



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014136408, 22.07.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2013

Дата регистрации:
25.07.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.07.2012 US 61/674,180

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2016 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 25.07.2018 Бюл. № 21

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 20.02.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/051433 (22.07.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/015328 (23.01.2014)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
ПАТЕНТИКА

(72) Автор(ы):

ХАЛПЕРИН Жозе А. (US),
ЧОРЕВ Майкл (US),
АКТАС Хусейн (US)

(73) Патентообладатель(и):

ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ
ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2010/138820 A2, 02.12.2010. WO
2010/138820 A2, 02.12.2010. TING CHEN et al.
"Chemical genetics identify Eif2[alpha] kinase
heme-regulated inhibitor as an anticancer
target", NATURE CHEMICAL BIOLOGY.
vol. 7, N9, 1 September 2011, p. 610-616. TING
CHEN et al. "Chemical genetics identify
Eif2[alpha] kinase heme-regulated inhibitor as
an (см. прод.)

(54) СПОСОБЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ДЛЯ
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НУТРИЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

(57) Реферат:

Изобретение касается способа определения
эффективности композиции в отношении
ингибирования инициации трансляции, уровень
ингибиторной активности которой в отношении
инициации трансляции неизвестен, где способ
включает: приведение клетки линии, которая
имеет номер доступа РТА-13010 в Американской
коллекции типовых культур (АТСС), в контакт
с указанной композицией в течение периода
времени и при температуре, достаточных для
ингибирования пролиферации указанной клетки,
приведение клетки линии, которая имеет номер

доступа РТА-13011 в АТСС, в контакт с
указанной композицией в течение периода
времени и при температуре, достаточных для
ингибирования пролиферации указанной клетки,
измерение индуцированного указанной
композицией уровня ингибирования
пролиферации указанной клетки линии, которая
имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и
уровня ингибирования пролиферации указанной
клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-
13011 в АТСС, причем величина указанной
ингибиторной активности указанной композиции

в отношении процесса инициации трансляции пропорциональна уровню ингибирования пролиферации в клетке линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и сравнение уровня ингибирования пролиферации, индуцированного указанной композицией, с уровнем ингибирования пролиферации, индуцированного стандартом, имеющим известную величину указанной активности, и определение композиции как не имеющей ингибиторной активности в отношении инициации трансляции, если указанная композиция ингибирует пролиферацию указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС; при этом указанная композиция представляет собой пищевой, нутрицевтический или лекарственный продукт, при этом указанная клетка линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 и/или РТА-13011 в АТСС, характеризуется тем, что содержит лентивирусный

экспрессионный вектор, который содержит: (а) гетерологичный ген eIF2 α , у которого полностью отсутствуют 3' и 5' НТО; (б) направленную на нуклеотид №1098, тимидиновый нуклеотид в 3'-НТО области эндогенного гена eIF2, миРНК №1098, которая ингибирует более 85% эндогенной экспрессии eIF2; и (в) оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG). Изобретение также касается: линии клеток рака предстательной железы человека РС-3, экспрессирующих eIF2 α -WT, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, в которой экспрессия эндогенного eIF2 α ингибируется более чем на 85%, и линии клеток рака предстательной железы человека РС-3, экспрессирующих eIF2 α -S51A, которая имеет номер доступа РТА- 13011 в АТСС, в которых экспрессия эндогенного eIF2 α ингибируется более чем на 85%, для определения ингибирования инициации трансляции. 4 н. и 15 з.п. ф-лы, 4 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

anticancer target", NATURE CHEMICAL BIOLOGY. vol. 7, N9, 1 September 2011, p. 610-616. WO 2008/008333 A2, 17.01.2008. SVERINE DENOYELLE et al. "In vitro inhibition of translation initiation by, -diarylureaspotential anti-cancer agents", BIOORGANIC @ MEDICAL CEMISTRY LETTERS, PERGAMON, vol. 22, N1, 31 October 2011, p. 402-409.

RU 2 6 6 2 3 5 8 C 2

RU 2 6 6 2 3 5 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2006.01)

(21)(22) Application: **2014136408, 22.07.2013**

(24) Effective date for property rights:
22.07.2013

Registration date:
25.07.2018

Priority:

(30) Convention priority:
20.07.2012 US 61/674,180

(43) Application published: **10.09.2016** Bull. № 25

(45) Date of publication: **25.07.2018** Bull. № 21

(85) Commencement of national phase: **20.02.2015**

(86) PCT application:
US 2013/051433 (22.07.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/015328 (23.01.2014)

Mail address:
**190000, Sankt-Peterburg, VOKH-1125,
PATENTIKA**

(72) Inventor(s):

**KHALPERIN Khoze A. (US),
CHOREV Majkl (US),
AKTAS Khusejn (US)**

(73) Proprietor(s):

**PREZIDENT END FELLOUZ OF GARVARD
KOLLEDZH (US)**

(54) **CELL BASED QUALITY CONTROL BIOASSAYS FOR NUTRICEUTICAL AND MEDICINAL PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: measurement; testing.

SUBSTANCE: method comprises: contacting a line cell that has an access number of PTA-13010 in the American Type Culture Collection (ATCC) with said composition for a period of time and at a temperature sufficient to inhibit the proliferation of said cell, contacting a cell line that has an access number of PTA-13011 in the ATCC with said composition for a period of time and at a temperature sufficient to inhibit the proliferation of said cell, measuring the proliferation inhibition level of the said cell line induced by said composition, which has an access number of PTA-13010 in the ATCC, and a proliferation inhibition level of said cell line which has an access number of PTA-

13011 in the ATCC, wherein the amount of said inhibitory activity of said composition with respect to the translation initiation process is proportional to the proliferation inhibition level in the cell of the line that has an access number of PTA-13010 in the ATCC, and comparing the proliferation inhibition level induced by said composition with the proliferation inhibition level induced by a standard having a known amount of said activity, and determining the composition as having no inhibitory activity with respect to translation initiation if said composition inhibits the proliferation of said cell, a line that has an access number of PTA-13011 in the ATCC; wherein said composition is a food, nutraceutical or medicinal product, wherein said cell

of the line that has an access number of PTA-13010 and / or PTA-13011 in the ATCC is characterised in that it contains a lentiviral expression vector that contains: (a) a heterologous eIF2 α gene, which is completely free of 3' and 5' NTO; (b) directed at nucleotide No. 1098, thymidine nucleotide in 3'-NTO areas of the endogenous eIF2 gene, siRNA No. 1098, which inhibits more than 85% of the endogenous expression of eIF2; and (c) Kozak optimal consensus sequence (GCCACCATGG). Invention also relates to: human prostate cancer cell lines PC-3, expressing eIF2 α -WT, which has an access number of PTA-13010 in the ATCC, in which the expression of endogenous

eIF2 α is inhibited by more than 85%, and human prostate cancer cell lines PC-3, expressing eIF2 α -S51A, which has an access number of PTA-13011 in the ATCC, in which the expression of endogenous eIF2 α is inhibited by more than 85%, to determine inhibition of translation initiation.

EFFECT: invention relates to a method for determining the effectiveness of a composition with respect to inhibition of translation initiation, the level of inhibitory activity of which with respect to translation initiation is unknown.

19 cl, 4 dwg, 6 ex

R U 2 6 6 2 3 5 8 C 2

R U 2 6 6 2 3 5 8 C 2

ЗАЯВЛЕНИЕ О ГОСУДАРСТВЕННОМ УЧАСТИИ

Изобретение было осуществлено при государственной поддержке в рамках гранта R01CA078411, присужденного Национальным институтом здоровья (США).

Правительство США имеет определенные права на данное изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США 61/674180, поданной 20 июля 2012, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Варианты реализации настоящего изобретения относятся в целом к исследованию пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов и лекарственных средств в отношении свойств, имеющих практическую значимость для здоровья человека или животных.

Варианты реализации настоящего изобретения дополнительно включают усовершенствованные способы, в которых для количественной оценки активности указанных продуктов в качестве ингибиторов процесса инициации трансляции применяют клеточные методы исследований с применением новых клеточных линий.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Процесс инициации трансляции матричной РНК (мРНК) играет важную роль в регуляции размножения клеток и их злокачественной трансформации, поскольку экспрессия большинства регуляторных белков, управляющих онкогенезом и размножением клеток, контролируется на этапе трансляции (Flynn et al., 1996, Cancer Surv. 27:293; Sonenberg et al., 1998, Curr. Opin. Cell Biol. 10:268). По этой причине инициация трансляции является тщательно регулируемым клеточным процессом. Неэффективная отрицательная регуляция инициации трансляции может привести к индукции,

возникновению и прогрессированию онкологического заболевания (Donze et al., 1995, Embo J. 14: 3828; Rosenwald, 1996, Bioessays 18: 243-50; De Benedetti et al., 2004, Oncogene 23: 3189-99; and Rosenwald, 2004, Oncogene 23:3230). В случае нарушения контроля процесса инициации трансляции, его ингибирование также может вызвать обращение фенотипов трансформированных клеток (Jiang et al., 2003, Cancer Cell Int. 3:2; Graff et al., 1995, Int. J. Cancer 60:255). Комплекс eIF2-GTP-Met-tRNA_i (также известный как тройной комплекс) является ключевым положительным регулятором процесса инициации трансляции. Уменьшение его доступности нарушает начало новых раундов трансляции белка. Несмотря на то, что трансляция многих онкогенных белков и других факторов роста клеток в значительной мере зависит от присутствия указанного тройного комплекса, это не относится к конститутивным генам (генам «домашнего хозяйства»), по этой причине пищевые продукты, нутрицевтические продукты и лекарственные средства, которые способствуют уменьшению концентрации, доступности или активности указанного тройного комплекса, потенциально могут представлять собой безопасные средства для профилактики и лечения заболеваний. Помимо этого экспрессия определенных генов-супрессоров опухолей и проапоптотических генов и/или белков по существу увеличивается в присутствии ингибиторов тройного комплекса или, в более общем смысле, в присутствии ингибиторов процесса инициации трансляции. В целом, снижение эффективности трансляции онкогенных белков, в особенности в комбинации с активированием генов-супрессоров опухолей и проапоптотических генов, как правило, предотвращает и/или подавляет развитие злокачественного фенотипа.

Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), омега-3 полиненасыщенная жирная кислота (омега-3 ПНЖК), обнаруживается в больших количествах в жире, полученном из рыбы, особенно из рыбы диких популяций, обитающих в холодных океанических водах.

Выращенная в искусственных условиях рыба обычно содержит гораздо более низкие концентрации омега-3 ПНЖК, по сравнению с рыбой диких популяций. Было обнаружено, что при введении жира морских видов рыб пациентам с раком предстательной железы происходит фосфорилирование белка eIF2 α , что указывает на уменьшение доступности функционального белка eIF2 для образования тройного комплекса, этот вывод согласуется с результатами, полученными в ходе исследований на животных моделях и клеточных экспериментальных системах с использованием ЭПК и синтетических ингибиторов тройного комплекса. Соответственно, пищевые добавки, которые содержат ингибиторы процесса инициации трансляции, представляют собой продукты, привлекательные с коммерческой точки зрения, для лечения и/или профилактики онкологических заболеваний и/или пролиферативных заболеваний, при которых характерным патологическим отклонением является нарушение клеточной пролиферации. Такие пищевые добавки также могут действовать в качестве регуляторов процесса инициации трансляции и представляют собой продукты, привлекательные с коммерческой точки зрения, для лечения и/или профилактики болезней обмена веществ, таких как ожирение и диабет.

Рыбий жир, полученный из различных источников, широко доступен для потребителей в виде пищевого продукта или пищевой добавки. Жир, а также фракции или компоненты, полученные из жира, содержащиеся в различных производственных сериях, партиях, образцах или дозах продукта, могут различаться по качеству или эффективности, в зависимости от источников происхождения (например, климатических условий, видов рыб или условий выращивания, поставщиков) или условий обработки. Те же условия могут быть применимы к содержимому одной серии, партии, образца или дозы продукта. Другие пищевые продукты, нутрицевтические продукты или лекарственные средства, которые содержат природные или синтетические ингибиторы процесса инициации трансляции, могут различаться между собой по качеству или эффективности по аналогичным причинам.

В этой связи существует необходимость контроля и/или обеспечения качества физиологического или лечебного действия продукта на потенциальных потребителей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Производство пищевых добавок, обладающих лечебным/профилактическим действием в отношении заболеваний человека, представляет собой быстро развивающуюся отрасль индустрии с многомиллиардными оборотами во всем мире. Тем не менее, одной из основных нерешенных проблем в этой отрасли индустрии является недостаточный контроль качества продуктов, которые выделяют из природных источников, в целях гарантированного обеспечения специфичной биологической активности и эффективности, эквивалентности биологической активности среди различных препаратов, выделенных/полученных из одного и того же растительного/животного источника, и сопоставимой эффективности среди препаратов, выделенных из одного и того же вида растений или животных, но происходящих из различных географических регионов и/или индустриальных источников.

Ингибиторы, активаторы или другие виды модуляторов процесса инициации трансляции обладают широким спектром действия в качестве противоопухолевых и антипролиферативных средств, а также широким спектром действия в отношении энергетического баланса организма. Нутрицевтические продукты, содержащие ингибиторы, активаторы или другие виды модуляторов процесса инициации трансляции, включая, но не ограничиваясь ими, препараты рыбьего жира, можно применять для профилактики заболеваний человека, характеризующихся нарушением клеточной

пролиферации, включая онкологические заболевания. Однако отсутствие в настоящее время биологических способов исследований, с помощью которых можно определить биологическую активность нутрицевтических продуктов такого рода, делает невозможным контроль их качества, эффективности и/или однородности между различными торговыми марками или источниками, либо между различными партиями или продуктами одной торговой марки или из одного и того же источника.

