermentation' J. Agric. Food Chem. 47, 2491-2495 (1999).
3. Ouerdane L., Mester Z. 'Production and Characterization of Fully Selenomethionine-Labelled *Saccharomyces cerevisiae*' J. Agric. Food Chem. 56,11792-11799, (2008).
4. Korhola.M.; Vainio, A.; Edaelman, K. 'Selenium yeast' Ann. Clin. Res. 18, 65-68, (1986).
5. Surai P.F. Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction' Nottingham University Press 2002, 234-236 (2002).
6. Kelly, M. P.; Power R. F. ' Fractionation and identification of the major selenium compounds in selenized yeast' J. Dairy Sci. 78, 237-242 (1995).
7. McSheehy, S.; Kelly, J.; Tessier, L.; Mester, Z. 'Identification of Selenomethionine in selenized yeast using two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry based proteomic analysis' Analyst 130, 35-37 (2005).

8. Sedmak J. J. 'Production of beta-Glucans and Mannans' Publicación de Sol. de Patente de Estados Unidos Pub. N.º: US 2006/0263415 A1.
- 5 9. Rayman, M.P. 'The importance of selenium to human health' *The Lancet* 356, 233-241 (2000).
- 10 10. McKenzie, R.C.; Rafferty, T.S.; Beckett, G.J. 'Selenium: an essential element for immune function' *Trends in Immunology* 19, 342-345 (1998).
11. Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. 'The antioxidant role of selenium and selenocompounds' *Biomedicine&Pharmacotherapy* 57, 134-144 (2003).
12. Combs, G.F.; Grey, W.P. 'Chemopreventive Agents: Selenium' *Pharmacol. Ther.* 79, 179-192 (1998).
- 15 13. Clark, L.C.; Combs Jr., G.F.; Turnbull, B.W. *et al.*, 'Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of Skin' *J. Am. Med. Assoc.* 276, 1957-1963 (1996).
14. Otero, M.A.; Vasallo, M.C.; Verdecia, O.; Fernandez, V.; Betancourt, D. 'A Process for the Complete Fractionation of Baker's Yeast' *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66, 67-71 (1996).
- 20 15. Roberge, M.T.; Borgerding, A.J.; Finley, J.W. 'Speciation of Selenium Compounds from High Selenium Broccoli Is Affected by the Extracting Solution' *J. Agric. Food Chem.* 51, 4191-4197 (2003).
16. Furnsinn *et al.*, *Int. J of Obesity and Related Metab. Dis.*, 19, 458-463 (1995).
- 25 17. El-Bayoumy, *The role of selenium in cancer prevention*, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991.
18. Yu *et al.*, *Biol Trace Elem Res*, 56: 117-124 (1997).
19. Yoshizawa *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 90: 1219-1224, (1998).
- 30 20. Brooks, *et al.*, *J Urol*, 166: 2034-2038, (2001).
21. Garland *et al.*, *J. Am. Coll Nutr.*, 12: 400-11 (1993); Ghadirian *et al.*, *Cancer Detect Prev*, 24: 305-13 (2000).
- 35 22. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975).
23. Goehring *et al.*, *J. Anim. Sci.* 59, 725-732 (1984); Gerloff *et al.*, *J. Anim. Sci.* 70, 3934-3940 (1992).
- 40 24. Meister y Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760 (1983).
25. Deleve y Kaplowitz, *Pharm. Ther.* 52, 287-305 (1991).
26. Palmer y Paulson, *Nutr. Rev.* 55, 353-361 (1997).
- 45 27. Salonen *et al.*, *Am. J. Epidemiol.* 120: 342-349 (1984).
28. Willett *et al.*, *Lancet* 2: 130-134 (1983).
- 50 29. Virtamo *et al.*, *Cancer* 60: 145-148 (1987).
30. Ip., *J. Nutr.* 128: 1845-1854 (1998).
31. Ip y Daniel, *Cancer Res.* 45: 61-65 (1985).
- 55 32. Pence *et al.*, 102: 759-761 (1994).
33. Bedwal, R. S., *et al.*, *Medical Hypotheses*, 41 (2):150-159 (agosto de 1993).
- 60 34. Ferris G. M. Lloyd, *et al.*, *App. Clin. Biochem.*, 26:83-88 (1989).
35. Furnsinn, C. *et al.*, *Internat'l J. of Obesity and Related Metab. Dis.*, 19 (7): 458-463 (1995).
- 65 36. Mahan, *Proceedings of the 15th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido*, pp. 523-535 (1999).
37. Discher *et al.*, *Journal of Physical Chemistry B* (2002), 106 (11), 2848-2854.

