

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 941**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2013 PCT/US2013/051433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14015328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2013 E 13745268 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2820418**

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

30 Prioridad:

**20.07.2012 US 201261674180 P**

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

**01.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HALPERIN, JOSE A.;  
CHOREV, MICHAEL y  
AKTAS, HUSEYIN**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 656 941 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 basados en células para productos nutracéuticos y medicinales

**Declaración de intereses gubernamentales**

5 La invención se realizó con ayuda del gobierno con el número R01CA078411 concedida por los Institutos nacionales de la salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

**Campo de la invención**

10 Realizaciones de la presente invención se refieren de manera general al ensayo de productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales para propiedades beneficiosas para la salud humana o animal. Realizaciones de la presente invención incluyen además métodos mejorados que emplean ensayos basados en células que usan líneas celulares novedosas para el ensayo de tales productos para determinar actividad como inhibidores del inicio de la traducción.

**Antecedentes de la invención**

15 El inicio de la traducción de 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 del crecimiento celular y oncogénicas se regula por traducción (Flynn *et al.*, 1996, *Cancer Surv.* 27:293; Sonenberg *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:268). Por este motivo, el inicio de la traducción es un proceso celular estrechamente regulado. Un fallo en la regulación negativa del inicio 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 un inicio de la traducción mal regulado 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<sub>i</sub> (también conocido como el complejo ternario) es un regulador positivo clave del inicio de la traducción. Limitar su disponibilidad restringe el inicio de nuevas rondas de traducción de proteínas. Aunque la traducción de muchas proteínas oncogénicas y otros factores de crecimiento celular se basa fuertemente en el complejo ternario, lo mismo no es cierto para genes de mantenimiento, motivo por el cual productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales que ayudan a limitar la cantidad, disponibilidad o actividad del complejo ternario ofrecen posiblemente un medio seguro de prevención y tratamiento de la enfermedad. Además, la expresión de determinados supresores tumorales y genes y/o proteínas proapoptóticos aumenta realmente en presencia de inhibidores del complejo ternario o, más generalmente, del inicio de la traducción. La traducción reducida de proteínas oncogénicas, especialmente en combinación con la regulación por incremento de supresores tumorales y genes proapoptóticos, tiende en conjunto a prevenir y/o reprimir el fenotipo maligno.

35 El ácido eicosapentaenoico (EPA), un ácido graso poliinsaturado n-3 (PUFA n-3), se encuentra en grandes cantidades en aceite derivado de pescado, particularmente los de poblaciones silvestres nativas de aguas oceánicas frías. Los peces de piscifactoría contienen normalmente niveles mucho menores de PUFA n-3 que los peces silvestres. Se ha observado que cuando se administra aceite de pescado marino a pacientes con cáncer de próstata humano, eIF2 $\alpha$  se fosforila, 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 de animal o sistemas experimentales basados en células. Por consiguiente, suplementos alimenticios que contienen inhibidores del inicio de la traducción representan productos comerciales atractivos para el tratamiento y/o la prevención de cáncer y/o enfermedades proliferativas en las que la proliferación celular anómala es una anomalía patológica característica. Tales suplementos alimenticios también pueden actuar como reguladores del inicio de la traducción, y representan productos comerciales atractivos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades metabólicas tales como obesidad y diabetes.

45 Aceite de pescado de una variedad de fuentes está ampliamente disponible para los consumidores como producto alimenticio o suplemento nutricional. El aceite, o fracciones o componentes derivados de aceite, contenido en diferentes lotes, series, muestras o dosis de producción de un producto puede variar en cuanto a la calidad o la potencia, dependiendo de sus fuentes (por ejemplo, climas, especies de peces o condiciones de crecimiento, proveedores) o condiciones de procesamiento. Lo mismo puede ser cierto incluso para el contenido de un único lote, serie, muestra o dosis de producto. Otros productos alimenticios, nutracéuticos o medicinales que contienen inhibidores del inicio de la traducción naturales o sintéticos pueden variar en cuanto a la calidad o la potencia por motivos similares.