Соответственно, согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложены способы контроля и/или обеспечения качества пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов и лекарственных средств в отношении способности указанных продуктов модулировать инициацию трансляции мРНК, что позволит решить проблему, которая заключается в необходимости предоставить потребителям точную информацию, касающуюся возможной пользы таких продуктов для здоровья.

В настоящем изобретении предложены биологические способы исследований, специфичные в отношении процесса инициации трансляции, которые можно применять для количественной оценки биологической активности соединений, например, нутрицевтических продуктов, которые содержат ингибиторы, активаторы или модуляторы процесса инициации трансляции. Биологические способы исследований, специфичные в отношении процесса инициации трансляции, которые предложены в настоящей заявке, позволяют оценить качество (например, биологическую активность), эффективность и однородность партий нутрицевтических продуктов, которые содержат вещества, например, эндогенные вещества или добавки, которые действуют в качестве ингибиторов, активаторов или иных модуляторов процесса инициации трансляции.

Указанные биологические способы исследований обеспечивают точные и быстрые инструменты для определения степени, в которой данный образец пищевого продукта, нутрицевтического продукта или лекарственного средства может модулировать процесс инициации трансляции, и таким образом обеспечивать полезные свойства для человека или животного, которые потребляют такой продукт, или которому вводят такой продукт. Указанные биологические способы исследований в целом позволяют исследовать способность образца такого продукта ингибировать инициацию трансляции мРНК. Типичные биологические способы исследований, описанные в настоящей заявке, позволяют детектировать способность образца ингибировать образование, доступность или активность тройного комплекса, или посредством фосфорилирования eIF2 α , или иным образом.

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения может быть проведено исследование способности образца продукта активировать трансляцию некоторых транскриптов мРНК. Активация трансляции таких транскриптов может указывать на наличие, концентрацию, доступность и/или активность ЭПК или других омега-3 ПНЖК, содержащихся в данном образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно детектировать способность образца активировать трансляцию некоторых транскриптов мРНК, 5'-нетранслируемая область (5'-НТО) которых содержит две или более открытых рамок считывания (ОРС). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно исследовать способность образца активировать трансляцию одного или более из ATF-4, BRCA1 мРНКb, CD59, TCTP и GCN4, в качестве меры эффективности и/или способности такого образца обеспечивать полезные свойства для здоровья человека или животного, которые потребляют соответствующий продукт, или которым вводят соответствующий продукт. С помощью таких биологических способов исследований можно детектировать

повышенную концентрацию, доступность или активность белков, полученных в результате активации трансляции таких мРНК. Степень, в которой увеличивается, активируется или иным образом модулируется трансляция маркерных белков, можно определить путем сравнения результатов исследований с контрольными величинами.

5 Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что подобную активацию трансляции можно облегчить путем фосфорилирования eIF2 α и/или посредством ингибирования тройного комплекса.

В соответствии с настоящим изобретением предложен способ оценки величины активности, имеющей практическую значимость, в образце пищевого продукта,
10 нутрицевтического продукта или лекарственного средства путем детектирования полинуклеотидных продуктов генов, транскрипция которых увеличивается, активируется или иным образом модулируется в присутствии ЭПК или других омега-3 ПНЖК, содержащихся в данном образце.

Согласно некоторым вариантам реализации в соответствии с настоящим изобретением
15 предложен способ детектирования продуктов генов, транскрипция которых увеличивается, активируется или иным образом модулируется в присутствии ЭПК, других омега-3 ПНЖК или других полезных агентов. Такие транскрипты могут включать, но не ограничиваются ими, транскрипты, которые кодируют ATF-4, BiP, СНОР, Хрб-1 и синтетазы аминокислот. В некоторых вариантах реализации настоящего
20 изобретения предложены способы детектирования транскриптов мРНК, которые кодируют указанные белки, например, с помощью методов обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот (например, ПЦР или методов изотермической реакции амплификации, известных в данной области техники) или гибридизации нуклеиновых кислот. Увеличение, активацию или модуляцию иным образом
25 транскрипции гена также можно обнаружить с использованием исследований на основе репортерных генов, например, таких, при которых в системе, которая обеспечивает транскрипцию ДНК промотор гена, представляющего интерес, функционально связан с репортерным геном до осуществления контакта с исследуемым или контрольным образцом. Степень, в которой транскрипция увеличивается, активируется или
30 модулируется иным образом, определяют путем сравнения уровней транскрипции или величины активности репортерного гена, наблюдаемых в исследуемом образце, с теми, которые наблюдают для внешнего или внутреннего (например, двойная репортерная метка) стандарта или контроля.

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения
35 предложен способ исследования пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов и лекарственных средств в целях обнаружения (детектирования) белков, кодируемых продуктами генов, транскрипция которых увеличивается, активируется или модулируется иным образом в присутствии ЭПК, других омега-3 ПНЖК или других полезных агентов. Такие белки могут включать, но не ограничиваются ими, ATF-4, BiP, СНОР, Хрб-1 и
40 синтетазы аминокислот. Для того чтобы определить эффективность исследуемого образца концентрации таких белков, наблюдаемые в присутствии исследуемого образца, могут быть сопоставлены с теми, которые наблюдают в присутствии стандартного или другого контрольного образца.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ
45 определения однородности партии, состоящей из множества отдельных композиций, включающий этапы детектирования активности в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процесса инициации трансляции по меньшей мере одной из таких отдельных композиций, и сравнения величины активности

в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процесса инициации трансляции по меньшей мере одной из отдельных композиций с соответствующей величиной стандарта для определения однородности партии.

- Соответственно, согласно некоторым типичным вариантам реализации предложен
- 5 способ определения наличия у вещества (например, вещества, полученного из рыбьего жира, и/или вещества, содержащего ЭПК) одного или более полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств. Способ включает следующие этапы: обеспечение второго образца, содержащего вторую последовательность мРНК, имеющую по меньшей мере две открытые рамки считывания в 5'-НТО, причем вторая
- 10 последовательность мРНК кодирует второй биомаркерный белок; приведение второго образца в контакт с веществом; и детектирование уровней трансляции первого и второго биомаркерных белков, причем уровень трансляции второго биомаркерного белка выше, чем уровень трансляции первого биомаркерного белка, в случае если вещество имеет одно или более полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств.
- 15 Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения первый образец приводят в контакт со стандартным веществом или контрольным веществом. Согласно другим аспектам настоящего изобретения первая мРНК и вторая мРНК имеют идентичные последовательности. Согласно другим аспектам настоящего изобретения первый биомаркерный белок и второй биомаркерный белок представляют собой идентичные
- 20 белки. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения первый и второй биомаркерные белки выбирают из группы, состоящей из продукта мРНКб гена восприимчивости к раку молочной железы 1 (BRCA1), фактора активации транскрипции 4 (ATF-4), опухолевого белка, регулируемого на этапе трансляции (TCTP), протектина (CD59) и фактор общего контроля с постоянной репрессией 4 (general control
- 25 nonderepressible 4, GCN4). Согласно другим аспектам настоящего изобретения этап детектирования уровней трансляции осуществляют с помощью одного или более методов, таких как Вестерн-блот, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноцитохимические методы анализа. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения образец представляет собой животную, клеточную или бесклеточную
- 30 систему (например, системы на основе лизатов ретикулоцитов кролика), в которой, в зависимости от конкретного случая, может произойти транскрипция ДНК и/или трансляция мРНК. Клетки могут быть получены от человека, других млекопитающих (включая, но не ограничиваясь ими, мышей и крыс), кур и других птиц, или дрожжей. Бесклеточные системы включают цитоплазматические экстракты ретикулоцитов
- 35 кролика, зародышей пшеницы или клеток млекопитающих, такие как экстракты клеток линии HeLa S100. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения 5'-НТО представляет собой природную или синтетическую последовательность. Согласно другим аспектам настоящего изобретения 5'-НТО функционально связана с последовательностью, которая кодирует репортерный белок. Согласно некоторым
- 40 аспектам настоящего изобретения уровни трансляции определяют путем оценки одного или более видов активности репортерного белка. Согласно другим аспектам настоящего изобретения уровень трансляции второго биомаркерного белка составляет по меньшей мере 150% от уровня трансляции первого биомаркерного белка. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения оценивают активность омега-3 полиненасыщенных
- 45 жирных кислот (ПНЖК) (например, эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК)) в веществе. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения указанное вещество представляет собой образец пищевого продукта, образец нутрицевтического продукта или образец фармацевтического препарата.

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ определения наличия у вещества (например, вещества, полученного из рыбьего жира и/или вещества, содержащего ЭПК) одного или более полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств. Указанный способ включает следующие этапы: обеспечение образца, включающего последовательность мРНК, которая имеет по меньшей мере две открытые рамки считывания в 5'-НТО, причем последовательность мРНК кодирует биомаркерный белок, приведение указанного образца в контакт с веществом, определение уровня трансляции указанного биомаркерного белка и определение уровня трансляции белка, представляющего собой внутренний стандарт, причем биомаркерный белок имеет более высокий уровень трансляции, чем уровень трансляции белка, представляющего собой внутренний стандарт, в случае если указанное вещество обладает одним или более полезными биологическими, нутрицевтическими или лечебными свойствами. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения белок, представляющий собой внутренний стандарт, кодируется последовательностью мРНК, которая имеет одну открытую рамку считывания (ОРС) в 5'-НТО, или не имеет ОРС в 5'-НТО. Согласно другим аспектам настоящего изобретения биомаркерный белок выбирают из группы, состоящей из продукта мРНКб гена BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 и GCN4. Согласно другим аспектам настоящего изобретения этап детектирования уровня трансляции осуществляют с помощью одного или более методов, таких как Вестерн-блот, ИФА и иммуноцитохимические методы анализа. Согласно другим аспектам настоящего изобретения 5'-НТО представляет собой природную или синтетическую последовательность. Согласно другим аспектам настоящего изобретения 5'-НТО функционально связана с последовательностью, которая кодирует репортерный белок. Согласно другим аспектам настоящего изобретения уровни трансляции определяют, оценивая один или более видов активности репортерного белка. Согласно другим аспектам настоящего изобретения уровень трансляции биомаркерного белка составляет по меньшей мере 150% от уровня трансляции внутреннего стандарта. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения оценивают активность омега-3 ПНЖК (например, ЭПК) в веществе. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения вещество представляет собой образец пищевого продукта, образец нутрицевтического продукта или образец фармацевтического препарата.

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ детектирования способности вещества (например, вещества, полученного из рыбьего жира, и/или вещества, содержащего ЭПК) активировать биомаркерный ген на этапе транскрипции. Способ включает следующие этапы: обеспечение первой исследуемой системы (тест-системы), включающей последовательность мРНК, которая содержит область, кодирующую первый репортерный белок, функционально связанную с промотором первого биомаркера, обеспечение второй исследуемой системы (тест-системы), включающей вторую последовательность мРНК, которая содержит область, кодирующую второй репортерный белок, функционально связанную с промотором второго биомаркера, приведение указанной второй исследуемой системы в контакт с веществом, детектирование уровней транскрипции первой и второй последовательностей мРНК, сравнение уровней транскрипции первой и второй мРНК, определение того, является ли уровень транскрипции второй последовательности мРНК более высоким, чем уровень транскрипции первой последовательности мРНК, и идентификацию вещества как активатора биомаркерного гена в случае, если уровень транскрипции второй мРНК

превышает уровень транскрипции первой мРНК, в том случае если вещество активирует биомаркерный ген на этапе транскрипции. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения первая и вторая исследуемые системы представляют собой системы на основе животных моделей, клеточные или бесклеточные системы. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения осуществляют контакт первой исследуемой системы со стандартным веществом или контрольным веществом. Согласно другим аспектам настоящего изобретения первая мРНК и вторая мРНК имеют идентичные последовательности, и/или первый репортерный белок и второй репортерный белок являются идентичными. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения уровни транскрипции определяют методом ПЦР в режиме реального времени (например, в условиях *in vitro* и *in vivo* (например, в клетках)). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения транскрипционную активность определяют путем детектирования активности одного или более репортерных белков. Согласно другим аспектам настоящего изобретения биомаркерный ген кодирует проапоптотический белок или белок-супрессор опухолей (например, СНОР, BpR, ATF-4, Xbp-1, синтазу аминокислот или т.п.). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения уровень транскрипции второй последовательности мРНК составляет по меньшей мере 150% от уровня транскрипции первой последовательности мРНК. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения оценивают активность омега-3 ПНЖК (например, ЭПК) в веществе. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения вещество представляет собой образец пищевого продукта, образец нутрицевтического продукта или образец фармацевтического препарата.

