



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월13일

(11) 등록번호 10-2136763

(24) 등록일자 2020년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01) C12N 5/09 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-7026323

(22) 출원일자(국제) 2013년07월22일

심사청구일자 2018년05월02일

(85) 번역문제출일자 2014년09월19일

(65) 공개번호 10-2015-0035496

(43) 공개일자 2015년04월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/051433

(87) 국제공개번호 WO 2014/015328

국제공개일자 2014년01월23일

(30) 우선권주장

61/674,180 2012년07월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Chen et al., Nat Chem Biol, Vol. 7(9), 2011, pp. 610-616.

WO2010138820 A2

WO2008008333 A2

WO2010121131 A2

(73) 특허권자

프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지

미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17

(72) 발명자

할페린, 조세 에이.

미국 메사추세츠 02446 브루클린 비콘 스트리트 1443

코레브, 미셸

미국 메사추세츠 02467 체스넛 힐 사우스 스트리트 205

아크타스, 휴세인

미국 메사추세츠 02465 뉴튼 템플 스트리트 35

(74) 대리인

박장원

전체 청구항 수 : 총 20 항

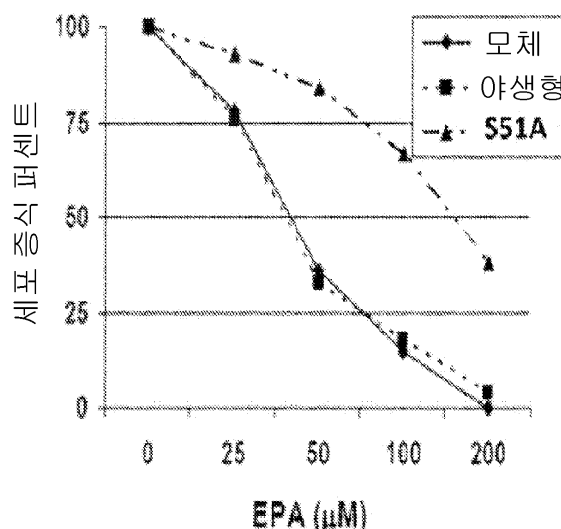
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 기능 식품 및 의약품의 세포 기반 품질 조절 생물학적 분석

(57) 요약

번역 개시 억제 활성의 레벨이 알려지지 않은 조성물의 번역 개시 억제 효능을 측정하는 방법으로서, eIF2 α -야생형(eIF2 α -WT) 세포를 상기 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서 상기 조성물에 접촉시키는 단계; 상기 시료에 의하여 유도된 상기 eIF2 α -WT 세포의 증식 억제 레벨을 측정하는 단계; 및 상기 시료에 의하여 유도된 증식 억제 레벨을 상기 활성의 양이 알려진 표준에 의하여 유도된 증식 억제 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 상기 시료 중의 상기 번역 개시 억제 활성의 양은 상기 eIF2 α -WT 세포의 증식 억제 레벨에 비례하는 것인 방법.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

청구항 1

번역 개시 억제 활성의 레벨이 알려지지 않은 조성물의 번역 개시 억제 효능을 측정하는 방법으로서,

ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포를 해당 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서 상기 조성물에 접촉시키는 단계;

ATCC 수탁번호 PTA-13011 세포를 해당 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서 상기 조성물에 접촉시키는 단계;

상기 조성물에 의하여 유도된 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포 및 ATCC 수탁번호 PTA-13011 세포의 증식 억제 레벨을 측정하는 단계로서,

여기서 상기 조성물 중의 상기 번역 개시 억제의 활성량은 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포의 증식 억제 레벨에 비례하는 것인 단계;

상기 조성물에 의하여 유도된 증식 억제 레벨을 번역 개시 억제의 활성량이 알려진 표준물질에 의하여 유도된 증식 억제 레벨과 비교하는 단계; 및

상기 조성물이 상기 수탁번호 PTA-13011 세포의 증식을 억제하는 경우 해당 조성물에게 번역 개시 억제 활성이 없는 것으로 동정하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 기능 식품(nutriceutical)인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 오메가-3 농축물인 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표준물질은 상기 번역 개시 억제 활성의 알려진 양을 포함하는 조성물인 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물 중의 활성량을 상기 표준물질 중의 번역 개시 억제 활성량과 비교함으로써, 상기 조성물의 번역 개시 억제 활성량을 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물 중의 상기 활성은 상기 표준물질 중의 활성의 퍼센트로서 표시되는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 표준물질은 에이코사펜타에노산(EPA)의 알려진 양인 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 접촉 전에 가수분해된 것인 방법.

청구항 9

시료 중의 번역 개시 억제 활성량을 측정하는 방법으로서,

ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포를 상기 시료와 접촉시키는 단계;

상기 접촉된 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포 및 상기 시료를, 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서 배양시키는 단계; 및

상기 시료에 의하여 유도된 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포의 세포 증식 억제 레벨을 측정하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 시료에 의하여 유도된 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포의 세포 증식 억제의 레벨은, 상기 시료 내 상기 번역 개시 억제의 활성량에 비례하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포 증식 억제 레벨은 처리되지 않은 ATCC 수탁번호 PTA-13010 세포의 증식의 퍼센트로서 표시되는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료에 의하여 유도된 증식 억제의 레벨을, 활성량이 알려진 표준물질에 의하여 유도된 세포 증식 억제의 레벨과 비교하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 억제 활성의 측정 전에 상기 시료를 가수분해하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 표준물질은 상기 활성의 알려진 레벨을 함유하는 종전에 분석된 시료인 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 표준물질은 EPA의 알려진 양인 것인 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 시료는 오메가-3 농축물인 것인 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 시료는 생선 오일 추출물을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 시료는 기능 식품(nutriceutical)인 것인 방법.

청구항 18

제9항에 있어서,

ATCC 수탁번호 PTA-13011 세포를, 해당 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서, 번역 개시 억제 활성량이 알려진 상기 시료와 접촉시키는 단계; 및

상기 시료에 의하여 유도된 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13011 세포의 증식 억제 레벨을 측정하는 단계

를 더 포함하고, 여기서 상기 시료가 상기 ATCC 수탁번호 PTA-13011 세포의 증식을 억제하는 것인 경우, 해당 시료는 번역 개시 억제 활성을 갖지 않는 것인 방법.

청구항 19

ATCC 수탁번호 PTA-13010을 갖는 인간 전립선암 세포주 PC-3 eIF2 α -WT.

청구항 20

ATCC 수탁번호 PTA-13011을 갖는 인간 전립선암 세포주 PC-3 eIF2 α -S51A.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호 언급

[0002] 본 출원은 2012년 7월 20일에 출원된 미국 가출원 제61/674,180호에 의거한 우선권을 주장하며, 이는 언급에 의하여 그 전체로서 본 명세서에 통합된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명의 구현예들은 일반적으로 식품, 기능 식품(nutraceutical) 및 의약품의 인간 또는 동물 건강에 유익한 특성 분석에 관한 것이다. 더 나아가 본 발명의 구현예들은 그와 같은 제품들의 번역 개시 억제제로서의 활성 분석을 위하여 신규한 세포주를 사용한 세포 기반 분석을 채택하는, 개선된 방법을 포함한다.

배경 기술

[0005] 대부분의 발암성 및 세포 성장 조절 단백질의 발현이 번역과정에서 조절되기 때문에, 메신저 RNA(mRNA) 번역 개시는 세포 성장 및 악성 변형 조절에 있어 중대한 역할을 한다(Flynn et al., 1996, *Cancer Surv.* 27:293; Sonenberg et al., 1998, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:268). 이러한 이유로, 번역 개시는 엄격하게 조절되는 세포적 과정이다. 번역 개시의 음성적 조절의 실패는 암의 유도, 발병 및 진행을 야기할 수 있다(Donze et al., 1995, *Embo J.* 14: 3828; Rosenwald, 1996, *Bioessays* 18: 243-50; De Benedetti et al., 2004, *Oncogene* 23: 3189-99; 및 Rosenwald, 2004, *Oncogene* 23:3230). 열악하게 조절되는 번역 개시의 억제는 또한 변형된 표현형의 복귀를 야기할 수도 있다(Jiang et al., 2003, *Cancer Cell Int.* 3:2; Graff et al., 1995, *Int. J. Cancer* 60:255). eIF2/GTPMet-tRNA_i 복합체(3원 복합체로도 알려짐)는 번역 개시의 핵심 양성적 조절자이다. 그것의 이용도의 제한은 단백질 번역의 뉴 라운드의 개시를 단축한다. 많은 발암성 단백질 및 다른 세포 성장 인자들의 번역이 3원 복합체에 크게 의존하는 반면에, 하우스키핑 유전자는 그러하지 아니한데, 그러한 이유로 3원 복합체의 양, 이용도 또는 활성을 제한하는데 도움을 주는 식품, 기능성 식품 및 의약품은 잠재적으로 질병을 예방

하고 치료하는 안전한 수단을 제공한다. 또한, 특정 종양 억제자 및 프로-아포토시스 유전자 및/또는 단백질의 발현은 3원 복합체의 억제자 또는 보다 일반적으로 번역 개시의 억제자의 존재하에서 증가한다. 발암성 단백질 번역의 감소는, 특히 종양 억제자 및 프로-아포토시스 유전자의 상향 조절과 함께, 악성 표현형을 전체적으로 예방 및/또는 억제하는 경향이 있다.

[0006] n-3 다불포화 지방산(n-3 PUFA)인 에이코사펜타에노산(EPA)은 생선, 특히 한랭 해수 원산의 야생 군집의 어류로부터 유래한 오일에서 다량으로 발견된다. 양식된 어류는 야생 어류와 비교하여 전형적으로 훨씬 더 적은 n-3 PUFAs 레벨을 함유한다. 해양 생선 오일을 인간 전립선암 환자에게 투여한 경우 eIF2 α 가 인산화되는 것이 발견되었는데, 이는 3원 복합체에 대하여 기능적인 eIF2의 이용도가 감소하였음을 제시하는 것이며, 이는 동물 모델 또는 세포 기반 실험 시스템에 EPA 및 3원 복합체에 대한 합성 억제제를 사용한 경우의 발견과 일치하는 것이다. 따라서 번역 개시 억제제를 함유하는 식이 보충제는, 암 및/또는 비정상적 세포 증식을 특징적인 병리학적 이상 증세로 갖는 증식성 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 매력적인 상업적 제품을 나타낸다. 그와 같은 식이 보충제는 또한 번역 개시 조절제로서 작용할 수 있고 비만 및 당뇨병과 같은 대사 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 매력적인 상업적 제품을 나타낸다.

[0007] 다양한 원천으로부터 유래한 생선 오일은 식품 또는 영양 보충제로서 소비자에게 널리 이용가능하다. 제품의 상이한 생산 로트, 배치, 샘플 또는 용량 중에 함유되어 있는 오일 또는 오일 유래된 분획 또는 성분은, 그들의 원천(예컨대, 기후, 어류의 종류 또는 생장 조건, 공급자) 또는 가공 조건에 따라 질 또는 효능에 있어 달라질 수 있다. 심지어 제품의 단일 로트, 배치, 샘플 또는 용량의 성분에 있어서도 그러할 수 있다. 천연 또는 합성의 번역 개시 억제제를 함유하는 다른 식품, 기능 식품 또는 의약품도 유사한 이유로 그 질 또는 효능에 있어 상이할 수 있다.

[0008] 잠재적 소비자에 대한 제품의 생리학적 또는 의학적 효능에 관하여 품질 조절 및/또는 보증의 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 인간 질병에 대한 치료적/예방적 효능을 갖는 식이 보충물은 전세계적으로 빠르게 성장하는 수십억 달러 산업을 대표한다. 그러나, 본 산업에 있어 해결되지 않은 중요한 문제는 천연의 공급원으로부터 추출된 제품의 품질을 통제할 수가 없다는 것인데, 이는 특이적인 생물학적 활성 및 효능, 동일한 식물/동물 원천으로부터 추출/생산된 상이한 제조물 간의 생물학적 활성의 균질성, 및 동일한 식물 또는 동물 품종으로부터 추출되었지만 상이한 지리적 위치 및/또는 산업 공급원으로부터 유래한 제조물 간의 비슷한 효능을 보증하기 위한 것이다.

[0010] 번역 개시의 억제제, 상향 조절제 또는 다른 조절제들은 에너지 균형에 대한 넓은 스펙트럼의 효과를 가질 뿐만 아니라, 넓은 스펙트럼의 항암, 항세포 증식 효과를 갖는다. 번역 개시 억제제, 상향 조절제 또는 다른 조절제를 함유하는 기능 식품은 생선 오일 제조물을 제한 없이 포함하는데, 암을 포함하는 비정상적 세포 증식을 특징으로 하는 인간 질병을 예방하기 위하여 사용될 수 있었다. 그러나, 이러한 종류의 기능 식품의 생물학적 활성을 측정하기 위한 현존하는 생물 분석법의 부재는, 상이한 브랜드 또는 공급원 간에 있어서, 또는 단일의 브랜드 또는 공급원에서 유래한 상이한 배치 또는 생산품 간에 있어서, 품질, 효능 및/또는 균질성을 조절하는 것을 불가능하게 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 이에 따라, 예시적인 특정 구현예에 있어서, mRNA 번역 개시를 조절할 수 있는 제품의 능력에 관하여, 식품, 기능 식품 및 의약품의 품질을 조절 및/또는 보증하고, 그에 따라 그와 같은 제품들이 갖는 유익한 건강상의 이익에 관하여 소비자에게 정확한 정보 제공에 대한 요구를 충족시키는 방법이 제공된다.

