



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년09월20일
(11) 등록번호 10-0983450
(24) 등록일자 2010년09월14일

(51) Int. Cl.

A61K 36/00 (2006.01) A61K 31/593 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01) A61K 31/34 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7027182

(22) 출원일자(국제출원일자) 2006년04월28일

심사청구일자 2007년12월27일

(85) 번역문제출일자 2007년11월22일

(65) 공개번호 10-2008-0019590

(43) 공개일자 2008년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/016376

(87) 국제공개번호 WO 2006/116721

국제공개일자 2006년11월02일

(30) 우선권주장

60/675,580 2005년04월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20020006613 A1

전체 청구항 수 : 총 14 항

(73) 특허권자

히다치 가세교교 가부시끼가이샤

일본국 도쿄도 신주구구 니시신주구 2초오메 1반 1코

히타치케미칼 리서치센터 인코포레이티드

미국 캘리포니아 92617 엘바인 헬스 사이언시스 로드 1003

(72) 발명자

미츠하시 마사토

미국 캘리포니아 92614 엘바인 페어다운 11

(74) 대리인

특허법인 원전

심사관 : 박종일

(54) 식품보충제에 대한 개별적 다양성 평가의 모델로서 전혈내의 생체 외 유전자 발현

(57) 요약

보충제와 같은 식품성분의 투여를 개별적으로 적정화하기 위한 방법이 개시된다. 상기 방법에 있어서, 포유동물의 전혈을 식품성분에 노출시킨다. 질병 상태에 관련된 지표 mRNA의 농도는, 식품성분에 노출시킨 후에, 그리고 어떤 경우에는 노출된 혈액세포의 추가적인 자극 후에 백혈구에서 측정된다. 노출 후의 mRNA 농도와 노출되지 않은 혈액세포에서 관찰되는 값을 비교함으로써, 포유동물에서 식품성분의 영향이 어떠한지에 대하여 결정하는 것이 가능하다. 수많은 가능한 식품성분에 대하여 포유동물의 혈액을 스크리닝함으로써, 질병 상태를 치료 또는 예방하기 위한 특정 포유동물에 적정화된, 최적의 식품성분 세트를 개발하는 것이 가능하다.

특허청구의 범위

청구항 1

시험관 내에서 식품성분을 포유동물의 전혈에 노출시키고;

상기 노출 후, 상기 전혈에서 mRNA의 양을 측정하며, 상기 mRNA는 암 또는 자가면역 질환과 관련되고; 그리고 측정된 결과를 기초로 하여 포유동물에서 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과를 확인하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과와 상관 관계를 가지는, 암 또는 자가면역 질환에 대한 개별적 포유동물에서 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과의 평가 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

노출되지 않은 전혈에 존재하는 mRNA 양을 측정하고, 노출되지 않은 전혈에서 측정한 mRNA의 양을 노출된 전혈에서 측정한 mRNA의 양과 비교함으로써, mRNA 양의 변화를 결정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 노출 후, 전혈을, 피토헤마글루티닌, 방사선 및 열응집된 IgG로 이루어지는 군으로부터 선택되는 자극제에 노출시키고; 그리고

노출되지 않은 전혈로부터 얻어진 측정 결과를, 식품성분과 자극제에 노출시킨 후 얻어진 측정 결과와 비교하는 것을 포함하는 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과를 평가하는 것을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 노출되지 않은 전혈은 mRNA 양을 측정하기 전에 인산완충염류액 또는 디메틸설폭사이드인 대조군 운반체에 노출시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 전혈의 노출은 헤파린의 첨가를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 전혈을 5시간 이하 동안 자극하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 전혈을 30분 내지 4시간 동안 자극하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 mRNA는 인터류킨-2, 인터류킨-4, 종양괴사인자 알파, IgG Fc 수용체, p21, Fas 리간드, 종양괴사인자 거대군 멤버 3, 및 종양괴사인자 거대군 멤버 15를 코딩하는 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 식품성분은 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤, 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고;

상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포 내의 IgG Fc 수용체를 코딩하는 mRNA 양을 측정하고;

상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고

상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 항암 효과를 확인하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관 관계가 있는, 포유동물에서의 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의, 항암 효과의 측정 방법.

청구항 13

포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고;

상기 포유동물의 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈을 방사선으로 자극하고;

상기 자극 후, 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포 내의 p21 또는 PUMA 유전자 산물을 코딩하는 mRNA 양을 측정하고;

상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고

상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 항암 효과를 확인하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관 관계가 있는, 포유동물에서의 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤, 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의, 항암 효과의 측정 방법.

청구항 14

포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고;

상기 포유동물의 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈을 피토헤마글루티닌으로 자극하고;

상기 자극 후, 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 인터류킨-2, 인터류킨-4, 종양괴사인자 알파, 및 Fas 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 코딩하는 mRNA 양을 측정하고;

상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고

상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과를 확인하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관 관계가 있는, 포유동물에서 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤, 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의, 항

암 또는 항-자가면역질환 효과의 측정 방법.

청구항 15

포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고;

상기 포유동물의 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈을 열응집된 IgG로 자극하고;

상기 자극 후, 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 종양괴사인자 거대군 3 및 종양괴사인자 거대군 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자 산물을 코딩하는 mRNA 양을 측정하고;

상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고

상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 항암 또는 항-자가면역질환 효과를 확인하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관 관계가 있는, 포유동물에서 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤, 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의, 항암 또는 항-자가면역질환 효과의 측정 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 mRNA는 백혈구 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 보충제(supplements)와 같은 식품성분(dietary components)의 투여를 적정화(tailoring)하기 위한 방법과 관련되는 것이다. 상기 방법에 있어서, 포유동물의 전혈(whole blood)을 식품성분에 노출시킨다. 질병 상태에 관련된 지표(marker) mRNA의 농도(level)는, 식품성분에 노출시킨 후에, 그리고 어떤 경우에는 노출된 혈액 세포의 추가적인 자극 후에 백혈구(leukocytes) 내에서 측정한다. 노출 후의 mRNA 농도를 노출되지 않은 혈액세포에서 관찰되는 값과 비교하므로써, 포유동물에서 식품성분의 영향이 어떠한지에 대하여 결정하는 것이 가능하다. 가능한 수많은 식품성분에 대하여 포유동물의 혈액을 스크리닝하므로써, 질병 상태를 치료 또는 예방하기 위한 특정 포유동물에 적정화된, 최적의 식품성분 세트를 개발하는 것이 가능하다.