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ изготовления продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Способ включает следующие этапы: обеспечение первого образца, включающего первую последовательность мРНК, которая содержит по меньшей мере две открытые рамки считывания в 5'-нетранслируемой области указанной первой последовательности мРНК, причем первая последовательность мРНК кодирует первый биомаркерный белок, обеспечение второго образца, включающего вторую последовательность мРНК, которая содержит по меньшей мере две открытые рамки считывания в 5'-нетранслируемой области (НТО) указанной второй последовательности мРНК, причем вторая последовательность мРНК кодирует второй биомаркерный белок, приведение второго образца в контакте продуктом рыбьего жира, сравнение уровней трансляции и определение детектирование уровней трансляции первого и второго биомаркерных белков, причем уровень трансляции второго биомаркерного белка является более высоким, чем уровень трансляции первого биомаркерного белка, в случае если продукт рыбьего жира обеспечивает одно или более полезных биологических, нутрицевтических или лекарственных свойств для субъекта, и выбор продукта рыбьего жира, который имеет более высокий уровень трансляции, в качестве продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения первый образец приводят в контакт со стандартным веществом или контрольным веществом. Согласно другим аспектам настоящего изобретения первая мРНК и вторая мРНК имеют идентичные последовательности. Согласно другим аспектам настоящего изобретения первый биомаркерный белок и второй биомаркерный белок являются идентичными (например, продукт мРНКb гена BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 и GCN4).

Согласно некоторым примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ изготовления продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Способ включает следующие этапы: обеспечение образца, включающего

последовательность мРНК, которая содержит по меньшей мере две открытые рамки считывания в 5'-нетранслируемой области последовательности мРНК, причем последовательность мРНК кодирует биомаркерный белок, приведение образца в контакт с продуктом рыбьего жира, детектирование уровня трансляции биомаркерного белка, 5 детектирование уровня трансляции белка, представляющего собой внутренний стандарт, сравнение и определение является ли уровень трансляции биомаркерного белка более высоким, чем уровень трансляции белка, представляющего собой внутренний стандарт, в случае если продукт рыбьего жира может обеспечить одно или более полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств для субъекта, и выбор продукта 10 рыбьего жира, который имеет более высокий уровень трансляции, в качестве продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения биомаркерный белок выбирают из группы, состоящей из продукта мРНКб гена BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 и GCN4.

Согласно некоторым типичным вариантам реализации настоящего изобретения 15 предложен способ изготовления продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Способ включает следующие этапы: обеспечение первой исследуемой системы (тест-системы), включающей последовательность мРНК, которая содержит область, кодирующую первый репортерный белок, функционально связанную с промотором первого биомаркера, обеспечение второй исследуемой системы (тест-системы), 20 включающей вторую последовательность мРНК, которая содержит область, кодирующую второй репортерный белок, функционально связанную с промотором второго биомаркера, приведение второй исследуемой системы в контакт с продуктом рыбьего жира, детектирование уровней транскрипции первой и второй последовательностей мРНК, сравнение и определение является ли уровень транскрипции 25 второй последовательности мРНК более высоким, чем уровень транскрипции первой последовательности мРНК, в случае если продукт рыбьего жира может обеспечить одно или более полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств для субъекта, и выбор продукта рыбьего жира, который имеет более высокий уровень трансляции, в качестве продукта рыбьего жира, контролируемого по качеству. Согласно 30 некоторым аспектам настоящего изобретения промотор биомаркера выбирают из группы, состоящей из промотора СНОР, промотора ВР, промотора ATF-4, промотора Хбр-1 или промотора синтетазы аминокислот и т.п., или других промоторов, индукция которых осуществляется аналогичным образом за счет ингибирования процесса инициации трансляции.

Согласно некоторым дополнительным примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложены способы детектирования транскриптов, концентрации которых в образце увеличиваются в результате активности омега-3 жирных кислот, с применением 35 методов детектирования нуклеиновых кислот, такие как ПЦР в режиме реального времени. Дополнительно предложены способы детектирования в образце транскриптов, концентрации которых увеличиваются в результате активности омега-3 жирных кислот, путем детектирования активности репортерных белков, кодируемых генами, находящимися под контролем промоторов, которые активируется под действием 40 омега-3 жирных кислот на этапе транскрипции. Дополнительно предложены способы детектирования повышенной эффективности трансляции транскриптов, которые имеют две или более открытых рамок считывания в их 5'-НТО. Дополнительно предложены способы изготовления пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов и лекарственных средств, контролируемых по качеству, используя способы 45 детектирования в образце транскриптов, концентрации которых увеличиваются в

результате активности омега-3 жирных кислот.

Согласно некоторым дополнительным примерам вариантов реализации настоящего изобретения предложены способы детектирования эффективности композиции, обладающей ингибиторной активностью в отношении инициации трансляции, которые включают этапы приведения клеток, экспрессирующих eIF2 α -WT, в контакт с указанной композицией в течение периода времени и при температуре, достаточных для ингибирования пролиферации указанных клеток, и определения степени ингибирования пролиферации указанных клеток, индуцированного указанной композицией, причем величина указанной активности указанной композиции пропорциональна степени ингибирования пролиферации указанных клеток, экспрессирующих eIF2 α -WT.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Перечисленные выше и другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны из нижеследующего подробного описания типичных вариантов реализации, рассматриваемых во взаимосвязи с прилагаемыми чертежами, где:

На Фиг. 1 приведены результаты исследования, полученные с помощью метода Вестерн-блота, с использованием антител к общему белку eIF2 α или антител к β -актину. Дорожка 1 соответствует клеткам, трансдуцированным вектором pLVTHM без миРНК, дорожки 2 и 3 соответствуют клеткам, трансдуцированным вектором pLVTHM, содержащим кассеты eIF2 α -WT и eIF2 α -S51A OPC и миРНК #1098.

На Фиг. 2 приведен график, показывающий результаты исследования уровней мРНК эндогенного eIF2 α , определенных методом ПЦР в режиме реального времени в исходных клетках (Mat) и клетках, экспрессирующих рекомбинантный (REC) eIF2 α -WT (GFP) и eIF2 α -S51A/RFP или eIF2 α -WT/RFP. Дорожка 1 соответствует клеткам, трансдуцированным вектором pLVTHM без миРНК, дорожки 2 и 3 соответствуют клеткам, трансдуцированным вектором pLVTHM, содержащим кассеты eIF2 α -WT и eIF2 α -S51A OPC и миРНК #1098.

На Фиг. 3 приведены результаты исследования, полученные с помощью метода Вестерн-блота. Клетки, указанные в подписи к Фиг.2, обрабатывали носителем или ЭПК, и клеточные лизаты помечали с применением антител к pS51-eIF2 α (вверху) или антител к общему eIF2 α (внизу). Rec = рекомбинантный, End = эндогенный eIF2 α .

На Фиг. 4 показано графическое отображение результатов исследования устойчивости клеток, экспрессирующих eIF2 α -S51A, к ингибированию клеточной пролиферации, индуцированному ЭПК, тогда как пролиферация исходных клеток PC-3 (Mat) или клеток PC-3, трансдуцированных рекомбинантным белком eIF2 α /RFP и миРНК, чувствительна к ингибированию клеточной пролиферации, индуцированному ЭПК, и зависит от дозы кислоты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Было сделано парадоксальное наблюдение, что трансляция некоторых мРНК осуществляется более эффективно при недостатке тройного комплекса, а не при его избытке (Aktas et al., 2004, Journal of Nutrition 134(9): 2487S-2491S; Halperin and Aktas, международная публикация патентной заявки WO 2008/008333). Это наблюдение относится к молекулам мРНК, кодирующим фактор транскрипции ATF-4, который активирует на этапе трансляции многие гены раннего ответа на стресс, такие как проапоптотический С/ЕВР-гомологичный белок (CHOP) или шаперон иммуноглобулин-связывающий белок раннего ответа (BiP) (Harding et al., 2000, Mol. Cell 6:1099). Трансляция изоформы мРНК BRCA1, обозначенной мРНКb, также осуществляется более эффективно при недостатке тройного комплекса. Было обнаружено, что омега-3 полиненасыщенная жирная кислота, эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), активирует

СНОР (номер доступа в GenBank S40706) и регулируемый глюкозой белок 78 (BiP, номер доступа RefSeq NM_005347) в раковых клетках и в опухолях, полученных от животных с моделями онкологических заболеваний или от пациентов, и что ЭПК увеличивала трансляцию мРНК BRCA1 в линиях клеток рака молочной железы и опухолях

5 животных.

Последовательности мРНК BRCA1 и мРНК, кодирующей фактор активации транскрипции 4 (ATF-4, номер доступа в RefSeq NM_001675), содержат несколько открытых рамок считывания (ОРС) в их 5'-нетранслируемой области (5'-НТО). Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы полагают, что

10 дополнительные мРНК, которые содержат две или более ОРС в их 5'-НТО, были определены к настоящему моменту. Такие мРНК включают, но не ограничиваются ими, транскрипты мРНК генов, которые кодируют опухолевый белок, контролируемый на этапе транскрипции (TCTP, номер доступа в RefSeq NM_003295.2), протектин (CD59) и фактор общего контроля с постоянной репрессией 4 (GCN4, номер доступа в RefSeq

15 NC_00113). В соответствии с некоторыми типичными вариантами реализации может быть проведена количественная оценка способности образца пищи, нутрицевтического продукта или лекарственного средства повышать распространенность, концентрацию или биологическую активность белка, кодируемого транскриптом мРНК, имеющим несколько ОРС в 5'-НТО. В частности, может быть проведена количественная оценка

20 способности такого образца вызывать увеличение распространенности, концентрации или активности одного или более из BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 и GCN4.

Повышение эффективности транскрипции некоторых генов также происходит в присутствии ингибиторов тройного комплекса. Помимо генов, которые кодируют ATF-4, BiP и СНОР, гены, которые демонстрируют повышенную эффективность транскрипции

25 в присутствии ингибиторов процесса инициации трансляции, включают гены, кодирующие X-Vox-связывающий белок 1 (XBP-1, номер доступа в RefSeq NM_001079539.1) и синтетазы аминокислот. Такие гены являются подходящими биомаркерами для проведения исследований ингибиторов процесса инициации трансляции, эффективность которых оценивают в соответствии с настоящим

30 изобретением, например, ингибиторов, обнаруживаемых в рыбьем жире. Транскрипты таких генов можно детектировать и количественно оценивать их концентрации до и после воздействия образцов исследуемых пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов или лекарственных средств на подопытных животных, клеточные или бесклеточные системы с использованием способов, известных в данной области техники,

35 затем концентрации транскриптов могут быть сопоставлены, чтобы определить степень, в которой исследуемый образец усиливает транскрипцию маркерного гена. В другом варианте реализации концентрации транскриптов исследуемых биомаркеров могут быть сопоставлены с таковыми для контрольных транскриптов (например, конститутивных генов) или транскриптов, выделенных из животных моделей, клеточных

40 или бесклеточных систем, после воздействия на них стандартных или контрольных веществ с известной величиной биологической активности. Аналогичным образом можно осуществлять детектирование и количественную оценку концентраций белковых продуктов, полученных в результате транскрипции биомаркерных генов, и их концентрации могут быть сопоставлены с теми, которые обнаруживаются в

45 необработанных животных моделях, клеточных или бесклеточных системах либо в животных моделях, клеточных и бесклеточных системах после воздействия стандартных или контрольных веществ с известной величиной биологической активности.

В настоящее время термин «нутрицевтический» представляет собой комбинированное

понятие, включающее «питательный» и «фармацевтический», и относится к пищевому продукту, который обеспечивает один или более видов благоприятных воздействий на организм, например, человека. Термин «нутрицевтический» может также относиться к одному или более соединениям, которые присутствуют в пищевом продукте. Пищевые продукты включают, но не ограничиваются ими, диетические добавки, продукты питания, напитки и т.п. Термины «нутрицевтический» и «пищевая добавка» могут быть использованы взаимозаменяемо. Наличие у вещества (например, пищевого продукта, нутрицевтического продукта или фармацевтического препарата) полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств относится к способности вещества обеспечивать одно или более свойств, имеющих практическую значимость для здоровья субъекта, как описано в настоящей заявке (например, при предотвращении, уменьшении и/или лечении одного или более заболеваний и/или расстройств, описанных в настоящей заявке).

Нутрицевтические продукты согласно настоящему изобретению включают жиры, полученные из рыб, например, рыб, обитающих в теплых или холодных водах, пресноводных рыб, морских рыб, рыб из солоноватых вод, диких рыб, выращиваемых в искусственных условиях рыб и т.п., и препараты жирных кислот, такие как те, которые содержат омега-3 жирные кислоты.

В настоящей заявке термин «омега-3 жирные кислоты» относится к полиненасыщенным жирным кислотам, таким как те, которые обнаруживаются в жире из жирной рыбы, такой как макрель, лосось, сардины и т.п., или полученным из растительных источников, таких как семена чиа, периллы, льна, грецкого ореха, портулака, клюквы, облепихи, конопли и т.п., и фруктов растений, таких как пальма асаи. Омега-3 жирные кислоты включают, но не ограничиваются ими, α -линолевою кислоту (АЛК), эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК), докозагексаеновую кислоту (ДГК) и т.п.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам определения эффективности композиции в отношении ингибирования, активирования или модулирования процессов инициации трансляции или транскрипции генов. В настоящей заявке термин «эффективность» включает, но не ограничивается этим, действенность соединения, например, нутрицевтического продукта, в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процессов инициации трансляции или транскрипции генов. Эффективность композиции может быть определена как способность композиции ингибировать, активировать или модулировать иным образом процессы инициации трансляции или транскрипции генов по отношению к стандарту или контролю.