[0012] 번역 개시에 대한 억제제, 상향 조절제 또는 조절제를 함유하는 화합물, 예컨대 기능 식품의 생물학적 활성을 정량적으로 분석하기 위하여 사용될 수 있는, 번역 개시-특이적 생물 분석법이 제공된다. 여기에서 제공되는 번역 개시-특이적 분석법은, 번역 개시의 억제제, 상향 조절제 또는 다른 조절제로서 작용하는 생산물, 예컨대 내인성인 생산물 또는 첨가물을 함유하는 기능 식품의 품질(예컨대, 생물학적 활성), 효능 및 배치 균일성을 산정한다.

[0013] 이러한 분석 방법은 식품, 기능 식품 또는 의약품의 주어진 시료가 번역 개시를 조절할 수 있는 정도를 측정하는 정확하고도 신속한 수단을 제공하고, 그로 인하여 그와 같은 제품을 소비하거나 또는 그와 같은 제품이 투여

되는 인간 또는 동물을 유익하게 한다. 이 분석 방법은 그와 같은 제품의 시료의 mRNA 번역 개시를 억제하는 능력에 대하여 테스트되는 것을 가능하게 한다. 본 명세서에 기술되는 예시적인 분석법들은, eIF2 α 의 인산화 또는 다른 방법을 통한 3원 복합체의 형성, 이용도 또는 활성을 억제하는 시료의 능력을 측정하는 것을 가능하게 한다.

[0014] 예시적인 특정 구현예에서, 특정 mRNA 전사체 번역을 상향 조절하는 제품의 시료의 능력을 테스트 할 수도 있다. 그와 같은 전사체 번역의 상향 조절은 그와 같은 시료 중에 포함되어 있는 EPA 또는 다른 3-n PUFAs의 존재, 레벨, 이용도 및/또는 활성을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, 5' 비번역 영역(5' UTRs)이 2개 이상의 오픈 리딩 프레임(ORFs)을 포함하는 특정 mRNA 전사체의 번역을 증가시키는 시료의 능력을 측정할 수도 있다. 특정 구현예에서, 대응 제품을 소비하거나 또는 대응 제품이 투여될 인간 또는 동물에 대한 건강상의 이점을 나타내는 시료의 효능 및/또는 능력의 측정자로서, ATF-4, BRCA1 mRNA, CD59, TCTP 및 GCN4의 1 이상의 번역을 증가시키는 시료의 능력을 시험할 수도 있다. 그와 같은 분석법은 이러한 mRNA의 상향 조절된 번역의 결과로서 생성되는 단백질의 증가된 양, 이용도 또는 활성을 측정할 수 있다. 마커 단백질 번역이 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 정도는 대조군을 사용한 시험 결과와 비교함으로써 측정될 수 있다. 특정 이론에 묶이지 않으면서, 그와 같은 증가된 번역은 eIF2 α 의 인산화 및/또는 3원 복합체의 억제에 의하여 촉진될 수 있다.

[0015] 본 발명은 시료 중에 포함된 EPA 또는 다른 3-n PUFAs의 존재하에서 전사가 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 유전자의 핵산 생성물을 측정함으로써, 식품, 기능 식품 또는 의약품 시료의 유익한 활성이 분석되는 것을 가능하게 한다.

[0016] 특정 구현예에서, 본 발명은 EPA, 다른 3-n PUFAs 또는 다른 유익한 제제의 존재하에서 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 유전자 전사체를 탐지하기 위한 방법을 제공한다. 그와 같은 전사체는, 비제한적 방식으로 ATF-4, BiP, CHOP, Xbp-1 및 아미노산 합성 효소를 코딩하는 것들을 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예들은, 역전사, 핵산 증폭(예컨대, 본 기술 분야에 알려진 PCR 또는 등온 증폭 방법) 또는 핵산 혼성화 방법을 통한 것과 같이, 그와 같은 단백질을 코딩하는 mRNA 전사체를 탐지하는 것을 제공한다. 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 유전자 전사의 탐지는, 예컨대 시험 또는 대조군 시료와 접촉하기에 앞서, DNA 전사를 발생할 수 있게 하는 시스템 중에서 관심 대상 유전자의 프로모터가 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 것과 같은 리포터 유전자 분석법을 사용하여 수행될 수 있다. 전사가 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 정도는 시험 시료 중에서 관찰되는 리포터 유전자 활성의 전사 레벨을, 외부 또는 내부(예컨대, 듀얼-리포터)의 표준 또는 대조군에 대하여 관찰되는 값과 비교함으로써 측정된다.

[0017] 예시적인 특정 구현예들은 EPA, 다른 3-n PUFAs 또는 다른 유익한 제제의 존재하에서 증가, 상향 조절 또는 다르게 조절되는 유전자 전사체에 의하여 코딩되는 단백질을 측정함으로써, 식품, 기능 식품 또는 의약품의 분석법을 제공한다. 그와 같은 단백질로는, 비제한적 방식으로 ATF-4, BiP, CHOP, Xbp-1 및 아미노산 합성 효소가 포함될 수 있다. 시험 시료의 존재하에서 관찰되는 그와 같은 단백질의 레벨은, 시험 시료의 효능을 측정하기 위하여 표준 또는 다른 대조군 시료의 존재하에서 관찰되는 단백질의 레벨과 비교될 수 있다.

[0018] 다른 구현예에서, 개별 조성물들 다수의 배치 균일성을 측정하는 방법이 제공되는데, 이는 개별 조성물들의 적어도 하나의 번역 개시 억제, 상향 조절 또는 다른 조절을 측정하고, 개별 조성물들의 적어도 하나의 번역 개시 억제, 상향 조절 또는 다른 조절 활성을 표준에 비교하여 배치 균일성을 측정하는 단계를 포함하는 것이다.

[0019] 이에 따라, 예시적인 특정 구현예에서, 물질(예컨대, 생선 오일로부터 유래하는 물질 및/또는 EPA를 함유하는 물질)이 1 이상의 유익한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 가지는지 여부를 측정하는 방법이 제공된다. 이 방법은 제2의 mRNA 서열이 제2의 바이오마커 단백질을 코딩하는 것으로서, 5' UTR에 적어도 2개의 오픈 리딩 프레임을 갖는 제2의 mRNA 서열을 함유하는 제2의 시료를 제공하는 단계, 제2의 시료를 물질과 접촉시키는 단계, 및 제1 및 제2 바이오마커 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계를 포함하는 것이고, 여기서 만일 물질이 1 이상의 유익한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 갖는다면, 제1의 바이오마커의 번역 레벨보다 제2의 바이오마커 단백질의 번역 레벨이 더 크게 된다. 특정 관점에 있어서, 제1의 시료는 표준 물질 또는 대조군 물질과 접촉된다. 다른 관점에 있어서 제1의 mRNA 및 제2의 mRNA는 동일한 서열을 갖는다. 다른 관점에서, 제1 바이오마커 단백질 및 제2 바이오마커 단백질은 동일한 단백질이다. 특정 관점에서 제1 및 제2의 바이오마커 단백질은 유방암 민감성 유전자 1 (BRCA1) 전사 b 생성물, 활성 전사 인자 4(ATF-4), 번역적으로 조절된 종양 단백질(TCTP), 프로텍틴(CD59) 및 일반 조절 논디프레서블 4(GCN4)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 관점에 있어서, 번역 레벨을 측정하는 단계는 웨스턴 분석법, ELISA 및 면역 세포 화학 중 1 이상에 의하여 수행된다. 특정 관점에서, 시료는 동물, 세포 또는 세포 프리 시스템(예컨대, 래빗 망상 적혈구 용해물 시스템)인데, 여기

서 DNA 전사 및/또는 mRNA 번역이 적절하게 발생할 수 있다. 세포는 인간, 다른 포유동물(마우스 및 래트를 제한 없이 포함함), 닭 또는 다른 조류 또는 이스트로부터 유래될 수 있다. 세포 프리 시스템은 래빗 망상 적혈구, 휘트-점 또는 HeLa S100와 같은 포유동물 세포의 세포질 추출물을 포함한다. 특정 관점에서, 5' UTR은 천연 발생 또는 합성의 것이다. 다른 관점에서, 5' UTR은 리포터 단백질을 코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 특정 관점에서, 번역 레벨은 리포터 단백질의 1 이상의 활성을 분석함으로써 측정된다. 다른 관점에서, 제2의 바이오마커 단백질의 번역 레벨은 제1의 바이오마커의 번역 레벨의 적어도 150%이다. 특정 관점에서, 물질은 n-3 다가불포화 지방산(PUFA) (예컨대, EPA(에이코사펜타엔산)) 활성에 대하여 분석된다. 특정 관점에서, 물질은 식품 시료, 기능 식품 시료 또는 의약품 시료이다.

[0020]

예시적인 특정 구현예에서, 물질(예컨대, 생선 오일로부터 유래한 물질 및/또는 EPA를 함유하는 물질)이 1 이상의 유의한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 갖는지를 측정하는 방법이 제공된다. 이 방법은 5' UTR에 적어도 2개의 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 서열을 포함하는 시료를 제공하는 단계(여기서, mRNA 서열은 바이오마커 단백질을 코딩함), 시료를 물질과 접촉시키는 단계, 바이오마커 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계, 및 내부 표준 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계를 포함하는 것이고, 여기서 만일 물질이 1 이상의 유의한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 갖는다면, 내부 표준 단백질의 번역 레벨보다 바이오마커 단백질 번역 레벨이 더 크게 된다. 특정 관점에서, 내부 표준 단백질은 5' UTR에 하나의 오픈 리딩 프레임을 갖거나 갖지 않는 mRNA 서열에 의하여 코딩되는 것이다. 다른 관점에서, 바이오마커 단백질은 BRCA1 전사 b 생성물, ATF-4, TCTP, CD59 및 GCN4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 관점에서, 번역 레벨을 측정하는 단계는 웨스턴 분석, ELISA 및 번역 세포 화학 중 1 이상에 의하여 수행된다. 또 다른 관점에서, 5' UTR은 천연적으로 발생한 것이거나 또는 합성의 것이다. 다른 관점에서 5' UTR은 리포터 단백질을 코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 관점에서, 번역 레벨은 리포터 단백질의 1 이상의 활성을 분석함으로써 측정된다. 다른 관점에서, 바이오마커 단백질의 번역 레벨은 내부 표준의 번역 레벨의 적어도 150% 이다. 특정 관점에서, 물질의 n-3 PUFA (예컨대, EPA) 활성이 분석된다. 특정 관점에서, 물질은 식품 시료, 기능 식품 시료 또는 의약품 시료이다.

[0021]

예시적인 특정 구현예에서, 본 발명은 물질(예컨대, 생선 오일로부터 유래된 물질 및/또는 EPA를 함유하는 물질)이 바이오마커 유전자의 전사적 상향 조절을 매개하는지 여부를 측정하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은 제1의 바이오마커 프로모터에 작동가능하게 연결된 제1의 리포터 단백질을 위한 코딩 영역을 갖는 mRNA 서열을 포함하는 제1의 시험 시스템을 제공하는 단계, 제2의 바이오마커 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2의 리포터 단백질을 위한 코딩 영역을 갖는 제2의 mRNA 서열을 포함하는 제2의 시험 시스템을 제공하는 단계, 제2의 시험 시스템을 물질과 접촉시키는 단계, 제1 및 제2의 mRNA 서열의 전사 레벨을 측정하는 단계, 제1 및 제2의 mRNA의 전사 레벨을 비교하여 제2의 mRNA 서열의 전사 레벨이 제1의 mRNA 서열의 전사 레벨보다 더 큰지 여부를 결정하는 단계, 및 물질이 바이오마커 유전자의 전사의 상향 조절을 매개하는 경우에는, 제1의 mRNA의 전사 레벨보다 제2의 mRNA의 전사 레벨이 더 크다면, 상기 물질을 바이오마커 유전자의 상향 조절자로서 밝히는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정 관점에서, 제1 및 제2의 시험 시스템은 동물 분석, 세포 기반 분석 또는 세포 프리 분석이다. 특정 관점에서, 제1의 시험 시스템은 표준 물질 또는 대조군 물질과 접촉된다. 다른 관점에서, 제1의 mRNA 및 제2의 mRNA는 동일한 서열을 갖고 및/또는 제1의 리포터 단백질 및 제2의 리포터 단백질은 동일한 단백질이다. 특정 관점에서, 전사 레벨은 실시간 PCR(예컨대, 인 비트로 또는 인 비보(예컨대, 세포 내에서))에 의하여 측정된다. 특정 관점에서, 전사 활성은 1 이상의 리포터 단백질 활성을 탐지함으로써 측정된다. 다른 관점에서, 바이오마커 유전자는 프로-아포토시스 단백질 또는 종양 억제 단백질(예컨대, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1, 아미노산 합성 효소 등)을 코딩한다. 특정 관점에서, 제2의 mRNA 서열의 전사는 제1의 mRNA 서열의 전사 레벨의 적어도 150%이다. 특정 관점에서, 물질은 n-3 PUFA(예컨대, EPA) 활성에 대하여 분석된다. 특정 관점에서 물질은 식품 시료, 기능 식품 시료 또는 의약품 시료이다.