배경기술

[0002] 비타민, 폴리페놀, 강황(turmeric) 등과 같은 식품성분(보충제)은 배양 세포와 동물에 다양한 생물학적 활성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 활성의 일부는 이후의 임상 연구에 의하여 확인되었다. 이러한 생물학적 활성의 일부는 다양한 질병 상태를 나타내는 환자에 효과를 나타낼 것으로 기대된다. 예를 들어, 면역 시스템 구성 성분의 활성을 증가시키는 식품성분은 어떤 암에 대한 효과를 가질 것이라고 기대되는 반면에, 특정 면역 시스템 구성 성분의 활성을 감소시키는 식품성분은 자가 면역 질환의 경우에 효과적일 것으로 기대된다. 그러나, 임상 연구 결과를 특정 개인을 위한 개별화된 식품성분 조합 설계에 적용하는 것은 어려운 것이다. 만약, 반응자(responders)와 비반응자(non-responders) 모두가 연구 집단에 존재하고, 비반응군이 반응군보다 실질적으로 더 많다면, 이중맹검 임상시험(double-blind clinical trials)에서는 이러한 식품성분이 효과를 가질 것으로 기대된다고는 확인할 수 없다. 나아가, 유전자형(genotyping) 또는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism) 분석은 단지 표적 유전자와 핫 스팟(hot spots)이 특정화되고 난 후에만, 식품 최적화에 유용하다. 소위, 적정화, 개별화 또는 개인화(personalized) 의약 또는 영양제의 중요성은 연구단체(scientific community)와 일반(general public)에 모두 인식되어 있다(Jain, KK, "Personalized medicine," Curr Opin Mol Ther 2002; 4: 548-58 참고). 그러나, 적용 가능한 기술은 여전히 제한적이다.

[0003] 식품보충제의 혈중 농도는 여러 문헌에 이미 개시되어 있다. 식이요법을 고려하면, 알려진 표준 혈중 농도에서 다양한 식품보충제의 알려져 있거나 기대되는 효과를, 포유동물의 실제의 개별적 결과와 비교하는 것이 바람직하다. 이것은 포유동물에 대한 식품보충제 세트 또는 식이요법을 설계하기 위한 목적으로, 포유동물로부터 채취된 전혈 내의 백혈구에서 각 보충제의 효능을 평가하는 것을 가능하게 한다. 백혈구에서의 이러한 효과는 염증, 암 면역, 자가면역 질환 등에 적용될 수 있다. 그러나, 이것을 달성하기 위한 효과적인 방법은, 특히 생체 외

(*ex vivo*) 범위에서는 아직 없다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 후보 식품성분을 포유동물의 전혈에 노출시킨 후, 백혈구 내에서 측정된 지표 mRNA의 농도에 기초하여 개별 포유동물에 대한 보충제 등의 식품성분을 적정화하기 위한 방법에 관한 것이다.

본 발명의 하나의 구체예에 있어서, 식품성분을 포유동물의 전혈에 노출시키고; 노출 후, 암 또는 자가면역 질환과 관련된 mRNA의 양을 측정하고; 그리고 측정된 결과를 기초로 하여 포유동물에서 식품성분의 잠재적 효과를 동정하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 잠재적 효과와 상관 관계를 가지는, 암 또는 자가면역 질환에 대한 개별적 포유동물에서 식품성분의 잠재적 효과를 평가하는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 노출되지 않은 전혈에 존재하는 mRNA 양을 측정하고, 노출되지 않은 전혈에서 측정된 mRNA의 양을 노출된 전혈에서 측정된 mRNA의 양과 비교함으로써, mRNA 양의 변화가 결정된다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 상기 방법은 노출 후, 전혈을 자극제(stimulating agent)에 노출시키고; 그리고 노출되지 않은 전혈로부터 얻어진 측정 결과를, 식품성분과 자극제에 노출시킨 후 얻어진 측정 결과와 비교하는 것을 포함하는 식품성분의 잠재적인 효과를 평가하는 것을 더 포함한다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 상기 자극제는 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin), 방사선(radiation) 및 열응집된 IgG(heat-aggregated IgG)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 상기 노출되지 않은 전혈은 mRNA 양을 측정하기 전에 대조군 운반체(control vehicle)에 노출시킨다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 상기 대조군 운반체는 인산완충염류액(phosphate-buffered saline) 또는 디메틸 설펍사이드이다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 전혈의 노출은 헤파린의 첨가를 포함한다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 전혈을 5시간 이하 동안 자극한다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 전혈을 30분 내지 4시간 동안 자극한다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, mRNA는 인터류킨-2(interleukin-2), 인터류킨-4, 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor alpha), IgG Fc 수용체(IgG Fc receptor), p21, Fas 리간드(Fas ligand), 종양괴사인자 거대군 멤버 3(tumor necrosis factor superfamily member 3) 및 종양괴사인자 거대군 멤버 15를 코딩하는 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 식품성분은 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate), g-리놀레산(g-linoleic acids), 제니스테인(genistein), 커큐민(curcumin), 케르세틴(queracetin), 숙성 마늘(aged garlic), 아가리쿠스(Agaricus), 프로폴리스(propolis), 상황버섯(meshimakobu), 노니 추출물(noni extract), 알콕시글리세롤(alkoxyglycerol) 및 푸코이단(fucoidan)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고; 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포 내의 IgG Fc 수용체를 코딩하는 mRNA 양을 측정하고; 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고, 상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 잠재적 항암 효과를 동정하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관 관계가 있는, 포유동물에서의 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의, 잠재적인 항암 효과를 측정하는 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고; 상기 포유동물의 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈을 방사선으로 자극하고; 상기 자극 후, 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포 내의 p21 또는 PUMA 유전자 산물을 코딩하는 mRNA 양을 측정하고; 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고, 상기 비교의 결과에 기초하여 식품

성분의 잠재적 항암 효과를 동정하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관관계가 있는, 포유동물에서의 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의 잠재적인 항암 효과를 측정하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 포유동물의 전혈을 식품성분에 4시간 이하 동안 노출시키고; 상기 포유동물의 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈을 피토헤마글루티닌으로 자극하고; 상기 자극 후, 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포 내의 인터류킨-2, 인터류킨-4, 종양괴사인자 알파 및 Fas 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 코딩하는 mRNA 양을 측정하고; 상기 노출된 전혈과 노출되지 않은 전혈의 혈액세포에서 얻어진 측정 결과를 비교하고; 그리고, 상기 비교의 결과에 기초하여 식품성분의 잠재적인 항암 또는 항-자가면역 질환 효과를 동정하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 mRNA 양의 변화는 식품성분의 효과와 상관관계가 있는, 포유동물에서 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, g-리놀레산, 제니스테인, 커큐민, 케르세틴, 숙성 마늘, 아가리쿠스, 프로폴리스, 상황버섯, 노니 추출물, 알콕시글리세롤 및 푸코이단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품성분의 잠재적인 항암 또는 항-자가면역질환 효과를 측정하는 방법을 제공한다.

실시예

[0025] 본 발명의 구체예들에 있어서, 식품보충제와 같은 다양한 식품성분에 반응하는 개별적 다양성(individual variation)이 평가되었다. "식품성분"은 포유동물의 식품의 일부분을 형성하는 모든 화합물 또는 물질을 나타내고, 반면에 "식품보충제"는 비타민과 천연 추출물과 같이 포유동물의 식품을 보충하기 위하여 사용되는 유익한 식품성분을 나타낸다. 헤파린으로 처리된 인간 전혈을 생체 외에서 각 식품성분과 함께 인큐베이션시켜, 상기 식품성분에 노출되므로써 유도되는 유전자 발현의 변화를 상기 식품보충제에 노출된 백혈구뿐만 아니라, 그렇게 노출되지 않은 백혈구 내에서 암, 자가면역 질환 등과 같은 증상에 관련된 유전자의 발현을 정량하므로써 평가하였다. 어떤 경우에, 전혈은 mRNA 농도를 정량하기 전에 피토헤마글루티닌, 방사선 또는 열응집된 IgG("HAG")와 같은 자극제로써 자극에 적용되었다. 추가적으로, 어떤 식품보충제에 대하여는, 노출되지 않은 전혈에서의 mRNA 농도를 정량하기 전에, 상기 혈액을 식품보충제가 정상적으로 용해되어 있는 운반체에 노출시켰다.