Стандарт или контроль согласно настоящему изобретению представляет собой соединение или композицию, которые обладают активностью в отношении ингибирования, активирования или модулирования процессов инициации трансляции или транскрипции, как определено по результатам одного или более биологических способов исследований, описанных в настоящей заявке. Стандарты могут быть получены из различных источников, таких как источники омега-3 жирных кислот или других агентов, описанных в настоящей заявке. Стандарты могут быть синтезированы в лабораторных условиях или получены из коммерческих источников. Стандарт может быть разбавлен или сконцентрирован, чтобы уменьшить или увеличить его активность в отношении ингибирования, активирования или модулирования трансляции, соответственно. В другом варианте стандарт или контроль может быть внутренним по отношению к исследуемой системе, например, ген, промотор гена, транскрипт мРНК

или белок (например, конститутивный ген, промотор, транскрипт или белок), эффективность транскрипции или трансляции которых по существу не зависит от исследуемого вещества, например, β -актин, убиквитин, β -тубулин, ГАФДГ и т.п.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения стандарт или контроль представляет собой омега-3 жирную кислоту, такую как эйкозапентаеновая кислота. Стандарт или контроль может быть получен из рыбьего жира (например, жира морских рыб) или льняного масла.

Согласно другим аспектам настоящего изобретения стандарт или контроль представляет собой биомаркер, который по существу нечувствителен к влиянию вещества, эффективность или биологическую активность которого исследуют. Применительно к регуляции гена или промотора гена на этапе транскрипции либо регуляции транскрипта мРНК или белка на этапе трансляции, термин «по существу нечувствительный» при оценке активности исследуемого вещества означает, что регуляция транскрипции или трансляции полностью не зависит от действия исследуемого вещества либо модулируется им в значительно меньшей степени (например, по меньшей мере в 10 раз, 100 раз, 1000 раз или более сниженная чувствительность к действию исследуемого вещества), по сравнению с регуляцией этих процессов для биомаркера.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения исследуемый образец откалиброван таким образом, что концентрации его активных компонентов находятся в линейном диапазоне и не вызывают насыщение исследуемой системы. Методы калибровки хорошо известны в данной области техники и включают методы простых разведений, серийных разведений и т.п.

В соответствии с настоящим изобретением предложены способы исследований, в которых активность композиции в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процессов трансляции или транскрипции сравнивают с таковой для стандарта с использованием одного или более биологических способов исследований, описанных в настоящей заявке. Величина активности композиции может составлять 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% или более 1000% от величины активности стандарта или контроля.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения величина активности в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процессов инициации трансляции или транскрипции гена составляет от приблизительно 1% до 200%, от приблизительно 5% до 195%, от приблизительно 10% до 190%, от приблизительно 20% до 180%, от приблизительно 30% до 170%, от приблизительно 40% до 160%, от приблизительно 50% до 150%, от приблизительно 60% до 140%, от приблизительно 65% до 135%, от приблизительно 70% до 130%, от приблизительно 75% до 125%, от приблизительно 80% до 120%, от приблизительно 85% до 115%, от приблизительно 90% до 110%, от приблизительно 91% до 109%, от приблизительно 92% до 108%, от приблизительно 93% до 107%, от приблизительно 94% до 106%, от приблизительно 95% до 105%, от приблизительно 96% до 104%, от приблизительно 97% до 103%, от приблизительно 98% до 102% или от приблизительно 99% до 101% величины активности стандарта или контроля. Согласно другим аспектам настоящего изобретения величина активности в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процессов инициации трансляции или транскрипции гена составляет от

приблизительно 50% до приблизительно 150% величины активности стандарта, от приблизительно 80% до приблизительно 120% величины активности стандарта, от приблизительно 90% до приблизительно 110% величины активности стандарта или от приблизительно 95% до приблизительно 105% величины активности стандарта или

5 контроля.

Термин «примерно» или «приблизительно» обычно относится к пределам приемлемого диапазона ошибок для типа значения и способа измерения. Например, это может означать, что отклонение величины находится в пределах 20%, более предпочтительно в пределах 10% и наиболее предпочтительно в пределах 5% от

10

заданного значения или диапазона. В соответствии с другим вариантом, особенно в биологических системах, термин «приблизительно» означает приблизительно в пределах величины \log (т.е., на порядок), предпочтительно в пределах коэффициента равного одному или двум от заданного значения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения контроль или стандарт может иметь нулевую активность. Таким образом, при заданной активности может быть получен двоичный результат (т.е. положительный или отрицательный). В том случае, если необходимо точное количественное определение активности, она будет измеряться по абсолютной шкале или в сравнении со стандартом, который обладает, по меньшей мере, той или иной известной величиной активности. Нутрицевтический

20

продукт или композиция, включающая нутрицевтический продукт согласно настоящему изобретению, могут быть разбавлены или сконцентрированы, чтобы уменьшить или увеличить активность в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процесса трансляции или транскрипции по сравнению с контролем/ стандартом, соответственно.

25

В настоящем изобретении также предложены способы исследований, согласно которым однородность композиций в серии или партии определяют путем сравнения величин относительной активности двух или более (например, 10, 100, 1000, 10000 1000000 или более) композиций, используя один или более из биологических способов исследований, описанных в настоящей заявке. В настоящей заявке термины

30

«однородность партии» или «однородность серии» относятся, но не ограничиваются ими, к относительной активности двух или более композиций в партии или серии в отношении ингибирования, активирования или модулирования иным образом процесса инициации трансляции или активности в отношении активирования транскрипции. В настоящей заявке термины «партия» или «серия» относятся, но не ограничиваются ими,

35

к группе из двух или более композиций. Партия или серия включает композиции, приготовленные совместно, или композиции из двух или более источников (например, географических регионов, растительного или животного происхождения, коммерческих и/или синтетических источников). В настоящей заявке термин «партия» или «серия» также может относиться к одному пулу композиции, из которого должны быть получены

40

или произведены единицы продукции или исследуемые образцы, или который, в ином случае, будет далее разделен на части или фракции.

По меньшей мере, в некоторых примерах нутрицевтические продукты, описанные в настоящей заявке, можно применять в лечении расстройств, связанных с нарушением клеточной пролиферации, таких как клеточные пролиферативные расстройства

45

(например, онкологические заболевания). Лечение клеточных пролиферативных расстройств подразумевает ингибирование пролиферации, включая быструю пролиферацию. В настоящей заявке термин «клеточное пролиферативное расстройство» включает расстройства, характеризующиеся нежелательной или патологической

пролиферацией одной или более подгрупп(ы) клеток в многоклеточном организме. Термин «онкологическое заболевание» относится к различным типам злокачественных новообразований, большинство из которых может проникать в окружающие ткани и образовывать метастазы в разных участках (см., например, PDR Medical Dictionary, 1-е издание, 1995). Термины «новообразование» и «опухоль» относятся к патологической ткани, которая за счет клеточной пролиферации растет быстрее, чем нормальная ткань, и продолжает расти после отмены действия стимулов, которые инициировали пролиферацию (см., например, PDR Medical Dictionary, 1-е издание, 1995). В такой патологической ткани, которая может быть как доброкачественной (т.е. доброкачественная опухоль), так и злокачественной (т.е. злокачественная опухоль), частично или полностью отсутствует структурная организация и функциональная координация с нормальной тканью.

Формулировка «лечение клеточных пролиферативных нарушений» включает предотвращение индукции, возникновения, формирования или роста новообразований у субъекта или уменьшение роста уже существующих опухолей у субъекта.

Формулировка также может описывать ингибирование процессов проникновения опухолевых клеток в соседние ткани или проникновения метастаз новообразований из одного участка в другой. Примеры типов новообразований, которые включены в область настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, новообразования, связанные с онкологическими заболеваниями молочной железы, кожи, костей, предстательной железы, яичников, матки, шейки матки, печени, легких, мозга, гортани, желчного пузыря, поджелудочной железы, прямой кишки, паращитовидных желез, щитовидной железы, надпочечников, иммунной системы, нервной ткани, головы и шеи, толстой кишки, желудка, бронхов и/или почек.

Клеточные пролиферативные расстройства могут дополнительно включать расстройства, связанные с гиперпролиферацией клеток гладких мышц сосудов, таких как пролиферативные расстройства сердечнососудистой системы, например, атеросклероз и рестеноз. Клеточные пролиферативные расстройства также могут включать такие расстройства как пролиферативные кожные расстройства, например, X-сцепленный ихтиоз, псориаз, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, эпидермолитический гиперкератоз и себорейный дерматит. Клеточные пролиферативные расстройства могут дополнительно включать такие расстройства как аутосомно-доминантной поликистоз почек (ADPKD), мастоцитоз и клеточные пролиферативные расстройства, вызванные инфекционными агентами, такими как вирусы.

По меньшей мере, в некоторых примерах нутрицевтические продукты, которые исследовали и/или получали в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, можно применять в лечении расстройств, связанных с нарушением энергетического баланса, например, метаболических расстройств, включая, но не ограничиваясь ими, сахарный диабет, ожирение, болезни накопления гликогена, болезни накопления липидов, митохондриальные заболевания и т.п. (см. также www.emedicine.com/ped/GENETICS_AND_METABOLIC_DISEASE.htm). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения нутрицевтические продукты, которые исследовали и/или получали в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, модулируют увеличение веса путем взаимодействия с 5'-НТО рецептора лептина.

Способы детектирования, описанные в настоящей заявке, можно применять для детектирования одной или более последовательностей ДНК, последовательностей РНК, представляющих интерес белков или полипептидов в биологическом образце в

условиях *in vitro*, а также в условиях *in vivo*. Например, методики детектирования мРНК в условиях *in vitro* включают Нозерн-гибридизацию и гибридизацию *in situ*. Методики детектирования полипептида, соответствующего маркеру, предложенному в настоящем изобретении, в условиях *in vitro* включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), Вестерн-блот, иммунопреципитацию и иммунофлуоресцентные методы исследований. Методики детектирования геномной ДНК в условиях *in vitro* включают Саузерн-гибридизацию. Кроме того, методики детектирования белка и/или полипептида в условиях *in vivo* включают введение субъекту меченого антитела, направленного к белку и/или полипептиду. Например, антитело может быть помечено радиоактивным маркером, присутствие и расположение которого у субъекта можно детектировать с помощью стандартных методов визуализации.

Общий принцип детектирования и/или количественного определения включает приготовление образца или реакционной смеси, которые могут содержать одну или более последовательностей ДНК, последовательностей РНК, представляющих интерес белков или полипептидов, и зонд, в соответствующих условиях и в течение периода времени, которые достаточны для взаимодействия и связывания маркера и зонда с образованием комплекса, который можно выделять и/или детектировать в реакционной смеси. Такие исследования могут быть осуществлены различными способами.

Например, один из способов осуществления подобного исследования предполагает закрепление последовательности ДНК, последовательности РНК, представляющего интерес белка или полипептида, или зонда на твердой подложке, которая также называется субстратом, и детектирование комплексов зонда с целевой последовательностью ДНК, последовательностью РНК, представляющим интерес белком или полипептидом, закрепленными на твердой фазе, после завершения реакции. В одном из вариантов реализации такого способа образец, который должен быть исследован, чтобы определить наличие маркера и/или оценить его концентрацию, может быть закреплен на носителе или твердофазной подложке. Согласно другому варианту реализации возможна обратная ситуация, когда зонд может быть закреплен на твердофазной подложке, и при проведении исследования образец субъекта может вступать в реакцию в качестве неприкрепленного компонента.

Существует много общепринятых способов закрепления на твердой фазе компонентов для проведения исследований. Они включают, но не ограничиваются ими, иммобилизацию молекул маркеров или зондов за счет связывания с биотином и стрептавидином. Такие биотинилированные компоненты для проведения исследований могут быть приготовлены из биотин-N-гидроксисукцинимид (NHS) с помощью методик, известных в данной области техники (например, наборы для биотинилирования, Pierce Chemicals, Рокфорд, Иллинойс, США), и иммобилизованы в лунках 96-луночных планшетов, покрытых стрептавидином (Pierce Chemical). Согласно некоторым вариантам реализации поверхности с иммобилизованными на них компонентами для проведения исследований могут быть получены заранее и храниться.

Другие подходящие носители или твердофазные подложки для применения в таких способах исследований включают любой материал, способный связываться с классом молекул, к которому принадлежит маркер или зонд. Хорошо известные подложки или носители включают, но не ограничиваются ими, стекло, полистирол, нейлон, полипропилен, полиэтилен, декстран, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро и магнетит.

Для осуществления раскрытых в данном описании способов исследований с применением упомянутых выше подходов, к твердой фазе, на которой закреплен второй

компонент, добавляют свободный компонент. После завершения реакции компоненты, не вошедшие в состав комплекса, могут быть удалены (например, путем промывания) в условиях, при которых любые образованные комплексы остаются иммобилизованными на твердой фазе. Детектирование комплексов зонда с последовательностью ДНК, последовательностью РНК, представляющим интерес белком или полипептидом, которые закреплены на твердой фазе, можно осуществлять с использованием ряда способов, описанных в настоящей заявке.