[0022]

예시적인 특정 구현예에서, 본 발명은 품질이 조절된 생선 오일 제품을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 제1의 mRNA 서열의 5' 비번역 영역에서 적어도 2개의 오픈 리딩 프레임을 갖는 제1의 mRNA 서열을 포함하는 제1의 시료를 제공하는 단계(여기서, 제1의 mRNA 서열은 제1의 바이오마커 단백질을 코딩함), 제2의 mRNA 서열의 5' 비번역 영역(UTR)에서 적어도 2개의 오픈 리딩 프레임을 갖는 제2의 mRNA 서열을 포함하는 제2의 시료를 제공하는 단계(여기서, 제2의 mRNA 서열은 제2의 바이오마커 단백질을 코딩함), 제2의 시료를 접촉시키는 단계, 번역 레벨을 포함하고 생선 오일 제품을 밝히는 단계, 제1 및 제2의 바이오마커 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계(여기서, 생선 오일 제품이 대상체에 대하여 1 이상의 유의한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 제공할 수 있다면, 제1의 바이오마커의 번역 레벨보다 제2의 바이오마커 단백질의 번역 레벨이 더 크게 됨), 및 더 큰 번역 레벨을 갖는 생선 오일 제품을 품질 조절된 생선 오일 제품으로서 선별하는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정 관점에서, 제1의 시료는 표준 물질 또는 대조군 물질과 접촉된다. 다른 관점에서, 제1의 mRNA와 제2

의 mRNA는 동일한 서열을 갖는다. 또 다른 관점에서 제1의 바이오마커 단백질과 제2의 바이오마커 단백질은 동일한 단백질이다(예컨대, BRCA1 전사 b 생성물, ATF-4, TCTP, CD59 및 GCN4).

[0023] 예시적인 특정 구현예에서, 본 발명은 품질 조절된 생선 오일 제품을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 mRNA 서열의 5' 비번역 영역에 적어도 2개의 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA 서열을 포함하는 시료를 제공하는 단계(여기서, mRNA 서열은 바이오마커 단백질을 코딩함), 시료를 생선 오일 제품과 접촉시키는 단계, 바이오마커 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계, 내부 표준 단백질의 번역 레벨을 측정하는 단계, 비교하고 밝히는 단계(여기서, 만일 생선 오일 제품이 대상체에게 1 이상의 유의한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 제공한다면, 내부 표준 단백질의 번역 레벨보다 바이오마커 단백질의 번역 레벨이 더 크게 됨), 및 더 큰 번역 레벨을 갖는 생선 오일 제품을 품질 조절된 생선 오일 제품으로서 선별하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 바이오마커 단백질은 BRCA1 전사 b 생성물, ATF-4, TCTP, CD59 및 GCN4로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0024] 예시적인 특정 구현예에서, 본 발명은 품질 조절된 생선 오일 제품을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 제1의 바이오마커 프로모터에 작동가능하게 연결된 제1의 리포터 단백질에 대한 코딩 영역을 가지는 mRNA 서열을 포함하는 제1의 시험 시스템을 제공하는 단계, 제2의 바이오마커 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2의 리포터 단백질에 대한 코딩 영역을 갖는 제2의 mRNA 서열을 포함하는 제2의 시험 시스템을 제공하는 단계, 제2의 시험 시스템을 생선 오일 제품과 접촉시키는 단계, 제1 및 제2의 mRNA 서열의 전사 레벨을 측정하는 단계, 비교하고 선별하는 단계(여기서, 만일 생선 오일 제품이 대상체에게 1 이상의 유의한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특성을 제공할 수 있다면, 제1의 mRNA 서열의 전사 레벨보다 제2의 mRNA 서열의 전사 레벨이 더 크게 됨), 및 더 큰 번역 레벨을 갖는 생선 오일 제품을 품질 조절된 생선 오일 제품으로서 선별하는 단계를 포함한다. 특정 관점에서, 바이오마커 프로모터는 CHOP 프로모터, BiP 프로모터, ATF-4 프로모터, Xbp-1 프로모터 또는 아미노산 합성 효소 프로모터 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이거나 또는 번역 개시의 억제에 의하여 유사하게 유도되는 다른 프로모터이다.

[0025] 본 발명의 추가의 예시적인 특정 구현예에서, 오메가-3 지방산 활성의 결과로서 시료 중에 증가되는 전사체의 실시간 PCR과 같은 핵산 측정 방법을 사용하는, 측정을 위한 방법이 제공된다. 오메가-3 지방산에 의하여 전사적으로 상향 조절되는 프로모터의 영향하에서 유전자에 의하여 코딩되는 리포터 단백질의 활성 탐지를 통하여, 오메가-3 지방산의 활성의 결과로서 증가되는 전사체를 시료 중에서 측정하기 위한 방법이 추가로 제공된다. 5'UTRs 내에 2 이상의 오픈 리딩 프레임에 갖는 전사체의 증가된 번역을 탐지하는 방법이 추가로 제공된다. 오메가-3 지방산 활성의 결과로서 증가되는 전사체를 시료 중에서 탐지하는 방법을 사용하여, 품질 조절된 식품, 기능 식품 및 의약품을 제조하기 위한 방법이 또한 추가로 제공된다.

[0026] 본 발명의 추가의 예시적인 특정 구현예에서, 번역 개시 억제 활성을 갖는 조성물의 효능을 측정하는 방법이 제공되는데, 이는 eIF2 α -야생형(eIF2 α -WT) 세포를 상기 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 시간과 온도에서 상기 조성물에 접촉시키는 단계, 및 상기 조성물에 의하여 유도되는 상기 세포의 증식 억제의 정도를 측정하는 단계를 포함하는 것이고, 여기서 상기 조성물의 상기 활성은 상기 eIF2 α WT 세포의 증식 억제의 정도에 비례하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0027] 본 발명의 전술한 것과 다른 특징 및 이점들은, 수반하는 도면과 함께 고려되어 다음의 설명적인 구현예들의 상세한 설명으로부터 더 잘 이해될 것인데, 여기서

도 1은 eIF2 α 또는 β -액틴 항체를 사용한 웨스턴 블롯이다. 레인 1은 shRNA이 없이 pLVTHM 벡터에 의하여 형질 전환된 세포이고, 레인 2 및 3은 eIF2 α WT 및 eIF2 α S51A ORF 및 shRNA #1098 카세트를 포함하는 pLVTHM 벡터로 형질 전환된 세포이다.

도 2는 모체 (Mat) 및 재조합(Rec) eIF2 α WT(GFP) 및 eIF2 α S51A/RFP 또는 eIF2 α WT/RFP 세포 중에서 실시간 PCR에 의하여 측정된 내인성 eIF2 α mRNA 레벨을 보여주는 그래프이다. 레인 1은 shRNA 없이 pLVTHM 벡터로 형질 전환된 세포이고, 레인 2 및 3은 eIF2 α WT 및 eIF2 α S51A ORF 및 shRNA #1098 카세트를 함유하는 pLVTHM 벡터로 형질 전환된 세포이다.

도 3은 웨스턴 블롯이다. 도 2의 세포를 부형제 또는 EPA로 처리하였고, 용해물은 pS51-eIF2(상부) 또는 총 eIF2 α (하부)에 대한 항체로 탐지되었다. Rec= 재조합, End = 내인성 eIF2 α .

도 4는 eIF2 α S51A 발현 세포가 EPA에 의하여 유도된 세포 증식 억제에 대하여 저항성이었던 반면에, 재조합

eIF2 α RFP 및 shRNA으로 형질 전환된 모체 PC-3 세포 (MAT) 또는 PC-3 세포의 증식은 EPA에 의하여 유도되는 세포 증식의 억제에 용량 의존적 방식으로 민감하다는 것을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 어떤 mRNA들은 3원 복합체가 풍부할 때보다 부족할 때에 더 효율적으로 번역된다는 모순적인 관찰이 이루어진 적이 있다(Aktas et al., 2004, *Journal of Nutrition* 134(9): 2487S-2491S; Halperin and Aktas, 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/008333호). 이들은 전사 인자 ATF-4를 코딩하는 mRNA를 포함하는데, 이는 프로-아포토시스 C/EBP-동족 단백질(CHOP) 또는 ER 샤페론 결합 단백질(BiP)과 같은 많은 ER 스트레스 반응 유전자들을 전사적으로 상향 조절한다(Harding et al., 2000, *Mol. Cell* 6:1099). BRCA1 mRNA의 이소형태인 지정된 mRNAb 또한 3원 복합체가 드물 때에 효율적으로 번역된다. n-3 다가불포화 지방산 에이코사펜타엔산 (EPA)이 동물 암 모델 또는 인간 환자로부터 절제된 암 세포 및 종양 중에서, CHOP(진뱅크 수탁번호 S40706) 및 글루코스 조절된 단백질 78 (BiP, RefSeq 수탁번호 NM_005347)를 상향 조절하는 것으로 관찰되었고, 유방암 세포주 및 동물 종양 중에서 BRCA1 mRNA의 번역을 증가시키는 것으로 관찰되었다.
- [0029] BRCA1 mRNA 및 활성화 전사 인자 4(ATF-4, RefSeq 접근번호 NM_001675)를 코딩하는 mRNA 각각은 그것의 5' 비번역된 영역(5' UTR) 중에 다수의 오픈 리딩 프레임(ORFs)을 포함한다. 과학적 이론에 구애됨을 의도함이 없이, 그들 각각의 5' UTRs 중에 2 이상의 ORFs를 함유하는 추가의 mRNA가 이제 밝혀졌다. 그와 같은 mRNA는 번역적으로 조절된 종양 단백질(TCTP, RefSeq 수탁번호 NM_003295.2), 프로텍틴(CD59) 및 일반 조절 논디프레서블 4(GCN4, RefSeq 수탁번호 NC_00113)를 코딩하는 유전자들의 mRNA 전사체를 제한 없이 포함한다. 예시적인 특정 구현예에 따르면, 식품, 기능 식품 또는 의약품의 시료는 5' UTR에 다수의 ORFs를 갖는 mRNA 전사체에 의하여 코딩되는 단백질의 존재, 레벨 또는 생물학적 활성을 증가시키는 능력에 대하여 분석될 수 있다. 특히 그와 같은 시료는 1 이상의 BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 및 GCN4의 존재, 레벨 또는 활성의 증가를 매개하는 능력에 대하여 분석될 수 있다.
- [0030] 특정 유전자 전사의 증가는 또한 3원 복합체 억제제의 존재하에서 발생할 수 있다. ATF-4, BiP 및 CHOP을 코딩하는 유전자에 더하여, 번역 개시 억제제의 존재하에서 증가된 전사를 나타내는 유전자들은 X-박스 결합 단백질 1(Xbp-1, RefSeq 수탁번호 NM_001079539.1) 및 아미노산 합성 효소를 코딩하는 것들이다. 그와 같은 유전자들은 생선 오일 중에서 발견되는 것들과 같은, 본 발명에 따라 분석되는 번역 개시 억제제를 위한 적절한 시험 바이오마커를 제공한다. 이러한 유전자 전사체들은 시험 식품, 기능 식품 또는 의약품 시료에 대해 시험 동물 세포 또는 세포 프리 시스템을 노출하기 전 및 후에, 본 기술분야에서 알려진 방법을 사용하여 탐지되고, 레벨이 정량화될 수 있으며, 전사체의 레벨은 시험 시료가 마커 유전자의 전사를 촉진한 정도를 측정하기 위하여 비교될 수 있다. 또는, 시험 바이오마커 전사체의 레벨은 대조군 전사체의 것(예컨대, 하우스키팅 유전자의 것)과 비교되거나, 또는 알려진 생물학적 활성을 갖는 표준 또는 대조군에 노출된 동물, 세포 또는 세포 프리 시스템으로부터 분리된 전사체에 대하여 비교될 수 있다. 유사하게, 바이오마커 전사체의 단백질 생성물이 탐지되고 정량화될 수 있으며, 그들의 레벨을 처리되지 않은 동물, 세포 또는 세포 프리 시스템의 레벨과 비교하거나 또는 알려진 생물학적 활성을 갖는 표준 또는 대조군에 노출된 동물, 세포 또는 시스템과 비교할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능 식품(Nutraceutical)"은 영양 및 약학의 조합으로서 인간과 같은 유기체에 게 1 이상의 유익한 효과를 갖는 섭취가능한 물질을 의미한다. 또한, 용어 기능식품은 섭취가능한 물질 중에 존재하는 1 이상의 화합물을 의미할 수도 있다. 섭취가능한 물질로는 식이 보충제, 식품, 음료 et al.을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 용어 "기능 식품(Nutraceutical)" 및 "영양 보충제(Nutritional supplement)"는 교환가능하게 사용될 수도 있다. 유익한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학적 특징을 갖는 물질(예컨대, 식품, 기능 식품 또는 의약품)이란, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이(예컨대, 본 명세서에 기술되는 바와 같은 1 이상의 질병 및/또는 질환을 예방, 감소 및/또는 치료하는데 있어서), 개체에게 1 이상의 건강상의 유익함을 제공할 수 있는 물질의 능력을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 기능 식품은 한류성 어류, 온류성 어류, 담수 어류, 해수 어류, 기수 어류(brackish water fish), 야생 어류, 양식 어류 et al.과 같은 생선으로부터 유래하는 오일과, 오메가-3 지방산을 함유하는 것과 같은 지방산 제조물을 포함한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 오메가-3 지방산은 고et al.어, 연어, 정어리 등과 같은 기름이 많은 생선, 또는 치아(chia), 들깨, 아마, 호두, 쇠비름, 링곤베리 (lignonberry), 산자나무(seabuckthorn), 대마 등의 씨앗과 아사이 팜과 같은 식물의 과일과 같은 식물성 공급원으로부터 유래한 오일에서 발견되는 것들과 같은 다가불포화 지방산을 의미한다. 오메가-3 지방산은 α -리놀렌산(ALA), 에이코사펜타엔산(EPA), 도코사헥사에노산(DHA)

