(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 259 T2** 2007.04.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 173 476 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 259.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/11657**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 930 241.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/066625**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.04.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **09.11.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.04.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/415*** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
303814 **30.04.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Regents of the University of California, Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:
DE LUMEN, Benito O., Berkeley, Berkeley, CA 94720-3104, US; GALVES, F., Alfredo, Albany, CA 94706, US

(74) Vertreter:
Murgitroyd & Company, 48149 Münster

(54) Bezeichnung: **NÄHRSTOFFE AUS SOJABOHNENPROTEIN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

EINLEITUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Das Gebiet der Erfindung sind Sojabohnenproteine mit chemopräventiven Effekten.

Hintergrund

[0002] Das Konzept, dass diätetische Faktoren bei der Ätiologie unterschiedlicher Arten von Krebs eine wichtige Rolle spielen, wird von epidemiologischen Daten (World Cancer Fund, 1997) gut belegt. So gibt es zum Beispiel viele Anzeichen, die nahe legen, dass Diäten, die große Mengen an Sojabohnenprodukten enthalten, mit insgesamt geringen Krebssterberaten einhergehen, insbesondere für Dickdarm-, Brust- und Prostatakrebs, was Anstöße verliehen hat, spezifische Verbindungen in Sojabohnen zu identifizieren, die für deren krebspräventiven Effekte verantwortlich sein könnten (Messina und Barnes, 1991; Kennedy, 1995).

[0003] Ein aus Sojabohnen gewonnener Protease-Inhibitor, Bowman-Birk-Inhibitor (BBI), hat sich als ein besonders effektiver chemopräventiver Wirkstoff erwiesen (Kennedy, 1998). BBI ist als ein Protein von 8 kD mit definierter Sequenz und Struktur charakterisiert worden (abgehandelt von Birk, 1985), doch die meisten Untersuchungen, die die Wirksamkeit von BBI aufzeigen, haben BBIC, ein mit BBI angereichertes Sojabohnenextrakt, verwendet. BBIC ist sehr effektiv darin, Krebsentstehung zu unterdrücken, (1) die von mehreren unterschiedlichen Karzinogenen induziert wird, (2) in drei unterschiedlichen Tiermodellsystemen (Ratte, Maus und Hamster) und in In-vitro-Transformationssystemen (Kennedy et al., 1993), (3) in mehreren Geweben/Organen (Dickdarm, Leber, Lunge, Speiseröhre und oralem Epithel), (4) wenn Tieren über mehrere unterschiedliche Routen verabreicht (i.p., i.v., topisch, diätetisch), (5) verschiedene Arten von Tumoren involvierend (Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, Angiosarkome usw.), (6) in unterschiedlichen Zelltypen (Epithelzellen in Leber, Dickdarm, Lunge, Speiseröhre und Wangentasche sowie Bindegewebezellen (Fibroblasten sowohl in vitro als auch in der Leber), aus denen Angiosarkome entstehen. Somit ist die chemopräventive Fähigkeit von BBIC in einer Vielfalt von unterschiedlichen Krebsentstehungs-Assay-Systemen aufgezeigt worden, so dass im Jahr 1992 der Status als „Investigational New Drug" (neues Arzneimittel im Forschungsstadium) der FDA (IND-Nr. 34671) erreicht wurde und es sich nun in klinischen Studien mit Menschen befindet.

Literaturverweise

Birk (1985) The Bowman-Birk Inhibitor. Int J Peptide Protein Res 25: 113–131.
Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reod JL, Bannister AJ und Kouzarides T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. Nature 391: 597–601.
Clawson GA (1996) Protease inhibitors and carcinogenesis: A Review. Cancer Investigation 14(6): 597–608.
Da Silva Conceicao A und Krebbers E. (1994). A cotyledon regulatory region is responsible for the spatial expression patterns of Arabidopsis 2S albumin genes. Plant J. 5: 493–505.
DePinho RA (1998) The cancer-chromatin connection. Nature 391: 533–536.
Erickson, H. P. (1997). FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. Trends in Cell Biol. 7: 362–367.
Galvez AF und de Lumen BO (1999) A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. Nature Biotechnology 17: 495–500.
Galvez AF, Revilleza MJ und de Lumen BO (1997) A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA (Accession No. AF005030) Plant Gene Register. Plant Physiol 114: 1567.
Harlow E und Lane D (1988) Antibodies: A lab manual. S. 342. Cold Spring Harbor Lab.
Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL und Ayer DE (1997) Histone deacetylase is required for full transcriptional repression by mSin3A. Cell 89: 341–347.
Hauxwell AJ, Corke FMK, Hedley CL und Wang J. (1990). Storage protein gene expression is localized to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos: An analysis of seed development in Pisum sativum XIV. Development 110: 283–289.
Kennedy AR (1993a) Cancer prevention by protease inhibitors. Preventive Med 22: 796–811.
Kennedy AR (1993b) Potential mechanisms of antitumorigenesis by protease inhibitors. In: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III, S. 301–307. G. Bronzetti et al. (Hrsg). Plenum Press, New York.
Kennedy AR (1994) Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. Cancer Res (Suppl) 54: 1999S–2005S.
Kennedy AR (1995) The evidence for soybean products as cancer preventive agents. J Nutr 125: 733S–743S.
Kennedy AR (1998) The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. Am J Clin Nutr