Согласно некоторым типичным вариантам реализации зонд, в случае если он является закрепленным компонентом в исследовании, может быть помечен для детектирования и считывания результатов исследования, прямо или косвенно, с применением детектируемых маркеров, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры детектируемых маркеров включают различные радиоактивные фрагменты, ферменты, простетические группы, флуоресцентные маркеры, люминесцентные маркеры, биолюминесцентные маркеры, металлические частицы, связывающиеся пары белок-белок, связывающиеся пары белок-антитело и т.п. Примеры флуоресцентных белков включают, но не ограничиваются ими, желтый флуоресцентный белок (YFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид, фикоэритрин и т.п. Примеры биолюминесцентных маркеров включают, но не ограничиваются ими, люциферазы (например, люциферазы бактерий, светлячка, жука-щелкуна и т.п.), люциферин, экворин и т.п. Примеры ферментных систем, содержащих визуально детектируемые сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, галактозидазы, глюкуронидазы, фосфатазы, пероксидазы, холинэстеразы и т.п. Идентифицируемые маркеры также включают радиоактивные соединения, такие как ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^3H и ^{32}P . Идентифицируемые маркеры коммерчески доступны из различных источников.

Флуоресцентные метки и способы их присоединения к нуклеотидам и/или олигонуклеотидам описаны во многих обзорах, включая Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 9-е изд. (Molecular Probes, Inc., Юджин, 2002); Keller and Manak, DNA Probes, 2-е изд. (Stockton Press, Нью-Йорк, 1993); под ред. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Оксфорд, 1991); и Wetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26:227-259 (1991). Конкретные методики, которые можно применять согласно настоящему изобретению, описаны в следующей выборке ссылок: патенты США №№4757141, 5151507 и 5091519. В одном аспекте настоящего изобретения один или более флуоресцентных красителей применяют в качестве меток, например, как раскрыто в патентах США №5188934 (красители на основе 4,7-дихлорфлуоресцеина); №5366860 (спектрально разрешаемые родаминовые красители); №5847162 (красители на основе 4,7-дихлорродамина); №4318846 (красители на основе замещенного эфиром флуоресцеина); №5800996 (красители для оценки резонансного переноса энергии); Lee et al.; 5066580 (ксантиновые красители); 5688648 (красители для оценки резонансного переноса энергии); и т.п. Введение метки также можно осуществлять с применением квантовых точек, как раскрыто в патентах, приведенных далее, и публикациях патентных заявок: патенты США №№6322901, 6576291, 6423551, 6251303, 6319426, 6426513, 6444143, 5990479, 6207392, 2002/0045045 и 2003/0017264. В настоящей заявке термин «флуоресцентная метка» включает сигнальный фрагмент, который передает информацию за счет способности одной или более молекул поглощать кванты света и испускать их в виде флуоресценции. Такие флуоресцентные свойства включают интенсивность флуоресценции, время жизни флуоресценции,

характеристики спектра испускания, резонансный перенос энергии и т.п.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения определение способности зонда распознавать маркер можно осуществлять без прикрепления метки к любому компоненту в исследовании (зонду или маркеру), используя такие методики как анализ биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени (BIA) (см, например, Sjolander et al. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338 2345 and Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699 705). В настоящей заявке «BIA» или «поверхностный плазмонный резонанс» представляет собой технологию исследования биоспецифических взаимодействий в реальном времени без прикрепления метки к любому из партнеров, вступающих во взаимодействие (например, система BIAcore). Изменение массы на связывающей поверхности (указывающее на связывание) приводит к изменению показателя преломления света вблизи поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR)), в результате этого появляется детектируемый сигнал, который может быть использован в качестве признака протекания в реальном времени реакции между биологическими молекулами.

Кроме того, согласно другому варианту реализации аналогичный способ детектирования и/или количественного определения может быть осуществлен с применением одной или более последовательностей ДНК, последовательностей РНК, представляющих интерес белков или полипептидов и зонда в качестве веществ, растворенных в жидкой фазе. При проведении такого исследования входящую в состав комплекса последовательность ДНК, последовательность РНК, представляющий интерес белок или полипептид и зонд отделяют от несвязанных компонентов с помощью любой из нескольких стандартных методик, включая, но не ограничиваясь ими, дифференциальное центрифугирование, хроматографию, электрофорез и иммунопреципитацию. При дифференциальном центрифугировании комплексы последовательности ДНК, последовательности РНК, представляющего интерес белка или полипептида и зонда могут быть отделены от несвязанных компонентов в исследованиях с помощью серии этапов центрифугирования за счет различных скоростей седиментации комплексов в условиях седиментационно-диффузного равновесия вследствие различий по размерам и плотностям (см, например, Rivas and Minton (1993) *Trends Biochem Sci.* 18:284). Стандартные хроматографические методики также можно применять для отделения молекул, входящих в состав комплекса, от несвязанных молекул. Например, гель-фильтрационная хроматография позволяет провести разделение молекул на основании их размера с помощью колонки, наполненной соответствующей смолой для гель-фильтрации; например, относительно более крупный комплекс может быть отделен от относительно небольших несвязанных компонентов. Аналогичным образом, относительное различие заряда комплекса последовательности ДНК, последовательности РНК, представляющего интерес белка или полипептида с зондом, по сравнению с зарядами несвязанных компонентов, может быть использовано, чтобы отличить комплекс от несвязанных компонентов, например, путем использования смол для ионообменной хроматографии. Такие смолы и хроматографические методики хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Heegaard (1998) *J. Mol. Recognit.* 11:141; Hage and Tweed (1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 12:499). Гель-электрофорез также можно применять для отделения компонентов в исследованиях, входящих в состав комплекса, от несвязанных компонентов (см., например, Ausubel et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987 1999). Согласно этой методике комплексы белка или нуклеиновой кислоты разделяются в зависимости от размера или заряда, например. Для того чтобы

поддержат связывающие взаимодействия в ходе процесса электрофоретического разделения, в качестве экспериментальных условий предпочтение, как правило, отдается неденатурирующим материалам для получения геля, не содержащего восстанавливающего агента. Подходящие условия для осуществления конкретного способа исследования и их компоненты должны быть хорошо известны специалисту в данной области техники.

Согласно некоторым типичным вариантам реализации настоящего изобретения концентрация последовательности мРНК, представляющей интерес, может быть определена в биологическом образце в условиях *in situ* и/или *in vitro*, используя способы, известные в данной области техники. Во многих способах детектирования экспрессии используется выделенная РНК. При осуществлении способов в условиях *in vitro*, для очистки РНК из клеток крови может быть использована любая методика выделения РНК, которая позволяет выделить мРНК (см., например, Ausubel et al, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987 1999). Кроме того, большое количество клеток и/или образцов можно легко обработать с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как, например, одностадийный процесс выделения РНК по Хомчинскому (1989, патент США №4843155).

Выделенная мРНК может быть использована в исследованиях с применением методов гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются ими, Саузерн-блот или Нозерн-блот, ПЦР и наборы зондов. Согласно некоторым типичным вариантам реализации способ диагностики для детектирования концентраций мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зонд), которая может гибридизоваться с мРНК, кодируемой геном, который детектируют. Нуклеиновая кислота, выступающая в качестве зонда, может представлять собой, например, полноразмерную кДНК или ее часть, такую как олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере 7, 15, 30, 50, 100, 250 или 500 нуклеотидов, длина которого является достаточной для специфической гибридизации в жестких условиях с мРНК или геномной ДНК, кодирующей маркер согласно настоящему изобретению. Другие зонды, подходящие для применения в диагностических исследованиях согласно настоящему изобретению, описаны в настоящей заявке.

В одном варианте мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и обеспечивают ее контакт с зондом, например, путем электрофоретического разделения мРНК в агарозном геле с последующим переносом мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлозная мембрана. В другом варианте зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и обеспечивают контакт мРНК с зондом(ми), например, на ДНК-чипе. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы детектирования мРНК для применения в детектировании уровня мРНК, кодируемой маркерами согласно настоящему изобретению.

Альтернативный способ определения в образце концентрации мРНК, соответствующей маркеру согласно настоящему изобретению, включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты, например, с помощью методов ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант реализации, изложенный в патентах США №4683195 и №4683202), ПЦР в формате «COLD» (ко-амплификация при более низкой температуре денатурации) (Li et al. (2008) Nat. Med. 14:579), лигазной цепной реакции (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173),

применения Q-бета репликазы (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу «катящегося кольца» (патент США №5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновых кислот с последующим детектированием амплифицированных молекул, используя методики, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные схемы детектирования особенно подходят для обнаружения молекул нуклеиновых кислот, которые присутствуют в очень малых количествах. В настоящей заявке праймеры для амплификации представляют собой пару молекул нуклеиновых кислот, которые могут гибридизоваться с 5'- или 3'-областями гена (смысловая и антисмысловая нити, соответственно, или наоборот), и содержат короткую область между собой. В целом, праймеры для амплификации содержат приблизительно от 10 до 30 нуклеотидов в длину и фланкируют область от приблизительно 50 до 200 нуклеотидов в длину. В соответствующих условиях и при применении соответствующих реагентов такие праймеры обеспечивают амплификацию молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, фланкированную праймерами.

При осуществлении способов в условиях *in situ* отсутствует необходимость выделения мРНК из образца (например, физиологической жидкости (например, клеток крови)) перед началом процесса детектирования. Согласно таким способам клетку или образец ткани подготавливают/обрабатывают с использованием известных гистологических методов. Образец затем иммобилизуют на носителе, обычно предметном стекле, и приводят в контакт с зондом, который может гибридизоваться с мРНК, кодирующей маркер.

Помимо проведения измерений на основании оценки абсолютного уровня экспрессии последовательности ДНК, последовательности РНК, представляющего интерес белка или полипептида, измерения могут быть основаны на оценке нормированного уровня экспрессии последовательности ДНК, последовательности РНК и представляющего интерес белка или полипептида. Уровни экспрессии нормируют, корректируя абсолютный уровень экспрессии последовательности ДНК, последовательности РНК, представляющего интерес белка или полипептида, путем сравнения уровня их экспрессии с уровнем экспрессии гена, который не является маркером, например, стандартного или контрольного гена. Такое нормирование позволяет сравнивать уровень экспрессии в образце, полученном из одного источника, с уровнем в образце из другого источника.

В другом типичном варианте реализации осуществляют детектирование белка или полипептида. Согласно некоторым типичным вариантам реализации агент для детектирования полипептида согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, способное связываться с полипептидом, который соответствует маркеру согласно настоящему изобретению, такое как антитело с детектируемой меткой.

Антитела могут быть поликлональными или, более предпочтительно, моноклональными. Может быть использовано интактное антитело или его фрагмент (например, Fab или F(ab')₂). Термин «помеченный» по отношению к зонду или антителу включает прямое введение метки в зонд или антитело за счет связывания (т.е., за счет физической связи) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также косвенное мечение зонда или антитела при реакции с другим реагентом, который содержит метку. Примеры косвенного мечения включают детектирование первичного антитела с использованием флуоресцентно-меченого вторичного антитела и введение концевой биотиновой метки в ДНК-зонд таким образом, что он может быть обнаружен с помощью флуоресцентно-меченого стрептавидина.

Поликлональные антитела могут быть получены путем иммунизации подходящего

субъекта с использованием выбранного белка или полипептида. Титр выбранного белка у иммунизированного субъекта можно контролировать с течением времени с помощью стандартных методик, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием иммобилизованного белка. При желании молекулы антител к выбранному белку могут быть выделены из млекопитающего (например, из крови) и дополнительно очищены с помощью хорошо известных методик, таких как хроматография с использованием сорбентов на основе иммобилизованного белка. Для получения фракции IgG. Спустя соответствующий период времени после иммунизации, например, при достижении максимального титра антител к выбранному белку, антитело-продуцирующие клетки могут быть получены от субъекта и использованы для получения моноклональных антител с помощью стандартных методик, таких как методика гибридом, впервые описанная в работе Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (см. также, 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; и Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), методика человеческой В-клеточной гибридомы (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), методика EBV-гибридомы (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) или методики триомы. Технология получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, хорошо известна (в общих чертах см. 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). В общих чертах, иммортализованную клеточную линию (как правило, миелому) сливают с лимфоцитами (обычно спленоцитами) млекопитающего, иммунизированного выбранным белком, как описано выше, и культуральные супернатанты полученных клеток гибридомы подвергают скринингу для выявления гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело, которое связывается с выбранным белком.

Различные варианты способов исследований можно применять для определения наличия в образце белка, который связывается с данным антителом. Примеры таких вариантов, включают, но не ограничиваются ими, иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммунологический анализ (РИА), Вестерн-блот, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и т.п. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы детектирования белка/антитела для оценки экспрессии клетками (например, клетками физиологической жидкости, такими как клетки крови) маркера согласно настоящему изобретению.

В одном варианте исследования антитела или фрагменты антител можно применять в рамках таких методов как Вестерн-блот или иммунофлуоресцентный анализ для детектирования экспрессированных белков. Согласно такому способу применения, в целом, предпочтительной является иммобилизация антител или белков на твердой подложке. Подходящие твердофазные подложки или носители включают любую подложку, способную связывать антиген или антитело. Хорошо известные подложки или носители включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро, магнетит и т.п.

Для специалиста в данной области техники будут очевидны многие другие подходящие носители для связывания антитела или антигена и варианты адаптации таких подложек для применения в соответствии с настоящим изобретением. Например, белок, выделенный из клеток (например, клеток физиологической жидкости, таких как клетки крови), можно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и

иммобилизовать на твердофазной подложке, такой как нитроцеллюлоза. Подложка затем может быть промыта подходящими буферными растворами с последующей обработкой антителом, содержащим детектируемую метку. Твердофазная подложка может быть промыта буфером во второй раз для удаления несвязанного антитела.