[0026] 어떤 식품성분은 유전자 발현을 증가 또는 저해시키는 것으로 밝혀졌으나, 실질적인 개인 대 개인 간의 다양성이 확인되었으며, 이러한 다양성은 통계적으로 유의하다. 어떤 개인에 대하여, 상기 개인의 전혈을 특정 식품성분에 노출시키므로써 유도되는 mRNA 변화는, 상기 mRNA와 관련된 증상의 예방 또는 치료에 상기 식품성분의 잠재적 효과와 상관관계가 있는 것이다. 긍정적 및 부정적 상관관계가 모두 가능하며, 긍정적 상관관계는 식품성분이 상기 증상에 효과적일 수 있다는 것을 나타내는 것인 반면, 부정적 상관관계는 상기 식품성분이 그 개인에 효과적이지 않을 것이며, 적용되지 않아야 한다는 것을 나타낼 것이다. mRNA 농도의 증가 또는 감소는, 증상의 특성 및 정량된 mRNA에 의존하여, 상기 증상에 대한 식품성분의 잠재적 효과에 대한 신호일 수 있다. 예를 들어, 인터류킨-2(T-세포 활성의 지표)와 같은 면역계의 활성화에 관련된 mRNA 농도의 증가는 암에 대한 잠재적 효과에 긍정적 상관관계일 수 있는 반면, 동일한 mRNA 농도의 감소는 자가면역 질병에 대한 효과에 긍정적 상관관계일 수 있다. 다양한 식품성분에 대한 개인 혈액의 스크리닝으로부터 얻어진 상기 데이터는, 암과 같은 정량화된 mRNA에 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위하여 최적화된 식이요법을 설계하는데 사용될 수 있다.

[0027] 이 방법은 조 천연물(crude natural products)에 포함된 일반적인 활성성분을 탐색하기 위하여 산업상 사용될 수 있을 것이다. 건강관리 분야에서, 상기 방법은 개별화된 식이요법의 설계에 새로운 가능성을 열어 줄 것이다.

[0028] 본 발명의 방법은 본 발명의 구체예들을 통하여 더욱 상세하게 설명될 것이지만, 이러한 구체예들은 본 발명을 한정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0029] 구체예 1

[0030] 생리학적 조건과 가장 밀접한 조건에서 백혈구 작용을 평가하기 위하여, 본 발명의 방법의 구체예는 특정 백혈구 집단을 분리하지 않고, 전혈을 사용하였다. 항응고제로서 다양한 생물학적 활성에 대한 주요 성분인, 시트레이트 텍스트로오스 용액과 에틸렌디아민테트라아세트산칼슘(ethylenediaminetetraacetic acid chelate calcium)(Eggesbo et al., "LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL," Cytokine 1996; 8: 152-60 참고)과 함께, 헤파린이 본 구체예에서 항응고제로 사용되었다. mRNA 전사는 단백질 합성과, 이어지

는 생물학적 활성의 상위 단계에서 발생하므로, 본 발명의 하나의 구체예에서는 상기 mRNA에 의하여 코딩되는 상기 단백질과 관련된 생물학적 활성에 대한 표지(indication)로서 mRNA 농도를 채택하였다. 본 발명의 하나의 구체예는 유전자 발현의 변화에 있어서 20~40% 정도의 작은 변화도 확인하는 것이 가능한 mRNA 정량법을 채택하였다(Mitsuhashi M., "Absolute quantitation of mRNA in human blood leukocytes as a model for phenotypic gene expression-based diagnostics," Clin Chem, 2006 참고).

[0031] 본 구체예에 있어서, 인터류킨-2(IL-2), 인터류킨-4(IL-4) 및 종양괴사인자- α (TNF- α)의 피토헤마글루티닌-유도 유전자 발현은 다음과 같은 방법으로 정량되었다. 헤파린 처리된 전혈 50mL를 다양한 식품보충제와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 다음의 보충제가 사용되었다: 비타민 A, C 및 D, (녹차 유래의) 에피갈로카테킨 갈레이트, (대두 유래의) 제니스테인 및 (강황 향신료 유래의) 커큐민. 비타민 A는 면역계를 자극하는 것으로 알려져 있다. 비타민 C는 T 세포의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 비타민 D는 특정 암에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 에피갈로카테킨 갈레이트는 강력한 항산화제이며, 암세포에서 발견되는 다중약제내성(multidrug resistance)을 감소시키고, 특히 종양성신생세포(neoplastic cells)의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것으로 알려져 있다. 제니스테인은 몇몇 연구에서 항발암성 활성(anticarcinogenic activity)을 가지는 것으로 알려져 있으며, 가능한 작용 메커니즘은 세포사멸의 상향조절(upregulation), 혈관신생(angiogenesis)의 저해, DNA 토포이소머라아제 II의 저해 및 단백질 티로신 키나아제의 저해를 포함한다. 커큐민은 종양성신생세포에서 전-세포사멸 효과(proapoptotic effects)를 가지고, 이러한 세포에서 빈번하게 과다 발현되는 전사인자 NF- κ B의 활성을 방해한다.

[0032] 상기 식품보충제와 함께 인큐베이션한 후, 피토헤마글루티닌(PHA) 100mg/mL를 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 추가적으로 인큐베이션을 계속하였다. 각 식품보충제의 농도(표 I 참고)는 알려진 혈액 농도보다 조금 더 높았다. 다음으로, 다음에 설명된 바와 같이 mRNA를 정제하고, cDNA를 합성하고, 그리고 IL-2, IL-4 및 TNF- α 의 농도를 TaqMan real time polymerase chain reaction (PCR)(Holland, et al., "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase," Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7276-80)으로 정량하였다.