68 (suppl): 1406–1412S.
Kennedy AR und Little JB (1978) Protease inhibitors suppress radiation induced malignant transformation in vitro. Nature (Lond) 276: 825–826.
Kennedy AR, BF Szuhaj, P Newberne und Billings PC (1993) Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. Nutr Cancer 19: 281–302.
Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E und Eisenman RN (1997) Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. Cell 89: 349–356.
Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneval, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D und Harel-Bellan A. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. Nature 391: 601–605.
Messina M und Barnes S (1991) The role of soy products in reducing risk of cancer. J Natl Cancer Institute 83: 541–546.
Odani, S., Koide, T und Ono, T. 1987. Amino acid sequence of a soybean (Glycine max) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure. J. Biol. Chem. 262, 10502–10505.
Pazin M und Kadonaga JT (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? Cell 325–328.
Spencer D und Higgins TJV. (1981). Molecular aspects of seed protein biosynthesis. In: Commentaries in Plant Science, Hrsg. Smith H. (pergamon Press, New York) Bd. 2, S. 175–189.
World Cancer Fund/American Institute for Cancer Research (1997) Food, nutrition and the prevention of cancer: A global perspective. American Institute of Cancer Research. Washington DC.
Yavelow J, Collins M, Birk Y, Troll W und Kennedy AR (1985) Nanomolar concentrations of Bowman-Birk protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 82: 5395–5399.
Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR und Troll W. (1983) Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. Cancer Research (SUPPL) 43: 2454s2459s3.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Die Erfindung stellt die Verwendung eines Lunasin-Polypeptids bei der Herstellung von Formulierungen zur Abgabe effektiver Mengen von Lunasin als medizinischem Lebensmittel bereit. Genauer stellt die Erfindung die Verwendung eines Lunasin-Polypeptids, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 oder ein aktives Fragment davon, das zumindest das Arg-Gly-Asp-Motiv, gefolgt von mindestens einem hexa-Asp/Glu-Motiv, umfasst, bei der Herstellung einer Formulierung zur Krebs-Chemopräventation bereit, wobei diese Formulierung mindestens 50% des Polypeptidgewichts an dem Lunasin-Polypeptid und weniger als 10% des Polypeptidgewichts an Bowman-Birk-Inhibitor-Polypeptid umfasst. In anderen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 90%, noch besser mindestens 98% und am besten 100% des Polypeptidgewichts an dem Lunasin-Polypeptid und weniger als 2%, vorzugsweise weniger als 0,5%, noch besser weniger als 0,1% und am besten 0% des Polypeptidgewichts an Bowman-Birk-Inhibitor-Polypeptid. Die Formulierungen können durch eine große Vielfalt von zweckmäßigen Abgabeverfahren, die auf dem Stand der Technik wohl bekannt sind (siehe z. B. The Pharmacological Basis of Therapeutics, neunte Ausgabe, von Goodman und Gilman), einschließlich oraler Nahrungsaufnahme, durch topisches Inkontaktbringen mit Haut unter Verwendung wohl bekannter Techniken zur dermalen Abgabe, durch Einführung in einbehaltene physiologische Flüssigkeiten wie etwa Blut, Gelenkschmiere, interstitielle Flüssigkeit usw., abgegeben oder verabreicht werden.

[0005] In anderen Ausführungsformen dient die Formulierung zur
- oralen Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids,
- topischen Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids durch Inkontaktbringen von Haut mit der Formulierung oder
- Einführung der Formulierung in eine einbehaltene physiologische Flüssigkeit zur Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids.