5 Количество связанной метки на твердой подложке затем можно детектировать с помощью обычных способов.

Согласно некоторым типичным вариантам способы исследований согласно настоящему изобретению могут быть осуществлены на животных моделях (включая, но не ограничиваясь ими, лошадей, коров, овец, свиней, коз, кроликов, морских свинок, 10 крыс, мышей, песчанок, приматов и т.п.), клетках (например, клетках микроорганизмов (например, бактериальных клетках, вирусных клетках, дрожжевых клетках и т.п.)) или в бесклеточных системах (например, исследования транскрипции в условиях *in vitro*, исследования трансляции в условиях *in vitro*, исследования с применением клеточных лизатов, исследования с применением фракционированных клеточных лизатов и т.п.). 15 Следует понимать, что варианты реализации настоящего изобретения, которые были раскрыты в настоящей заявке, предназначены исключительно для описания некоторых способов применения и принципов настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники могут внести многочисленные модификации на основании идей настоящего изобретения, раскрытых в настоящей заявке, не отступая от сущности и 20 объема настоящего изобретения. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, упомянутых в настоящей заявке, полностью включено посредством ссылки.

Представленные ниже примеры приведены в качестве типичных вариантов реализации настоящего изобретения. Данные примеры не следует рассматривать как 25 ограничивающие объем изобретения, поскольку перечисленные и другие эквивалентные варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны, исходя из настоящего описания, чертежей, таблиц и прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Приготовление образцов для биологических способов исследований

30 Действующее вещество многих нутрицевтических продуктов, таких как рыбий жир, высвобождается при переваривании. В этой связи необходимо имитировать процесс пищеварения в пробирке, чтобы исследовать активность рыбьего жира в условиях *in vitro* (например, в клеточной культуре). Существует несколько способов достижения этой цели, один из этих способ описан ниже в качестве не ограничивающего примера.

35 Гидролиз рыбьего жира

Рыбий жир (10 г, ~12 ммоль) и NaOH (2,16 г, 54 ммоль) смешивали в воде (50 мл), абсолютном этаноле (70 мл) и толуоле (10 мл). Смесь перемешивали с помощью магнитной мешалки и нагревали с использованием обратного холодильника в атмосфере N₂ в течение 1,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, 40 обрабатывали 1 н. HCl (81 мл) и экстрагировали н-гексаном (100 мл). Органическую фазу промывали смесью этанол/вода (1:1, об./об.) до достижения значения водородного показателя (pH) водной фазы равного 5. Отделенную органическую фазу высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и удаляли растворитель в вакууме при комнатной 45 температуре. Полученный остаток представлял собой гидролизат рыбьего жира, в котором далее проводят количественное определение состава и оценку биологической активности.

ПРИМЕР 2

Детектирование мРНК биомаркера методом ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени представляет собой количественный метод, который позволяет детектировать изменение концентраций отдельных РНК. В этой связи при исследовании проапоптотических генов или генов-супрессоров опухолей, активируемых на этапе транскрипции в присутствии ингибиторов тройного комплекса, метод ПЦР в режиме реального времени обеспечивает быстрый и точный количественный способ исследования, пригодный для оценки доступности тройного комплекса, а также эффективный косвенный способ, позволяющий детектировать фосфорилирование eIF2 α , индуцированное омега-3 жирными кислотами. Было установлено, что результаты этого нового метода исследования также достоверно коррелировали с результатами, полученными при использовании существующего клеточного метода исследования уровня ATF-4, трансляция которого в значительной степени зависит от доступности тройного комплекса. Поэтому ПЦР в режиме реального времени представляет собой усовершенствованный метод контроля и обеспечения качества пищевых продуктов, нутрицевтических продуктов и лекарственных средств в отношении активности омега-3 жирных кислот и других полезных соединений, которые влияют на доступность тройного комплекса при инициации трансляции мРНК.

Стандартное исследование методом ПЦР в режиме реального времени

1. Высаживают клетки, полученные от человека, мыши или крысы, такие как, например, гепатоциты крысы, фибробласты мыши или человека, размноженные на стандартной питательной среде, такой как, например, DMEM или RPMI-1640 с добавлением 5-10% эмбриональной бычьей или телячьей сыворотки (каждые 3 лунки 6-луночного или 100 мм планшета, или другого контейнера) для каждого исследуемого условия;

2. Обрабатывают исследуемым соединением или контрольным/стандартным носителем.

3. Собирают клетки через шесть часов.

4. Выделяют РНК.

5. Осуществляют реакцию обратной транскрипции РНК.

6. Амплифицируют транскрипты мРНК биомаркера, полученные с помощью реакции обратной транскрипции (например, мРНК, кодирующей СНОР, BiP, ATF-4, Xbp-1 или синтазы аминокислот), и транскрипты 18S РНК (внутренний стандарт).

7. Проводят количественную оценку транскриптов биомаркера, полученных с помощью реакции обратной транскрипции, после нормирования к количеству транскриптов 18S, полученных с помощью реакции обратной транскрипции.

8. Сравнивают количество транскриптов биомаркера, полученных с помощью реакции обратной транскрипции, в образцах, подвергшихся различным видам обработки (например, обработанных исследуемым веществом или носителем).

Исследование мРНК в клетках методом ПЦР в режиме реального времени

1. Высаживают клетки (например, в 96-луночные планшеты или другой контейнер с несколькими отделениями).

2. Обрабатывают различными дозами соединений или носителем.

3. Лизируют клетки через 6 часов.

4. Осуществляют реакцию обратной транскрипции в этих же лунках;

5. Амплифицируют транскрипты мРНК биомаркера, полученные с помощью реакции обратной транскрипции (например, мРНК, кодирующей СНОР, BiP, ATF-4, Xbp-1 или синтазы аминокислот), и транскрипты 18S РНК в той же лунке.

6. Проводят количественную оценку транскриптов биомаркера, полученных с помощью реакции обратной транскрипции, после нормирования к количеству

транскриптов 18S, полученных с помощью реакции обратной транскрипции.

7. Сравнивают количество транскриптов биомаркера, полученных с помощью реакции обратной транскрипции, в образцах, подвергшихся различным видам обработки (например, обработанных исследуемым веществом или носителем). Результаты, полученные при амплификации транскрипта мРНК, кодирующего СНОР, приведены на фиг. 1, в сравнении с результатами, полученными при использовании существующего способа исследования уровня ATF-4.

ПРИМЕР 3

Детектирование транскрипционной активности биомаркерных генов с помощью исследования репортерных генов

Еще одним способом, позволяющим исследовать наличие и активность омега-3 жирных кислот в пищевых продуктах, нутрицевтических и лекарственных композициях, является оценка усиления транскрипционной активности маркерного гена с использованием конструкций, содержащих репортерный ген. В соответствии с этим способом каждая такая конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует репортерный белок (например, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, дальнекрасный флуоресцентный белок, DsRed, DsRed2, оранжевый флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, голубой флуоресцентный белок, бета-галактозидазу, пероксидазу хрена, аквапорины, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу или другой белок, который создает детектируемый сигнал или имеет ферментативную активность или другой вид активности, который восприимчив к детектированию с помощью способов, известных специалистам в данной области техники). Кодированная последовательность конструкции, функционально связанная с последовательностью репортерного белка, представляет собой природную или синтетическую промоторную область, которая активируется на этапе транскрипции в присутствии омега-3 жирных кислот или других подходящих ингибиторов инициации трансляции мРНК, например, ингибиторов тройного комплекса. Подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы генов, которые кодируют биомаркеры, такие как СНОР, BiP, ATF-4, Xbp-1 или синтазы аминокислот. Систему приводят в контакт или обрабатывают исследуемым образцом в условиях, которые обеспечивают протекание транскрипции нуклеиновой кислоты и трансляции мРНК. Подходящие отрицательные контроли включают, но не ограничиваются ими, параллельные исследуемые системы, которые вступают в контакт или обработаны иным образом, или системы, которые вступают в контакт или обработаны соответствующим стандартным образцом. В обеих системах, исследуемой и контрольной, функцию репортерного белка детектируют и количественно оценивают с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, и величины, описывающие функцию репортерного белка в исследуемой и стандартной системах, сравнивают, чтобы определить эффективность омега-3 жирных кислот, присутствующих в исследуемом образце. В ходе такого исследования сигнал, полученный с помощью конструкции, содержащей промотор ATF-4, или конструкции, содержащей промотор СНОР, которая также включает нативную 5'-НТО ATF-4, усиливается в большей степени, чем сигналы, полученные в результате использования других промоторов, поскольку в присутствии омега-3 жирных кислот активирование ATF-4 происходит на этапе как транскрипции, так и трансляции. Конструкции, содержащие репортерные гены, могут быть разработаны с учетом этого фактора, чтобы при оценке величины активности репортера сохранить в линейном диапазоне уровень сигнала, который ожидается в результате воздействия исследуемых образцов, в зависимости от их предполагаемой

эффективности до проведения исследования, например, на основании результатов, полученных на образцах сходного происхождения, обработанных аналогичным образом и т.п.

Некоторые конструкции, содержащие репортерные гены согласно настоящему изобретению, также включают комбинации высокоэффективных промоторов транскрипции и высокоэффективных 5'-НТО в системах трансляции, такие как промотор СНОР и 5'-НТО ATF-4, чтобы обеспечить, предпочтительно, геометрическое усиление сигнала, тем самым обеспечивая выгодное соотношение сигнал-шум по сравнению с конструкциями, содержащими репортерные гены, которые включают только один из двух элементов. Такая конструкция, содержащая репортерные гены, является особенно подходящей для исследований, в которых желательна высокая чувствительность, например, при сравнении разбавленных или слабopоложительных образцов, часто встречающихся на ранних стадиях обработки, или при детектировании редкого вида активности. Промоторы и 5'-НТО можно комбинировать в единую конструкцию, содержащую репортерные гены, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, и как описано в настоящей заявке. Подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы генов, которые кодируют биомаркеры, такие как СНОР, BiP, ATF-4, Xbp-1 или синтазы аминокислоты и т.п., и другие промоторы, известные в данной области техники и описанные в настоящей заявке. Подходящие 5'-НТО включают таковые для ATF-4, мРНКb BRCA1 CD59, TCTP и GCN4 и т.п., и другие 5'-НТО, известные в данной области техники и описанные в настоящей заявке. Подходящие конструкции, содержащие репортерные гены и включающие оба элемента, обеспечивают особые преимущества в том случае, если выбранные элементы, т.е. спаренные последовательности 5'-НТО и промотора, отвечают на идентичный или сходный агент или сигнал.

ПРИМЕР 4

Детектирование повышенного уровня трансляции биомаркерных белков

Чтобы определить эффективность омега-3 жирных кислот или других полезных агентов в продуктах питания, нутрицевтических продуктах или лекарственных средствах, транскрипты мРНК, в которых последовательности 5'-НТО, содержащие две или более ОРС, функционально связаны с последовательностями, кодирующими репортерные белки, помещают в условия, при которых возможно осуществление трансляции белка, например, в животных, клеточных или бесклеточных системах трансляции, таких как лизаты ретикулоцитов кролика, или в другой системе *in vitro*, содержащей клеточные компоненты, необходимые для осуществления трансляции мРНК с образованием белка. Транскрипты могут быть получены в системе (например, экспрессированы у животного, в клетке или другом комплексе, содержащем репортерную конструкцию и соответствующую полимеразу нуклеиновой кислоты, например, РНК-полимеразу) или могут быть получены экзогенным способом и добавлены к системе. Система необязательно может содержать внутренний контроль или другую контрольную репортерную мРНК, эффективность трансляции которой не зависит от присутствия омега-3 жирных кислот или других полезных агентов, которые детектируют в данном исследовании, что обеспечивает нормирование уровней исследуемой и контрольной активности трансляции по отношению к относительному количеству исследуемых и контрольных транскриптов, доступных для трансляции. В другом варианте уровни репортерной мРНК могут быть нормированы между различными исследуемыми образцами, и проведено сравнение уровней функциональной активности репортера.

Подходящие 5'-НТО для исследуемых транскриптов включают, но не ограничиваются

ими, НТО генов или транскриптов мРНК, которые кодируют биомаркерные белки, такие как BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 или GCN4. Подходящие 5'-НТО для контрольных транскриптов могут быть получены из генов или транскриптов мРНК, которые кодируют конститутивные белки, и/или тех, которые имеют одну или менее (т.е. ноль) ОРС в их 5'-НТО.

Системы, описанные выше, обрабатывают исследуемым веществом или приводят в контакт с образцом продукта питания, нутрицевтической или лекарственной композиции, и детектируют и количественно оценивают функцию исследуемого или контрольного репортерного белка (например, в одном и том же исследуемом образце; проводят сравнение функции между исследуемым образцом и необработанным образцом; между исследуемым образцом и образцом, обработанным стандартом для определения эффективности омега-3 жирной кислоты или другого полезного агента) с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, причем повышенные уровни репортерного белка положительно коррелируют с трансляционной активностью исследуемых репортерных мРНК и, следовательно, эффективностью омега-3 жирной кислоты или другого полезного агента, содержащегося в исследуемом образце.