등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0034] 본 발명의 특정 관점은 번역 개시 또는 유전자 전사를 억제, 상향 조절 또는 조절하는 조성물의 효능을 결정하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "효능"은 화합물, 예컨대 기능 식품의 번역 개시 또는 유전자 전사를 억제, 상향 조절 또는 다르게 조절하는 효과를 포함하는 것으로 의도된 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 조성물의 효능은 표준 또는 대조군과 비교하여, 번역 개시 또는 유전자 전사를 억제, 상향 조절 또는 다르게 조절하는 조성물의 능력으로 정의될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 표준 또는 대조군은 본 명세서에서 기술되는 생물 분석법의 1 이상에 의하여 측정되는 때에 번역 개시- 또는 전사 억제, 상향 조절 또는 조절 활성을 갖는 화합물 또는 조성물이다. 표준은 오메가-3 지방산 또는 여기서 기술되는 다른 제제의 공급원과 같은 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 표준은 실험실 내에서 합성되거나 또는 상업적 공급원으로부터 얻을 수도 있다. 표준은 그것의 번역 억제, 상향 조절 또는 조절 활성을 각각 감소 또는 증가시키기 위하여 회석되거나 또는 농축될 수 있다. 또는, 표준 또는 대조군은 시험 시스템에 대하여 내부적일 수 있는데, 예컨대 시험 물질에 의하여 전사 또는 번역이 실질적으로 영향을 받지 않는 유전자, 유전자 프로모터 mRNA 전사체 또는 단백질(예컨대, 하우스키핑 유전자, 프로모터, 전사체 또는 단백질), 예컨대 β -액틴, 유비퀴틴, b-튜블린, GAPDH 등일 수 있다.
- [0036] 특정 관점에서, 표준 또는 대조군은 에이코사펜타엔산과 같은 오메가-3 지방산이다. 표준 또는 대조군은 생선 오일(예컨대, 해양 생선 오일) 또는 아마씨 오일로부터 유래될 수도 있다.
- [0037] 다른 관점에서, 표준 또는 대조군은 효능 또는 생물학적 활성이 분석되는 물질의 효과에 대하여 실질적으로 둔감한 바이오마커이다. 유전자 또는 유전자 프로모터의 전사적 조절 또는 mRNA 전사체 또는 단백질의 번역적 조절과 관련하여 이러한 문맥에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로 둔감한"이란 시험 물질에 의하여 전혀 영향을 받지 않거나, 시험 물질의 활성에 대하여 바이오마커보다 현저하게 더 낮은 정도로(예컨대, 적어도 10-배, 100-배, 1000-배 또는 1000-배 이상 더 낮은 정도로) 조절되는 것을 의미한다.
- [0038] 특정 관점에서, 시험 시료는 그것의 활성 성분이 선행 범위에 있고, 시험 시스템을 포화시키지 않도록 교정된다. 교정의 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 단순한 회석, 일련의 회석 등을 포함한다.
- [0039] 본 발명은 조성물의 번역 또는 전사 억제, 상향 조절 또는 조절 활성을, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 생물 분석법 중 1 이상을 사용하여, 표준과 비교하는 분석 방법을 제공한다. 조성물은 표준 또는 대조군의 활성의 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185%, 190%, 195%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 또는 1000% 보다 높은 활성 레벨을 가질 수도 있다.
- [0040] 특정 관점에서, 번역 개시 또는 유전자 전사와 관련한 활성의 억제, 상향 조절 또는 다른 조절은 표준 또는 대조군 활성의 약 1% 내지 200%, 약 5% 내지 195%, 약 10% 내지 190%, 약 20% 내지 180%, 약 30% 내지 170%, 약 40% 내지 160%, 약 50% 내지 150%, 약 60% 내지 140%, 약 65% 내지 135%, 약 70% 내지 130%, 약 75% 내지 125%, 약 80% 내지 120%, 약 85% 내지 115%, 약 90% 내지 110%, 약 91% 내지 109%, 약 92% 내지 108%, 약 93% 내지 107%, 약 94% 내지 106%, 약 95% 내지 105%, 약 96% 내지 104%, 약 97% 내지 103%, 약 98% 내지 102%, 또는 약 99% 내지 101%이다. 다른 관점에서, 번역 개시 또는 유전자 전사와 관련한 억제, 상향 조절 또는 다른 조절은 표준 활성의 약 50% 내지 150%, 표준 활성의 약 80% 내지 120%, 표준 활성의 약 90% 내지 110%, 또는 표준 또는 대조군 활성의 약 95% 내지 약 105%이다.
- [0041] 용어 "약" 또는 "대략"은 값의 종류 및 측정의 방법에 대하여 수용가능한 오차 범위 이내를 일반적으로 의미한다. 예를 들어, 이는 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 더 좋기로는 10% 이내, 그리고 가장 더 좋기로는 5% 이내를 의미할 수 있다. 또는, 특히 생물학적 시스템에서, 용어 "약"은 주어진 값의 대략 1 로그 이내 (즉, 한도 이내), 좋기로는 1 또는 2 인자 이내를 의미한다.
- [0042] 본 발명의 특정 구현예에서, 대조군 또는 표준은 제로 활성을 가질 수도 있다. 따라서, 주어진 활성에 대하여 2 원의 결과(즉, 양성적 또는 음성적)가 얻어질 수 있다. 그와 같은 경우, 만일 활성의 정확한 정량화가 필요하다면, 절대 스케일 상에서 측정되거나 또는 알려진 레벨의 적어도 몇 가지 활성을 가지는 표준과 비교하여 측정될 것이다.
- [0043] 기능 식품 또는 본 발명의 기능 식품을 함유하는 조성물은 대조군/표준과 비교하여 그들의 번역 또는 전사

억제, 상향 조절 또는 조절 활성을 각각 감소 또는 증가시키기 위하여 회석되거나 농축될 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한 본 명세서에서 기술되는 분석법 1 이상을 사용하여, 2 이상(예컨대, 10, 100, 1000, 10,000, 1,000,000 또는 그 이상)의 조성물의 상대적인 활성을 비교함으로써, 조성물들의 배치 또는 로트 균일성을 측정하는 분석법을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "배치 균일성" 또는 "로트 균일성"은 배치 또는 로트 중의 2 이상의 조성물의 상대적인 번역 개시 억제, 상향 조절 또는 조절 활성, 또는 번역 상향 조절 활성을 의미하는 것으로 의도되지만 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "배치" 또는 "로트"는 2 이상의 조성물의 그룹을 제한 없이 의미한다. 배치 또는 로트는 2 이상의 공급원(예컨대, 지리학적, 식물, 동물, 상업적 및/또는 합성적 공급원)으로부터 유래한 조성물 또는 함께 제조된 조성물을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "배치" 또는 "로트"는 또한 조성물의 단일의 풀을 의미할 수도 있는데, 여기로부터 제품 또는 시험 시료의 단위가 유래되거나 생성될 것이며, 또는 다르게 더욱 분할되거나 또는 분획될 것이다.

[0045] 적어도 특정 실시예에서는, 본 명세서에 개시된 기능 식품은 세포 증식 질환(예컨대, 암)과 같은 비정상적 세포 증식과 관련된 질환을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 세포 증식 질환의 치료는 급속한 증식을 포함하는 증식을 억제하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포 증식 질환"은, 다세포 유기체 내에서 세포들의 1 이상의 하부 집단의 바람직하지 않은 또는 적절하지 않은 증식을 특징으로 하는 질환을 포함한다. 용어 "암"은 악성 신생물의 다양한 종류를 의미하는데, 그들 대부분은 주변 조직을 침범할 수 있고, 다른 부위로 전이될 수도 있다(예컨대, 문헌 PDR Medical Dictionary 1st edition, 1995 참조). 용어 "신생물" 및 "종양"은 세포 증식에 의하여 정상보다 빠르게 자라나고, 증식을 개시시켰던 자극이 제거된 후에도 성장을 계속하는 비정상적인 조직을 의미한다(예컨대, 문헌 PDR Medical Dictionary 1st edition, 1995 참조). 그러한 비정상적인 조직은 구조적인 유기성 및 정상적인 조직과의 기능적 합동을 부분적으로 또는 완전하게 결여하는 것으로 나타나는데, 이는 양성(즉, 양성 종양)이거나 또는 악성(즉, 악성 종양)일 수도 있다.

[0046] 용어 "세포 증식 질환의 치료"는 대상체 내에서 신생물의 유도, 개시, 수립 또는 성장을 예방하는 것 또는 대상체 내에 미리 존재하는 신생물의 성장 감소를 포함하는 것으로 의도된다. 그 용어는 또한 신생물 세포가 이웃 조직으로 침범하거나, 한 부위에서 다른 부위로 신생물이 전이되는 것을 억제하는 것을 기술할 수도 있다. 본 발명에 의하여 포괄되는 것으로 의도되는 신생물 종류의 예시로는 유방, 피부, 골, 전립선, 난소, 자궁, 자궁경부, 간, 폐, 뇌, 후두, 담낭, 췌장, 직장, 부갑상선, 갑상선, 부신, 면역 시스템, 신경 조직, 두경부, 결장, 위장, 기관지 및/또는 신장의 암들과 관련된 신생물들을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 세포 증식 질환은 증식성 심혈관 질환, 예컨대 아테롬성 동맥경화증 및 재발협착증과 같은 혈관 민무늬 근육 세포의 증식과 관련된 질환을 추가로 포함할 수 있다. 또한 세포 증식 질환은 증식적인 피부 질환, 예컨대 반성 유전성 어린선, 건선, 아토피성 피부염, 알레르기 접촉성 피부염, 표피 박탈 및 지루성 피부염과 같은 질환을 포함할 수 있다. 또한 세포 증식성 질환은 ADPKD(autosomal dominant polycystic kidney disease), 마스토사시토시스(mastocytosis) 및 바이러스와 같은 감염원에 의하여 야기되는 세포 증식 질환과 같은 질환들을 추가로 포함할 수 있다.

[0048] 적어도 특정 실시예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 따라 분석 및/또는 생산되는 기능 식품은, 대사 질환과 같은 에너지 균형과 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있는데, 이는 당뇨병, 비만, 글리코겐 저장 질환, 지방 저장 질환, 미토콘드리아 질환 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다(또한, 월드와이드웹: emedicine.com/ped/GENETICS_AND_METABOLIC_DISEASE.htm 참조). 특정 관점에서, 본 명세서에서 개시되는 방법에 따라 분석되고 및/또는 생산되는 기능 식품은 랩트 수용체의 5' UTR와 상호작용함으로써 체중 증가를 조절한다.

[0049] 본 명세서에 기술된 검출 방법은 인 비트로 및 인 비보 생물학적 시료 중에서 관심있는 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드 하나 이상을 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, mRNA 검출을 위한 인 비트로 기술로는 노던 혼성화 및 인 시투 혼성화가 포함된다. 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩타이드 검출을 위한 인 비트로 기술로는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assays), 웨스턴 블롯, 면역 침전법 및 면역 형광법이 포함된다. 게놈 DNA를 검출하기 위한 인 비트로 기술로는 서던 혼성화가 포함된다. 그뿐만 아니라, 단백질 및/또는 폴리펩타이드의 검출을 위한 인 비보 기술로는 단백질 및/또는 폴리펩타이드에 대한 표지된 항체를 대상체 내로 도입하는 것이 포함된다. 예를 들어, 항체는 대상체 내의 존재 및 위치가 표준 영상 기술에 의하여 탐지될 수 있는 방사능 마커로 표지될 수 있다.

[0050] 검출 및/또는 정량의 일반적 원리는 관심 대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드 1 이상과 프로브를 포함할 수 있는 시료 또는 반응 혼합물을 마커와 프로브가 상호작용하고 결합할 수 있는 적절한 조건 및 충

분한 시간하에서 준비하여, 반응 혼합물 중에서 제거되거나 및/또는 검출될 수 있는 복합체를 형성시키는 것과 관련된다. 이러한 분석법은 다양한 방식으로 수행될 수 있다.