38. Couvreur *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2002;19 (2):99-134.
39. Mosbach. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 7, pp. 92-96, 1994.
- 5 40. Wulff. *Trends in Biotechnology*, Vol. 11, pp. 85-87, 1993.
41. Andersson, *et al.*, *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ngo. T. T. ed.), pp. 383-394.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende selenoglicoproteínas solubles, donde las selenoglicoproteínas solubles contienen dos o más fracciones de las selenoglicoproteínas dependientes del pH, donde las selenoglicoproteínas solubles se obtienen mediante extracción ácida de las selenoglicoproteínas solubles a partir de levadura enriquecida con selenio y después de exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas, mediante precipitación secuencial dependiente del pH a dos o más valores de pH diferentes de las selenoglicoproteínas solubles, donde las selenoglicoproteínas solubles se generan con un método que comprende:
- 5 a) proporcionar levadura enriquecida con selenio;
b) exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas seguido de centrifugación para generar
- 10 i) un microgránulo que comprende material insoluble ácido; y
ii) una fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones
- 15 ácidas;
- c) precipitar selenoglicoproteínas de la fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas mediante un aumento del pH de la fase líquida de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 o 6,0; y
- 20 d) separar las selenoglicoproteínas precipitadas de la fase líquida.
2. La composición de la reivindicación 1, donde las selenoglicoproteínas solubles son solubles a pH inferior a 1,5, 2, 3, 4, 5 o 6.
- 25 3. La composición de la reivindicación 2, donde las selenoglicoproteínas solubles son solubles a pH inferior a 4, 5 o 6.
4. La composición de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un vehículo.
- 30 5. La composición de la reivindicación 4, donde el vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en un polimersoma, un polímero de liberación lenta, una nanocápsula, y un polímero con impresión molecular, preferentemente
- 35 donde el vehículo es un polímero de liberación lenta, o
donde el vehículo es un polimersoma usado para encapsular selenoglicoproteína, preferentemente
donde el polimersoma comprende copolímero de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO), o
donde el polimersoma comprende copolímero de dibloque de poli(ε-caprolactona) (PCL), o
donde el polimersoma comprende copolímeros de dibloque a base de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ε-caprolactona) (PEO-b-PCL), o
donde el polimersoma se obtiene a partir del acoplamiento de poli(ácido láctico), poli(glicólido), poli(ácido láctico-coglicólico) o poli(3-hidroxi butirato) con PEO.
- 40 6. La composición de la reivindicación 5, donde el diámetro medio de un polimersoma que encapsula selenoglicoproteína es 50-300 nm.
- 45 7. Un método para preparación de selenoglicoproteínas solubles que comprende:
- a) proporcionar levadura enriquecida con selenio;
b) exponer la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas seguido de centrifugación para generar
- 50 i) un microgránulo que comprende material insoluble ácido; y
ii) una fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas;
- c) precipitar selenoglicoproteínas de la fase líquida que comprende el extracto de levadura enriquecida con selenio soluble en las condiciones ácidas mediante un aumento del nivel de pH de la fase líquida de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 o 6,0; y
- 55 d) separar las selenoglicoproteínas precipitadas de la fase líquida.
8. El método de la reivindicación 7, donde las condiciones ácidas se obtienen usando tampón ácido o la adición de un ácido, preferentemente
- 60 donde el ácido es ácido clorhídrico.
9. El método de la reivindicación 7, donde la exposición de la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas comprende la exposición de la levadura enriquecida con selenio a un nivel de pH de 1,5.
- 65

10. El método de la reivindicación 7, donde las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas entre una y veinticuatro horas, preferentemente donde las levaduras enriquecidas con selenio se exponen a condiciones ácidas durante aproximadamente 8 horas.
- 5 11. El método de la reivindicación 7, donde la exposición de la levadura enriquecida con selenio a condiciones ácidas se produce a una temperatura superior a la temperatura ambiente, preferentemente donde la temperatura está entre 50 °C y 100 °C, más preferentemente donde la temperatura es 80 °C.
- 10 12. El método de la reivindicación 7, donde las selenoglicoproteínas se hacen precipitar desde la fase líquida en una diversidad de condiciones de pH para generar múltiples fracciones de selenoglicoproteínas solubles dependientes del pH, preferentemente donde las múltiples fracciones de selenoglicoproteínas solubles dependientes del pH se generan a valores de pH de 1,85, 3,0, 4,0 y 6,0.
- 15 13. El método de la reivindicación 7, donde la separación de las selenoglicoproteínas precipitadas de la fase líquida comprende centrifugación para formar un microgránulo de las selenoglicoproteínas precipitadas seguido de retirada de la fase líquida de las selenoglicoproteínas precipitadas.
- 20 14. El método de la reivindicación 7, donde las levaduras enriquecidas con selenio son levaduras enriquecidas con selenio no viables, secas que contienen un 2 % o menos de selenio inorgánico.
- 25 15. El método de la reivindicación 7, donde las selenoglicoproteínas solubles son solubles a pH inferior a 1,5, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 4, 5 o 6.