[0006] Verfahren zur Fertigung der Gegenstandsformulierungen durch Reinigen von Lunasin-Polypeptiden auf die erforderliche Reinheit und zum Kombinieren des Lunasin-Polypeptids mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger in einer oral aktiven Einnahmeeinheit werden hier ebenfalls offenbart. Das Lunasin-Ausgangsmaterial können Sojabohnen, ein rekombinantes Lunasin-Polypeptid-Expressionssystem, ein synthetisch produziertes Lunasin oder Extrakte oder Fraktionen davon sein. Geeignete Träger und Dosierungen lassen sich, angeleitet durch die bestehenden BBIC-Daten, leicht empirisch bestimmen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG BESTIMMTER AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

[0007] Die folgenden Beschreibungen bestimmter Ausführungsformen und Beispiele werden zur Veranschaulichung und nicht als Beschränkung geboten. Außer bei Gegenanzeige oder anderweitig angemerkt bedeuten die Begriffe "einer/eine/ein" in diesen Beschreibungen und in dieser ganzen Patentschrift ein oder mehrere, der Begriff „oder" bedeutet und/oder und Polynukleotid-Sequenzen sind so zu verstehen, dass sie gegenläufige Stränge sowie alternative Grundgerüste, die hier beschrieben werden, umgreifen.

[0008] Wir haben gezeigt, dass eine kleine Peptiduntereinheit eines 2S-Albumins, isoliert aus Sojabohnensamen, die wir Lunasin genannt haben, bei Expression in Säugetierzellen einen mitosehemmenden Effekt hat (Galvez AF und de Lumen BO, 1999 und USSN 08/938,675). Anders als bei anderen mitosehemmenden Wirkstoffen, die die Mikrotubulus-Funktion stören, haben wir gezeigt, dass sich Lunasin nach Transfektion und Expression des Lunasingens im Inneren der Zelle vorzugsweise an hypoacetyliertes Chromatin in Lunasin-transfizierten Zellen bindet, was zur Verdrängung von Kinetochorproteinen während der Mitose führt.

[0009] Das Lunasin-Polypeptid enthält außerdem ein funktionelles RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp). Wenn Lunasin von außen auf die Säugetierzellkulturen angewendet wird, bindet es sich durch das RGD-Tripeptid an Integrine der Zellmembran und gelangt anschließend durch Membran-Turnover in das Zytoplasma. Die relativ kleinen Mengen an Lunasin, die durch passive Diffusion und während der Prometaphase (wenn ein Auflösen der Nukleusmembran erfolgt) in den Nukleus gelangen, reichen aus, um Regionen hypoacetylierten Chromatins effektiv zu binden. Anders als bei Lunasin-transfizierten Zellen, die Lunasin in großen Mengen konstitutiv exprimieren, scheint internalisiertes Lunasin jedoch den Kinetochorzusammenbau nicht zu beeinträchtigen, da die Zellen die normale Mitose durchlaufen. Stattdessen hemmt Lunasin die Transformation normaler embryonaler Fibroblastenzellen zu Krebstumoren durch krebserregende Wirkstoffe. Die Bindungsaffinität von Lunasin an Regionen deacetylierter Nukleosome stimmt mit einer krebshemmenden Rolle von Lunasin als Tumorsuppressorsurrogat überein, indem es die Acetylierung von Chromatin und die Aktivierung von Onkogenen in Zellen mit mutierten Tumorsuppressorgenen verhindert. Die Zelladhäsionseigenschaft von Lunasin bringt auch den zusätzlichen Vorteil, dass die Ausbreitung von Krebs verhindert wird, indem es sich kompetitiv an Membranintegrine bindet, die von metastasischen Zellen zum Anhaften an die extrazelluläre Matrix und zur Proliferation benötigt werden.

[0010] Wir haben ebenfalls aufgezeigt, dass der aus Sojabohnen gewonnene Protease-Inhibitor Bowman-Birk-Inhibitor (BBIC), der sich als gegen verschiedene Arten von Krebs in In-vitro- und In-vivo-Tiermodellen chemopräventiv erwiesen hat, Lunasin als eine Hauptkomponente enthält. Tatsächlich reduzierte die Entfernung von Lunasin aus BBIC durch Immundepletion die Fähigkeit von BBIC, eine Karzinogen vermittelte Transformation von C3H-Zellen zu hemmen, signifikant. Zusätzlich dazu stellte sich heraus, dass Lunasin bei Verwendung equimolarer Mengen bei der Verhinderung Karzinogen induzierter Tumorbildung effektiver als BBIC war. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Lunasin ein, wenn nicht der aktive krebshemmende Bestandteil von BBIC ist.