- [0051] 예를 들어, 그와 같은 분석을 수행하기 위한 하나의 방법은 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 프로브를, 기질로도 언급되는 고상 지지대 위에 연결하고, 반응의 마지막에 고상에 연결된 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드/프로브 복합체를 검출하는 것과 관련된다. 그와 같은 방법의 하나의 구현예에서, 마커의 존재 및/또는 농도에 대하여 분석되어질 시료는 캐리어 또는 고상 지지체 상에 연결될 수 있다. 다른 구현예에서 역의 상황이 가능한데, 여기서는 프로브가 고상에 결합되고, 대상체로부터 유래한 시료가 분석의 결합되지 않은 성분으로서 반응하는 것이 허용될 수 있다.
- [0052] 분석 성분을 고상에 연결하는 많은 확립된 방법들이 존재한다. 여기에는 바이오틴 및 스트렙타비딘의 컨주게이션을 통하여 고정화된 마커 또는 프로브 분자가 제한 없이 포함된다. 그와 같은 바이오티닐화 분석 성분은 본 기술분야에서 알려진 기술(예컨대, 바이오티닐화 키트, Pierce Chemicals, Rockford, IL)을 사용하여 바이오틴-NHS(N-hydroxy-succinimide)로부터 제조될 수 있고, 스트렙타비딘-코팅된 96 웰 플레이트(Pierce Chemical)의 벽에 고정될 수 있다. 특정 구현예에서 고정화된 분석 성분을 구비한 표면은 미래 준비되어 저장될 수 있다.
- [0053] 그와 같은 분석을 위한 다른 적합한 캐리어 또는 고상 지지대로는 마커 또는 프로브가 속하는 분자 종류에 결합할 수 있는 그 어떠한 물질이라도 포함된다. 잘 알려진 지지대 또는 캐리어로는 유리, 폴리스티렌, 나일론, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리에틸렌, 텍스트란, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철석이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 언급된 접근법을 사용하여 분석을 수행하기 위하여, 비 고정화된 성분을 고상에 첨가하는데, 여기에 제2의 성분이 결합된다. 반응이 완결된 후에, 형성된 복합체 그 어떠한 것이라도 고상 위에 고정화된 채로 남아있게 할 조건하에서, 복합되지 않은 성분을 제거한다(예컨대, 세척에 의하여). 고상에 연결된 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드/프로브 복합체의 검출은 여기에서 개괄되는 다수의 방법 중에서 달성될 수 있다.
- [0055] 특정 예시적인 구현예에서, 프로브는, 그것이 연결되지 않은 분석 성분인 경우, 분석의 검출 또는 판독의 목적을 위하여 본 기술분야의 숙련된 자들에게 잘 알려진 검출가능한 마커를 사용하여, 직접적 또는 간접적으로 표시될 수 있다. 검출 가능한 마커의 예로는 다양한 방사능 모이어티, 효소, 보철 그룹, 형광 마커, 발광 마커, 생발광 마커, 금속 입자, 단백질-단백질 결합 쌍, 단백질-항체 결합 쌍 등이 포함된다. 형광 단백질의 예로는 황색 형광 단백질(YFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 시안 형광 단백질(CFP), 엠벨리페론, 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 단일 염화물, 피코에리트린 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 생물 발광 마커의 예로는 루시페라제(예컨대, 박테리아, 반딧불이, 방아벌레 등), 루시페린(luciferin), 에퀴린(aequorin) 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 시각적으로 검출가능한 신호를 갖는 효소 시스템의 예로는 갈락토시다제, 글루코리니다제, 포스파타제, 페록시다제, 클로레스테라제 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 동정 가능한 마커로는 ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^3H or ^{32}P 와 같은 방사능 화합물이 포함된다. 동정 가능한 마커들은 다양한 공급원으로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0056] 형광 라벨 및 뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드에 대한 그들의 부착은 다양한 평론에서 기술되고 있다(예컨대, 문헌 Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Ninth Edition (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002); Keller and Manak, *DNA Probes*, 2nd Edition (Stockton Press, New York, 1993); Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); 및 Wetmur, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26:227-259 (1991)을 포함함). 본 발명에 적용가능한 특정 방법론들이 다음의 참고 샘플에 개시되어 있다: 미국특허 제4,757,141호, 제5,151,507호 및 제5,091,519호. 하나의 관점에서 형광 염료의 1 이상이 표지로서 사용되는데, 예컨대 미국특허 제5,188,934호(4,7-디클로로플루오레신 염료); 제5,366,860호(스펙트럼 분석가능한 로다민 염료); 제5,847,162호(4,7-디클로로로다민 염료); 제4,318,846호(에테르-치환된 플루오레신 염료); 제5,800,996호(에너지 전달 염료); Lee et al.; 제5,066,580호(잔틴 염료); 제5,688,648호(에너지 전달 염료) 등에서 개시되는 바와 같은 것들이 있다. 표지는 또한 다음의 특허 및 특허공개 문헌에서 개시되는 바와 같이, 쿼텟 닷을 사용하여 수행될 수도 있다: 미국특허 제6,322,901호, 제6,576,291호, 제6,423,551호, 제6,251,303호, 제6,319,426호, 제6,426,513호, 제6,444,143호, 제5,990,479호, 제6,207,392호, 제2002/0045045호 및 제2003/0017264호. 본 명세서에서 사용되는 용어 "형광 라벨"은 1 이상의 분자의 형광 흡수 및/또는 발광 특성을 통하여 정보를 전달하는

신호 모이어티를 포함한다. 그와 같은 형광 특성으로는 형광 강도, 형광 지속시간, 발광 스펙트럼 특성, 에너지 전달 등이 포함된다.

[0057] 다른 구현예에서, 마커를 인식하는 프로브의 능력은 실시간 생분자 상호작용 분석(BIA) (예컨대, Sjolander et al. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338 2345 및 Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699 705 참조)과 같은 기술을 사용하여 어느 하나의 분석 성분(프로브 또는 마커) 을 표지하지 않고 달성될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "BIA" 또는 "표면 플라스몬 공명"은 상호작용하는 것들(예컨대, BIAcore) 중 어느 하나를 표지하지 않고, 실시간으로 생물 특이적 상호작용을 연구하기 위한 기술이다. 결합 표면에서 질량의 변화(결합됨을 지시)는, 생물학적 분자 간의 실시간 반응에 대한 지시자로서 사용될 수 있는 검출가능한 신호를 야기하면서, 표면 근처 빛의 굴절율의 변화를 야기한다(표면 플라스몬 공명(SPR)의 광학적 형상).

[0058] 또는, 다른 구현예에서, 유사 검출 및/또는 정량화 분석법이, 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드 1 이상 및 프로브를 액상 내의 용질로서 사용하여 수행될 수 있다. 그와 같은 분석법에서, 복합된 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드 및 프로브는 수개의 표준 기술 중 임의의 것을 사용하여 복합되지 않은 성분으로부터 분리되는데, 여기에는 분별 원심분리, 크로마토그래피, 전기영동 및 면역 침전법이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 분별 원심분리에서, 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드/프로브 복합체는, 그들의 상이한 크기 및 밀도에 근거한 복합체의 상이한 침전 평형으로 인하여, 일련의 원심분리 단계를 통하여 복합되지 않은 분석 성분들로부터 분리될 수 있다(예컨대, 문헌 Rivas and Minton (1993) *Trends Biochem Sci.* 18:284 참조). 표준 크로마토그래피 기법 또한 복합되지 않은 것들로부터 복합된 분자를 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피는 크기에 근거하여, 그리고 컬럼 포맷 내 적절한 겔 여과 레진의 활용을 통하여 분자들을 분리한다; 예를 들어, 상대적으로 더 큰 복합체는 상대적으로 더 작은 비복합 성분으로부터 분리될 수 있다. 이와 유사하게 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드/프로브 복합체의 비복합된 성분들과 비교하여 상대적으로 상이한 전하 특성을 이용하여 비복합된 성분들로부터 복합체를 분리할 수 있는데, 예를 들어 이온 크로마토그래피 레진의 활용을 통하여 할 수 있다. 그와 같은 레진 및 크로마토그래피 기술은 본 기술분야의 숙련된 자에게 잘 알려져 있다(예컨대, 문헌 Heegaard (1998) *J. Mol. Recognit.* 11:141; Hage and Tweed (1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 12:499 참조). 겔 전기영동 또한 결합되지 않은 성분들로부터 복합된 분석 성분들을 분리하기 위하여 채택할 수 있다(예컨대, 문헌 Ausubel et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987 1999 참조). 이러한 기술에서, 단백질 또는 핵산 복합체는 예컨대 크기 또는 전하에 기초하여 분리된다. 전기 영동 과정 중에 결합 상호작용을 유지하기 위하여, 환원제의 부재하에서 비변성 겔 매트릭스 물질 및 조건이 전형적으로 선호된다. 특정 분석에 대한 적절한 조건 및 그의 요소들은 본 기술분야의 숙련된 자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0059] 특정 예시적인 구현예에서, 관심 대상 mRNA 서열의 레벨은 본 기술분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 생물학적 시료 내에서 인 시투 및/또는 인 비트로 측정될 수 있다. 많은 발현 검출 방법이 분리된 RNA를 사용한다. 인 비트로 방법을 위하여, 혈액 세포로부터 RNA를 정제하기 위하여, mRNA의 분리에 대하여 선택적이지 않은 임의의 RNA 분리기술을 활용할 수 있다(예컨대, 문헌 Ausubel et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987 1999 참조). 추가적으로, 예컨대 콤크진스키(Chomczynski)의 단일 단계 RNA 분리 과정(1989, 미국특허 제4,843,155호)과 같이, 본 기술분야에서 숙련된 자들에게 잘 알려진 기술을 사용하여 다수의 세포 및/또는 시료를 용이하게 처리할 수 있다.

[0060] 분리된 mRNA는 혼성화 또는 증폭 분석에 사용될 수 있는데, 여기에는 서던 또는 노던 분석법, 폴리머라제 연쇄 반응 분석 및 프로브 분석법이 제한 없이 포함된다. 특정 예시적인 구현예에서, mRNA 레벨 검출을 위한 진단적 방법은 탐지 대상 유전자에 의하여 코딩되는 mRNA에 혼성화 할 수 있는 핵산 분자(프로브)와 분리된 mRNA를 접촉시키는 것과 관련된다. 핵산 프로브는 예를 들어, 전장 cDNA 또는 그의 일부분, 예컨대 적어도 7, 15, 30, 50, 100, 250 또는 500 뉴클레오타이드 길이를 갖고 본 발명의 마커를 코딩하는 mRNA 또는 게놈 DNA에 엄격한 조건하에서 특이적으로 혼성화하기에 충분한 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 분석 방법에 사용되기 위한 다른 적절한 프로브는 본 명세서에서 기술된 바와 같다.

[0061] 하나의 방식에서, mRNA는 고체 표면 위에 고정되고 프로브와 접촉되는데, 예를 들어 아가로스 겔 위에 분리된 mRNA를 걸고, 겔로부터 니트로셀룰로오스와 같은 멤브레인으로 mRNA를 전달시키는 것에 의할 수 있다. 또 다른 방식에서, 프로브는 예컨대 유전자 칩 분석에서 고체 표면 위에 고정되고 mRNA를 프로브와 접촉시킬 수 있다. 숙련된 기술자는 본 발명의 마커에 의하여 코딩되는 mRNA의 레벨 탐지에 사용하기 위하여, 알려진 mRNA 탐지 방

법을 용이하게 채택할 수 있다.

- [0062] 시료 중의 본 발명의 마커에 대응하는 mRNA 레벨을 결정하는 또 다른 방법은, 핵산 증폭의 과정, 예컨대 rtPCR (미국특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호에 기술된 실험 구현예), COLD-PCR(Li et al. (2008) *Nat. Med.* 14:579), 리가아제 연쇄 반응(Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189), 자가 지속되는 서열 복제 (Guatelli et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874), 전사적 증폭 시스템(Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173), Q-베타 레플리카제(Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), 롤링 순환 복제(미국특허 제5,854,033호) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법의 과정 및 이를 뒤따르는 증폭된 분자를 본 기술분야에서 숙련된 자들에게 잘 알려진 기술을 사용하여 탐지하는 과정과 관련된다. 이러한 검출 계획은 만일 그와 같은 분자가 매우 적은 숫자로 존재하는 경우에 핵산의 검출에 특히 유용하다. 본 명세서에 사용되는 증폭 프라이머는, 유전자의 5' 또는 3' 영역(플러스 및 마이너스 가닥 각각, 또는 역으로)으로 어닐링 될 수 있고, 사이에 짧은 영역을 포함하는 핵산의 쌍으로 정의된다. 일반적으로 증폭 프라이머는 길이가 약 10 내지 30 뉴클레오타이드이고, 길이가 약 50 내지 200 뉴클레오타이드인 영역을 플랭크한다. 적절한 조건 및 적절한 시약과 함께, 그와 같은 프라이머는 프라이머에 의하여 플랭크되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자의 증폭을 가능하게 한다.
- [0063] 인 시투 방법을 위하여, mRNA는 검출에 앞서 시료(예컨대, 체액(혈액 세포 등))로부터 분리될 필요가 없다. 그와 같은 방법에서 세포 또는 조직 시료는 알려진 조직학적 방법을 사용하여 제조/가공된다. 그 다음 시료를 지지대, 전형적으로는 유리 슬라이드에 고정시키고, 그 다음 마커를 코딩하는 mRNA에 혼성화 할 수 있는 프로브와 접촉시킨다.
- [0064] 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드의 절대 발현 레벨에 근거하여 측정을 수행하는 것에 대한 대안으로서, 측정이 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드의 평균화된 발현 레벨에 근거할 수도 있다. 발현 레벨은 그것의 발현을 마커가 아닌 유전자, 예컨대 표준 또는 대조군 유전자의 발현과 비교하여, 관심대상 DNA 서열, RNA 서열, 단백질 또는 폴리펩타이드의 절대 발현 레벨을 보정함으로써 평준화된다. 이러한 평준화는 하나의 공급원으로부터 유래한 시료부터 다른 공급원으로부터 유래한 시료까지 발현 레벨의 비교를 가능하게 한다.
- [0065] 다른 예시적인 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩타이드가 검출된다. 특정 예시적 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드를 검출하기 위한 제제는 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 항체인데, 예컨대 검출가능한 라벨을 갖는 항체이다. 항체는 폴리클론, 더 좋기로는 단일클론일 수 있다. 온전한 항체 또는 그의 단편(예컨대, Fab 또는 F(ab')₂)을 사용할 수 있다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은, 프로브 또는 항체에 검출가능한 물질을 커플링(즉, 물리적으로 연결)함으로써 프로브 또는 항체를 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지되는 다른 시약과의 반응성에 의하여 프로브 또는 항체를 간접적으로 표지하는 것도 포괄하도록 의도된다. 간접적인 표지의 예로는, 형광적으로 표지된 2차 항체를 사용하는 1차 항체의 검출과 형광적으로 표지된 스트렙타비딘을 이용하여 검출될 수 있도록 바이오틴으로 DNA 프로브를 말단표지하는 것이 포함된다.
- [0066] 폴리클론 항체는 선택된 단백질 또는 폴리펩타이드를 이용하여 적절한 대상체를 면역화함으로써 제조될 수 있다. 면역화된 대상체에서 선택된 단백질 역가는 고정화된 단백질을 사용하는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)와 같은 표준 기술을 사용하여, 시간에 걸쳐 모니터링될 수 있다. 필요한 경우, 선택 단백질에 대한 항체 분자를 포유동물로부터(예컨대, 혈액으로부터) 분리하고, IgG 분획을 얻기 위한 단백질 A 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 기술을 사용하여 추가로 정제할 수 있다. 면역 후 적절한 시점에, 예를 들어 항-선택 단백질 항체의 역가가 최고인 때에, 항체-생성 세포를 대상체로부터 얻고 표준 기술에 의하여 단일클론 항체를 제조하는데 사용할 수 있는데, 표준 기술로는 예컨대 콜러(Kohler)와 밀스타인(Milstein)에 의하여 기술된 하이브리도마 기술(Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497)(또한 참고문헌으로, Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; 및 Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), EBV-하이브리도마 기술(Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 또는 트리오마(trioma) 기술 등이 있다. 단일클론 항체 하이브리도마를 생성하기 위한 기술은 잘 알려져 있다(일반적으로, 문헌 R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter et al. (1977) *Somatic Cell Genet.*

3:231-36 참조). 간단하게 말하면, 불멸의 세포주(전형적으로 골수종)를 상기 기술한 바와 같은 선택 단백질에 의하여 면역화된 포유동물로부터 유래한 림프구(전형적으로 비장 세포)와 융합시키고, 얻어진 하이브리도마 세포의 배양 상층액을 스크리닝하여 선택 단백질에 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 밝혀낸다.