FIGURA 1

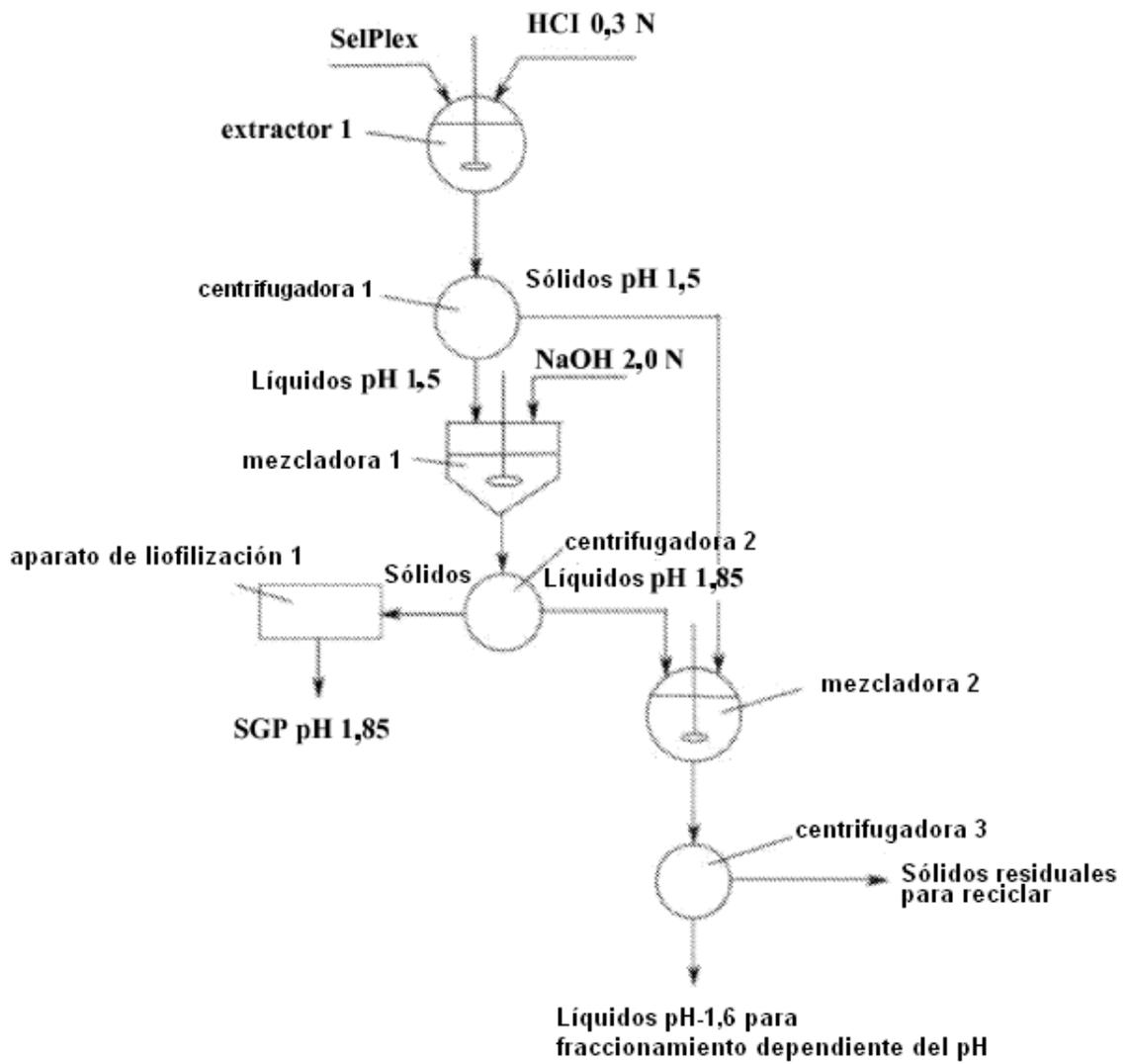


FIGURA 2

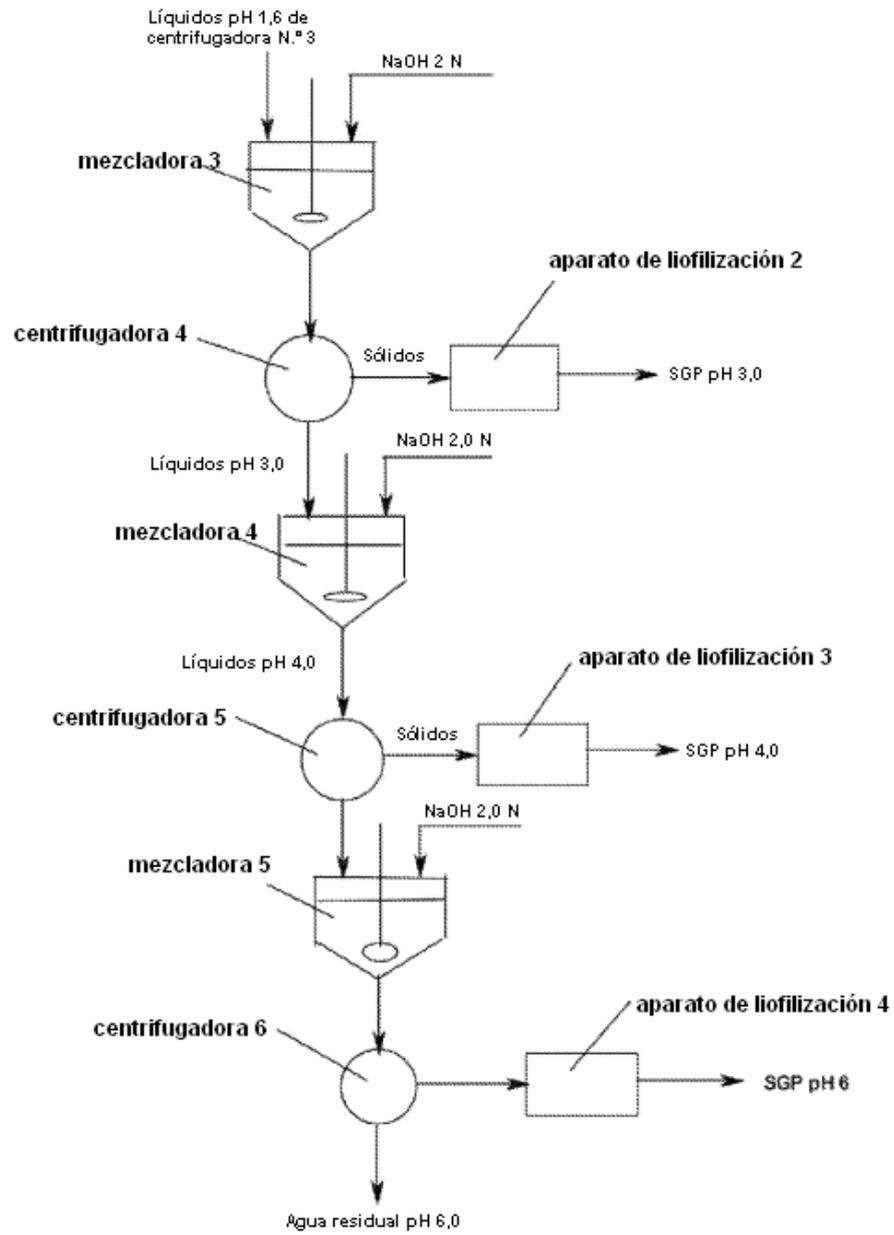
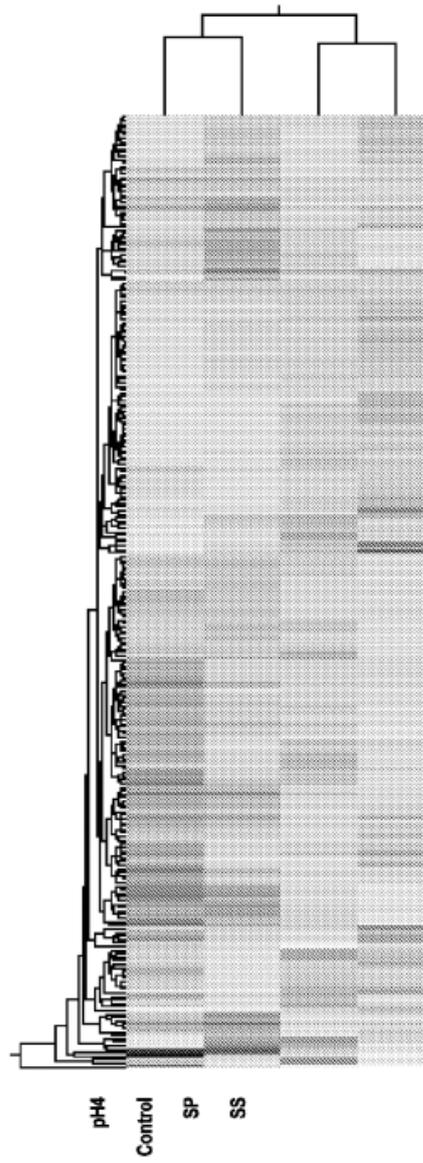


FIGURA 3



'Blanco = regulado de forma negativa, Gris = sin cambio, Negro = regulado de forma positiva en expresión genética relativa