[0011] Demgemäß bezeichnet der Begriff Lunasin in seiner Verwendung hier Verbindungen, die das natürliche Sojabohnen-Lunasin-Polypeptid (zufällig gereinigt und sequenziert von Odani et al., 1987) (Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser Cys Arg Lys Gln Leu Gln Gly Val Asn Leu Thr Pro Cys Glu Lys His Ile Met Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp, SEQ ID NO: 1) umfassen, und aktive Fragmente davon, die mindestens das Arg-Gly-Asp-Motiv, gefolgt von mindestens einem hexa-Asp/Glu-Motiv, umfassen.

[0012] Bevorzugte Lunasin-Polypeptide umfassen die Reste 33–43, vorzugsweise 21–43, noch besser 10–43 und am besten 1–43 von SEQ ID NO: 1. Beispielhafte Lunasin-del-Verbindungen (wobei wieder die N→C Nomenklaturübereinkunft verwendet wird), die sich beim Hemmen von Krebsentstehung in In-vitro- und Tiermodellen als effektiv erwiesen haben, schließen folgende ein:
Lunasin-del-1: Fusion von MRG und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-2: Fusion von α-Tubulin und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-3: Fusion von β-Tubulin und Resten 27–42 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-4: Fusion von MAP2 und Resten 5–43 von SEQ ID NO: 2
Lunasin-del-5: Fusion von Mapmodulin und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-6: Fusion von GFP und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-7: Fusion von MAP4 und Resten 23–42 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-8: Fusion von FLAGG und Resten 9–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-9: Fusion von CYCLIN A und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-10: Fusion von CYCLIN B1 und Resten 32–43 von SEQ ID NO: 1

Lunasin-del-11: Fusion von CYCLIN B2 und Resten 19–42 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-12: Fusion von CYCLIN B3 und Resten 13–43 von SEQ ID NO: 1
Lunasin-del-13: SH2-octa-Aspartat-Fusion
Lunasin-del-14: SH3-octa-Aspartat-Fusion
Lunasin-del-15: Fusion von SEQ ID NO: 1, Reste 27–34, und MRG-octa-Aspartat
Lunasin-del-16: Fusion von SEQ ID NO: 1, Reste 27–34, SEQ ID NO: 1, Reste 27–34, und octa-Aspartat
Lunasin-del-17: MRG-tetra-Aspartat-tetra-Glutamat-Fusion
Lunasin-Peptid hemmt die Karzinogen vermittelte Transformation von C3H 10T1/2-Maus-Fibroblastenzellen zu Tumorzellen. Experimente, die unter Verwendung des gleichen In-vitro-Transformations-Assays vorgenommen wurden, wie dem, der zum Bestimmen der chemopräventiven Eigenschaft von BBIC verwendet wurde, zeigten, dass die Anwendung des Lunasin-Peptids von außen bis auf 10 nM hinab (10 nM bis 10 mM) die Transformation von normalen embryonalen Maus-Fibroblastenzellen (C3H 10T1/2) zu Krebsfoci durch krebserregende Wirkstoffe MCA (3-Methylcholanthren) und DMBA (7,12-Dimethylbenzanthracen) hemmt.

[0013] Die Beseitigung des sauren Carboxylendes (Lunasin-del-C) und des RGD-Zelladhäsionsmotivs (Lunasin-GRG) hebt den Hemmeffekt auf, was darauf hinweist, dass diese Domänen essenziell sind.