[0067] 시료가 주어진 항체에 결합하는 단백질을 함유하는지 결정하기 위하여 다양한 방식이 채택될 수 있다. 그와 같은 방식의 예로는 효소면역분석(EIA), 방사면역분석(RIA), 웨스턴 블롯 분석, ELISA(enzyme linked immunoabsorbant assay) 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 숙련된 기술자는 세포(예컨대, 혈액 세포와 같은 체액 세포)가 본 발명의 마커를 발현하는지 여부를 결정하기 위하여 알려진 단백질/항체 검출 방법을 용이하게 채택할 수 있다.

[0068] 하나의 방식에서, 발현된 단백질을 검출하기 위한 웨스턴 블롯 또는 면역 형광 기술과 같은 방법 중에서 항체 또는 항체 단편을 사용할 수 있다. 그와 같은 사용에 있어서, 고체 지지대 위에 항체 또는 단백질을 고정시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 적절한 고체상 지지대 또는 캐리어로는 항원 또는 항체와 결합할 수 있는 임의의 지지체가 포함된다. 잘 알려진 지지체 또는 캐리어로는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 반려암, 자철석 등이 포함된다.

[0069] 본 기술분야에서 숙련된 자는 항체 또는 항원에 결합하기 위한 많은 다른 적절한 캐리어를 알고 있을 것이며, 본 발명과 함께 사용하기 위한 그와 같은 지지체를 채택할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포(예컨대, 혈액 세포와 같은 체액 세포)로부터 분리된 단백질을 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 걸고, 니트로셀룰로오스와 같은 고체상 지지대 위에 고정시킬 수 있다. 그 다음, 적절한 완충액으로 지지체를 세척한 후, 탐지가능하게 표지된 항체를 이용한 처리가 뒤따른다. 그 다음 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여, 고체상 지지체를 재차 세척한다. 그 다음 통상적인 수단을 사용하여 고체 지지체 상의 결합된 표지의 양을 측정할 수 있다.

[0070] 예시적인 특정 구현예에서, 본 발명의 분석은 동물 모델(말, 소, 양, 돼지, 염소, 토끼, 기니피그, 래트, 마우스, 게르빌루스, 비인간 영장류 등을 제한 없이 포함), 세포(예컨대, 미생물(박테리아 세포, 바이러스 세포, 효모 세포 등)로부터 유래한 세포) 또는 세포 프리 시스템(예컨대, 인 비트로 전사 분석, 인 비트로 번역 분석, 세포 용해물 분석, 분획된 세포 용해물 분석 등) 중에서 수행될 수 있다.

[0071] 기술된 본 발명의 구현예들은 본 발명의 원리의 몇몇 적용을 단지 설명하는 것이라는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 진정한 정신 및 범위를 벗어나지 않고, 본 명세서에서 제시된 가르침에 근거하여, 본 기술분야에서 숙련된 자들에 의하여 다수의 변형이 이루어질 수 있다. 본 출원에 걸쳐 인용된 모든 참조 문헌, 특허 및 공개된 특허출원의 내용은, 인용에 의하여 모든 목적에 대하여 그 전체로서 본 명세서에 통합된다.

[0072] 다음의 실시예들은 본 발명을 대표하기 위하여 제시된 것이다. 본 개시, 도면, 표 및 수반하는 청구항의 관점에서 이들 및 다른 균등한 구현예들이 명백할 것이기 때문에, 이들 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0073] **실시예 I**

[0074] **생분석을 위한 시료의 준비**

[0075] 생선 오일과 같은 많은 기능 식품의 활성 성분은 소화에 의하여 방출된다. 따라서 생선 오일의 인 비트로 활성을 시험(예컨대, 세포 배양)하기 위해서 시험 튜브 안의 이러한 소화를 모방하는 것이 필수적이다. 이를 달성하기 위한 여러 가지의 방법들이 있는데, 그와 같은 하나의 방법이 비제한적인 실시예로서 이하에 기술된다.

[0076] 생선 오일 가수분해

[0077] 생선 오일(10 g. ~12 mmol) 및 NaOH (2.16 g. 54 mmol)를 물(50 ml), 무수 에탄올(70 ml) 및 톨루엔(10 ml) 내에 혼합하였다. 자석을 이용하여 혼합물을 교반하고 N₂ 하에서 1.5 시간 동안 환류하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 1N HCl (81 ml)으로 처리한 후, n-헥산(100 ml)으로 추출하였다. 수상의 pH가 5에 도달할 때까지 에탄올/물(1:1, v/v)의 혼합물을 사용하여 유기상을 세척하였다. 분리된 유기상을 무수 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 여과하고, 실온 진공하에서 용매를 제거하였다. 얻어진 잔여물이 정량적 조성 분석 및 생물 활성 특성화를 수행할 생선 오일 가수 분해물이다.

[0078] **실시예 2**

[0079] **실시간 PCR에 의한 바이오마커 mRNA의 검출**

- [0080] 실시간 PCR은 특정 RNA의 레벨 변화를 검출하기 위한 정량적 방법이다; 그러므로, 3원 복합체의 억제제의 존재 하에서 전사적으로 상향 조절되어지는, 프로-아포토시스성 또는 종양 억제 유전자에 대한 실시간 PCR은, 3원 복합체의 이용도 평가를 위한 신속하고도 정확한 정량적 분석을 제공하며, 오메가-3 지방산에 의하여 유도된 eIF2 α 의 인산화 검출을 위한 효과적인 대체 분석법이다. 이러한 새로운 방법은 또한 3원 복합체의 이용도에 매우 의존적인 기존의 ATF-4 세포 기반 분석법의 사용을 통하여 얻어진 결과와 놀라운 상관관계를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 이것은 오메가-3 지방산 및 mRNA 번역을 개시하는 3원 복합체의 이용도에 영향을 미치는 다른 유익한 화합물의 활성화에 관하여, 식품, 기능 식품 및 의약품의 품질 조절 및 보증을 위한 개량된 방법이다.
- [0081] 표준 실시간 PCR 분석
- [0082] 1. 예컨대 각각의 조건에 대하여 5-10% 우태아 또는 송아지 혈청(6-웰 중의 3개 웰 또는 100 mm 플레이트 또는 다른 컨테이너)이 첨가된 DMEM 또는 RPMI 1640와 같은 표준 배양 배지 중에서 배양한 래트 간세포, 마우스 또는 인간 섬유아세포 와 같은 인간 마우스 또는 래트 기원의 세포를 플레이트에 둠;
- [0083] 2. 평가되어야 할 화합물로 또는 대조군/표준 부형제로 처리;
- [0084] 3. 6시간 후에 세포를 수확;
- [0085] 4. RNA 분리;
- [0086] 5. RNA를 역전사;
- [0087] 6. 바이오마커 mRNA(예컨대, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 또는 아미노산 합성 효소를 코딩하는 것) 및 18S RNA(내부 표준)의 역전사물을 증폭;
- [0088] 7. 18S 역전사물에 대하여 평준화한 후에 바이오마커 역전사물의 양을 측정; 그리고
- [0089] 8. 다르게 처리된(예컨대, 시험 화합물 또는 부형제로 처리된) 시료에 대하여 바이오마커 역전사물의 양을 비교.
- [0090] 세포 내, 실시간 PCR 분석
- [0091] 1. 세포를 플레이트(예컨대, 96-웰 플레이트 중에 또는 다른 멀티 챔버 형태)에 둠;
- [0092] 2. 화합물 또는 부형제의 다른 용량으로 처리;
- [0093] 3. 6시간 후 세포를 용출시킴;
- [0094] 4. 동일한 웰 내에서 역전사;
- [0095] 5. 바이오마커 mRNA(예컨대, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 또는 아미노산 합성 효소를 코딩하는 것) 및 18S RNA의 역전사물을 동일한 웰 내에서 증폭시킴;
- [0096] 6. 18S 역전사물에 대하여 평준화한 후 바이오마커 역전사물의 양을 측정; 그리고
- [0097] 7. 다르게 처리된(예컨대, 시험 화합물 또는 부형제로 처리된) 시료에 걸쳐 바이오마커 역전사물의 양을 비교.
- [0098] CHOP-코딩 mRNA 전사체를 증폭한 경우 얻어진 결과를, 종전의 ATF-4 분석에서 얻어진 결과와 비교하여 도 1에 나타내었다.
- [0099] **실시예 3**
- [0100] **리포터 유전자 분석을 통한 바이오마커 유전자의 전사 활성 검출**
- [0101] 식품, 기능 식품 및 의약 조성물 중의 오메가-3 지방산의 존재 및 활성을 분석하기 위한 다른 방법은 리포터 유전자 컨스트럭트를 사용하여 마커 유전자 전사 활성의 상향 조절을 측정하는 것이다. 이 방법에 따라 그와 같은 컨스트럭트 각각은 리포터 단백질(예컨대, 루시페라제, 녹색 형광 단백질, 적색, 근적외선, ds레드, ds레드2, 오렌지, 옐로우, 시안, 베타 갈락토시다제, 호오스레디쉬 펩티다제, 아쿠아포린, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 또는 검출 가능한 신호를 발생하거나 본 기술분야의 기술자들에게 알려진 방법에 의한 검출에 민감한 효소 활성 또는 다른 활성을 가지는 다른 단백질)을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 컨스트럭트의 리포터 단백질 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것은 오메가-3 지방산 또는 다른 적절한 mRNA 전사 개시 억제제, 예컨대 3원 복합체 억제제의 존재하에서 전사적으로 상향 조절되는 천연의 또는 합성의 프로모터 영역이다. 적절한 프로모

터는 비제한적 방식으로 CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 또는 아미노산 합성 효소와 같은 바이오마커를 코딩하는 유전자의 것들을 포함한다. 핵산 전사 및 mRNA 번역을 허용하는 조건하에서, 시스템이 테스트 시료에 접촉되어 처리된다. 적절한 음성 대조군은 이에 제한되는 것은 아니지만, 그와 같이 접촉 또는 처리되지 않은 평행 시험 시스템 또는 적절한 표준 시료에 의해 접촉 또는 처리되지 않은 것을 포함한다. 시험 및 대조군 시스템 둘 모두에서, 리포터 단백질 기능은 본 기술 분야에서 잘 알려진 방법에 의하여 검출 및 정량화되고, 시험 및 표준 시스템 내의 리포터 기능의 레벨은 시험 시료의 존재하 오메가-3 지방산의 효능을 측정하기 위하여 비교된다. 그러한 분석법에서, ATF-4 프로모터 컨스트럭트 또는 CHOP 프로모터 컨스트럭트(천연의 ATF-4 5'UTR을 또한 포함함)를 사용하여 얻어진 신호는, 다른 프로모터의 사용에서 얻어지는 것보다 더 큰 정도로 증폭되는데, 이는 오메가-3 지방산의 존재하에서 ATF-4가 전사적으로 그리고 번역적으로 상향 조절되어 있기 때문이다. 이점을 고려하여 리포터 컨스트럭트를 디자인하여, 분석에 앞서 예컨대 시료 또는 동종의 기원, 가공 등에서 얻어진 결과에 근거한 그들의 예상되는 효능에 따라, 테스트 시료에 노출시 나타날 것으로 예상되는 리포터 활성의 레벨에 대하여 선행의 범위 내에 신호 레벨을 유지할 수 있다.

[0102] 또한 본 발명의 특정 리포터 컨스트럭트는, CHOP 프로모터와 ATF-4 5'UTR과 같이, 고효율 전사 프로모터 및 고효율 번역 5'UTR을 조합하는데, 이는 좋기로는 기하학적인 신호 증폭을 제공하여, 그에 따라 두 요소 중 오직 하나만을 포함한 리포터 컨스트럭트와 비교하여 더 유익한 신호 대 노이즈 비율을 제공한다. 그와 같은 리포터 컨스트럭트는, 가공의 초기 단계 동안 또는 드문 활성을 검출할 때 흔하게 겪는 희석 또는 약하게 양성적인 시료를 비교할 때와 같이, 높은 민감성이 요구되는 분석법에서 특히 유용하다. 프로모터와 5'UTR은, 본 분야의 기술자들에게 알려진 방법 및 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여, 단일의 리포터 컨스트럭트 내로 조합될 수 있다. 유용한 프로모터로는 비제한적 방식으로, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 또는 아미노산 합성 효소 등과 같은 바이오마커를 코딩하는 유전자의 것 및 본 기술분야에 알려지고 본 명세서에 기술된 다른 것들이 포함된다. 유용한 5'UTRs로는 ATF-4, BRCA1 mRNA, CD59, TCTP 및 GCN4 등, 그리고 본 기술분야에 알려지고 본 명세서에 기술된 다른 것들이 포함된다. 두 요소를 모두 포함하는 유용한 리포터 컨스트럭트는, 선택된 요소들 즉 5'UTR 및 프로모터 쌍이 동일 또는 유사한 제제 또는 신호에 반응하는 때에 특히 유익하다.