FIGURA 4

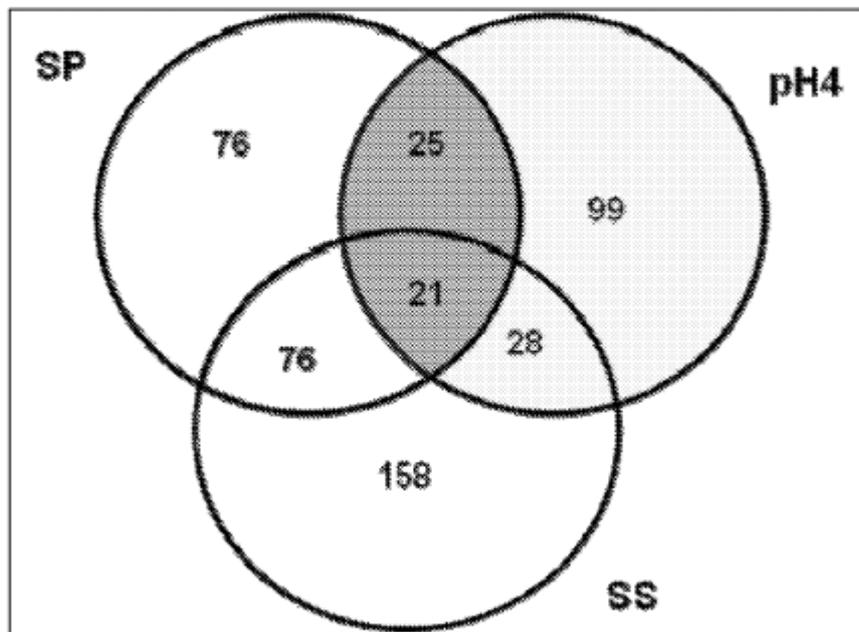
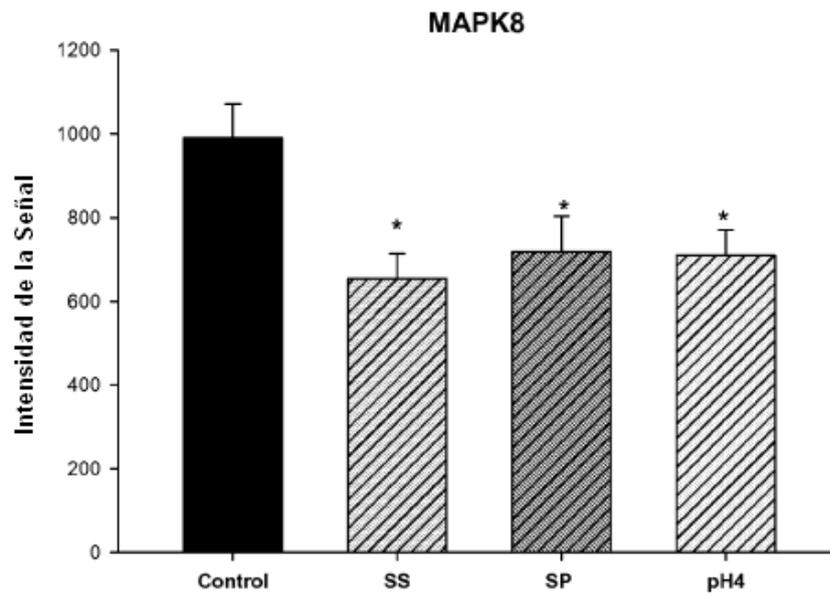
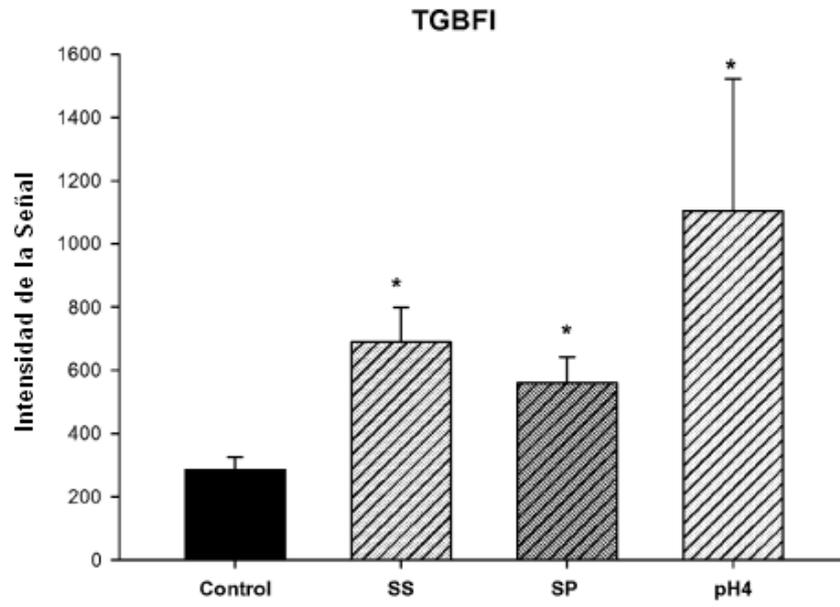
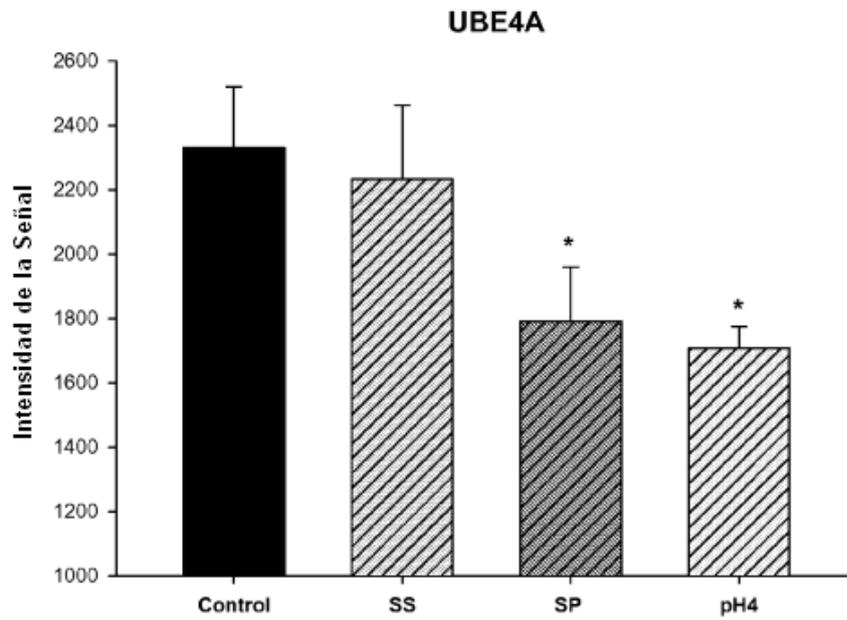
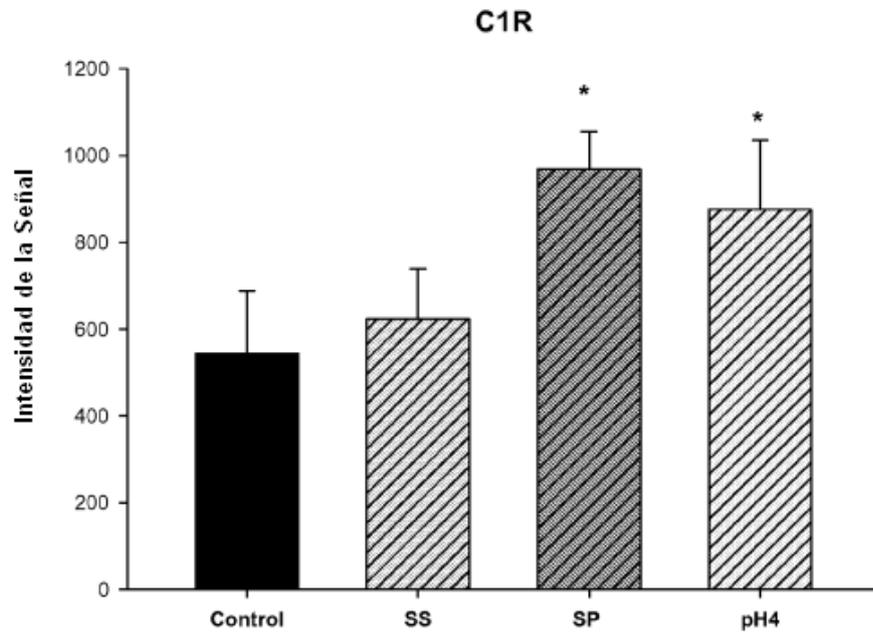