[0033] mRNA와 cDNA는 상기 식품성분에 노출된 전혈뿐만 아니라, 노출되지 않은 전혈로부터도 준비하였다. 요약하면, 홈-메이드 96-웰 필터플레이트(home-made 96-well filterplates)를 컬렉션 플레이트(collection plates) 위에 두고, pH 7.4의 5 mM Tris 150 μ l를 첨가하였다. 4°C, 120xg에서 1분 동안 원심분리한 후, 혈액샘플 50 μ l를 각 웰에 첨가하고, 즉시 4°C, 120xg에서 2분 동안 원심분리하고, PBS 300 μ l로 각 웰을 세척하고, 4°C, 2,000xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 다음으로, 예를 들어 1% 2-메르캅토에탄올(Bio Rad, Hercules, CA, USA), 0.5mg/ml proteinase K(Pierce, Rockford, IL, USA), 0.1mg/ml salmon sperm DNA(5 Prime Eppendorf/Brinkmann, Westbury, NY, USA), 0.1mg/ml E. coli tRNA(Sigma), 표 2에 나타난 특정 리버스 프라이머 및 각 10mM의 혼합액 및 standard RNA34 올리고뉴클레오티드가 첨가된, 0.5% N-라우로일사르코신(N-Lauroylsarcosine), 4X SSC, 10 mM Tris HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL CA-630 및 1.791M 구아니딘 티오시아네이트(guanidine thiocyanate)를 포함하는 저장 용해완충액(stock lysis buffer) 60 μ l를 상기 필터플레이트에 첨가하고, 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 다음으로 상기 필터플레이트를 올리고(dT)-고정화 마이크로플레이트(oligo(dT)-immobilized microplates)(GenePlate, RNature)에 두고, 4°C, 2,000xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 4°C에서 하룻밤 저장한 후, 상기 마이크로플레이트를 플레인 용해완충액(plain lysis buffer) 100 μ l로 3회 세척하고, 세척완충액(wash buffer)(0.5M NaCl, 10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA) 150 μ l로 4°C에서 3회 세척하였다. cDNA는 각 웰에 (프라이머 없이) 1x RT-완충액, 각각의 1.25mM dNTP, rRNasin 4단위 및 MMLV 역전사효소(Promega) 80단위를 포함하는 완충액 30 μ l를 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하여 직접 합성하였다. 특정 프라이머가 결합된 cDNA는 용액 내에 존재하고, 올리고(dT)가 결합된 cDNA는 마이크로플레이트 내에 고정된다. TaqMan PCR을 수행하기 위하여, 얻어진 cDNA 용액 4 μ l를 TaqMan universal master mix(ABI) 5 μ l와 올리고뉴클레오티드 혼합액(포워드 프라이머와 리버스 프라이머 각각 15 μ M 및 TaqMan 프로브 3~6 μ M) 1 μ l가 첨가된 384-웰 PCR 플레이트에 직접 투입하고, PRISM 7900HT(ABI)에서 95°C에서 10분 동안 1사이클, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 60°C에서 1분 동안 45사이클로 PCR을 수행하였다. 또한, SYBR Green PCR도 채택할 수 있으며, 이를 위하여, cDNA를 물에 3~4배 희석하고, cDNA 용액 4 μ l를 master mix(Biorad, Hercules, CA) 5 μ l와 올리고뉴클레오티드 혼합액(포워드 프라이머와 리버스 프라이머 각각 15 μ M) 1 μ l가 첨가된 384-웰 PCR 플레이트에 직접 투입하고, PRISM 7900HT(ABI)에서 95°C에서 10분 동안 1사이클, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분 동안 45사이클로 PCR을 수행하였다. 각 유전자는 분리된 웰에서 증폭시켰다. Ct를 분석 소프트웨어(SDS, ABI)로 측정하였다.

[0034] IL-2, IL-4 및 TNF- α 를 각각 T-세포 활성화, (알러지성 반응이 가능한) IgE 캐스캐이드의 활성화 및 세포독성의 지표로 선택하였다. 정확한 통계적 분석(Student's t-test)을 위하여, 전혈에 대하여 3개의 동일한 앨리퀀트(triplicate aliquots)를 출발물질로 사용하였다. 데이터는 어떠한 양의 PCR 산물을 생성하기 위하여 요구되는 PCR 싸이클 수인 싸이클 트레숄드(cycle threshold)(Ct)(도 1), PHA-자극 샘플의 Ct 값에서 자극되지 않은 샘플의 Ct 값을 뺀 ΔCt , 및 식품보충제-처리 샘플의 ΔCt 값에서 처리되지 않은 대조군 샘플의 ΔCt 값을 뺀 $\Delta \Delta Ct$ 로 표시하였다(표 1). Ct는 로그 단위(log scale)이므로, 1 ΔCt 또는 $\Delta \Delta Ct$ 는 2배 또는 1/2배 양이고, 음의 ΔCt 값은 발현이 증가함을 의미한다.

[0035] 도 1은 전혈에서 PHA-유도 유전자 발현을 보여준다. 헤파린 처리된 전혈 50 μ L를 다양한 농도(A) 또는 100mg/mL의 PHA(B)와 함께 37°C에서 2시간(A) 또는 다양한 길이의 시간 동안 인큐베이션하고, 다음으로 상기에 설명된 바와 같이 IL-2(■), IL-4(▲) 및 TNF- α (◆)의 농도를 정량하였다. 시스템 내로 첨가된 Standard artificial RNA(RNA34)(○)도 정량하였다. 각 데이터는 전혈의 3개의 동일한 앨리퀀트로부터 Ct \pm 표준편차를 의미한다.

[0036] 도 1에 나타난 바와 같이, PHA는 근사적으로 10~20 μ g/mL의 EC₅₀을 갖는 투여량 의존적 방식(dose dependent manner)으로 IL-2, IL-4 및 TNF- α mRNA 발현을 유도하였다(도 1A). mRNA 유도는 빠르게 진행되며, 30~60분 후에 최고점에 도달하였다(Figure 1B). PHA 자체에 대한 이차적 효과를 피하기 위하여, PHA 투여량 및 인큐베이션 시간을 최고 수준으로 고정하였다(100mg/mL 및 120분). 표 1에 나타난 바와 같이, 식품보충제의 효과는 각 mRNA에 대하여 실질적인 개별적 다양성을 나타내었다. 100 μ g/mL PHA에서의 유전자 발현이 과포화되었으므로(도 1A), -0.65 미만의 $\Delta \Delta Ct$ 변화는 현저한 통계적 유의성을 가졌다. 흥미롭게도, 녹차 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)는 7건 모두의 경우에서 PHA-유도 IL-4 발현을 향상시켰지만, IL-2와 TNF- α 에 대한 그것의 작용은 개별적 다양성을 보여주었다(Table 1). IL-2에 있어서, 7인 중 3인이 감소를 나타내었고, 1인은 증가를 나타내었으며, 3인은 변화가 없었다(표 1). 강황 커큐민(Cur.)에 있어서, 2인에서 IL-2, IL-4 및 TNF- α 발현이 유의적으로 감소하였으나, 나머지 5인은 변화가 없었다(표 1). 비타민 A, C 및 D는 1~3인의 예외를 제외하고는 모두 IL-4 발현이 증가되었다(표 1). 대두 제니스테인(표 1에서 "Gen"으로 표시)은 거의 활성이 없었지만, 몇몇 개인들에게는 현저한 반응을 나타내었다(표 1).