[0103] 실시예 4

[0104] 바이오마커 단백질의 증가된 번역의 검출

[0105] 식품, 기능 식품 또는 의약품 내 오메가-3 지방산 또는 다른 유익한 제제의 효능을 측정하기 위하여, 2이상의 ORF를 포함하는 5'UTR 서열이 리포터 단백질을 코딩하는 서열과 작동가능하게 연결된 mRNA 전사체를, 단백질 번역이 발생할 수 있는 조건하, 예컨대 래빗 망상 적혈구 용해물 또는 mRNA의 단백질로의 번역을 발생시키기 위하여 필수적인 세포적 성분들을 함유하는 다른 인 비트로 시스템과 같은 동물, 세포 또는 세포프리 번역 시스템하에 노출시킨다. 전사체는 시스템 내에 생성(예컨대, 리포터 컨스트럭트 및 RNA 폴리머라제 등의 적절한 핵산 폴리머라제를 포함하는 동물, 세포, 또는 다른 혼합물 내에서 발현)될 수 있으며, 또는 외부에서 생성되어 시스템에 첨가될 수도 있다. 시스템은, 분석에서 탐지하고자 하는 오메가-3 핵산 또는 다른 유익한 제제의 존재하에서 번역 효율이 영향받지 않는 내부의 또는 다른 조절 리포터 mRNA를 임의적으로 함유할 수도 있으며, 그에 따라 번역이 가능한 시험 및 대조군 전사체의 상대적인 양에 대하여, 시험 및 대조군 번역 활성의 레벨을 평균화하는 것을 가능하도록 한다. 또는, 리포터 mRNA 레벨은 다양한 시험 시료 및 비교되는 리포터 기능 레벨 사이에서 평균화될 수도 있다.

[0106] 시험 전사체를 위한 적절한 5'UTRs로는 비제한적 방식으로 BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 or GCN4와 같은 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자 또는 mRNA 전사체의 것들이 포함된다. 대조군 전사체를 위한 적절한 5'UTRs는 하우스키퍼 단백질 코딩하거나 및/또는 그들 각각의 5'UTRs 내에 하나 또는 더 적은(즉 0개의) ORF를 갖는 유전자 또는 mRNA 전사체로부터 이끌어올 수도 있다.

[0107] 상술한 시스템은 식품, 기능 식품 또는 의약 조성물의 시료 및 본 기술분야에서 잘 알려진 방법에 의하여 탐지되고 정량화된 시험 및 대조군 리포터 단백질 기능의 양(예컨대, 시험 시료 내; 시험 시료와 미처리 시료 간; 시험 시료 및 오메가-3 지방산 또는 다른 유익한 제제의 효능에 대한 표준으로 처리된 시료 간)에 의하여 처리되고 접촉되는데, 여기서 리포터 기능의 상승된 레벨은 시험 리포터 mRNA의 번역 활성과 양성적으로 상응되고, 이는 결과적으로 시험 시료 내 함유된 오메가-3 지방산 또는 다른 유익한 제제의 효능과 상응된다.

[0108] 실시예 5

[0109] 생선 오일로부터 품질 조절된 기능 식품 및 다른 제품의 제조

- [0110] 상기 언급한 바와 같이, 생선 오일은 오메가-3 지방산의 중요한 공급원이다; 그러나 이러한 유익한 화합물의 함량 및 생물 활성에 있어 생선 오일의 공급은 서로 간에 크게 차이가 난다. 본 발명은 오메가-3 지방산의 알려진, 일정한 생물 활성을 갖는 생선-오일-유래된 제품의 제조 방법을 제공한다.
- [0111] 생선을 잡은 후, 살아있는 동안 또는 신선하게 죽여서 식품-등급 제조 조건에서 압착하여 살점으로부터 오일을 추출한다. 여과, 킬레이션 및/또는 관련 기술분야에서 기술자들에게 알려진 다른 방법을 사용하여 중금속 및 다른 환경 오염물질을 제거한다. 그 다음 임의적으로, 생선 오일을 예컨대 맛, 향 및/또는 외관을 개선하기 위하여, 다른 유익한 제제(식물 스테롤 또는 다른 유익한 화합물을 비제한적 방식으로 포함)를 첨가하기 위하여, 또는 오메가-3 지방산 및/또는 다른 유익한 제제들을 농축시키기 위하여 추가로 가공할 수도 있다. 경우에 따라, 가공되지 않은, 부분적으로 가공된 (예컨대, 해독된), 분획화된, 또는 다른 방법으로 가공된 생선 오일은 예컨대 병 또는 기타 비소모성 용기, 또는 겔 캡슐이나 캡슐렛 등의 식용 또는 의료용 캡슐과 같은 소모성 용기에 포장될 수 있다. 생선 오일 중에 함유된 오메가-3 지방산 및/또는 다른 유익한 제제는 임의로 강화, 부분적으로 정제 또는 심지어 완전히 정제, 즉 분리될 수 있다.
- [0112] 앞서 언급한 제조의 하나 이상의 단계에서, 생선 오일, 중간체 또는 완결된 제품의, ATF-4, CHOP, BiP, Xbp-1 또는 아미노산 합성 효소와 같은 바이오마커를 코딩하는 1 이상의 유전자의 전사를 증가시키는 능력, 또는 BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 또는 GCN4와 같은 바이오마커들을 코딩하는 mRNA로부터 유래한 5'UTRs를 포함하는 5'UTRs 중에 2 이상의 ORFs를 포함하는 mRNA의 번역을 증가시키는 능력은, 본 명세서의 선행하는 실시예에 기술된 방법을 사용하여 분석된다. 제조 초기 단계 동안에 얻어진 분석결과는 추가의 생산 단계 동안 오메가-3 지방산의 농축 중에 얻어질 조절을 가능하게 하거나, 또는 제품 성분의 조절, 혼합물 또는 제제를 다르게 가이드하여 오메가-3 지방산 생물 활성과 관련하여 알려진 효능을 갖는 식품, 기능 식품 또는 의약품을 생산할 수도 있다. 임의적으로, 완성된 제품 시료(예컨대, 유래되거나 선별된 배치 또는 로트의 각각을 대표하는, 액체 또는 분말의 분량, 또는 단일 캡슐렛)는 분배에 앞서 분석되어, 제품이 갖는 유익한 생물학적, 영양 약학적 또는 의학 특성의 레벨과 관련하여, 예컨대, 번역 개시의 억제, 또는 바이오마커 유전자 전사 및 mRNA 번역의 억제, 상향 조절 또는 다른 조절과 관련되는 치료 또는 예방적 특성과 관련하여, 이루어질 라벨 또는 다른 상업적 주장을 가능하게 할 수도 있다.
- [0113] **실시예 6**
- [0114] **기능 식품-등급의 생선 오일(NFO) 제조/배치의 생물학적 항암 활성의 정량화를 가능하게 하는, 강건하고 민감한 세포-기반 분석법의 개발.**
- [0115] **연구 디자인:**
- [0116] **변이된(eIF2 α -S51A EPA-저항성) 또는 야생형(eIF2 α -WT₂ EPA-민감성) eIF2 α 를 발현하는 형질변환 인간 전립선암 세포주의 발생**
- [0117] **목적:** 인간 전립선암 세포주 중에서 eIF2 α 의 인산화와 n-3 PUFAs의 항암 활성 간의 인과 관계를 결정하는 것. 각각 내인성인 eIF2 α 가 없는 상태에서, 인산화가 불가능한 변이체(eIF2 α S51A) 또는 재조합 야생형 eIF2 α (eIF2 α WT) 및 적색 형광 또는 녹색 형광 단백질을 발현하는 세포를 제조하였다. 내인성인 eIF2 α 단백질로부터 유래한 재조합 eIF2 α 단백질을 분화시키기 위하여, 재조합 eIF2 α 를 헤마글루티닌(HA)과 N-말단 태그시켜, eIF2 α (S51A 변이체 또는 WT) 및 형광 단백질의 공동 발현을 보장하였다. 두 단백질이 1:1의 비율로 번역될 수 있는 최근 개시된 기술을 사용하였다. 이는 이들 두 단백질의 아미노산 서열이 프로테아제 2A 절단 부위에 의하여 분리될 수 있음을 전제로 하여, 하나의 단일시스트론 mRNA로서 그들의 코딩 서열을 클로닝함으로써 달성된다. 다시 말해, 단일의 오픈 리딩 프레임(ORF)로부터 번역된 프로-단백질은 프로테아제 2A에 의하여 절단되어 HA-태그된 eIF2 α (WT 또는 S51A) 및 RFP 또는 GFP 단백질을 발생시킨다. 여기서의 특이적인 컨스트럭트에서, 프로테아제 2A에 의한 절단은 HA-태그된 천연 eIF2 α 와 형광 단백질의 프로테아제 2A 인식 서열과의 융합을 생성하였다. 재조합 eIF2 α (WT 또는 S51A)에 영향을 주지 아니한 채 shRNA로 내인성 eIF2 α 를 침묵시키기 위하여, eIF2 α 유전자의 모든 5' 및 3'UTR 요소를 플라스미드로부터 절단하였다.
- [0118] **실험 디자인:** 본 디자인은 내인성 eIF2 α 를 일시적으로 조절되어질 재조합 eIF2 α (WT 또는 S51A) 단백질로 대체함을 필요로 하였다. 이를 달성하기 위하여, pLVTHM 렌티바이러스 벡터를 사용하였다. 이 벡터는 포유동물 세포 중에서의 ORF 발현을 위한 인간 신장 요소 1 프로모터-조절되는 카세트와, shRNA 매개된 유전자 사일런싱을 위한 바이러스 LTR/SIN-조절되는 카세트를 포함한다. GFP와 연계된 eIF2 α WT 및 RFP와 연계된 eIF2 α S51A 코딩 서열을 사용하였다. 프로테아제 2A 절단 부위를 eIF2 α (WT 또는 S51A)와 형광 단백질 사이에 삽입하였다. 세포를

태그하기 위하여 RFP 및 GFP를 사용하였다. 이들은 인 비트로 및 인 비보에서 적절한 필터를 사용하여 현미경하에서 쉽게 구별되기 때문에, 이들 두 리포터들이 선정되었다. 최적의 번역을 위하여 완전한 코작(Kozak) 콘센서스 서열(GCCACCATGG)이 ORFs보다 앞서게 하였다. 내인성 eIF2 α 를 타겟으로 하지만 재조합 eIF2 α 는 타겟으로 하지 아니하는 최상의 shRNA 서열을 밝히기 위하여, 내인성 eIF2 α 의 5' 또는 3'UTR을 타겟으로 하는 수개 후보의 렌티바이러스 shRNAs를, 각각의 shRNA를 평가하기 위한 웨스턴 블롯 분석법을 사용하여 스크리닝하였다. 본 연구를 통하여, shRNA 서열 중의 하나인 shRNA #1098가 내인성 eIF2 α 발현의 거의 전면적 철폐를 야기하는 것으로 나타났다. 이 shRNA를 pLVTHM 벡터의 shRNA 발현 카세트 속으로 클로닝하였다.

[0119] **내인성 eIF2 α 발현을 재조합 단백질(eIF2 α S51A 또는 eIF2 α -WT)로 대체하는, 형질전환 인간 전립선암 세포주의 발생**

[0120] eIF2 α S51A 또는 eIF2 α WT와 RFP를 코딩하는 pLVTHM 벡터를 사용하여 인간 PC-3 전립선 암세포주를 형질전환시키고, FACS 분류에 의하여 RFP의 유사한 레벨을 발현하는 세포들을 선별하였다. 내인성 및 재조합 eIF2 α 모두를 인식하는 염소 항-eIF2 α 항체와 Alexa-680 컨주게이션된 항-염소 항체를 사용하는 고해상도 SDS-PAGE 전기영동 및 웨스턴 블롯 분석법을 사용하여, 내인성 eIF2 α 와 비교하여 형질전환 eIF2 α (WT 또는 S51A)의 발현에 대하여 세포를 확장하고 특성화하였다. 상기 기술한 렌티바이러스 벡터가 도입된 전립선암 세포는, 2개의 eIF2 α 이소 형태, 즉 내인성 eIF2 α 에 상응하는 빠른 이동 단백질 및 태그된 재조합 eIF2 α (HA 태그는 약 1.5 kd을 첨가함)에 상응하는 느린 이동 단백질을 발현한다. 이러한 느린 이동 단백질이 진정 형질전환 eIF2 α 이라는 사실은, 단일클론 항-HA 항체 및 Alexa-800가 컨주게이션된 항-마우스 항체(보여지지 않음)를 사용하여 동일한 겔을 블로팅함으로써 확인하였다. 항-eIF2 α 항체가 추정컨데 동일한 친화도로 내인성 및 재조합 eIF2 α 둘 모두를 인식할 수 있기 때문에, 단일의 항-eIF2 α 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의하여 내인성 및 재조합 eIF2 α 의 상대적 발현을 정량화할 수 있다.

[0121] eIF2 α S51A/RFP 또는 eIF2 α WT/RFP 및 shRNA#1098를 코딩하는 pLVTHM 벡터를 이용하여 PC-3 인간 전립선암 세포주를 형질전환시켰고, 항-토탈 eIF2 α 또는 β -액틴 항체를 사용하여 세포 용해물을 블롯화하였다. 도 1에서, 레인 1은 shRNA이 없이 pLVTHM 벡터로 형질전환된 세포이고, 레인 2 및 3은 eIF2 α WT 또는 eIF2 α S51A ORF 및 shRNA #1098 카세트를 함유하는 pLVTHM 벡터로 형질전환된 세포이다. shRNA 삽입이 없는 pLVTHM 벡터로 형질전환된 세포는 내인성 eIF2 α 만큼 많은 재조합 단백질을 발현하였다.