[0014] Lunasin ist eine Hauptkomponente des Bowman-Birk-Protease-Inhibitors (BBIC) aus Sojabohnen, einer bekannten krebspräventiven Substanz. Protease-Inhibitoren weisen, anders als andere mögliche Klassen von krebspräventiven Substanzen, die untersucht worden sind, mehrere Merkmale auf, die wir als ebenfalls auf Lunasin zutreffend beobachtet haben. Der auffälligste Unterschied besteht in ihrer Fähigkeit, Krebsentstehung auf eine irreversible Weise zu beeinflussen. Wenn die Verabreichung von BBIC beendet wird, sei es in In-vitro- oder In-vivo-Experimenten, treten in den verwendeten Assay-Systemen keine bösartigen Zellen oder Tumore auf (Kennedy, 1994). Chemopräventive Wirkstoffe wie etwa Vitamin E, b-Carotin und Retinoide haben im Gegensatz dazu einen reversiblen Effekt auf In-vitro-Systeme – transformierte Zellen treten auf, nachdem diese chemopräventiven Wirkstoffe aus Karzinogen behandelten Kulturzellen entfernt worden sind. Protease-Inhibitoren sind außerdem darin anders als andere chemopräventive Wirkstoffe, dass sie bei extrem niedrigen Pegeln (nM) effektiv sind, während die anderen Wirkstoffe nur bei sehr hohen Pegeln (mM) effektiv sind. Die Dosis-Wirkung der BBIC-Suppression von Krebsentstehung ist deshalb außergewöhnlich, da die Dosispegel von BBIC über einen Bereich, der über mehrere Größenordnungen variiert, die gleichen Unterdrückungsseffekte haben. Drittens unterscheidet die auffällige Fähigkeit der Protease-Inhibitoren, so viele unterschiedliche Krebsarten zu unterdrücken, diese von den meisten chemopräventiven Wirkstoffen. Ihre antineoplastischen Eigenschaften sind nicht auf spezifische Organe/Gewebe beschränkt.

[0015] Lunasin gehört, wie BBIC, zu derselben Klasse der 2S-Albumin-Familie, und beide werden auf ähnliche Weisen zubereitet. Wir haben mittels Western-Blot-Analyse herausgefunden, dass Lunasin eine Hauptkomponente von im Handel erhältlichen BBIC-Präparaten (Sigma) ist. In einem beispielhaften Blot zeigte Spur 3, die ein Rohpräparat des Trypsininhibitors (Sigma T 9128, lösliches Sojabohnenpulver des Typs II-S) enthielt, eine Hauptproteinbande bei 16 kDa, die in dem Immunoblot hervorgehoben wurde. BBI ist ein Protein von 8 kDa, von dem bekannt ist, dass es in Lösung dimerisiert. Spur 4, die BBIC (Sigma T9777, Bowman-Birk-Inhibitor, aus gefriergetrocknetem Sojabohnenpulver) enthielt, zeigte zwei Proteinbanden, 8 kDa und 16 kDa, die beide im Immunoblot hervorgehoben wurden. Lunasin, das 2 Cystein-Reste aufweist, kann mit BBI (als ein Monomer und ein Dimer), das 14 Cystein-Reste aufweist, Disulfidbindungen bilden. Dies zeigt deutlich, dass Lunasin in BBIC als eine Hauptkomponente zu finden ist. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die Entfernung von Lunasin aus BBIC durch eine Lunasin-Antikörper-Affinitätssäule und durch Harzbehandlung die Fähigkeit des BBIC, die Transformation von C3H-Zellen zu hemmen, signifikant reduzierte. Diese Anzeichen weisen, zusammen mit der Fähigkeit des Lunasin, die Karzinogen vermittelte Transformation von C3H-Zellen zu hemmen, darauf hin, dass Lunasin ein, wenn nicht das aktive chemopräventive Hauptmolekül in BBIC ist. Unsere Daten weisen vielmehr darauf hin, dass BBIC dahingehend wirken kann, Lunasin vor der Verdauung im Magen-Darm-Trakt zu schützen. Die Fähigkeit von Lunasin, in das Innere von Säugetierzellen zu gelangen, dann die Chromatinfunktion zu modifizieren, bietet nun einen rationalen Mechanismus, um die chemopräventive Eigenschaft von BBIC zu erklären, sowie eine Anleitung für die Verwendung von Lunasin als Nahrungstherapeutika oder Nahrungsergänzungsmittel, insbesondere als krebshemmender Wirkstoff. Das Ersetzen von BBI durch Lunasin bei vergleichbaren Dosierungen und Verabreichungsrouten zum Beispiel bietet Wirksamkeit in Zell- und Tieruntersuchungen (siehe US-Patente Nr. 5,618,679; 5,616,492; 5,614,198; 5,505,946; 5,376,373; 5,338,547).