FIGURA 5



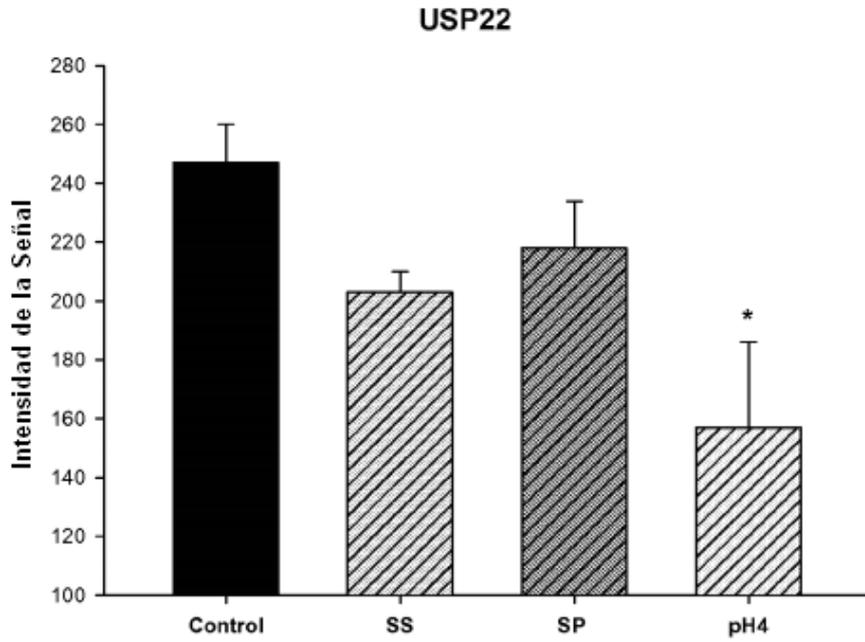
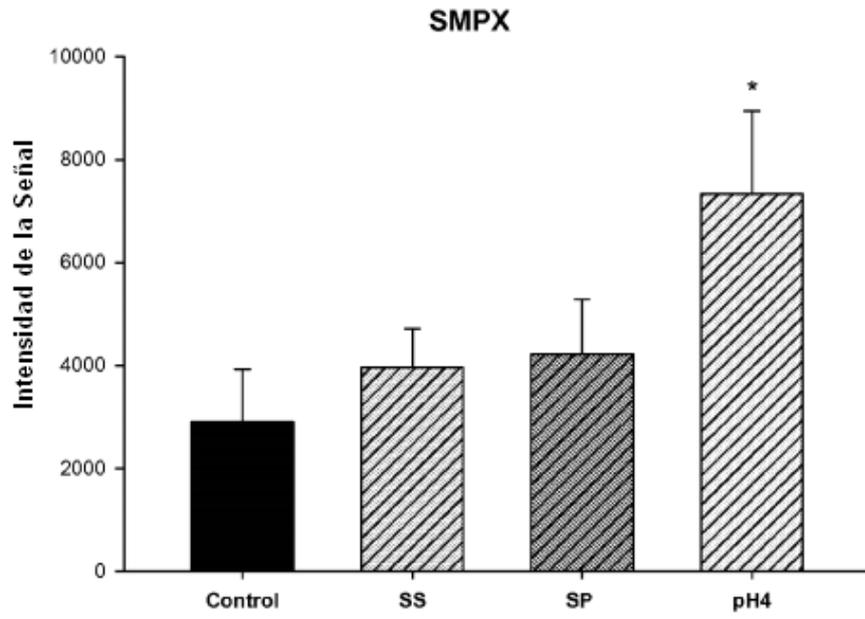
* $p < 0,05$