[0037] [표 1] 생체 외에서 식품보충제의 미토젠(mitogen) 유도 유전자 발현에 대한 효과

mRNA	식품첨가제*	$\Delta \Delta Ct$ (평균 \pm 표준편차, n=3)**						
		대상 1	대상 2	대상 3	대상 4	대상 5	대상 6	대상 7
IL-2	VA	-0.98 \pm 0.04	-1.61 \pm 0.32	0.49 \pm 0.33	-0.29 \pm 0.21	-1.16 \pm 0.02	-0.26 \pm 0.20	-0.66 \pm 0.35
	VC	-0.18 \pm 0.54	0.06 \pm 0.60	1.04 \pm 0.21	1.47 \pm 0.19	-0.80 \pm 0.13	1.02 \pm 0.05	0.07 \pm 0.27
	VD	-0.13 \pm 0.07	0.06 \pm 0.40	0.06 \pm 0.15	-0.31 \pm 0.30	-0.45 \pm 0.61	-0.55 \pm 0.14	-0.86 \pm 0.12
	EGCG	-0.11 \pm 0.02	-0.07 \pm 0.48	1.32 \pm 0.54	0.81 \pm 0.11	-0.99 \pm 0.33	1.11 \pm 0.14	-0.41 \pm 0.29
	Gen.	-0.41 \pm 0.53	0.00 \pm 0.44	0.11 \pm 0.23	0.08 \pm 0.04	-0.02 \pm 1.03	0.06 \pm 0.27	-0.28 \pm 0.29
	Cur.	1.47 \pm 0.59	2.51 \pm 0.25	0.31 \pm 0.14	0.33 \pm 0.27	0.03 \pm 0.20	0.01 \pm 0.14	-0.01 \pm 0.21
IL-4	VA	-2.14 \pm 0.08	-1.56 \pm 0.34	-0.15 \pm 0.40	-0.98 \pm 0.41	-1.24 \pm 0.13	-0.65 \pm 0.09	-1.15 \pm 0.39
	VC	-2.20 \pm 0.72	-0.86 \pm 0.62	-0.77 \pm 0.40	-0.43 \pm 0.17	-1.22 \pm 0.17	-0.77 \pm 0.09	-1.30 \pm 0.22
	VD	-0.17 \pm 1.0	0.06 \pm 0.15	-0.77 \pm 0.40	-0.43 \pm 0.17	-1.22 \pm 0.17	-0.77 \pm 0.09	-1.30 \pm 0.22
	EGCG	-1.83 \pm 0.20	-1.56 \pm 0.46	-0.82 \pm 0.34	0.92 \pm 0.25	-1.37 \pm 0.3	-0.9 \pm 0.01	-1.47 \pm 0.41
	Gen.	-1.83 \pm 0.20	-1.56 \pm 0.46	-0.82 \pm 0.34	-1.04 \pm 0.16	-0.45 \pm 0.34	-0.34 \pm 0.62	0.28 \pm 0.25
	Cur.	1.27 \pm 0.78	3.09 \pm 0.15	-0.01 \pm 0.67	0.10 \pm 0.27	0.06 \pm 0.20	0.16 \pm 0.13	0.52 \pm 0.26
TNF α	VA	-1.56 \pm 0.11	-0.57 \pm 0.94	0.51 \pm 0.63	-0.08 \pm 0.29	-0.76 \pm 0.34	-0.50 \pm 0.10	-1.11 \pm 0.24
	VC	-1.82 \pm 0.65	0.16 \pm 1.14	-0.04 \pm 0.27	0.09 \pm 0.16	-1.21 \pm 0.14	-0.18 \pm 0.64	-0.10 \pm 0.15
	VD	-0.25 \pm 1.47	0.14 \pm 0.90	-0.04 \pm 0.27	0.09 \pm 0.16	-1.21 \pm 0.14	-0.18 \pm 0.64	-0.10 \pm 0.15
	EGCG	-1.14 \pm 0.32	-0.03 \pm 0.66	0.33 \pm 0.62	-0.16 \pm 0.12	-1.22 \pm 0.29	-0.66 \pm 0.14	-0.94 \pm 0.46
	Gen.	-1.14 \pm 0.32	-1.01 \pm 0.04	0.33 \pm 0.62	-0.16 \pm 0.12	-0.32 \pm 0.54	-0.02 \pm 0.20	-0.17 \pm 0.18
	Cur.	3.52 \pm 1.84	3.64 \pm 2.26	0.83 \pm 0.60	0.45 \pm 0.15	0.13 \pm 0.17	0.07 \pm 0.01	0.12 \pm 0.21

[0038]

[0039] * VA: 비타민 A(최종 농도=100nM), VC: 비타민 C(10 μ g/mL), VD: 비타민 D(100nM), EGCG: 에피갈로카테킨 갈레이트(녹차)(10 μ M), Gen: 제니스테인(대두)(2 μ M), Cur.: 커큐민(강황)(200nM).

[0040] ** 볼드체: 유의적 증가, 밑줄 이탤릭체: 유의적 저해

[0041] [표 2] 유전자 프라이머 서열

mRNA	TAQMAN 프로브	포워드 프라이머	리버스 프라이머
IL-2	CTGATGAGAC AGCAACCAT GTAGAATTTC TGAA	GAACATAAGG GATCTGAAAC AACATTTC	TGTTGAGATG ATGCTTTGAC AAAA
IL-4	CGATTCTCTGAA ACGGCTCGACAGG	CACAGGCACA AGCAGCTGAT	CCTTCACAGG ACAGGAATTC AAG
TNF- α	ACTTTGCCGA GTCTGGGCAGG	TCAATCGGCCCCGACTATCTC	CAGGGCAATG ATCCCAAAGT
CD32A	CTGAACCCCA GGGCACCTAC TGACG	GCTGACGGCG GCTACATG	GAGGAAGAGT CAGGTAGATG TTTTTATCA
p21	CCACTCCAAA CGCCGGCTGA TC	TTCTGCTGTCTCTCCTCAGATTCT	GGATTAGGGC TTCCTCTTGG A
PUMA	CCCCGCCCA TCAATCCCA	GGGCCAGACTGTGAATCCT	ACGTGCTCTC TCTAAACCTA TGCA
FasL	FAM-CTGAGCCATC GGTGAAACTA ACAGATAAGC A- TAMRA	TGGCAGCATC TTCACTTCTA AATG	GAAATGAGTC CCCAAACAT CTCT
TNFSF3		AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA	CACGGCCCCAAGAAGGT
TNFSF15		TGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT	CCATTAGCTTGTCCCTTCTTG
RNA34	CCAAGGCCCA GCCCTCACAC A	AGCCCCCTCACTCCCAA	GGGTGCTGTGCTTCTGTGAAC

[0042]

[0043]

구체예 2

[0044]

본 발명의 방법에 관한 본 구체예에서는 CD32A mRNA의 발현이 개인별 백혈구에서 평가되었다. 상기 mRNA는 IgG Fc 수용체를 코딩하고, 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)에 관련된다. CD32A mRNA 농도를 증가시키는 식품 성분은 개인의 ADCC 활성을 촉발시키므로써 직접적인 항암 활성을 제공할 것으로 기대된다. 태클적으로, 그러한 식품성분은 순환하는 백혈구 내의 IgG Fc 수용체 mRNA 농도를 동시에 증가시키므로써 (trastuzumab(Herceptin) 또는 rituximab(Rituxan)와 같은) 최근에 개발된 고가의 단일클론항체를 기반으로 하는 치료법을 향상시킬 수 있을 것이다. 상기에서 설명한 방법은, 피토타마글루티닌과 같은 자극제가 사용되지 않은 것을 제외하고, CD32A mRNA 농도를 측정하는데 사용된다. 프라이머 서열은 상기 표 2에 나타내었다.