ПРИМЕР 5

Изготовление из рыбьего жира нутрицевтических и других продуктов, контролируемых по качеству

Как уже упоминалось выше, рыбий жир является важным источником омега-3 жирных кислот. Однако источники рыбьего жира значительно отличаются друг от друга по содержанию и биологической активности этих полезных соединений. В изобретении предложены способы изготовления продуктов, полученных из рыбьего жира, которые обладают известной, идентичной биологической активностью омега-3 жирных кислот.

Выловленную рыбу, как живую, так и парную, спрессовывают в условиях производства пищевых продуктов, чтобы вызвать экстрагирование жира из плоти. Тяжелые металлы и другие загрязнители окружающей среды удаляют фильтрованием, комплексообразованием и/или другими способами, известными специалистам в данной области техники. Рыбий жир затем необязательно может быть подвергнут дальнейшей обработке, например, для улучшения вкуса, аромата и/или внешнего вида, для добавления других полезных агентов (включая, но не ограничиваясь ими, фитостеролы или другие полезные соединения) или для концентрирования омега-3 жирных кислот и/или других полезных агентов. Необработанный, частично обработанный (например, детоксифицированный), фракционированный или иным образом обработанный рыбий жир необязательно может быть упакован, например, в бутылки или другие контейнеры для многоразового использования или одноразовые контейнеры, такие как капсулы пищевой или фармацевтической категории, например, гелевые капсулы или капсуловидные таблетки. Омега-3 жирные кислоты и/или другие полезные агенты, содержащиеся в рыбьем жире, необязательно могут быть обогащенными, частично очищенными или даже полностью очищенными, т.е., выделенными.

На одном или более из указанных выше этапов производства способность рыбьего жира, промежуточного продукта или готового продукта вызывать увеличение эффективности транскрипции одного или более генов, которые кодируют биомаркеры, такие как ATF-4, CHOP, BiP, Xbp-1 или синтазы аминокислот, или, в другом варианте, вызывать увеличение эффективности трансляции мРНК, содержащих две или более ОРС в их 5'-НТО, включая, но не ограничиваясь, 5'-НТО из мРНК, которые кодируют биомаркеры, такие как BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 или GCN4, исследуют с помощью способов, описанных в предыдущих примерах настоящей заявки. Результаты

исследований, полученные на ранних этапах производства, позволяют проводить корректировку концентраций омега-3 жирных кислот в ходе дальнейших этапов производства, или в ином случае могут быть использованы для планирования процессов соединения, смешивания компонентов продукта или составления рецептуры продукта, что приводит к получению продуктов питания, нутрицевтических или лекарственного средств с известной эффективностью в отношении биологической активности омега-3 жирных кислот. Необязательно может быть проведено исследование образцов готового продукта (например, аликвоты жидкости или порошка, или одной капсулообразной таблетки, которые являются типичными для партии или серии, из которых они были получены или отобраны) до распространения, что позволяет предоставить потребителю заявленные данные и другую маркетинговую информацию о продукте, касающуюся уровня полезных биологических, нутрицевтических или лечебных свойств, которыми обладает продукт, например, в отношении ингибирования процесса инициации трансляции или терапевтических или профилактических свойств, связанных с ингибированием, активированием или модулированием иным образом процессов транскрипции биомаркерных генов или трансляции мРНК.

ПРИМЕР 6

Разработка надежных, чувствительных клеточных способов исследований, которые позволяют количественно оценить противоопухолевую биологическую активность препаратов/партий рыбьего жира нутрицевтической категории (НРЖ).

Дизайн исследования:

Получение трансгенных линий клеток рака предстательной железы человека, экспрессирующих мутантный белок (eIF2 α -S51A ЭПК-резистентный) или eIF2 α дикого типа (eIF2 α -WT2 ЭПК-чувствительный).

Цель: определить причинно-следственную связь между фосфорилированием eIF2 α и противоопухолевой активностью омега-3 ПНЖК в линиях клеток рака предстательной железы человека. Были получены клетки, которые экспрессируют нефосфорилированную мутантную форму eIF2 α (eIF2 α -S51A) или рекомбинантный eIF2 α дикого типа (eIF2 α -WT) и красный флуоресцентный белок или зеленый флуоресцентный белок, соответственно, при отсутствии эндогенного eIF2 α . Чтобы отличить рекомбинантный белок eIF2 α от эндогенного белка eIF2 α в рекомбинантный eIF2 α была введена N-концевая гемагглютининовая метка (НА), чтобы убедиться в одновременной экспрессии рекомбинантного eIF2 α (мутантной формы S51A или белка дикого типа) и флуоресцентного белка. Для проведения таких исследований применяли недавно описанную методику, согласно которой трансляция двух белков может осуществляться в соотношении 1:1. Это достигается путем клонирования последовательностей, кодирующих белки, в виде единой моноцистронной мРНК, при условии, что аминокислотные последовательности этих двух белков отделены друг от друга сайтом рестрикции для протеазы 2A. Другими словами, белок-предшественник, трансляция которого осуществляется с одной открытой рамки считывания (ОРС), разрезают с помощью протеазы 2A, чтобы получить НА-меченый eIF2 α (WT или S51A) и белки RFP или GFP. В конкретной конструкции, раскрытой в настоящей заявке, расщепление протеазой 2A позволило получить НА-меченый нативный eIF2 α и гибридный флуоресцентный белок, включающий последовательность, которая распознается протеазой 2A. Для того чтобы подавить экспрессию эндогенного eIF2 α с помощью миРНК, не влияя на экспрессию рекомбинантного eIF2 α (WT или S51A), из плазмиды были удалены все 5' и 3'-НТО элементы гена eIF2 α .

Схема эксперимента: согласно схеме эксперимента, чтобы обеспечить возможность

регулирования экспрессии белка eIF2 α по времени требовалась замена эндогенного eIF2 α на рекомбинантный белок eIF2 α (WT или S51A). Для достижения этой цели использовали лентивирусный вектор pLVTHM. Этот вектор содержит кассету, контролируемую промотором человеческого фактора элонгации 1, для экспрессии OPC

5 в клетках млекопитающих, и вирусную LTR/SIN-контролируемую кассету для опосредованного миРНК подавления экспрессии генов. В экспериментах использовали eIF2 α -WT в тандеме с последовательностью, кодирующей GFP, и eIF2 α -S51A в тандеме с последовательностью, кодирующей RFP. Сайт рестрикции, распознаваемый протеазой 2A, вставляли между eIF2 α (WT или S51A) и флуоресцентными белками. RFP и GFP

10 применяли, чтобы пометить клетки. Эти два репортерных белка были выбраны, поскольку они легко различаются под микроскопом с использованием соответствующих спектральных фильтров в условиях *in vitro* и *in vivo*. Чтобы достичь наиболее эффективной трансляции перед OPC вставляли оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG). Для определения наиболее эффективной

15 последовательности миРНК, которая воздействует на эндогенный, но не рекомбинантный eIF2 α , был проведен скрининг нескольких последовательностей-кандидатов лентивирусных миРНК, которые воздействуют на 5'-или 3'-НТО эндогенного eIF2 α , используя метод Вестерн-блота для оценки каждой миРНК. В ходе этих исследований было показано, что одна из последовательностей миРНК, миРНК #1098,

20 вызывала почти полное подавление экспрессии эндогенного eIF2 α . Указанную миРНК клонировали в кассете для экспрессии миРНК вектора pLVTHM.

Получение трансгенных линий клеток рака предстательной железы человека, в которых вместо эндогенного eIF2 α экспрессируется рекомбинантный белок (eIF2 α -S51A или eIF2 α -WT).

25 Линии клеток рака предстательной железы человека PC-3 трансдуцировали вектором pLVTHM, кодирующим eIF2 α -S51A или eIF2 α -WT и RFP, и отбирали клетки, экспрессирующие аналогичные уровни RFP согласно результатам исследования методом проточной цитометрии (FACS). Клетки размножали и оценивали уровень экспрессии трансгенного eIF2 α (WT или S51A) в сравнении с уровнем экспрессии эндогенного eIF2 α

30 с помощью методов электрофореза высокого разрешения в ДСН-ПААГ и Вестерн-блота, используя антитела козы к eIF2 α , которые распознают как эндогенный, так и рекомбинантный eIF2 α , и Alexa-680-конъюгированные Ig к антителам козы. Клетки рака предстательной железы, трансдуцированные лентивирусным вектором, описанным выше, экспрессируют две изоформы eIF2 α : изоформу с более высокой скоростью

35 электрофоретической миграции, которая соответствует эндогенному eIF2 α , и изоформу с более медленной скоростью электрофоретической миграции, которая соответствует меченому рекомбинантному eIF2 α (метка НА добавляет приблизительно 1,5 кДа). Идентичность изоформы с более медленной скоростью электрофоретической миграции и трансгенного eIF2 α подтверждали с помощью гибридизации образцов на этих же

40 гелях с моноклональными антителами к метке НА и Alexa-800-конъюгированными антителами к антителам мыши (данные не приведены). Поскольку антитела к eIF2 α могут распознавать как эндогенный, так и рекомбинантный eIF2 α , предположительно, с близкой величиной аффинности, относительную экспрессию эндогенного и рекомбинантного eIF2 α можно количественно оценить методом Вестерн-блота,

45 используя одно антитело к eIF2 α . Линии клеток рака предстательной железы человека PC-3 трансдуцировали вектором pLVTHM, кодирующим eIF2 α -S51A/RFP или eIF2 α -WT/RFP и миРНК #1098, и клеточные лизаты подвергали гибридизации с антителами к общему eIF2 α или антителами к β -актину. На фиг. 1 дорожка 1 представляет клетки,

трансдуцированные вектором pLVTHM без миРНК, дорожки 2 и 3 представляют клетки, трансдуцированные вектором pLVTHM, содержащим кассеты eIF2 α -WT или eIF2 α -S51A OРС и миРНК #1098. Клетки, трансдуцированные вектором pLVTHM без вставки миРНК, экспрессировали приблизительно равные количества рекомбинантного и

5 эндогенного белка eIF2 α .

Экспрессия эндогенного белка eIF2 α резко снижалась в клетках, трансдуцированных вектором pLVTHM, содержащим миРНК #1098. Данный вирусный вектор с постоянным уровнем снижал экспрессию мРНК эндогенного eIF2 α на ~85% (фиг. 2). Эти данные указывают на то, что происходило эффективное замещение эндогенного eIF2 α на

10 рекомбинантный eIF2 α (WT или мутантный вариант S51A) при сохранении общего уровня экспрессии eIF2 α , который в максимально возможной степени соответствовал таковому в исходных клетках.

В трансгенных линиях клеток оценивали ответ на ЭПК-индуцированное фосфорилирование eIF2 α . ЭПК вызвала фосфорилирование как эндогенного eIF2 α , так и рекомбинантного eIF2 α -WT, но не рекомбинантного eIF2 α -S51A (см., например,

15 фиг. 3, где приведены результаты оценки влияния ЭПК). Следовательно, ЭПК вызвала значительное фосфорилирование eIF2 α в исходных клетках или клетках, экспрессирующих рекомбинантный eIF2 α -WT, но не в клетках, экспрессирующих рекомбинантный eIF2 α -S51A.

Исходные клетки линии РС-3 (МАТ) или клетки линии РС-3, трансдуцированные вектором экспрессии, кодирующим рекомбинантный eIF2 α /RFP и миРНК (#1 в положении 1098 в 3'-НТО эндогенной, но не рекомбинантной мРНК), который воздействует на экспрессию эндогенного eIF2 α , культивировали в присутствии

20 возрастающих концентраций ЭПК. Общий уровень пролиферации клеток оценивали количественно с помощью окрашивания сульфородамино В (SRB) через пять дней инкубации и выражали в виде процента от числа контрольных клеток, обработанных носителем. Как показано на фиг. 4, клетки линии РС-3, экспрессирующие рекомбинантный eIF2 α -WT, были чувствительны к ингибированию пролиферации

30 клеток под действием ЭПК в зависимости от дозы кислоты, в то время как клетки, экспрессирующие рекомбинантный eIF2 α -S51A, были устойчивы к ее действию.

В заключение следует отметить, что в настоящей заявке были описаны клеточные способы исследований, в которых модифицированные на молекулярном уровне клетки применяют для измерения удельной ингибиторной активности в отношении процесса

35 инициации трансляции концентратов, содержащих омега-3 ПНЖК, или других нутрицевтических средств, биологическая активность которых реализуется посредством eIF2 α -опосредованного ингибирования процесса инициации трансляции. Предложенные способы исследований являются точными и чувствительными, поскольку они позволяют оценить величину активности в образце в отсутствие активности эндогенного eIF2 α .

Эти результаты показывают, что трансгенные линии клеток злокачественных

40 опухолей человека, раскрытые в настоящей заявке, являются эффективными инструментами для оценки величины биологической активности нутрицевтических продуктов согласно настоящему изобретению и концентратов, содержащих омега-3 ПНЖК, которые индуцируют фосфорилирование eIF2 α , а также для контроля качества таких продуктов. Клеточные культуры РС-3 eIF2 α -WT (штамм 351) и РС-3 eIF2 α -S51A

45 (штамм 411) были депонированы в Американской коллекции типовых культур (АТСС, Манассас, Виргиния, США) 22 июня 2012 г. и получили номер доступа в АТСС РТА-13010 и РТА-13011, соответственно.

Клеточные методы исследований согласно настоящему изобретению осуществляют

следующим образом:

Клетки: от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 клеток, экспрессирующих eIF2 α -S51A или eIF2 α -WT, культивируют в каждой лунке 96-луночного планшета при температуре приблизительно 37°C в течение приблизительно одних суток. Культуральная среда: полноценная (с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки) среда для культивирования тканей RPMI-1640 (Invitrogen, Калифорния, США).