FIGURA 6



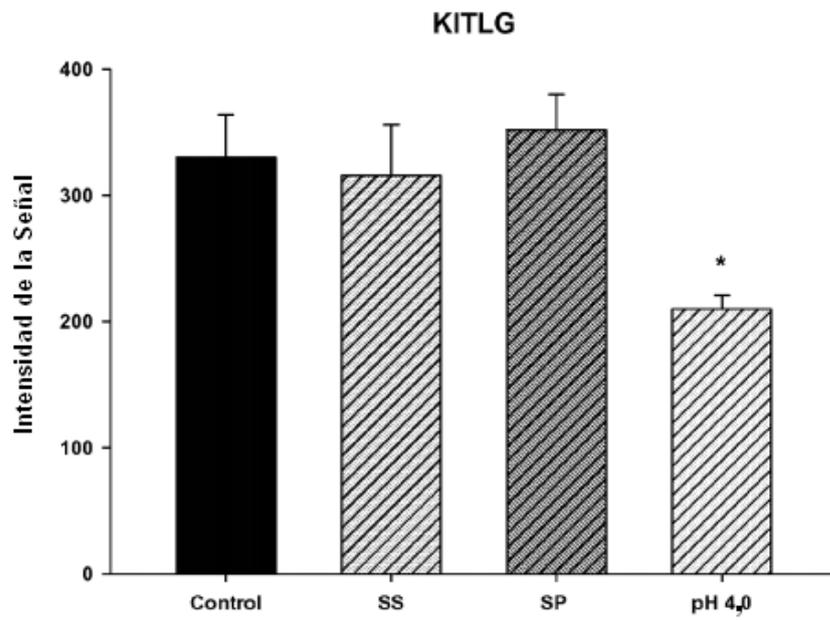
* $p < 0,05$

FIGURA 7



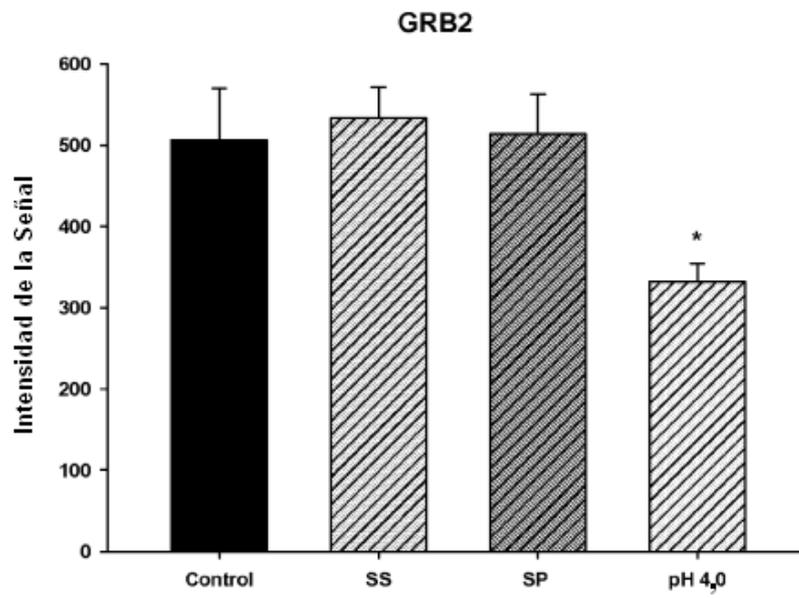
* $p < 0,05$

FIGURA 8



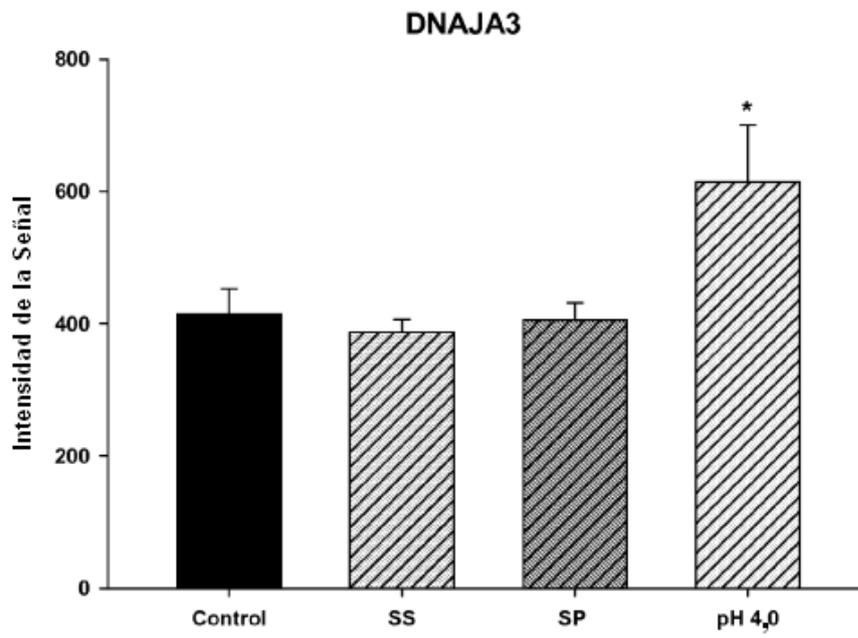
* $p < 0,05$

FIGURA 9



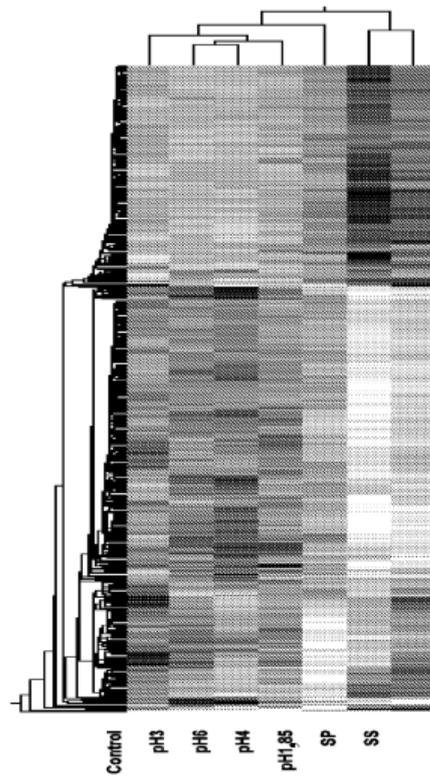