[0122] shRNA #1098를 함유하는 pLVTHM로 형질전환된 세포 중에서 내인성 eIF2 α 단백질의 발현은 드라마틱하게 감소하였다. 이 바이러스 벡터는 내인성 eIF2 α mRNA의 발현도 일관되게 ~85% 감소시켰다(도 2). 이러한 데이터는 전체 eIF2 α 레벨을 어버이 세포의 것에 가능한 한 근접하게 유지하면서, 내인성 eIF2 α 가 재조합 eIF2 α (WT 또는 S51A 변이체)에 의하여 성공적으로 대체되었음을 나타낸다.

[0123] 형질도입된 세포는 EPA-유도된 eIF2 α 인산화에 대한 반응을 특징으로 하였다. EPA는 내인성 eIF2 α 및 재조합 eIF2 α WT 모두에 대하여 인산화를 야기하였지만, 재조합 eIF2 α S51A에 대해서는 그러하지 아니하였다(예컨대, EPA의 효과에 대한 도 3 참조). 결과적으로 EPA는 모체의 또는 재조합 eIF2 α WT 발현 세포 중에서 eIF2 α 의 현저한 인산화를 일으킨 반면, 재조합 eIF2 α S51A 발현 세포 중에서는 그러하지 아니하였다.

[0124] 모체 PC-3 세포(MAT), 또는 내인성 eIF2 α 발현을 타겟으로 하는 재조합 eIF2 α RFP 및 shRNA(재조합 mRNA가 아닌 내인성의 3'UTR 내 1098 위치에서 #1) 발현 벡터로 형질전환된 세포를 EPA의 증가하는 농도하에서 배양하였다. 배양 5일 후에 SRB 분석에 의하여 전체 세포 증식을 정량화하고, 부형제로 처리한 대조군 세포의 퍼센트로서 발현시켰다. 도 4에서 보여지는 바와 같이, 재조합 eIF2 α WT를 발현하는 PC-3 세포는 용량 의존적 방식으로 EPA에 의한 세포 증식의 억제에 민감한 반면, 재조합 eIF2 α S51A를 발현하는 것들은 저항성이었다.

[0125] 결론적으로, eIF2 α 매개된 번역 개시의 억제에 의하여 생물학적 활성을 행사하는 오메가-3 농축물 또는 다른 기능 식품의 번역-개시 억제 특이적 활성을 측정하기 위하여, 분자적으로 제조한 세포를 활용하는 세포-기반 분석을 본 명세서에 기술하였다. 이 분석법은 내인성 eIF2 α 활성의 부재하에서 시료 중의 활성을 측정하기 때문에 정확하고 민감하다.

[0126] 이러한 발견은 본 명세서에 개시된 형질전환 인간 암 세포가, eIF2 α 인산화를 유도하는 본 발명의 기능 식품 제조물 및 오메가-3 농축물의 생물학적 활성의 측정을 위하여, 그리고 그와 같은 제조물의 품질 조절을 위하여 훌륭한 도구가 됨을 나타낸다.

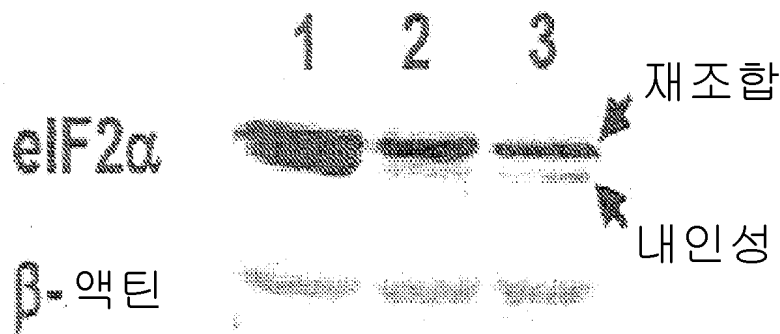
[0127] PC-3 eIF2 α WT(균주 351) 및 PC-3 eIF2 α S51A(균주 411) 세포 배양을 아메리카 타입 컬처 콜렉션(ATCC Manassas, VA)에 2014년 6월 22일에 기탁하였고, 각각 ATCC 수탁번호 PTA-13010 및 PTA-13011를 부여받았다.

- [0128] 본 발명의 세포 기반 분석법은 다음과 같이 수행된다:
- [0129] **세포:** 약 1000 내지 약 2000 eIF2 α S51A 또는 eIF2 α WT 세포를 96웰 플레이트의 각각의 웰에서, 약 37℃의 온도에서 약 1일 동안 배양한다.
- [0130] 배지: 완전(5% 우태아 혈청이 첨가됨) 조직 배양 배지 RPMI-1640 (Invitrogen, CA)
- [0131] **실험재료:**
- [0132] 96-웰 조직 배양 플레이트
- [0133] 술포로다민(Sulforhodamine) B 염료(SRB, 0.57% v/w, Sigma, IL)
- [0134] 트리카복시아세트 산(Tricarboicacetic acid) (TCA, 10%, Sigma IL)
- [0135] 빙초산 (1%, Sigma, IL)
- [0136] 10 mM 트리스 염기 (Sigma, IL)
- [0137] 100 mM 화합물 스톱
- [0138] 세포를 준비/플레이트에 둠
- [0139] 80%의 컨플루언시까지 암세포를 배양
- [0140] 표준 프로토콜에 따라 트립신화
- [0141] 트립신 중화, 세포 용해 및 카운트.
- [0142] 96-웰 플레이트의 각각의 웰 당 100 μ l 배지 내에 1000 세포를 플레이트
- [0143] 빈 웰에서 웰 방치
- [0144] 4 화합물에 대하여 1 플레이트 필요
- [0145] 다른 플레이트(세포주 당 12 웰)에 세포를 플레이트, 이를 "0일" 플레이트로 표시
- [0146] 화합물 첨가(다음 날)
- [0147] 0일 플레이트에 10% TCA 50 μ l 첨가, 4℃에서 보관
- [0148] 배양 배지 내 40, 12, 3.6, 1.62, 및 0 (용매) μ M 화합물을 준비
- [0149] 희석 전체에 걸쳐 용매(DMSO) 농도를 동일하게 유지
- [0150] 세포주에 대한 각각의 플레이트의 3개 웰에 각각의 화합물 희석액 100 μ l를 첨가
- [0151] 최종 화합물 농도는 20, 6, 1.8, 0.54, 및 0 μ M
- [0152] 세포를 배양기로 되돌림
- [0153] 화합물 첨가 5일 후에 10% TCA 100 μ l 첨가
- [0154] 4℃에서 최소 1시간 배양
- [0155] **SRB 염색**
- [0156] 비카이(Vichai) 및 커티카라(Kirtikara)의 프로토콜(Nature Methods 2006, vol 1:1112-1115)을 따름
- [0157] a) 세포를 염색
- [0158] 냉방으로부터 세포를 제거
- [0159] 내용물을 따라냄
- [0160] 단일 증류된 H₂O로 4회 세척
- [0161] 과다 H₂O의 제거
- [0162] 플레이트 건조(블로우 건조 또는 공기 건조)

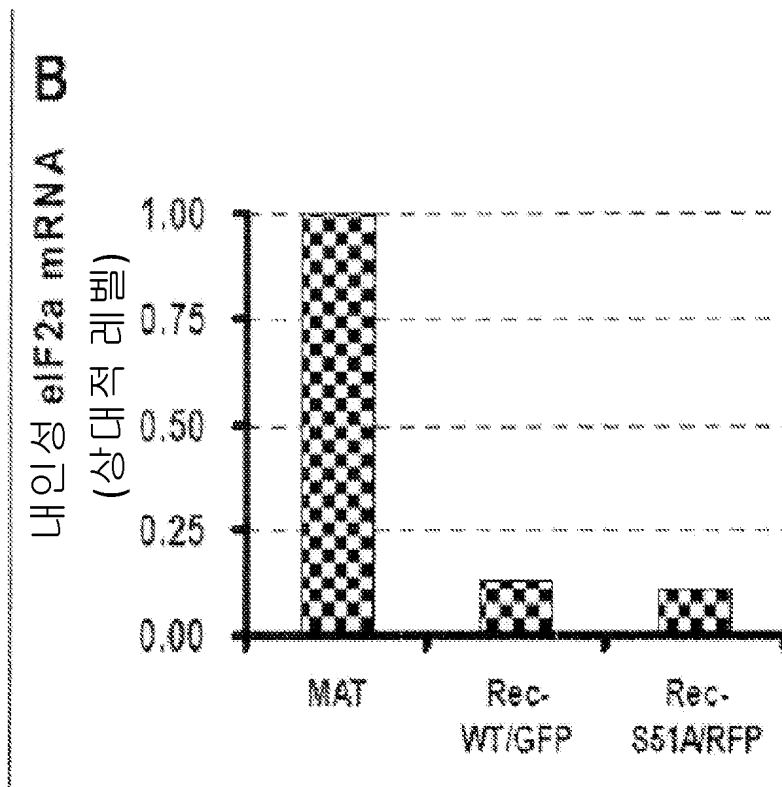
- [0163] 각 웰에 0.057% SRB 용액 100 μ l 첨가
- [0164] RT 30분 배양
- [0165] 염료를 따라냄
- [0166] 1% 아세트 산으로 4회 세척
- [0167] 플레이트 공기 건조
- [0168] b) OD 측정
- [0169] 각각의 웰에 10 mM TRIS-염기 (~pH 10.5) 200 μ l 첨가
- [0170] 5-10분 동안 플레이트를 흔들
- [0171] 마이크로플레이트 리더 내 510 nM에서 OD 판독
- [0172] 대조군 세포 성장의 %로서 세포 성장 억제 퍼센트를 계산 =
- [0173] $((\text{평균 OD 시료} - \text{Mean OD 0일}) / (\text{평균 OD 부형제} - \text{평균 OD 0일})) \times 100$
- [0174] % 성장 억제 = 100 - 대조군 세포 성장 %
- [0175] 분석은 비교 목적으로 표준을 사용하는데, 이는 종전에 분석된 기능 식품 또는 미리 양이 결정된 EPA이다. eIF2 α S51A 세포는 eIF2 α 의 세포 증식을 독립적으로 억제하는 물질에 대한 음성 대조군으로서 준비되고 사용된다. 도 4는 표준 커브의 예시이다. 표준 커브는 증식 억제의 양이 본 발명의 기능 식품 또는 EPA의 양에 비례한다는 것을 보여준다. 표준은 시료 중의 활성 양을 측정하기 위하여 모든 분석과 함께 수행되는데, 이는 증식 억제의 정도가 본 발명의 기능 식품의 양에 비례하기 때문이다.

도면

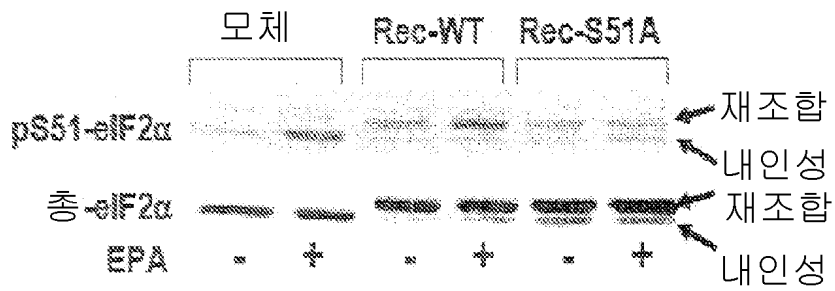
도면1



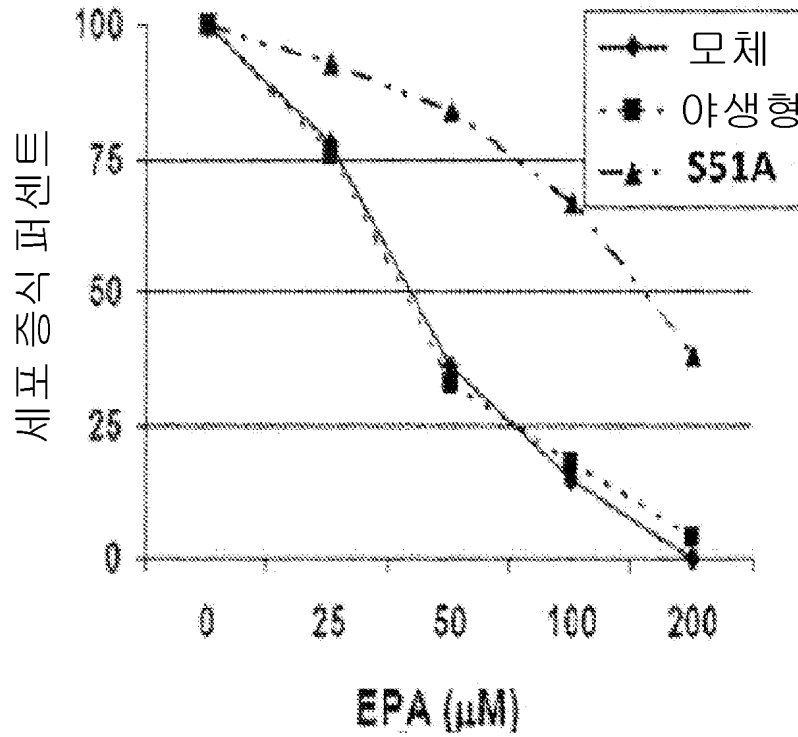
도면2



도면3



도면4



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13

【변경전】

제12항에 있어서,

【변경후】

제11항에 있어서,