Материалы:

96-луночные планшеты для культур тканей.

Краситель сульфородамин В (SRB, 0,57% об./масс, Sigma, Иллинойс, США).

Трикарбосиликуксусная кислота (ТСА, 10%, Sigma, Иллинойс, США).

Ледяная уксусная кислота (1%, Sigma, Иллинойс, США).

10 мМ Трис-основание (Sigma, Иллинойс, США).

100 мМ исходный раствор соединения.

Клетки подготавливают и высаживают.

Размножают опухолевые клетки до достижения 80% конфлюентности.

Обрабатывают трипсином согласно стандартному протоколу.

Нейтрализуют трипсин, диссоциируют клетки и подсчитывают.

Высаживают 1000 клеток в 100 мкл среды в каждую лунку 96-луночного планшета.

Лунки по краям планшета оставляют пустыми.

Для 4-х соединений необходим 1 планшет.

Высаживают клетки в другой планшет (12 лунок на одну клеточную линию), помечают этот планшет как «0-й день».

Вносят соединения (на следующий день).

Вносят по 50 мкл 10% ТСА в лунки планшета, помеченного 0-й день, хранят при 4°C.

Готовят серию разведений соединения в культуральной среде в концентрации 40, 12, 3, 6, 1,62 и 0 (растворитель) мкМ.

Необходимо поддерживать одинаковую концентрацию растворителя (ДМСО) во всех разведениях.

Вносят по 100 мкл каждого разведения соединения в три лунки каждого планшета для одной клеточной линии.

Конечные концентрации соединения составляют 20, 6, 1,8, 0,54 и 0 мкМ.

Клетки помещают в инкубатор.

Через пять дней после внесения соединений добавляют по 100 мкл 10% ТСА.

Инкубируют при 4°C минимум 1 ч.

Окрашивание сульфородамином В

Окрашивание проводят согласно протоколу Vichai and Kirtikara (Nature Methods 2006, том 1:1112-1115)

а) Окрашивание клеток

Удаляют клетки из холодной комнаты.

Удаляют содержимое.

Промывают четыре раза дистиллированной H₂O.

Удаляют излишек H₂O.

Высушивают планшеты (обдувают сухим воздухом или высушивают естественным путем).

Вносят по 100 мкл 0,057% раствора SRB в каждую лунку.

Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.

Удаляют краситель.

Промывают 1% уксусной кислотой четыре раза.

Высушивают планшеты.

б) Измерение оптической плотности (ОП)

Вносят по 200 мкл 10 mM Трис-основания (~pH 10,5) в каждую лунку.

5 Встряхивают планшет в течение 5-10 мин.

Регистрируют ОП при длине волны 510 нм в считывающем устройстве для микропланшетов.

Рассчитывают величину ингибирования роста клеток в виде процента от величины роста контрольных клеток:

10
$$((\text{Средняя ОП}_{\text{образец}} - \text{средняя ОП}_{0\text{-й день}}) / (\text{средняя ОП}_{\text{носитель}} - \text{средняя ОП}_{0\text{-й день}})) \times 100$$

Ингибирование роста (%) = 100-% роста контрольных клеток

В исследовании для сравнения результатов используют стандарт, который представляет собой исследованный ранее нутрицевтический продукт или заранее
15 определенное количество ЭПК. Клетки, экспрессирующие eIF2 α -S51A, получают и используют в качестве отрицательного контроля для веществ, которые ингибируют клеточную пролиферацию, независимо от eIF2 α . На фиг. 4 приведен пример стандартной кривой. Стандартная кривая показывает, что величина ингибирования пролиферации пропорциональна количеству нутрицевтического продукта согласно настоящему
20 изобретению или ЭПК. Стандартную кривую получают для каждого исследования, чтобы определить величину активности в образце, поскольку степень ингибирования пролиферации пропорциональна количеству нутрицевтического продукта согласно настоящему изобретению.

25 (57) Формула изобретения

1. Способ определения эффективности композиции в отношении ингибирования инициации трансляции, уровень ингибиторной активности которой в отношении инициации трансляции неизвестен, включающий:

30 приведение клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в Американской коллекции типовых культур (АТСС), в контакт с указанной композицией в течение периода времени и при температуре, достаточных для ингибирования пролиферации указанной клетки,

35 приведение клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС, в контакт с указанной композицией в течение периода времени и при температуре, достаточных для ингибирования пролиферации указанной клетки,

измерение индуцированного указанной композицией уровня ингибирования пролиферации указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и уровня ингибирования пролиферации указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС,

40 причем величина указанной ингибиторной активности указанной композиции в отношении процесса инициации трансляции пропорциональна уровню ингибирования пролиферации в клетке линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и сравнение уровня ингибирования пролиферации, индуцированного указанной композицией, с уровнем ингибирования пролиферации, индуцированного стандартом,
45 имеющим известную величину указанной активности, и

определение композиции как не имеющей ингибиторной активности в отношении инициации трансляции, если указанная композиция ингибирует пролиферацию указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС;

при этом указанная композиция представляет собой пищевой, нутрицевтический или лекарственный продукт, при этом указанная клетка линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 и/или РТА-13011 в АТСС, характеризуется тем, что содержит лентивирусный экспрессионный вектор, который содержит:

- 5 (а) гетерологичный ген eIF2 α , у которого полностью отсутствуют 3' и 5' НТО;
- (б) направленную на нуклеотид №1098, тимидиновый нуклеотид в 3'-НТО области эндогенного гена eIF2, миРНК №1098, которая ингибирует более 85% эндогенной экспрессии eIF2; и
- (в) оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG).
- 10 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция представляет собой концентрат омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный стандарт представляет собой композицию с известной величиной ингибиторной активности в отношении инициации трансляции.
- 15 4. Способ по п. 3, который включает определение величины ингибиторной активности указанной композиции в отношении инициации трансляции путем сравнения величины указанной активности в указанной композиции с величиной ингибиторной активности в отношении инициации трансляции указанного стандарта.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что величину указанной активности в указанной
- 20 композиции выражают в виде процента от величины активности в указанном стандарте.
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный стандарт представляет собой известное количество эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК).
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную композицию подвергают гидролизу перед осуществлением этапа приведения в контакт.
- 25 8. Способ определения величины ингибиторной активности образца в отношении инициации трансляции, включающий следующие этапы:
 - приведение клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, в контакт с указанным образцом,
 - осуществление инкубации указанной находящейся в контакте клетки линии, которая
 - 30 имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и указанного образца в течение периода времени и при температуре, достаточных для ингибирования пролиферации указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, и
 - измерение уровня ингибирования пролиферации указанной клетки линии, которая имеет номер РТА-13010 доступа в АТСС, индуцированного указанным образцом,
 - 35 причем уровень ингибирования пролиферации указанных клеток линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, индуцированный указанным образцом, пропорционален величине ингибиторной активности указанного образца в отношении инициации трансляции, при этом указанная клетка линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, характеризуется тем, что содержит лентивирусный экспрессионный
 - 40 вектор, который содержит:
 - (а) гетерологичный ген eIF2 α , у которого полностью отсутствуют 3' и 5' НТО;
 - (б) направленную на нуклеотид №1098, тимидиновый нуклеотид в 3'-НТО области эндогенного гена eIF2 миРНК №1098, которая ингибирует более 85% эндогенной экспрессии eIF2; и
 - 45 (в) оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG).
 9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что уровень ингибирования клеточной пролиферации выражают в виде процента от уровня пролиферации в необработанной клетке линии, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС.

10. Способ по п. 9, который включает сравнение уровня ингибирования пролиферации клеток, индуцированного указанным образцом, с уровнем ингибирования пролиферации клеток, индуцированного стандартом с известной величиной указанной активности.

11. Способ по п. 8, который включает осуществление гидролиза указанного образца перед определением указанной ингибиторной активности.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный стандарт представляет собой исследованный ранее образец, который имеет известную величину указанной активности.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный стандарт представляет собой известное количество ЭПК.

14. Способ по п. 8, отличающийся тем, что образец представляет собой концентрат омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

15. Способ по п. 8, отличающийся тем, что образец содержит экстракт рыбьего жира.

16. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой нутрицевтический продукт.

17. Способ по п. 8, дополнительно включающий приведение клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС, в контакт с указанным образцом, величина ингибиторной активности которого в отношении инициации трансляции известна, в течение периода времени и при температуре, достаточных для ингибирования пролиферации указанной клетки, и измерение уровня ингибирования пролиферации указанной клетки линии, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС, индуцированного указанным образцом, причем, если указанный образец ингибирует пролиферацию указанной клетки, то такой образец не обладает ингибиторной активностью в отношении инициации трансляции.

18. Линия клеток рака предстательной железы человека РС-3, экспрессирующих eIF2 α -WT, которая имеет номер доступа РТА-13010 в АТСС, в которой экспрессия эндогенного eIF2 α ингибируется более чем на 85%, для определения ингибирования инициации трансляции, при этом указанная линия клеток содержит лентивирусный экспрессионный вектор, который содержит:

(а) гетерологичный ген eIF2 α , у которого полностью отсутствуют 3' и 5' НТО;

(б) направленную на нуклеотид №1098, тимидиновый нуклеотид в 3'-НТО области эндогенного гена eIF2 миРНК №1098, которая ингибирует более 85% эндогенной экспрессии eIF2; и

(в) оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG).

19. Линия клеток рака предстательной железы человека РС-3, экспрессирующих eIF2 α -S51A, которая имеет номер доступа РТА-13011 в АТСС, в которой экспрессия эндогенного eIF2 α ингибируется более чем на 85%, для определения ингибирования инициации трансляции, при этом указанная линия клеток содержит лентивирусный экспрессионный вектор, который содержит:

(а) гетерологичный ген eIF2 α , у которого полностью отсутствуют 3' и 5' НТО;

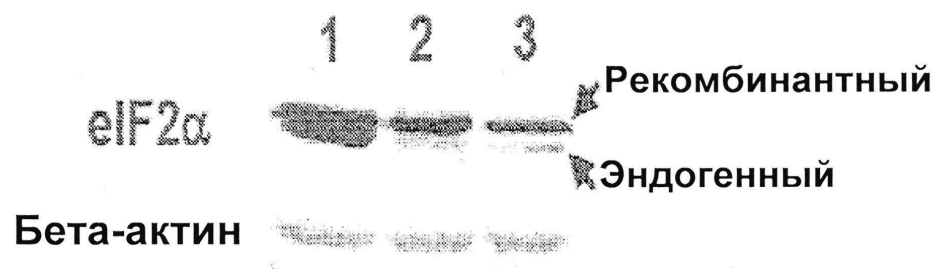
(б) направленную на нуклеотид №1098, тимидиновый нуклеотид в 3'-НТО области эндогенного гена eIF2 миРНК №1098, которая ингибирует более 85% эндогенной экспрессии eIF2; и

(в) оптимальную консенсусную последовательность Козака (GCCACCATGG).

1

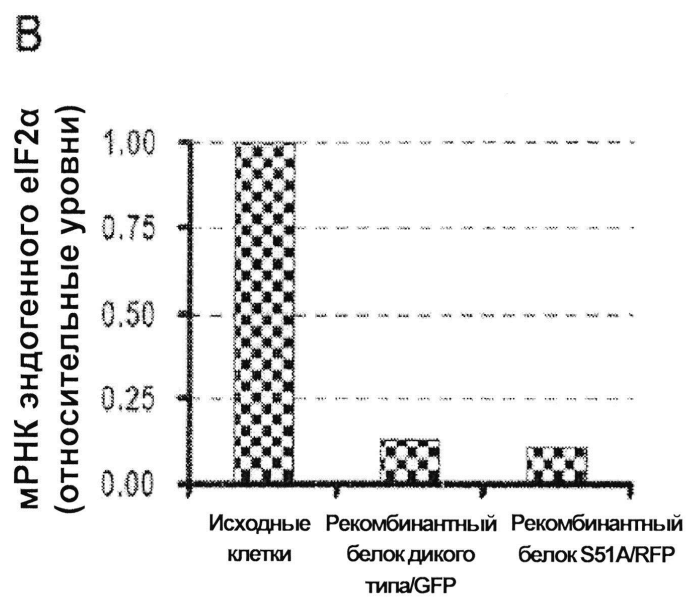
1 / 4

ФИГУРА 1

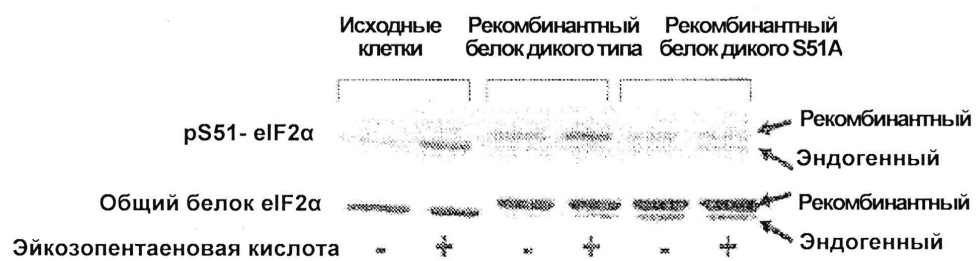


2

ФИГУРА 2



ФИГУРА 3



ФИГУРА 4