* $p < 0,05$

FIGURA 10



* $p < 0,05$

FIGURA 11



*Blanco = regulado de forma negativa, Gris = sin cambio, Negro = regulado de forma positiva en expresión genética relativa

FIGURA 12

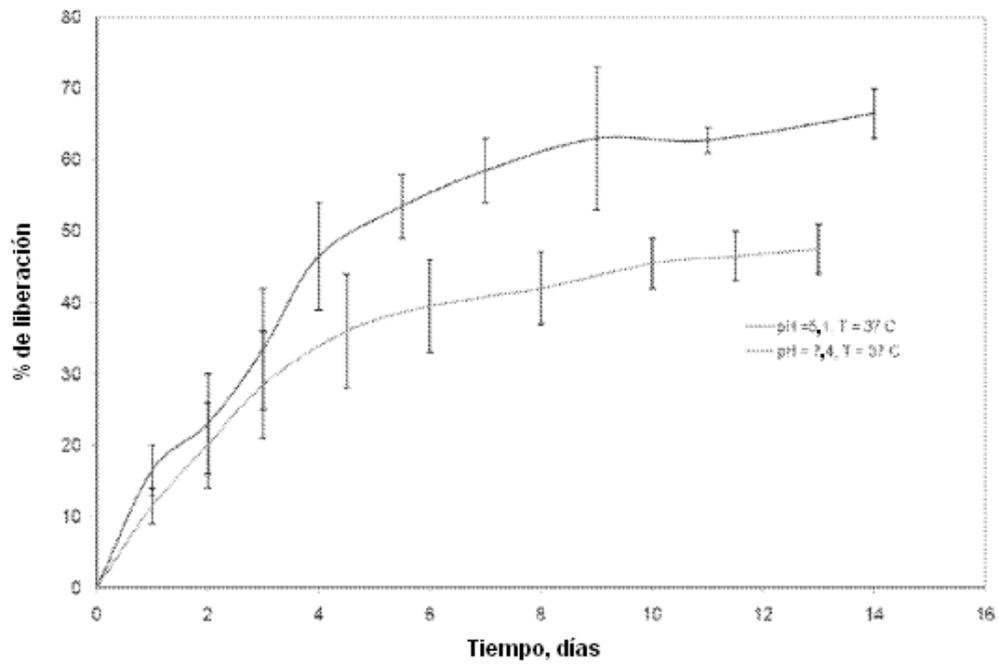


FIGURA 13