[0045]

사용된 식품보충제는 다음과 같다: 비타민 A("VA", 100nmol/L, 최종농도), 비타민 C("VC", 10mg/mL), 비타민 D("VD", 100nmol/L), 비타민 E("VE", 1IU/mL), 에피갈로카테킨 갈레이트(녹차로부터 얻어진 카테킨 폴리페놀)("EGC" 또는 "카테킨", 10mmol/L), γ -리놀레산(식물유의 고도불포화지방산)("rLA", 1mg/mL), 제니스테인(대두)("Gen", 2mmol/L), 커큐민("Cur" 강황 향신료)(200nmol/L), 케르세틴("Que", 식물성 색소 플라보노이드)(100nmol/L), 숙성 마늘(kyoric("kyo"), 원액(full strength)), 아가리쿠스("Aga", Kyowa, 원액), 프로폴리스("Pro", 1:10 희석), 상황버섯("Mesh"), 노니 추출물("Noni") 및 상어간유("Alk", 알코시글리세롤 (투여(미확인된 투여량(identified doses))). 이러한 모든 식품성분은 면역계 또는 암 또는 양자 모두에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 상기 구체예 1에서 설명된 식품성분에 추가하여, 비타민 E는 면역 식세포작용(immune phagocytosis)에 우수한 효과를 갖는 것으로 알려져 있으며, 특히 스트레스 상태에서 감염에 대한 감수성이 저하된 동물에 유익한 것으로 나타났다. γ -리놀레산의 결핍은 면역계 손상을 야기하는데, 이 물질은 면역-지지 프로스타글란딘(immune-supporting prostaglandins) 생산의 중간체이다. 케르세틴은 쥐(rats)에서 자연살세포(natural killer cell) 활성을 촉진하고, 거대세포(mast cells), 호염기성구(basophils) 및 호중구(neutrophils)의 탈과립을 저해하는 것으로 알려져 있다. 숙성 마늘 추출물은 면역계 촉진제로서 수십년 동안 사용되어 왔다. 아가리쿠스 블라제이(*Agaricus blazei*)와 같은 아가리쿠스 버섯 추출물은 항암효과를 가진 것으로 나타났다. 벌집으로부터 얻어진 항생물질인 프로폴리스는 카페인산 페네틸에스테르를 함유하며, 동물 모델에서 암 형성을 예방하는 것으로 알려져 있다. 프로폴리스는 세포사멸의 과정을 촉진하므로써 암세포 성장을 억제시킨다. 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 항-종양성신생 베타-글루칸(anti-neoplastic beta-glucans)을 함유하는 중요한 약용 버섯이고, 그 수용성 추출물은 종양의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 노니 추출물은 인디안 멀버리(*Morinda citrifolia*)의 열매로부터 얻어지며, 폐암 생쥐의 생존 기간을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타난 노니-피피티(noni-ppt)로 알려진 다당-풍부 물질을 함유한다. 상어 간유 등에서 발견되는 알코시글리세롤은 항암 치료제 및 면역증강제로 사용되고 있다. 추가적으로 사용될 수 있는 식품성분은 해조(seaweed)로부터 얻어진 푸코이단이며, 종양 세포 침투를 저해하고, 면역계 구성성분의 농도를 증가시키는 것으로 나타났다. 본 구체예에서는 인산염 완충액이 대조군으로 사용되었다.

[0046]

인큐베이션은 37°C에서 3시간 동안 진행되었다. 다음으로, CD32A mRNA를 정량하였고, 결과를 도 2에 나타내었다. 오픈 서클(open circles)은 $p < 0.05$ 을 나타낸다. 각 심볼(symbol)은 50mL hepatin 처리 전혈의 3개

의 동일한 엘리퀴트로부터의 평균±표준편차를 나타낸다. 제니스테인의 플라스마 농도는 단일 대두밀을 투여한 후, 8시간 쯤, 4mmol/L가 되는 것으로 보고되었다. 그러므로, 전혈에서 2mmol/L 제니스테인으로 3시간 인큐베이션이 적합하게 이루어졌다.

[0047] 개인에 대한 결과로부터, 식품성분 비타민 D와 비타민 E, 에피갈로카테킨 갈레이트, γ -리놀레산, 제니스테인, 프로폴리스 및 노니 추출물이 항암 활성에 최적화된 식품으로 개인에 사용하는 것이 적절하다는 것을 나타내었다.

[0048] **구체예 3**

[0049] 본 구체예에서, 4인의 hepatin 처리된 전혈(구체예 2에서와 동일한 혈액 농도)을 다양한 식품보충제와 함께 37℃에서 1~2시간 동안 예비-인큐베이션하고, 다음으로 1Gy 방사선으로 자극하였다. 다음으로 상기 혈액을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로 p21 mRNA 농도를 구체예 1에서 설명된 방법으로 측정하였다. 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다. DNA 손상 반응에 대한 각 식품성분의 효과를 보여주기 위한 세포사멸 지표로 p21 mRNA를 선택하였다. p21에 대한 대안으로서, PUMA(세포사멸의 p53 상향조절 모듈레이터)가 정량될 수 있다.

[0050] 결과는 도 3에 나타내었다. 도면에서 오픈 서클은 방사선 자극 없이 얻어진 값을 나타내는 반면, 클로즈드 서클(closed circles)은 방사선이 사용된 것을 나타낸다. 각 심볼은 50mL hepatin 처리된 전혈의 3개의 동일한 엘리퀴트로부터의 평균±표준편차를 나타낸다.

[0051] 도 면에 나타난 바와 같이, 개인들은 다양한 식품성분에 반응한다. 이러한 결과는 종양성신생세포에서 세포사멸을 촉진시키므로써 암을 치료하거나 예방하기에 최적화된 개별적 식품을 설계하는데 사용될 수 있을 것이다.

[0052] **구체예 4**

[0053] 본 구체예에서, 2인의 hepatin 처리된 전혈을 다양한 식품보충제와 함께 37℃에서 2시간 동안 예비-인큐베이션하고(구체예 2와 같은 혈액 농도), 다음으로 피토헤마글루티닌으로 자극하였다. 다음으로 상기 혈액을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, Fas 리간드(FasL) mRNA의 농도를 구체예 1에 설명된 방법을 사용하여 측정하였다. 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다. Fas 리간드 mRNA는 세포사멸 촉진에 대한 각 식품성분의 효과를 나타내는 세포사멸 지표로서 선택하였다.

[0054] 결과를 도 4에 나타내었다. 상기 도면에서 메워진 기호는 대조군 값과 유의적이지 않은 값을 나타내고, 빗금 기호는 대조군 값과 비교하여 유의적으로 증가된 값을 나타내며($p < 0.05$), 빈 기호는 대조군 값과 비교하여 유의적으로 감소된 값을 나타낸다($p < 0.05$). 각 기호는 50mL hepatin 처리된 전혈의 3개의 동일한 엘리퀴트로부터의 평균±표준편차이다.

[0055] 도 4에 나타난 바와 같이, 식품성분에 대한 개별적인 반응은 매우 다양하다. 이러한 결과는 종양성신생세포의 세포사멸을 촉진하므로써 암을 치료 또는 예방하기에 최적화된 개별적 식품을 설계하는데 사용될 수 있을 것이다.

[0056] **구체예 5**

[0057] 본 구체예에서, 2인의 hepatin 처리된 전혈을 다양한 식품보충제와 함께 37℃에서 2시간 동안 예비-인큐베이션하고(구체예 2와 같은 혈액 농도), 다음으로 1.2mL 열응집된 IgG로 자극하였다. 열응집된 IgG(HAG)는 PBS에 63℃에서 15분 동안 20mg/mL 인간 IgG(Sigma, St. Louis)를 가열하여 제조하였다(Ostreiko et al., Immunol Lett. 15, 311 (1987) 참고, 참고문헌으로 본원에 통합됨). 다음으로 상기 혈액을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, TNFSF3 및 TNFSF15 mRNA의 농도는, mRNA를 정량하기 위하여 SYBR Green PCR을 사용한 것을 제외하고는 구체예 1에 설명된 방법을 사용하여 측정되었다. TNFSF3는 또한 림포톡신-알파(lymphotoxin-alpha, LT 알파), 종양괴사인자-베타(tumor necrosis factor-beta, TNF-베타) 및 림포톡신-베타(lymphotoxin-beta, LT 베타)로 알려져 있다. 분비된 LT 알파는 가용성 동형삼중합체(soluble homotrimer)인 LT 알파 3로 조립된다. 또한, 분비된 LT 알파는 멤브레인-관련 LT 베타와 복합체를 형성하여 두 타입의 이형삼중합체(heterotrimer)인 LT 알파 1/베타 및 LT 알파 2/베타 1을 생성한다. TNFSF3는 활성화된 미성숙 CD4 세포(activated naive CD4 cells), 비분극화된 IL-2-분비 이펙터(unpolarized IL-2-secreting effectors) 및 Th1 이펙터에 의하여 발현되고, TNFSF3 수용체는 어떤 종양세포에 의하여 발현된다. 또한, TNFSF15는 TL1A으로 알려져 있고, TNF 거대군에 속하는 타입 II 트랜스멤브레인 단백질이다. TNFSF15는 내피세포에서 우세하게 발현되고, 그것의 발현은 TNF- α 와 IL-1 α 에 의하여 유도된다. TNFSF15는 TNF 수용체 거대군 멤버 25(TNFRSF25)로 명명된 자살수용체 3(death receptor 3, DR3)에 고도의 친화력으로 결합한다. 세포 환경(cell context)에 따라, TNFSF15와 DR3의 결합

(ligation)은 전사인자 NF- κ B의 활성화 또는 캐스파아제(caspases)와 세포사멸의 활성화의 2종의 신호전달경로 중 한 가지를 촉진시킬 수 있다.

[0058] 프라이머 서열은 상기 도 2에 나타내었다. 이러한 mRNA는 면역계 활성화와 세포사멸 반응에 대한 각 식품성분의 효과를 나타내는 세포사멸 지표로서 선택되었다.

[0059] 그 결과를 도 5, 6 및 7에 나타내었다. 도 5에서, 메워지지 않은 원은 PBS 대조군을 사용한 케이스 1으로부터 얻어진 TNFSF3 값을 나타내는 반면, 폐쇄 원은 HAG 자극을 사용한 경우에 얻어진 TNFSF3 값을 나타낸다. 나아가, 회색 원은 케르세틴에 노출된 혈액에서의 HAG 유도 TNFSF3 발현을 나타낸다. TNFSF3 수용체가 어떤 암 세포에서 발현되기 때문에, 이 유전자의 발현의 증가는 이러한 세포의 세포사멸을 증가시킬 수 있으므로, 케르세틴은 이러한 개인에 대한 항암 특성을 가지는 식품에 포함되는 우수한 후보물질이 될 수 있다. 열린 삼각형과 닫힌 삼각형은 케이스 2로부터의 동일한 값을 나타낸다. 도 5의 Y-축 값은 싸이클 트레슈older(Ct)를 나타낸다. 각 기호는 50mL 혈판된 처리된 전혈의 3개의 동일한 엘리퀴트로부터의 평균±표준편차를 나타낸다. 도 6과 도 7은 두 케이스(도 6)와 비타민 A만을 투여한 추가의 다섯 케이스(도 7)에서의 TNFSF15의 정량의 결과를 나타낸다. 도 6에 나타난 바와 같이, 비타민 A는 TNFSF-15의 베이스라인 발현을 감소시켰고, 하나의 케이스(케이스 1)에서는 HAG에 대한 효과를 제거시켰다. 도 7에 나타난 추가 데이터에서, 비타민 A는 케이스 1과 전체 일곱 케이스의 두 케이스(양 도면에서의 케이스 1)에서 HAG-유도 TNFSF15 발현에 대한 저해 작용을 나타내었다. 이러한 케이스 1과 같은 경우에서, 비타민 A는 자가면역 질환과 같이 면역계가 비정상적으로 활성화되는 상태를 치료 또는 예방하는데 유용할 것이다.

[0060] 상기 설명된 구체예들에서, 혈액 농도를 측정하기 위하여 식품첨가제를 적용하였다. 그러나, 상기 방법의 다른 구체예들에서는, 천연물로부터의 다양한 조추출물(crude products)이 활성 성분을 확인하기 위하여 스크리닝될 수 있다. 적당한 mRNA 타겟을 선별하므로써, 여러 기능에 접근할 수 있다. 특정 상태에 따른 식품성분의 잠재적 효과를 평가하기 위한 정량화에 적절한 mRNA를 선별하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상기 결과는, 생리학적 생체 외 유전자 발현 분석이 개인들에서 식품보충제의 효과를 확인하기 위한 적당한 방법론인 것을 보여준다. 고농도의 식품보충제에서의 부정적 반응은, 이러한 개인들은 채혈시에 시험된 식품보충제에 의하여 백혈구 작용의 현저한 증가 또는 저해를 기대할 수 없을 것이라는 것을 암시할 것이다. 본 발명에서는 특정 식품첨가제를 채택하였지만, 상기 방법은 특정 식품과 같은 다른 식품성분에도 동등하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 전혈의 피토헤마글루티닌 자극 후, 백혈구 내에서 IL-2, IL-4 및 TNF- α mRNA의 농도 측정 결과를 나타낸다.

[0021] 도 2는 전혈을 다양한 식품성분에 노출시킨 후, 백혈구 내에서 CD32A mRNA의 농도 측정 결과를 나타낸다.

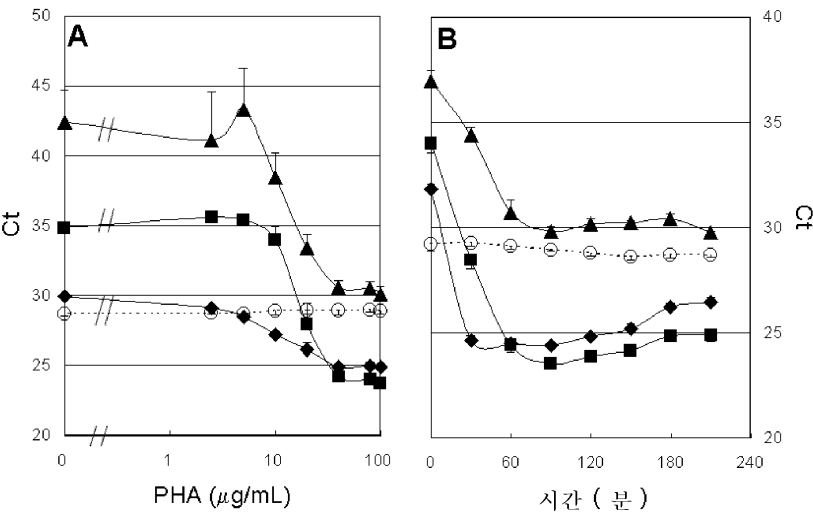
[0022] 도 3은 전혈을 다양한 식품성분과 방사선 자극에 노출시킨 후, 백혈구 내에서 p21 mRNA의 농도 측정 결과를 나타낸다.

[0023] 도 4는 전혈을 다양한 식품성분과 피토헤마글루티닌 자극에 노출시킨 후, 백혈구 내에서 Fas 리간드 mRNA의 농도 측정 결과를 나타낸다.

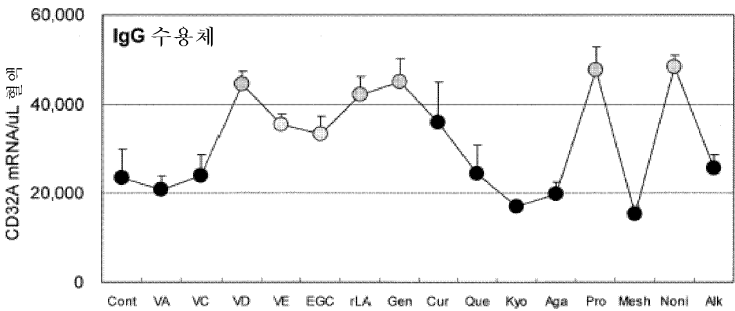
[0024] 도 5 내지 도 7은 전혈을 다양한 식품성분과 열응집된 IgG 자극에 노출시킨 후, 백혈구 내에서 종양괴사인자 거대군 멤버 3과 15의 mRNA의 농도 측정 결과를 나타낸다.

도면

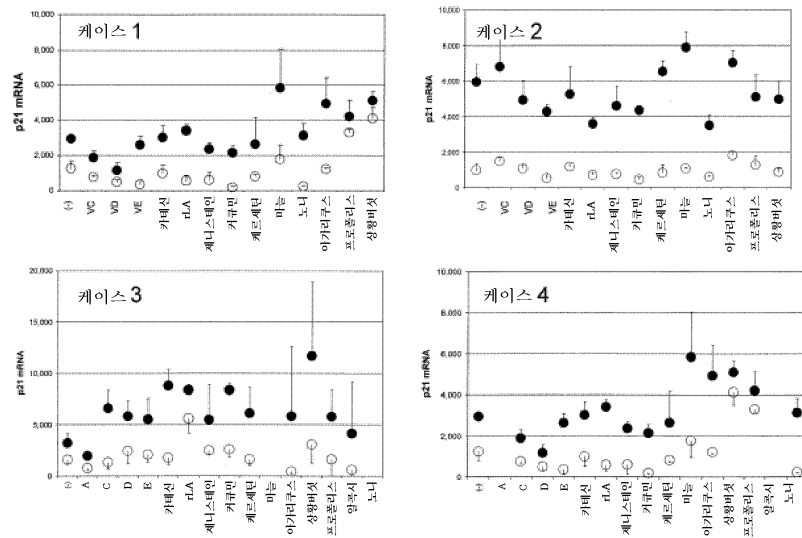
도면1



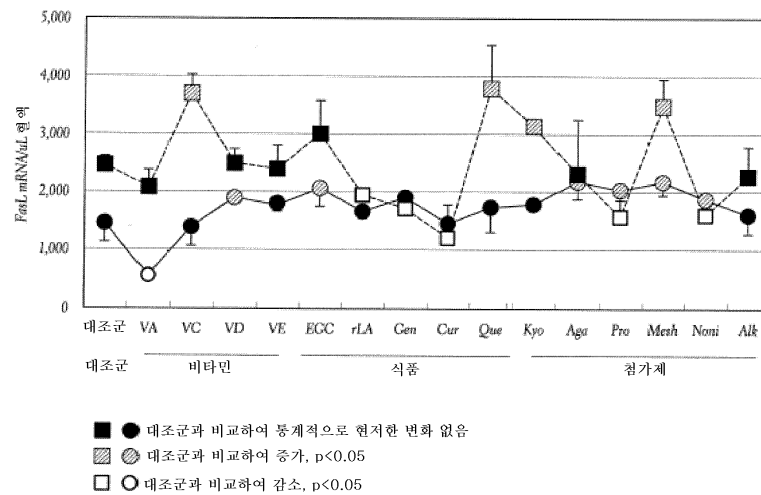
도면2



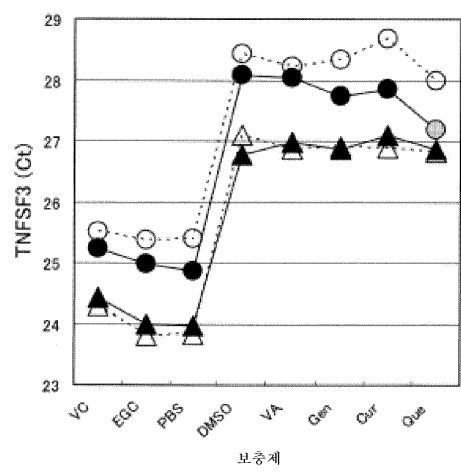
도면3



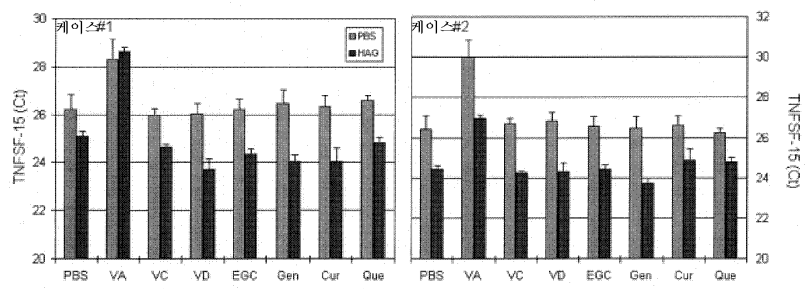
도면4



도면5



도면6



도면7