[0016] Chromatinabwandlung und Tumorsuppression. Wir vermuten, dass die Chromatinbindungsfähigkeit von Lunasin der zugrunde liegende Mechanismus hinter der mitosehemmenden Eigenschaft des Lunasin-Gens und der krebspräventiven Eigenschaft des Lunasin-Peptids ist. Eine Reihe von Untersuchungen

weist nachdrücklich darauf hin, dass die Chromatinabwandlung mit Tumorsuppressionswegen verknüpft ist. (DePinho, 1998; Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin, 1998; Pazin und Kadonaga, 1997; Hassig et al., 1997; Laherty et al., 1997). Das Retinoblastomprotein Rb ist zum Beispiel mit E2F (einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die von Rb gesteuert werden) und HDAC1 (der Haupt-Säugetier-Histondeacetylase, die die Chromatinstruktur modifiziert) in Säugetierzellen zu einem Komplex geformt. Rb unterdrückt E2F regulierte Promotoren, indem es HDAC1 heranzieht, das Kernhistone deacetyliert, was eine engere Assoziation zwischen DNA und Nukleosomen bewirkt, so dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Erkennungselemente in der DNA erschwert wird. Der Rb/HDAC/E2F-Komplex könnte ein Ziel für transformierende Viren sein, was zur Freigabe der Suppression und einem vollständig transformierten Zustand führen könnte. Die Bindung von Lunasin an die hypoacetylierte Region des Chromatins kann die Tumorgenese in einem anderen Kontext unterdrücken. Während die Deacetylierung eine engere Assoziation der DNA mit den Nukleosomen in kondensierten Chromosomen bewirkt, was zu einer Änderung der Struktur höherer Ordnung führt, legt sie auch positive Ladungen auf Lysinresten frei, die es dem Lunasin ermöglichen würden, an Histonendsequenzen zu binden und den reversiblen Acetylierungs-/Deacetylierungsprozess zu verhindern. Folglich wird die Genexpression mehr oder weniger permanent unterbunden. Untersuchungen an Tieren zeigen, dass Lunasin die Verdauung effektiv überlebt, absorbiert wird und in die Gewebe gelangt. Unsere Anzeichen zeigen, dass Lunasin in der Zelle über das RGD-Motiv internalisiert wird (d. h. es gibt keine Internalisierung, wenn das RGD-Motiv beseitigt wird) und aufgrund seiner Größe von 4 kDa durch passive Diffusion und während der Prometaphase, wenn die Kernhülle aufgelöst wird, in das Innere des Nukleus gelangt. Letztlich bindet sich Lunasin an die Kernhistone der Nukleosomen und hemmt die Transformation der Zelle in der Gegenwart von Karzinogenen, indem es die Transkription wie oben beschrieben unterbindet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> de Lumen, Benito O.
Galvez, Alfredo F.

<120> Nahrungstherapeutika mit Sojabohnenprotein

<130> B99-089

<140> 09/303,814

<141> 1999-04-30

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> Sojabohne

<400> 1

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

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

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

Patentansprüche

1. Verwendung eines Lunasin-Polypeptids, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 oder ein aktives Fragment davon, das zumindest das Arg-Gly-Asp-Motiv, gefolgt von mindestens einem hexa-Asp/Glu-Motiv umfasst, bei der Herstellung einer Formulierung zur Krebs-Chemoprävention, wobei diese Formulierung mindestens 50% des Polypeptidgewichts an dem Lunasin-Polypeptid und weniger als 10% des Polypeptidgewichts an Bowman-Birk-Inhibitor-Polypeptid umfasst.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung mindestens 90% des Polypeptidgewichts an dem Lunasin-Polypeptid und weniger als 1% des Polypeptidgewichts an Bowman-Birk-Inhibitor-Polypeptid umfasst.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lunasin-Polypeptid 33–43 von SEQ ID NO: 1 umfasst.

4. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lunasin-Polypeptid die Reste 21–43 von SEQ ID NO: 1 umfasst.

5. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lunasin-Polypeptid die Reste 10–43 von SEQ ID NO: 1 umfasst.

6. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lunasin-Polypeptid die Reste 1–43 von SEQ ID NO: 1 umfasst.

7. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lunasin-Polypeptid aus den Resten 1–43 von SEQ ID NO: 1 besteht.

8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1–7, wobei die Formulierung zur oralen Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids dient.

9. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Formulierung der topischen Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids durch Inkontaktbringen von Haut mit der Formulierung dient.

10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Formulierung der Einführung der Formulierung in eine einbehaltene physiologische Flüssigkeit zur Verabreichung eines Lunasin-Polypeptids dient.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen