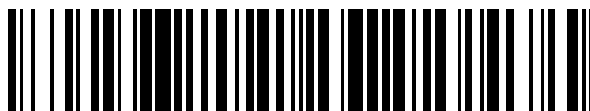


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 425**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2010 PCT/US2010/031393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2011 WO10121131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10765259 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2419541**

54 Título: **Bioensayos de control de calidad para productos nutracéuticos y medicinales**

30 Prioridad:

17.04.2009 US 170330 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2017

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**HALPERIN, JOSE A. y
AKTAS, HUSEYIN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 629 425 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bioensayos de control de calidad para productos nutracéuticos y medicinales

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense número 61/170.330, presentada el 17 de abril de 2009.

5 Declaración de intereses del gobierno

La invención se realizó con apoyo gubernamental con la subvención R01CA078411 otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo

10 Las realizaciones de la presente invención se refieren en general al ensayo de alimentos, productos nutracéuticos y medicinales para detectar propiedades beneficiosas para la salud humana o animal. Las realizaciones de la presente invención incluyen además métodos para la fabricación de alimentos, productos nutracéuticos y medicinales que, tal como se determina cuantitativamente mediante métodos de ensayo mejorados, pueden modular los niveles de determinados biomarcadores de ácido nucleico o proteína asociados con, o que son de una manera indicativos de, prevención o cura de una enfermedad.

15 Antecedentes

La iniciación de la traducción del ARN mensajero (ARNm) desempeña un papel crítico en la regulación del crecimiento celular y la transformación maligna porque la expresión de la mayoría de las proteínas reguladoras oncogénicas y del crecimiento celular se regula traduccionalmente (Flynn *et al.*, 1996, Cancer Surv. 27:293; Sonenberg *et al.*, 1998, Curr. Opin. Cell Biol. 10:268). Por este motivo, la iniciación de la traducción es un proceso celular fuertemente regulado. El no poder realizar una regulación negativa de la iniciación de la traducción puede conducir a la inducción, aparición y progresión de cáncer (Donze *et al.*, 1995, Embo J. 14: 3828; Rosenwald, 1996, Bioessays 18: 243-50; De Benedetti *et al.*, 2004, Oncogene 23: 3189-99; y Rosenwald, 2004, Oncogene 23:3230). La inhibición de una iniciación de la traducción escasamente regulada también puede provocar la reversión de fenotipos transformados (Jiang *et al.*, 2003, Cancer Cell Int. 3:2; Graff *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 60:255). El complejo eIF2-GTP-Met-tRNA_i (también conocido como complejo ternario) es un regulador positivo clave de la iniciación de la traducción. La limitación de su disponibilidad reduce la iniciación de nuevas rondas de traducción de proteína. Aunque la traducción de muchas proteínas oncogénicas y otros factores de crecimiento celular se basa en gran medida en el complejo ternario, lo mismo no es cierto para genes de mantenimiento, motivo por el cual alimentos, productos nutracéuticos y medicinales que ayudan a limitar la cantidad, disponibilidad o actividad del complejo ternario ofrecen potencialmente un medio seguro de prevención y tratamiento de la enfermedad. Además, la expresión de determinados supresores de tumores y proteínas y/o genes proapoptóticos aumenta realmente en presencia de inhibidores del complejo ternario o, más generalmente, de la iniciación de la traducción. La reducción de la traducción de proteínas oncogénicas, especialmente combinada con la regulación por incremento de supresores de tumores y genes proapoptóticos, tiende globalmente a prevenir y/o reprimir el fenotipo maligno.

35 El ácido eicosapentaenoico (EPA), un ácido graso poliinsaturado n-3 (AGPI n-3), se encuentra en grandes cantidades en aceite derivado de pescado, particularmente los de poblaciones silvestres nativas de aguas oceánicas frías. El pescado de piscifactoría contiene normalmente niveles mucho más bajos de AGPI n-3 que el pescado silvestre. Se ha observado que cuando se administra aceite de pescado marino a pacientes humanos con cáncer de próstata, se fosforila eIF2 α , lo que sugiere que la disponibilidad de eIF2 funcional para el complejo ternario se ha reducido, según los hallazgos usando EPA e inhibidores sintéticos del complejo ternario en modelos animales o sistemas experimentales basados en células. Por consiguiente, complementos dietéticos que contienen inhibidores de la iniciación de la traducción representan productos comerciales atractivos para el tratamiento y/o la prevención de cáncer y/o enfermedades proliferativas en la que una proliferación celular anómala es una anomalía patológica característica. Tales complementos dietéticos pueden actuar también como reguladores de la iniciación de la traducción, y representan productos comerciales atractivos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades metabólicas tales como obesidad y diabetes.

El aceite de pescado de una variedad de fuentes está ampliamente disponible para los consumidores como producto alimenticio o complemento nutricional. El aceite, o componentes o fracciones derivados del aceite, contenidos en diferentes lotes, tandas, muestras o dosis de producción de un producto pueden variar en calidad o potencia, dependiendo de sus fuentes (por ejemplo, clima, especie de pescado o condiciones de crecimiento, proveedores) o condiciones de procesamiento. Lo mismo puede ser incluso cierto del contenido de un único lote, tanda, muestra o dosis de producto. Otros productos alimenticios, nutracéuticos o medicinales que contienen inhibidores naturales o sintéticos de la iniciación de la traducción pueden variar en calidad o potencia por motivos similares.

55 El documento WO 2008/008333 da a conocer bioensayos (por ejemplo un ensayo de complejo ternario de ATF-4) para detectar si una sustancia alimenticia o complemento nutricional puede modificar la iniciación de la traducción.

Aktas & Halperin (J. Nutr. 134 (2004); p. 2487-91) dan a conocer estudios sobre el efecto anticancerígeno de ácidos

grasos poliinsaturados omega-3.

Belin *et al.* (PLOS One 4, n.º 2 (2009); p. e4409) describe el efecto antiproliferativo de vitamina C a alta dosis; la expresión génica de varios genes (ARNt sintasa y varios genes de subunidades de factores de iniciación de la traducción) se regulaba por disminución de una manera dependiente de la dosis tal como se identifica mediante RT-PCR.

Jung *et al.* (Biochem. Biophys. Res. 390, n.º 1 (2009); p. 71-6) dan a conocer que la silibinina, un flavonoide, disminuye la expresión de HIF-1 alfa así como la síntesis de proteína global por medio de la ruta de eIF-4F induciendo fosforilación de eIF-2a.

Vary (J. Nutr. 137 (2007); p. 2074-9) dan a conocer el efecto estimulante de leucina sobre la iniciación de la traducción de ARNm aumentando la formación de complejo de eIF4G-eIF4E activo.

Existe la necesidad de garantía y/o control de calidad con respecto a los efectos medicinales o fisiológicos de un producto sobre los posibles consumidores.

Sumario

Los complementos dietéticos con efectos terapéuticos/preventivos para enfermedades humanas representan una industria en rápido crecimiento, de miles de millones de dólares, en todo el mundo. Sin embargo, un importante problema no resuelto en esta industria es la falta de control de calidad de productos que se extraen de fuentes naturales para garantizar una potencia y actividad biológica específicas, una homogeneidad en la actividad biológica entre diferentes preparaciones extraídas/producidas a partir de la misma fuente vegetal/animal, y una potencia comparable entre las preparaciones extraídas de la misma especie vegetal o animal pero que se originan de diferentes regiones geográficas y/o fuentes industriales.

Los inhibidores, reguladores por incremento u otros moduladores de la iniciación de la traducción tienen efectos anticancerígenos, anti-proliferación celular de amplio espectro así como efectos de amplio espectro sobre el balance de energía. Podrían usarse nutricoséuticos que contienen inhibidores, reguladores por incremento u otros moduladores de la iniciación de la traducción, incluyendo pero sin limitarse a preparaciones de aceite de pescado, para la prevención de enfermedades humanas caracterizadas por proliferación celular anómala, incluyendo cáncer. Sin embargo, la ausencia actual de bioensayos para determinar la actividad biológica de nutricoséuticos de esta clase hace imposible controlar su calidad, potencia y/o homogeneidad entre diferentes marcas o fuentes o entre diferentes tandas o productos de una única marca o fuente.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se proporcionan métodos para la garantía y/o el control de calidad de alimentos, productos nutricoséuticos y medicinales con respecto a la capacidad de tales productos para modular la iniciación de la traducción de ARNm, abordando de ese modo la necesidad de suministrar información precisa a los consumidores con respecto a los posibles beneficios para la salud de tales productos.

Se proporcionan bioensayos específicos de la iniciación de la traducción que pueden usarse para evaluar cuantitativamente la actividad biológica de compuestos, por ejemplo, nutricoséuticos, que contienen inhibidores, reguladores por incremento o moduladores de la iniciación de la traducción. Los ensayos específicos de la iniciación de la traducción proporcionados en el presente documento evalúan la calidad (por ejemplo, actividad biológica), potencia y homogeneidad de tandas de nutricoséuticos que contienen productos, por ejemplo, aditivos o productos endógenos, que actúan como inhibidores, reguladores por incremento u otros moduladores de iniciación de la traducción.

Estos métodos de ensayo ofrecen medios rápidos y precisos de determinación del grado en el que una muestra dada de un producto alimenticio, nutricoséutico o medicinal puede modular la iniciación de la traducción, y de ese modo beneficiar a un ser humano o animal que consume tal producto o al que se le administra tal producto. Estos métodos de ensayo permiten generalmente que una muestra de un producto de este tipo se someta a prueba para determinar su capacidad para inhibir la iniciación de la traducción de ARNm. Los ensayos a modo de ejemplo descritos en el presente documento permiten la detección de la capacidad de una muestra para inhibir la formación, disponibilidad o actividad del complejo ternario, ya sea a través de fosforilación de eIF2 α o de otra forma.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, una muestra de un producto puede someterse a prueba para determinar su capacidad para regular por incremento la traducción de determinados transcritos de ARNm. La regulación por incremento de la traducción de tales transcritos puede indicar la presencia, el nivel, la disponibilidad y/o la actividad de EPA u otros AGPI 3-n contenidos en tal muestra. En determinadas realizaciones, puede detectarse la capacidad de una muestra para aumentar la traducción de determinados transcritos de ARNm cuyas regiones no traducidas en 5' (UTR en 5') contienen dos o más marcos de lectura abiertos (ORF). En determinadas realizaciones, puede someterse a prueba la capacidad de una muestra para aumentar la traducción de uno o más de ATF-4, BRCA1 mRNA, CD59, TCTP y GCN4 como una medida de la potencia y/o capacidad de tal muestra para conferir beneficios para la salud en un ser humano o animal que consume el correspondiente producto o al que se le administra el correspondiente producto. Tales ensayos pueden detectar cantidades aumentadas, disponibilidad o actividades de proteínas producidas como resultado de la traducción regulada por incremento de estos ARNm. El

grado hasta el que la traducción de proteínas marcadoras se aumenta, se regula por incremento o se modula de otra forma puede determinarse mediante comparación de resultados de prueba con controles. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, tal traducción aumentada puede facilitarse mediante la fosforilación de eIF2 α y/o la inhibición del complejo ternario.

- 5 La invención permite que una muestra de un producto alimenticio, nutricional o medicinal se someta a ensayo para detectar actividades beneficiosas detectando productos de ácido nucleico de genes cuya transcripción está aumentada, regulada por incremento o modulada de otra forma en presencia de EPA u otros AGPI 3-n contenidos en tal muestra.

10 En determinadas realizaciones, la invención proporciona la detección de transcritos de genes que están aumentados, regulados por incremento o modulados de otra forma en presencia de EPA, otros AGPI 3-n u otros agentes beneficiosos. Tales transcritos pueden incluir los que codifican para ATF-4, BiP, CHOP, Xbp-1. Determinadas realizaciones de la invención proporcionan la detección de transcritos de ARNm que codifican para tales proteínas, tal como a través de transcripción inversa, amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR o métodos de amplificación isotérmica conocidos en la técnica) o métodos de hibridación de ácido nucleico. La
15 detección de transcripción génica aumentada, regulada por incremento o modulada de otra forma puede realizarse usando ensayos de gen indicador, por ejemplo, de manera que el promotor del gen de interés esté operativamente unido a un gen indicador antes del contacto con la prueba o muestra de control en un sistema que permite que se produzca la transcripción del ADN. El grado hasta el que la traducción se aumenta, se regula por incremento o se modula de otra forma se determina a través de la comparación de niveles de transcripción o la actividad del gen
20 indicador observada en la muestra de prueba con los observados para un control o patrón interno o externo (por ejemplo, indicador doble).

Determinadas realizaciones a modo de ejemplo proporcionan el ensayo de alimentos, productos nutricionales y medicinales detectando proteínas codificadas por transcritos génicos que están aumentados, regulados por incremento o modulados de otra forma en presencia de EPA, otros AGPI 3-n u otros agentes beneficiosos. Tales
25 proteínas pueden incluir ATF-4, BiP, CHOP, Xbp-1. Los niveles de tales proteínas observados en presencia de una muestra de prueba pueden compararse con los observados en presencia de un patrón u otra muestra de control para determinar la potencia de la muestra de prueba.

En otra realización, se proporciona un método de determinación de la homogeneidad de tandas de una pluralidad de composiciones individuales que comprende las etapas de detectar la inhibición de la iniciación de la traducción, la
30 regulación por incremento u otra actividad de modulación de al menos una de las composiciones individuales, y comparar la inhibición de la iniciación de la traducción, regulación por incremento u otra actividad de modulación de la al menos una de las composiciones individuales con un patrón para determinar la homogeneidad de tandas.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método para determinar si una sustancia (por ejemplo, una sustancia derivada de aceite de pescado y/o una sustancia que contiene EPA) tiene
35 una o más propiedades biológicas, nutricionales o medicinales beneficiosas. El método incluye las etapas de proporcionar una segunda muestra que incluye una segunda secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en su UTR en 5', en el que la segunda secuencia de ARNm codifica para una segunda proteína de biomarcador, poner en contacto la segunda muestra con la sustancia, y detectar los niveles de traducción de las proteínas de biomarcador primera y segunda, en el que el nivel de traducción de la segunda proteína de
40 biomarcador es mayor que el nivel de traducción del primer biomarcador si la sustancia tiene una o más propiedades biológicas, nutricionales o medicinales beneficiosas. En determinados aspectos, la primera muestra se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otros aspectos, el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia. En otros aspectos, la primera proteína de biomarcador y la segunda proteína de biomarcador son la misma proteína. En determinados aspectos, las proteínas de biomarcador primera y segunda se
45 seleccionan del grupo que consiste en producto b de transcrito de gen de susceptibilidad a cáncer de mama 1 (BRCA1, factor de transcripción activante 4 (ATF-4), proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), protectina (CD59) y control general no desrepresible 4 (GCN4). En otros aspectos, la etapa de detección de los niveles de traducción se realiza mediante uno o más de análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ELISA e inmunocitoquímica. En determinados aspectos, la muestra es un animal no humano, una célula o un sistema libre de
50 células (por ejemplo, un sistema de lisado de reticulocitos de conejo) en el que puede producirse transcripción de ADN y/o traducción de ARNm, según sea apropiado. Las células pueden derivarse de seres humanos, otros mamíferos (incluyendo sin limitación ratones y ratas), pollos u otras aves o levaduras. Los sistemas libres de células incluyen reticulocitos de conejo, germen de trigo o extractos citoplasmáticos de células de mamífero tales como extractos de HeLa S100. En determinados aspectos, la UTR en 5' se produce de manera natural o es sintética. En
55 otros aspectos, la UTR en 5' está operativamente unida a una secuencia codificante que codifica para una proteína indicadora. En determinados aspectos, los niveles de traducción se determinan sometiendo a ensayo una o más actividades de la proteína indicadora. En otros aspectos, el nivel de traducción de la segunda proteína de biomarcador es al menos el 150% del nivel de traducción del primer biomarcador. En determinados aspectos, la sustancia está sometándose a ensayo para detectar una actividad de ácido graso poliinsaturado n-3 (AGPI) (por ejemplo, un ácido eicosapentaenoico (EPA)). En determinados aspectos, la sustancia es una muestra de producto
60 alimenticio, una muestra de producto nutricional o una muestra de producto farmacéutico.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método para determinar si una sustancia (por ejemplo, una sustancia derivada de aceite de pescado y/o una sustancia que contiene EPA) tiene una o más propiedades biológicas, nutracéuticas o medicinales beneficiosas. El método incluye las etapas de proporcionar una muestra que incluye una secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en su UTR en 5', en el que la secuencia de ARNm codifica para una proteína de biomarcador, poner en contacto la muestra con la sustancia, detectar un nivel de traducción de la proteína de biomarcador y detectar un nivel de traducción de una proteína de patrón interno, en el que el nivel de traducción de la proteína de biomarcador es mayor que el nivel de traducción de la proteína de patrón interno si la sustancia tiene una o más propiedades biológicas, nutracéuticas o medicinales beneficiosas. En determinados aspectos, la proteína de patrón interno está codificada por una secuencia de ARNm que tiene uno o ningún marco de lectura abierto en su UTR en 5'. En otros aspectos, la proteína de biomarcador se selecciona del grupo que consiste en producto b de transcrito de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4. En otros aspectos, la etapa de detección del nivel de traducción se realiza mediante uno o más de análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ELISA e inmunocitoquímica. En aún otros aspectos, la UTR en 5' se produce de manera natural o es sintética. En otros aspectos, la UTR en 5' está operativamente unida a una secuencia codificante que codifica para una proteína indicadora. En otros aspectos, los niveles de traducción se determinan sometiendo a ensayo una o más actividades de la proteína indicadora. En otros aspectos, el nivel de traducción de la proteína de biomarcador es al menos el 150% del nivel de traducción del patrón interno. En determinados aspectos, la sustancia está sometiendo a ensayo para detectar una actividad de AGPI n-3 (por ejemplo, EPA). En determinados aspectos, la sustancia es una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutracéutico o una muestra de producto farmacéutico.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método para detectar si una sustancia (por ejemplo, una sustancia derivada de aceite de pescado y/o una sustancia que contiene EPA) media en la regulación por incremento de la transcripción de un gen de biomarcador. El método incluye las etapas de proporcionar un primer sistema de prueba que incluye una secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una primera proteína indicadora operativamente unida a un primer promotor de biomarcador, proporcionar un segundo sistema de prueba que incluye una segunda secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una segunda proteína indicadora operativamente unida a un segundo promotor de biomarcador, poner en contacto el segundo sistema de prueba con la sustancia, y determinar los niveles de transcripción de las secuencias de ARNm primera y segunda, en el que el nivel de transcripción de la segunda secuencia de ARNm es mayor que el nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm si la sustancia media en la regulación por incremento de la transcripción del gen de biomarcador. En determinados aspectos, los sistemas de prueba primero y segundo son un ensayo en animales, un ensayo basado en células o un ensayo libre de células. En determinados aspectos, el primer sistema de prueba se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otros aspectos el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia y/o la primera proteína indicadora y la segunda proteína indicadora son la misma proteína. En determinados aspectos, los niveles de transcripción se determinan mediante PCR en tiempo real (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en células)). En determinados aspectos, la actividad transcripcional se determina detectando una o más actividades de proteína indicadora. En otros aspectos, el gen de biomarcador codifica para una proteína proapoptótica o una proteína supresora de tumores (por ejemplo, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1, una aminoácido sintetasa o similar). En determinados aspectos, la transcripción de la segunda secuencia de ARNm es al menos el 150% del nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm. En determinados aspectos, la sustancia está sometiendo a ensayo para detectar una actividad de AGPI n-3 (por ejemplo, EPA). En determinados aspectos, la sustancia es una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutracéutico o una muestra de producto farmacéutico.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método para fabricar un producto de aceite de pescado de calidad controlada. El método incluye las etapas de proporcionar una primera muestra que incluye una primera secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en la región no traducida en 5' de la primera secuencia de ARNm, en el que la primera secuencia de ARNm codifica para una primera proteína de biomarcador, proporcionar una segunda muestra que incluye una segunda secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en la región no traducida en 5' (UTR) de la segunda secuencia de ARNm, en el que la segunda secuencia de ARNm codifica para una segunda proteína de biomarcador, poner en contacto la segunda muestra con el producto de aceite de pescado, detectar los niveles de traducción de las proteínas de biomarcador primera y segunda, en el que el nivel de traducción de la segunda proteína de biomarcador es mayor que el nivel de traducción del primer biomarcador si el producto de aceite de pescado puede proporcionar una o más propiedades biológicas, nutracéuticas o medicinales beneficiosas a un sujeto, y seleccionar un producto de aceite de pescado que tiene un mayor nivel de traducción que un producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinados aspectos, la primera muestra se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otros aspectos, el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia. En aún otros aspectos, la primera proteína de biomarcador y la segunda proteína de biomarcador son la misma proteína (por ejemplo, producto b de transcrito de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4).

También se da a conocer en el presente documento un método para fabricar un producto de aceite de pescado de calidad controlada. El método incluye las etapas de proporcionar una muestra que incluye una secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en la región no traducida en 5' de esta secuencia de ARNm, en el que la secuencia de ARNm codifica para una proteína de biomarcador, poner en contacto la muestra con el producto

de aceite de pescado, detectar un nivel de traducción de la proteína de biomarcador, detectar un nivel de traducción de una proteína de patrón interno, en el que el nivel de traducción de la proteína de biomarcador es mayor que el nivel de traducción de la proteína de patrón interno si el producto de aceite de pescado puede proporcionar una o más propiedades biológicas, nutricéuticas o medicinales beneficiosas a un sujeto, y seleccionar un producto de aceite de pescado que tiene un mayor nivel de traducción que un producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinados aspectos, la proteína de biomarcador se selecciona del grupo que consiste en producto b de transcrito de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4.

También se da a conocer en el presente documento un método para fabricar un producto de aceite de pescado de calidad controlada. El método incluye las etapas de proporcionar un primer sistema de prueba que incluye una secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una primera proteína indicadora operativamente unida a un primer promotor de biomarcador, proporcionar un segundo sistema de prueba que incluye una segunda secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una segunda proteína indicadora operativamente unida a un segundo promotor de biomarcador, poner en contacto el segundo sistema de prueba con el producto de aceite de pescado, detectar los niveles de transcripción de las secuencias de ARNm primera y segunda, en el que el nivel de transcripción de la segunda secuencia de ARNm es mayor que el nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm si el producto de aceite de pescado puede proporcionar una o más propiedades biológicas, nutricéuticas o medicinales beneficiosas a un sujeto, y seleccionar un producto de aceite de pescado que tiene un mayor nivel de traducción que un producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinados aspectos, el promotor de biomarcador se selecciona del grupo que consiste en promotor de CHOP, promotor de BiP, promotor de ATF-4, promotor de Xbp-1 o un promotor de aminoácido sintetasa, y similares u otros promotores inducidos de manera similar por la inhibición de la iniciación de la traducción.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo adicionales de la presente invención, se proporcionan métodos para la detección de transcritos en una muestra que aumentan como resultado de la actividad de ácidos grasos omega-3 usando métodos de detección de ácido nucleico, tales como PCR en tiempo real. Se proporcionan además métodos para la detección de transcritos en una muestra que aumentan como resultado de la actividad de ácidos grasos omega-3 a través de la detección de la actividad de proteínas indicadoras codificadas por genes bajo la influencia de promotores que están regulados por incremento transcripcionalmente por ácidos grasos omega-3. Se proporcionan además métodos para la detección de la traducción aumentada de transcritos que tienen dos o más marcos de lectura abiertos en sus UTR en 5'. También se da a conocer en el presente documento la fabricación de alimentos, productos nutricéuticos y medicinales de calidad controlada usando el método de detección de transcritos en una muestra que aumentan como resultado de la actividad de ácidos grasos omega-3.

Breve descripción del dibujo

Las características y ventajas anteriores y otras de la presente invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomada conjuntamente con el dibujo adjunto en el que:

la figura 1 representa gráficamente los resultados obtenidos cuando se amplificó un transcrito de ARNm que codifica para CHOP.

Descripción detallada

Se ha hecho la observación paradójica de que algunos ARNm se traducen más eficazmente cuando el complejo ternario es escaso que cuando es abundante (Aktas *et al.*, 2004, Journal of Nutrition 134(9): 2487S- 2491S; Halperin y Aktas, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2008/008333). Estos incluyen el ARNm que codifica para el factor de transcripción ATF-4, que regula por incremento transcripcionalmente muchos de los genes de respuesta al estrés de ER tales como proteína C/EBP-homóloga proapoptótica (CHOP) o la proteína de unión a chaperona de ER (BiP) (Harding *et al.*, 2000, Mol. Cell 6:1099). Una isoforma del ARNm de BRCA1, designada ARNm_b, también se traduce más eficazmente cuando el complejo ternario es escaso. Se observó que el ácido graso poliinsaturado n-3 ácido eicosapentaenoico (EPA) regulaba por incremento CHOP (número de registro de Gen-Bank S40706) y la proteína 78 regulada por glucosa (BiP, número de registro de RefSeq NM_005347) en células cancerosas y en tumores extirpados de o bien modelos de cáncer en animales o bien pacientes humanos, y que aumentaba la traducción de ARNm_b de BRCA1 en líneas celulares de cáncer de mama y tumores animales.

Cada uno de ARNm_b de BRCA1 y el ARNm que codifica para el factor de transcripción activante 4 (ATF-4, número de registro de Ref-Seq NM_001675) contiene múltiples marcos de lectura abiertos (ORF) en su región no traducida en 5' (UTR en 5'). Sin pretender restringirse a ninguna teoría científica, se han identificado ahora ARNm adicionales que contienen dos o más ORF en sus UTR en 5' respectivas. Tales ARNm incluyen, sin limitación, los transcritos de ARNm de los genes que codifican para proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP, número de registro de RefSeq NM_003295.2), protectina (CD59) y control general no desrepresible 4 (GCN4, registro de RefSeq NC_00113). Según determinadas realizaciones a modo de ejemplo, una muestra de un producto alimenticio, nutricéutico o medicinal puede someterse a ensayo para determinar su capacidad para aumentar la presencia, el nivel o la actividad biológica de una proteína codificada por un transcrito de ARNm que tiene múltiples ORF en su UTR en 5'. En particular, una muestra de este tipo puede someterse a ensayo para determinar su capacidad para

mediar en un aumento en la presencia, el nivel o la actividad de uno o más de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4.

También se produce un aumento de la transcripción de determinados genes en presencia de inhibidores del complejo ternario. Además de genes que codifican para ATF-4, BiP y CHOP, los genes que presentan una transcripción aumentada en presencia de inhibidores de iniciación de la traducción son los que codifican para proteína de unión a caja X 1(Xbp-1, número de registro de RefSeq NM_001079539.1) y aminoácido sintetasas. Tales genes proporcionan biomarcadores de prueba apropiados para inhibidores de la iniciación de la traducción sometidos a ensayo según la invención, tal como los encontrados en aceite de pescado. Estos transcritos génicos pueden detectarse, y cuantificarse sus niveles, antes y después de la exposición de animales, células o sistemas libres de células de prueba a la muestra producto alimenticio, nutricional o medicinal de prueba mediante métodos conocidos en la técnica, y los de los transcritos pueden compararse para determinar el grado hasta el que la muestra de prueba facilitaba la transcripción del gen de marcador. Alternativamente, los niveles de los transcritos de biomarcador de prueba pueden compararse con los de transcritos de control (por ejemplo, de genes de mantenimiento) o con transcritos aislados de animales, células o sistemas libres de células expuestos a patrones o controles de actividad biológica conocida. De manera similar, los productos proteicos de los transcritos de biomarcador pueden detectarse y cuantificarse, y compararse sus niveles con los de animales, células o sistemas libres de células no tratados o con animales, células o sistemas expuestos a un patrón o control de actividad biológica conocida.

El término “nutricéutico”, tal como se usa en el presente documento, es una combinación de “nutricional” y “farmacéutico”, y se refiere a una sustancia que puede ingerirse que tiene uno o más efectos beneficiosos sobre un organismo tal como un ser humano. El término nutricéutico también puede referirse a uno o más compuestos que están presentes en una sustancia que puede ingerirse. Las sustancias que pueden ingerirse incluyen, pero no se limitan a complementos dietéticos, alimentos, bebidas y similares. Los términos “nutricéutico” y “complemento nutricional” pueden usarse de manera intercambiable. Una sustancia (por ejemplo, un producto alimenticio, un producto nutricéutico o uno farmacéutico) que tiene propiedades biológicas, nutricéuticas o medicinales beneficiosas se refiere a la capacidad de la sustancia para proporcionar a un individuo uno o más beneficios para la salud tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, en la prevención, reducción y/o cura de una o más enfermedades y/o trastornos descritos en el presente documento).

Los nutricéuticos de la presente invención incluyen aceites derivados de pescado tal como pescado de aguas frías, pescado de aguas templadas, pescado de agua dulce, pescado de agua salada, pescado de agua salobre, pescado silvestre, pescado criado en piscifactorías y similares, y preparaciones de ácidos grasos tales como las que contienen ácidos grasos omega-3.

El término “ácido graso omega-3”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos grasos poliinsaturados tales como los encontrados en aceite de pescado aceitoso tal como caballa, salmón, sardinas y similares, o fuentes vegetales tales como las semillas de chía, perilla, lino, nuez, verdolaga, arándano rojo, espino amarillo, cáñamo, y similares, y frutos de plantas tales como la palma de Acai. Los ácidos grasos omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido α -linoleico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y similares.

Determinados aspectos de la invención se refieren a métodos de determinación de la potencia de una composición para inhibir, regular por incremento o modular la iniciación de la traducción o transcripción génica. El término “potencia”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir, pero no se limita a, la eficacia de un compuesto, por ejemplo, un nutricéutico, para inhibir, regular por incremento o modular de otra forma la iniciación de la traducción o transcripción génica. La potencia de una composición puede definirse como la capacidad de la composición para inhibir, regular por incremento o modular de otra forma la iniciación de la traducción o transcripción génica en relación con un patrón o control.

Un patrón o control de la presente invención es un compuesto o una composición que tiene una inhibición de la iniciación de la traducción o transcripción, regulación por incremento o actividad de modulación tal como se determina mediante uno o más de los bioensayos descritos en el presente documento. Pueden obtenerse patrones a partir de una variedad de fuentes tales como las fuentes de ácidos grasos omega-3 u otros agentes descritos en el presente documento. Pueden sintetizarse patrones en el laboratorio u obtenerse de fuentes comerciales. Un patrón puede diluirse o concentrarse para disminuir o aumentar su inhibición de la traducción, regulación por incremento o actividad de modulación, respectivamente. Alternativamente, un patrón o control puede ser interno para el sistema de prueba, por ejemplo, un gen, promotor génico, transcrito de ARNm o proteína (por ejemplo, un gen de mantenimiento, promotor, transcrito o proteína) cuya transcripción o traducción no se ve sustancialmente afectada por la sustancia de prueba, por ejemplo, β -actina, ubiquitina, b-tubulina, GADPH y similares.

En determinados aspectos, un patrón o control es un ácido graso omega-3, tal como ácido eicosapentaenoico. El patrón o control puede derivarse de aceite de pescado (por ejemplo, aceite de pescado marino) o aceite de semilla de lino.

En otros aspectos, un patrón o control es un biomarcador que es sustancialmente insensible a los efectos de la sustancia cuya potencia o actividad biológica está sometiéndose a ensayo. Tal como se usa en este contexto con

respecto a la regulación de un gen o promotor génico, o regulación traduccional de un transcrito de ARNm o proteína, el término “sustancialmente insensible” significa o bien que no se ve en absoluto afectado o bien que se modula en un grado significativamente menor (por ejemplo, al menos 10 veces, 100 veces, 1000 veces o más de 1000 veces menos) por la sustancia de prueba que un biomarcador para la actividad de la sustancia de prueba.

- 5 En determinados aspectos, se calibra una muestra de prueba de manera que sus componentes activos estén en el intervalo lineal y no saturen el sistema de prueba. Se conocen bien en la técnica métodos de calibración e incluyen diluciones sencillas, diluciones en serie y similares.

La presente invención proporciona ensayos en los que se compara la inhibición de la traducción o transcripción, regulación por incremento o actividad de modulación de una composición con un patrón usando uno o más de los
10 bioensayos descritos en el presente documento. Una composición puede tener un nivel de actividad que es el 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%,
15 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, o mayor del 1000% de la actividad del patrón o control.

En determinados aspectos, la inhibición, regulación por incremento u otra modulación de la actividad con respecto a la iniciación de la traducción o transcripción génica es de entre aproximadamente el 1% y el 200%, entre aproximadamente el 5% y el 195%, entre aproximadamente el 10% y el 190%, entre aproximadamente el 20% y el 180%, entre aproximadamente el 30% y el 170%, entre aproximadamente el 40% y el 160%, entre aproximadamente
20 el 50% y el 150%, entre aproximadamente el 60% y el 140%, entre aproximadamente el 65% y el 135%, entre aproximadamente el 70% y el 130%, entre aproximadamente el 75% y el 125%, entre aproximadamente el 80% y el 120%, entre aproximadamente el 85% y el 115%, entre aproximadamente el 90% y el 110%, entre aproximadamente el 91% y el 109%, entre aproximadamente el 92% y el 108%, entre aproximadamente el 93% y el 107%, entre aproximadamente el 94% y el 106%, entre aproximadamente el 95% y el 105%, entre aproximadamente el 96% y el
25 104%, entre aproximadamente el 97% y el 103%, entre aproximadamente el 98% y el 102%, o entre aproximadamente el 99% y el 101%, de la actividad del patrón o control. En otros aspectos, la inhibición, regulación por incremento u otra modulación de la actividad con respecto a la iniciación de la traducción o transcripción génica es de entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 150% de la actividad del patrón, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 120% de la actividad del patrón, entre aproximadamente el 90% y
30 aproximadamente el 110% de la actividad del patrón, o entre aproximadamente el 95% y aproximadamente el 105% de la actividad del patrón o control.

En determinadas realizaciones, un control o patrón puede tener una actividad cero. Por tanto, puede obtenerse un resultado binario (es decir, positivo o negativo) para una actividad dada. En tal caso, si se necesita una cuantificación precisa de la actividad, se mediría en una escala absoluta o en comparación con un patrón que tiene
35 al menos alguna actividad de un nivel conocido.

Un nutracéutico o una composición que incluye un nutracéutico de la presente invención puede diluirse o concentrarse para disminuir o aumentar su inhibición de la traducción o transcripción, regulación por incremento o actividad de modulación en relación con el control/patrón, respectivamente.

La presente invención también proporciona ensayos en los que se determina la homogeneidad de tandas o lotes de composiciones comparando la actividad relativa de dos o más (por ejemplo, 10, 100, 1000, 10.000 1.000.000 o más) composiciones usando uno o más de los bioensayos descritos en el presente documento. Tal como se usan en el presente documento, los términos “homogeneidad de tandas” u “homogeneidad de lotes” pretenden referirse, pero sin limitarse a, la inhibición de la iniciación de la traducción, regulación por incremento o actividad de modulación
40 relativa, o actividad de regulación por incremento de la transcripción, de dos o más composiciones en una tanda o lote. Tal como se usa en el presente documento, los términos “tanda” o “lote” se refieren, pero no se limitan a, un grupo de dos o más composiciones. Una tanda o lote incluye composiciones preparadas juntas o composiciones de dos o más fuentes (por ejemplo, fuentes geográficas, vegetales, animales, comerciales y/o sintéticas). Tal como se usa en el presente documento, el término “tanda” o “lote” también puede referirse a un único conjunto de una composición, a partir del cual se extraen o producen unidades de productos o muestras de prueba, o que se
45 dividirán o fraccionarán adicionalmente de otro modo.

En al menos determinados ejemplos, los nutracéuticos dados a conocer en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de trastornos asociados con proliferación celular aberrante tales como trastornos proliferativos celulares, (por ejemplo, cáncer). El tratamiento de trastornos proliferativos celulares pretende incluir la inhibición de la proliferación incluyendo proliferación rápida. Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno
55 proliferativo celular” incluye trastornos caracterizados por proliferación no deseada o inapropiada de uno o más subconjuntos de células en un organismo multicelular. El término “cáncer” se refiere a diversos tipos de neoplasias malignas, la mayoría de las cuales pueden invadir tejidos circundantes, y pueden metastatizarse a diferentes sitios (véase, por ejemplo, PDR Medical Dictionary 1ª edición, 1995). Los términos “neoplasia” y “tumor” se refieren a un tejido anómalo que crece mediante proliferación celular más rápidamente de lo normal y sigue creciendo tras eliminarse los estímulos que iniciaron la proliferación (véase, por ejemplo, PDR Medical Dictionary 1ª edición, 1995).
60

Tal tejido anómalo muestra una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal que puede ser o bien benigno (es decir, tumor benigno) o bien maligno (es decir, tumor maligno).

La expresión “tratamiento de trastornos proliferativos celulares” pretende incluir la prevención de la inducción, aparición, establecimiento o crecimiento de neoplasias en un sujeto o una reducción en el crecimiento de neoplasias preexistentes en un sujeto. La expresión también puede describir la inhibición de la invasión de células neoplásicas a tejidos vecinos o la metástasis de una neoplasia de un sitio a otro. Los ejemplos de los tipos de neoplasias que pretenden abarcarse por la presente invención incluyen pero no se limitan a las neoplasias asociadas con cánceres de la mama, piel, hueso, próstata, ovarios, útero, cuello uterino, hígado, pulmón, cerebro, laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, glándula suprarrenal, sistema inmunitario, tejido neural, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios y/o riñones.

Los trastornos proliferativos celulares pueden incluir además trastornos asociados con hiperproliferación de células de músculo liso vascular tales como trastornos cardiovasculares proliferativos, por ejemplo, aterosclerosis y reestenosis. Los trastornos de proliferación celular pueden incluir también trastornos tales como trastornos proliferativos de la piel, por ejemplo, ictiosis ligada al cromosoma X, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgica, hiperqueratosis epidermolítica y dermatitis seborreica. Los trastornos proliferativos celulares pueden incluir además trastornos tales como enfermedad de riñón poliquístico dominante autosómica (ADPKD), mastocitosis y trastornos de proliferación celular provocados por agentes infecciosos tales como virus.

En al menos determinados ejemplos, los nutracéuticos sometidos a ensayo y/o producidos según los métodos dados a conocer en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de trastornos asociados con el balance de energía, tales como trastornos metabólicos incluyendo, pero sin limitarse a, diabetes, obesidad, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, trastornos de almacenamiento de lípidos, enfermedades mitocondriales y similares (véase también el sitio web: emedicine.com/ped/GENETICS_AND_METABOLIC_DISEASE.htm). En determinados aspectos, los nutracéuticos sometidos a ensayo y/o producidos según los métodos dados a conocer en el presente documento modulan el aumento de peso interaccionando con la UTR en 5' del receptor de leptina.

Los métodos de detección descritos en el presente documento pueden usarse para detectar una o más secuencias de ADN, secuencias de ARN, proteínas o polipéptidos de interés en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones de tipo Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína y/o polipéptido incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína y/o polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

Un principio general de detección y/o cuantificación implica preparar una muestra o mezcla de reacción que puede contener una o más secuencias de ADN, secuencias de ARN, proteínas o polipéptidos de interés y una sonda en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el marcador y la sonda interaccionen y se unan, formando así un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden realizarse de una variedad de modos.

Por ejemplo, un método para realizar un ensayo de este tipo implicaría anclar la secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés o una sonda sobre un soporte de fase sólida, también denominado sustrato, y detectar complejos de secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés/sonda diana anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un método de este tipo, una muestra que va a someterse a ensayo para detectar la presencia y/o concentración de marcador, puede anclarse sobre un portador o soporte de fase sólida. En otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda puede anclarse a una fase sólida y puede permitirse que una muestra de un sujeto reaccione como un componente no anclado del ensayo.

Hay muchos métodos establecidos para anclarse componentes de ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas de marcador o sonda que se inmovilizan a través de conjugación de biotina y estreptavidina. Tales componentes de ensayo biotinilados pueden prepararse a partir de biotina-NHS(N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). En determinadas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados pueden prepararse de antemano y almacenarse.

Otros portadores o soportes de fase sólida adecuados para tales ensayos incluyen cualquier material que pueda unirse a la clase de molécula a la que pertenece el marcador o la sonda. Los soportes o portadores bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, poliestireno, nailon, polipropileno, nailon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita.

Con el fin de realizar los ensayos con los enfoques mencionados anteriormente, el componente no inmovilizado se añade a la fase sólida tras lo cual se ancla el segundo componente. Tras completarse la reacción, pueden eliminarse componentes no complejados (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado en la fase sólida. La detección de complejos de secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés/sonda anclados a la fase sólida puede lograrse en varios métodos explicados resumidamente en el presente documento.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, la sonda, cuando es el componente de ensayo no anclado, puede marcarse para el fin de detección y lectura del ensayo, o bien directa o bien indirectamente, con marcadores detectables que conoce bien un experto en la técnica. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen diversos restos radiactivos, enzimas, grupos prostéticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores bioluminiscentes, partículas metálicas, pares de unión proteína-proteína, pares de unión proteína-anticuerpo y similares. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína de fluorescencia verde (GFP), proteína de fluorescencia cian (CFP), umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina y similares. Los ejemplos de marcadores bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luciferasa (por ejemplo, bacteriana, de luciérnaga, de escarabajo click y similares), luciferina, aequorina y similares. Los ejemplos de sistemas enzimáticos que tienen señales detectable visualmente incluyen, pero no se limitan a, galactosidasas, glucorinidasas, fosfatasa, peroxidasa, colinesterasas y similares. Los marcadores identificables también incluyen compuestos radiactivos tales como ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^3H o ^{32}P . Están disponibles comercialmente marcadores identificables de una variedad de fuentes.

Se describen marcadores fluorescentes y su unión a nucleótidos y/o oligonucleótidos en muchas revisiones, incluyendo Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, novena edición (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002); Keller y Manak, *DNA Probes*, 2ª edición (Stockton Press, Nueva York, 1993); Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); y Wetmur, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26:227-259 (1991). Se dan a conocer metodologías particulares aplicables a la invención en la siguiente muestra de referencias: patentes estadounidenses n.ºs 4.757.141, 5.151.507 y 5.091.519. En un aspecto, se usan uno o más colorantes fluorescentes como marcadores, por ejemplo, tal como se da a conocer mediante las patentes estadounidenses n.ºs 5.188.934 (colorantes de 4,7-diclorofluoresceína); 5.366.860 (colorantes de rodamina que pueden resolverse espectralmente); 5.847.162 (colorantes de 4,7-diclororodamina); 4.318.846 (colorantes de fluoresceína sustituida con éter); 5.800.996 (colorantes de transferencia de energía); Lee *et al.*; 5.066.580 (colorantes de xantina); 5.688.648 (colorantes de transferencia de energía); y similares. El marcaje puede llevarse a cabo también con puntos cuánticos, tal como se da a conocer en las siguientes patentes y publicaciones de patente: patentes estadounidenses n.ºs 6.322.901, 6.576.291, 6.423.551, 6.251.303, 6.319.426, 6.426.513, 6.444.143, 5.990.479, 6.207.392, 2002/0045045 y 2003/0017264. Tal como se usa en el presente documento, el término "marcador fluorescente" incluye un resto de señalización que porta información a través de las propiedades de absorción y/o emisión fluorescentes de una o más moléculas. Tales propiedades fluorescentes incluyen intensidad de fluorescencia, duración de fluorescencia, características del espectro de emisión, transferencia de energía, y similares.

En otra realización, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un marcador puede lograrse sin marcar ningún componente de ensayo (sonda o marcador) utilizando una tecnología tal como análisis de interacción molecular (BIA) en tiempo real (véase, por ejemplo, Sjolander *et al.* (1991) *Anal. Chem.* 63:2338 2345 y Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699 705). Tal como se usa en el presente documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los elementos que interaccionan (por ejemplo, BIAcore). Cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un acontecimiento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)), dando como resultado una señal detectable que puede usarse como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Alternativamente, en otra realización, pueden realizarse ensayos de detección y/o cuantificación análogos con una o más secuencias de ADN, secuencias de ARN, proteínas o polipéptidos de interés y sonda como solutos en una fase líquida. En un ensayo de este tipo, la secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés y sonda complejados se separan de los componentes no complejados mediante cualquiera de varias técnicas convencionales, incluyendo pero sin limitarse a: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, pueden separarse complejos de secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés/sonda de componentes de ensayo no complejados a través de una serie de etapas de centrifugación, debido a los diferentes equilibrios de sedimentación de los complejos basándose en sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas y Minton (1993) *Trends Biochem Sci.* 18:284). También pueden utilizarse técnicas cromatográficas convencionales para separar moléculas complejadas de las no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa moléculas basándose en el tamaño, y a través de la utilización de una resina de filtración en gel apropiada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande puede separarse de los componentes no complejados relativamente más pequeños. De manera similar, pueden aprovecharse las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo de secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés/sonda en comparación con los componentes no complejados para diferenciar el complejo de los componentes no complejados, por ejemplo a través de la utilización

de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Tales resinas y técnicas cromatográficas las conoce bien un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Heegaard (1998) J. Mol. Recognit. 11:141; Hage y Tweed (1997) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 12:499). También puede emplearse electroforesis en gel para separar componentes de ensayo complejados de componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 1999). En esta técnica, se separan complejos de proteína o ácido nucleico basándose en el tamaño o la carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el procedimiento electroforético, se prefieren normalmente condiciones y materiales de matriz de gel no desnaturalizantes en ausencia de agente reductor. Un experto en la técnica conocerá bien condiciones apropiadas para el ensayo particular y componentes del mismo.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, el nivel de una secuencia de ARNm de interés puede determinarse mediante formatos o bien *in situ* y/o bien *in vitro* en una muestra biológica usando métodos conocidos en la técnica. Muchos métodos de detección de la expresión usan ARN aislado. Para métodos *in vitro*, puede utilizarse cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione con respecto al aislamiento de ARNm para la purificación de ARN de células sanguíneas (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987 1999). Adicionalmente, pueden procesarse fácilmente grandes números de células y/o muestras usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento de ARN en una única etapa de Chomczynski (1989, patente estadounidense n.º 4.843.155).

Puede usarse ARNm aislado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de tipo Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y alineamientos de sondas. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, un método de diagnóstico para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que está detectándose. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica para un marcador de la presente invención. Otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en el presente documento.

En un formato, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una alineación de chip génico. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de ARNm codificado mediante los marcadores de la presente invención.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm correspondiente a un marcador de la presente invención en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante rTPCR (la realización experimental expuesta en las patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195 y 4.683.202), COLD-PCR (Li *et al.* (2008) Nat. Med. 14:579), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189), replicación de secuencias autosostenida (Guatelli *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173), replicasa Q-Beta (Lizardi *et al.* (1988) Bio/Technology 6:1197), replicación por círculo rodante (patente estadounidense n.º 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Tal como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse a regiones en 5' o 3' de un gen (hebras positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre medias. En general, los cebadores de amplificación tienen de desde aproximadamente 10 hasta 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de desde aproximadamente 50 hasta 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para métodos *in situ*, no es necesario aislar el ARNm de la muestra (por ejemplo, un fluido corporal (por ejemplo, células sanguíneas)) antes de la detección. En tales métodos, se prepara/procesa una muestra de células o tejido usando métodos histológicos conocidos. La muestra se inmoviliza entonces sobre un soporte, normalmente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridarse con ARNm que codifica para el marcador.

Como alternativa a realizar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluto de la secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado de la secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de una secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un patrón o control. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra de una fuente

con una muestra de otra fuente.

En otra realización a modo de ejemplo, se detecta una proteína o polipéptido. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, un agente para detectar un polipéptido de la invención es un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención, tal como un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje en un extremo de una sonda de ADN con biotina de manera que pueda detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales inmunizando un sujeto adecuado con una proteína o polipéptido de elección. El título de la proteína de elección en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando proteína inmovilizada. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra la proteína de elección pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. A un tiempo apropiado tras la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-proteína de elección son máximos, pueden obtenerse células que producen anticuerpos del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (véanse también, 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; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica de hibridoma de VEB (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véanse en general R. H. Kennet, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, N.Y. (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Geffer *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, se fusiona una línea celular inmortal (normalmente un mieloma) con linfocitos (normalmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con una proteína de elección tal como se describió anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se examinan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína de elección.

Puede emplearse una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo dado. Los ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y similares. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteínas/anticuerpos conocidos para su uso en la determinación de si las células (por ejemplo, células de fluidos corporales tales como células sanguíneas) expresan un marcador de la presente invención.

En un formato, pueden usarse anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, en métodos tales como inmunotransferencias de tipo Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, es preferible generalmente inmovilizar o bien el anticuerpo o bien las proteínas sobre un soporte sólido. Los portadores o soportes de fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte que pueda unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Los portadores o soportes bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, magnetita y similares.

Un experto en la técnica conocerá muchos otros portadores adecuados para la unión a anticuerpo o antígeno, y podrán adaptar tal soporte para su uso con la presente invención. Por ejemplo, puede hacerse correr proteína aislada de células (por ejemplo, células de fluidos corporales tales como células sanguíneas) sobre una electroforesis en gel de poliácridamida e inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte puede lavarse entonces con tampones adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo marcado de manera detectable. El soporte de fase sólida puede lavarse entonces con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse entonces por medios convencionales.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, pueden realizarse ensayos de la invención en modelos animales no humanos (incluyendo, pero sin limitarse a caballos, vacas, ovejas, cerdos, cabras, conejos, cobayas, ratas, ratones, jerbos, primates no humanos y similares), células (por ejemplo, células de microorganismos (por ejemplo, células bacterianas, células virales, células de levadura y similares)) o sistemas libres de células (por ejemplo, ensayos de transcripción *in vitro*, ensayos de traducción *in vitro*, ensayos de lisados celulares, ensayos de lisados celulares fraccionados y similares).

Ha de entenderse que las realizaciones de la presente invención que se han descrito son meramente ilustrativas de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Los expertos en la técnica pueden hacer

numerosas modificaciones basándose en las enseñanzas presentadas en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Detección de ARNm de biomarcador mediante PCR en tiempo real

- 5 La PCR en tiempo real es un método cuantitativo para detectar cambios en los niveles de ARN específicos; por tanto, la PCR en tiempo real para genes supresores de tumores o proapoptóticos regulados por incremento transcripcionalmente en presencia de inhibidores del complejo ternario proporciona un ensayo cuantitativo rápido y preciso para evaluar la disponibilidad del complejo ternario, y es un ensayo sustituto eficaz para la detección de la fosforilación de eIF2 α inducida por ácidos grasos omega-3. Se ha determinado que este nuevo ensayo también ha
- 10 mostrado una correlación notable con los obtenidos a través del uso de un ensayo basado en células de ATF-4 existente que es altamente dependiente de la disponibilidad del complejo ternario. Por tanto, es un método mejorado para la garantía y control de calidad de alimentos, productos nutracéuticos y medicinales con respecto a la actividad de ácidos grasos omega-3 y otros compuestos beneficiosos que influyen en la disponibilidad del complejo ternario para iniciar la traducción de ARNm.

Ensayo de PCR en tiempo real convencional

1. Sembrar en placa células de origen o bien humano, de ratón o bien de rata tales como, por ejemplo, hepatocitos de rata, fibroblastos humanos o de ratón hechos crecer en medios de cultivo convencionales tal como, por ejemplo, DMEM o RPMI 1640 con suero de ternera bovino o bovino fetal al 5-10% (o bien tres pocillos en una placa de 6 pocillos o de 100 mm, o bien otro recipiente) para cada condición;
- 20 2. tratar con compuesto que va a evaluarse o con control/vehículo convencional;
3. recoger las células tras seis horas;
4. aislar el ARN;
5. transcribir de manera inversa el ARN;
6. amplificar los transcritos inversos de ARNm de biomarcador (por ejemplo, el que codifica para CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 o una aminoácido sintetasa) y los de ARN 18S (patrón interno);
- 25 7. cuantificar la cantidad de transcrito inverso de biomarcador tras la normalización frente a transcrito inverso de 18S; y
8. comparar las cantidades de transcrito inverso de biomarcador a través de muestras tratadas de manera diferente (por ejemplo, tratadas con compuestos de prueba o vehículo).

Ensayo de PCR en tiempo real, en células

1. Sembrar en placa células (por ejemplo, en placas de 96 pocillos u otro formato de múltiples cámaras);
2. tratar con diferentes dosis de compuestos o vehículo;
3. lisar las células tras 6 horas;
4. transcribir de manera inversa en los mismos pocillos;
- 35 5. amplificar el transcrito inverso de ARNm de biomarcador (por ejemplo, el que codifica para CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 o una aminoácido sintetasa) y el de ARN 18S en el mismo pocillo;
6. cuantificar la cantidad de transcrito inverso de biomarcador tras la normalización frente a transcrito inverso de 18S; y
7. comparar las cantidades de transcrito inverso de biomarcador a través de muestras tratadas de manera diferente (por ejemplo, tratadas con compuestos de prueba o vehículo).
- 40

Los resultados obtenidos cuando se amplificó un transcrito de ARNm que codifica para CHOP se muestran en la figura 1, en comparación con los resultados obtenidos en el ensayo de ATF-4 existente.

EJEMPLO 2

Detección de la actividad transcripcional de genes de biomarcador por medio de ensayo de gen indicador

- 45 Otro medio mediante el cual someter a ensayo la presencia y actividad de ácidos grasos omega-3 en alimentos, composiciones nutracéuticas y medicinales es medir la regulación por incremento de la actividad transcripcional de

genes de marcador usando constructos de genes indicadores. Según este método, cada constructo de este tipo contiene una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa, proteína fluorescente verde, roja, roja lejana, dsRed, dsRed2, naranja, amarilla, cian, beta galactosidasa, peroxidasa del rábano, acuaporinas, cloranfenicol acetil transferasa, u otra proteína que genera una señal detectable o tiene una actividad enzimática u otra que es susceptible para la detección mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica). Operativamente unida a la secuencia que codifica para proteína indicadora del constructo está una región promotora sintética o que se produce de manera natural que se regula por incremento transcripcionalmente en presencia de ácidos grasos omega-3 u otros inhibidores adecuados de la iniciación de la traducción de ARNm, por ejemplo, inhibidores de complejo ternario. Los promotores adecuados incluyen, de un modo no limitativo, los de los genes que codifican para biomarcadores tales como CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 o aminoácido sintetasas. En condiciones que permiten que se produzca la transcripción de ácido nucleico y la traducción de ARNm, el sistema se pone en contacto o se trata con una muestra de prueba. Los controles negativos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un sistema de prueba en paralelo no puesto en contacto o tratado así, o uno que se pone en contacto o se trata con una muestra patrón apropiada. En los sistemas tanto de prueba como de control, se detecta la función de la proteína indicadora y se cuantifica mediante métodos bien conocidos en la técnica, y los niveles de función del indicador en los sistemas de prueba y patrón se comparan para determinar la potencia de los ácidos grasos omega-3 presentes en la muestra de prueba. En un ensayo de este tipo, la señal obtenida usando un constructo de promotor de ATF-4 o constructo de promotor de CHOP que también incluye la UTR en 5' de ATF-4 nativa se amplifica en un mayor grado que el resultante del uso de los otros promotores, ya que ATF-4 está regulado por incremento tanto transcripcional como traduccionalmente en presencia de ácidos grasos omega-3. Pueden diseñarse constructos de indicador teniendo en cuenta esto, para mantener los niveles de señal en el intervalo lineal para el nivel de actividad de indicador que se anticipa que resulta de la exposición a muestras de prueba, dependiendo de su potencia estimada antes del ensayo, por ejemplo, basándose en los resultados obtenidos con muestras de origen, procesamiento comparables o similares.

Determinados constructos de indicador de la presente invención también combinan promotores de la transcripción de alta eficacia y UTR en 5' de traducción de alta eficacia, tales como con el promotor de CHOP y la UTR en 5' de ATF-4, para proporcionar amplificación de la señal que es preferiblemente geométrica proporcionando de ese modo una razón de señal frente a ruido ventajosa en comparación con constructos de indicador que incluyen sólo uno de los dos elementos. Un constructo de indicador de este tipo es particularmente útil en ensayos en los que se desea una alta sensibilidad tal como cuando se comparan muestras diluidas o débilmente positivas comúnmente encontradas durante fases tempranas del procesamiento o cuando se detecta una actividad poco común. Pueden combinarse promotores y UTR en 5' en un único constructo de indicador usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y tal como se describe en el presente documento. Los promotores útiles incluyen, de un modo no limitativo, los de los genes que codifican para biomarcadores tales como CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 o aminoácido sintetasas y similares y otros conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Las UTR en 5' útiles incluyen ATF-4, ARNm de BRCA1, CD59, TCTP y GCN4 y similares y otras conocidas en la técnica y descritas en el presente documento. Un constructo de indicador útil que incluye ambos elementos es particularmente ventajoso cuando los elementos seleccionados, es decir apareamientos de UTR en 5' y promotor, responden al mismo agente o señal o similar.

EJEMPLO 3

Detección de traducción aumentada de proteínas de biomarcador

Para determinar la potencia de ácidos grasos omega-3 u otros agentes beneficiosos en productos alimenticios, nutracéuticos o medicinales, se exponen transcritos de ARNm en los que secuencias de UTR en 5' que contienen dos o más ORF están operativamente unidas a secuencias que codifican para proteínas indicadoras, a condiciones en las que se permite que se produzca traducción de proteína, por ejemplo, un sistema de traducción animal, celular o libre de células, tal como un lisado de reticulocitos de conejo u otro sistema *in vitro* que contiene los componentes celulares necesarios para efectuar la traducción de ARNm a proteína. Los transcritos pueden producirse dentro del sistema (por ejemplo, expresarse en un animal, célula u otra mezcla que contiene el constructo de indicador y una ácido nucleico polimerasa apropiada, por ejemplo, una ARN polimerasa), o pueden producirse de manera exógena y añadirse al sistema. El sistema puede contener opcionalmente un ARNm de indicador interno u otro control cuya eficacia de traducción no se ve afectada por la presencia de ácidos grasos omega-3 u otros agentes beneficiosos que el ensayo pretende detectar, permitiendo de ese modo que los niveles de actividad de traducción de prueba y control se normalicen frente a las cantidades relativas de transcritos de prueba y control disponibles que van a traducirse. Alternativamente, los niveles de ARNm de indicador pueden normalizarse entre diversas muestras de prueba y compararse los niveles de función de indicador.

Las UTR en 5' apropiadas para transcritos de prueba incluyen, de modo no limitativo, las de los genes o transcritos de ARNm que codifican para proteínas de biomarcador tales como BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 o GCN4. Las UTR en 5' apropiadas para transcritos de control pueden extraerse de genes o transcritos de ARNm que codifican para proteínas de mantenimiento y/o que tienen uno o menos (es decir, cero) ORF en sus respectivas UTR en 5'.

Los sistemas descritos anteriormente se tratan o se ponen en contacto con una muestra de una composición alimenticia, nutracéutica o medicinal, y las cantidades de función de proteína indicadora de prueba y control (por

- ejemplo, dentro de una muestra de prueba; entre una muestra de prueba y una muestra no tratada; entre una muestra de prueba y una muestra tratada con un patrón para determinar la potencia de un ácido graso omega-3 u otro agente beneficioso), se detectan y cuantifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, en los que niveles elevados de función de indicador se correlacionan positivamente con la actividad de traducción de los ARNm de indicador de prueba y, en consecuencia, con la potencia de un ácido graso omega-3 u otro agente beneficioso contenido en la muestra de prueba.

EJEMPLO 4 COMPARATIVO

Fabricación de productos nutracéuticos y otros productos de calidad controlada a partir de aceite de pescado

- Tal como se mencionó anteriormente, el aceite de pescado es una fuente significativa de ácidos grasos omega-3; sin embargo, los suministros de aceite de pescado difieren enormemente entre sí en el contenido y la bioactividad de estos compuestos beneficiosos. La invención proporciona métodos para la fabricación de productos derivados de aceite de pescado que presentan una bioactividad conocida, uniforme de ácidos grasos omega-3.
- Se captura pescado y, mientras está vivo o fresco, se prensa en condiciones de fabricación de calidad alimentaria para efectuar la extracción de aceite a partir de la carne. Se eliminan metales pesados y otros contaminantes medioambientales mediante filtración, quelación y/o otros métodos conocidos por los expertos en la técnica relevante. Opcionalmente, el aceite de pescado puede procesarse entonces adicionalmente, por ejemplo, para mejorar el gusto, aroma y/o aspecto, para añadir otros agentes beneficiosos (incluyendo, de modo no limitativo, fitoesteroles u otros compuestos beneficiosos) o para concentrar los ácidos grasos omega-3 y/u otros agentes beneficiosos. Opcionalmente, puede envasarse el aceite de pescado no procesado, parcialmente procesado (por ejemplo, detoxificado), fraccionado o procesado de otra forma, por ejemplo, en botellas u otros recipientes no consumibles, o en recipientes consumibles, tales como cápsulas de calidad farmacéutica o alimentaria, por ejemplo, cápsulas de gelatina o comprimidos oblongos. Opcionalmente, los ácidos grasos omega-3 y/u otros agentes beneficiosos contenidos en el aceite de pescado pueden enriquecerse, purificarse parcialmente o incluso purificarse completamente, es decir, aislarse.
- En una o más de las fases de fabricación mencionadas anteriormente, la capacidad del aceite de pescado, producto intermedio o producto terminado para efectuar un aumento de la transcripción de uno o más de los genes que codifican para biomarcadores tales como ATF-4, CHOP, BiP, Xbp-1 o aminoácido sintetasa o, alternativamente, un aumento de la traducción de ARNm que contienen en sus UTR en 5' dos o más ORF, incluyendo, de modo no limitativo, UTR en 5' de ARNm que codifican para biomarcadores tales como BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 o GCN4, se somete a ensayo usando los métodos descritos en los ejemplos anteriores en el presente documento. Los resultados del ensayo obtenidos durante fases tempranas de fabricación pueden permitir que se realicen ajustes en la concentración de ácidos grasos omega-3 durante las etapas de producción adicionales, o por lo demás pueden guiar el ensamblaje, la mezcla o la formulación de componentes de producto para dar como resultado un producto alimenticio, nutracéutico o medicinal de potencia conocida con respecto a la bioactividad de ácido graso omega-3. Opcionalmente, pueden someterse a ensayo muestras del producto terminado (por ejemplo, una alícuota de un líquido o polvo, o un único comprimido oblongo, cada uno representativo de la tanda o lote que se ha extraído o seleccionado) antes de la distribución, permitiendo de ese modo que se hagan alegaciones de etiquetado u otras alegaciones de comercialización con respecto al nivel de una propiedad biológica, nutracéutica o medicinal beneficiosa que presenta el producto, por ejemplo, con respecto a la inhibición de la iniciación de la traducción, o propiedades terapéuticas o preventivas asociadas con la inhibición, regulación por incremento u otra modulación de la traducción de ARNm o transcripción de gen de biomarcador.

REIVINDICACIONES

1. Método para someter a ensayo una sustancia para una actividad de ácido graso poliinsaturado (AGPI) n-3 que comprende las etapas de:

5 proporcionar un primer sistema de prueba no humano que incluye un gen que codifica para una secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una primera proteína indicadora operativamente unida a un primer promotor de gen de biomarcador;

proporcionar un segundo sistema de prueba no humano que incluye un gen que codifica para una segunda secuencia de ARNm que tiene una región codificante para una segunda proteína indicadora operativamente unida a un segundo promotor de gen de biomarcador;

10 poner en contacto el segundo sistema de prueba con la sustancia;

poner en contacto el primer sistema de prueba con una sustancia patrón o una sustancia de control; y

detectar los niveles de transcripción de las secuencias de ARNm primera y segunda, en el que el nivel de transcripción de la segunda secuencia de ARNm es mayor que el nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm si la sustancia tiene una actividad de AGPI n-3, y en el que dicho primero y dicho
15 segundo promotor de gen de biomarcador se selecciona del grupo que consiste en promotor de gen de proteína C/EBP proapoptótica (CHOP), promotor de gen de proteína de unión a chaperona ER (BiP), promotor de gen de factor de transcripción activante 4 (ATF-4) y promotor de gen de proteína de unión a caja X 1 (Xbp-1).
2. Método según la reivindicación 1, en el que los sistemas de prueba primero y segundo se seleccionan del grupo que consiste en un animal, una célula y un ensayo libre de células.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la primera proteína indicadora y la segunda proteína indicadora son la misma proteína.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que los niveles de transcripción se determinan mediante PCR en tiempo real.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la etapa de detección comprende PCR en tiempo real realizada *in vitro*.
7. Método según la reivindicación 5, en el que la etapa de detección comprende PCR en tiempo real realizada en células.
- 30 8. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la actividad transcripcional detectando una o más actividades de proteína indicadora.
9. Método según la reivindicación 1, en el que la transcripción de la segunda secuencia de ARNm es al menos el 150% del nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm.
- 35 10. Método según la reivindicación 1, en el que la sustancia se selecciona del grupo que consiste en una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutricional y una muestra de producto farmacéutico.
11. Método según la reivindicación 1, en el que la sustancia se deriva de aceite de pescado.
12. Método según la reivindicación 1, en el que el AGPI n-3 es ácido eicopentaenoico (EPA).
- 40 13. Método según la reivindicación 1, en el que la sustancia contiene EPA.

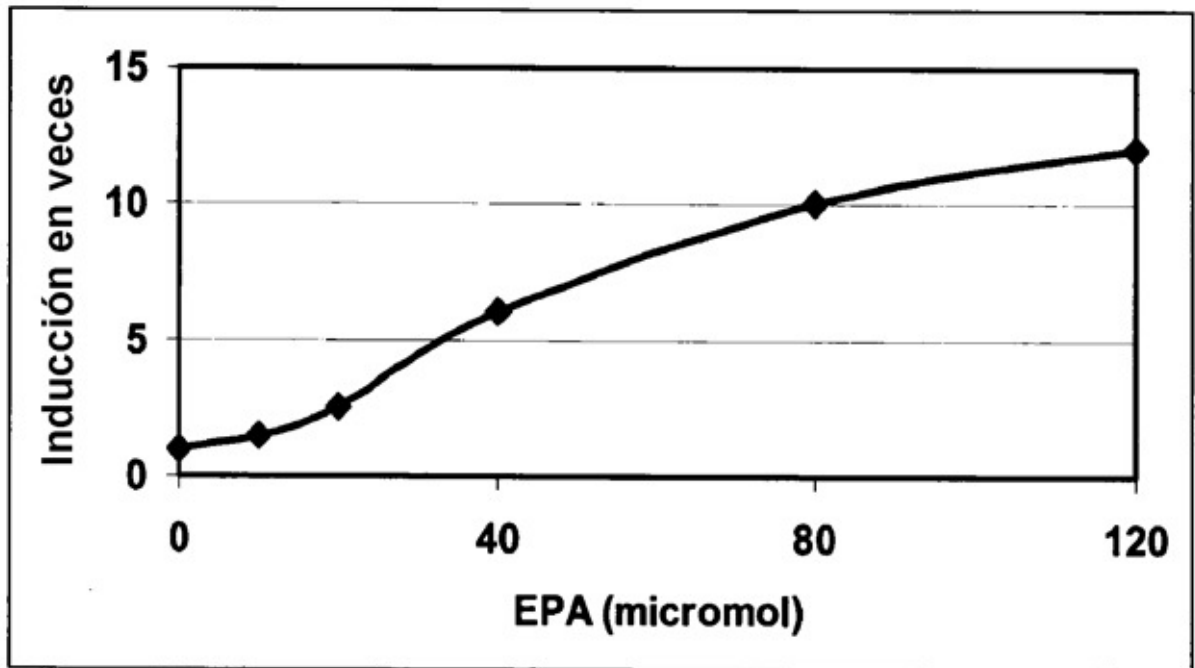


Figura 1