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

55 El documento WO 2010/138820 describe compuestos de N,N-diarilurea y compuestos de N,N'-diariltiurea como inhibidores del inicio de la traducción. Ting Chen *et al.*, "Chemical genetics identify eIF2 $\alpha$  kinase heme-regulated inhibitors as an anticancer target", *Nature chemical biology*, vol. 7, n.º 9, describen N,N'-diarilureas como inhibidores únicos de la acumulación de complejo ternario.

## Sumario de la invención

Los suplementos alimenticios con efectos terapéuticos/preventivos para enfermedades humanas representan una industria multimillonaria en rápido crecimiento en todo el mundo. Sin embargo, un problema principal sin resolver en esta industria es la falta de control de calidad de productos que se extraen de fuentes naturales para garantizar una actividad biológica y potencia 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.

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

Por consiguiente, en determinados aspectos a modo de ejemplo, se proporcionan métodos para el control y/o la garantía de calidad de productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales con respecto a la capacidad de tales productos para modular el inicio de la traducción de ARNm, abordando así la necesidad de proporcionar información precisa a consumidores referente a los posibles beneficios para la salud de tales productos.

La invención proporciona un método para determinar la potencia inhibidora del inicio de la traducción de una composición que tiene un nivel desconocido de actividad inhibidora del inicio de la traducción, que comprende:

- poner en contacto una célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010 con dicha composición durante un tiempo y a una temperatura eficaces para inhibir la proliferación de dicha célula;
- poner en contacto una célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011 con dicha composición durante un tiempo y a una temperatura eficaces para inhibir la proliferación de dicha célula;
- medir el nivel de inhibición de la proliferación de dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010 y dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011 inducido por dicha composición;
- en el que la cantidad de dicha actividad inhibidora del inicio de la traducción en dicha composición es proporcional al nivel de inhibición de la proliferación de la célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010; y
- comparar el nivel de inhibición de la proliferación inducido por dicha composición con el nivel de inhibición de la proliferación inducido por un patrón que tiene una cantidad conocida de dicha actividad;
- identificar la composición como que no tiene actividad inhibidora del inicio de la traducción si dicha composición inhibe la proliferación de dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011; y
- determinar la cantidad de actividad inhibidora del inicio de la traducción de dicha composición comparando la cantidad de dicha actividad en dicha composición con la cantidad de actividad inhibidora del inicio de la traducción en dicho patrón, en el que dicha actividad en dicha composición se expresa como porcentaje de la actividad en dicho patrón.

Se proporcionan bioensayos específicos del inicio de la traducción que pueden usarse para evaluar de manera cuantitativa la actividad biológica de compuestos, por ejemplo, productos nutracéuticos, que contienen inhibidores del inicio de la traducción. Los ensayos específicos del inicio de la traducción proporcionados en el presente documento evalúan la calidad (por ejemplo, actividad biológica), potencia y homogeneidad de series de productos nutracéuticos que contienen productos, por ejemplo, productos endógenos o aditivos que actúan como inhibidores del inicio de la traducción.

Estos métodos de ensayo ofrecen medios precisos y rápidos de determinación del grado al que una muestra dada de un producto alimenticio, nutracéutico o medicinal puede modular el inicio de la traducción, y de ese modo beneficiar a un ser humano o animal que consume tal producto o a quien se le administra tal producto. Estos métodos de ensayo permiten de manera general someter a prueba una muestra de un producto de este tipo para determinar su capacidad para inhibir el inicio de la traducción de ARNm. 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 $\alpha$  o de otro modo.

En determinadas divulgaciones a modo de ejemplo, puede someterse a prueba una muestra de un producto 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 PUFA 3-n contenidos en tal muestra. En determinadas divulgaciones, puede detectarse la capacidad de una muestra para aumentar la traducción de determinados transcritos de ARNm cuyas regiones no traducidas en 5' (5'-UTR) contienen dos o más marcos de lectura abiertos (ORF). En determinadas divulgaciones, puede someterse a prueba la capacidad de una muestra para aumentar la traducción de uno o más de ATF-4, ARNm de BRCA1, CD59, TCTP y GCN4 como medida de la potencia y/o capacidad de tal muestra para conferir beneficios para la salud a un ser humano o animal que consume el producto correspondiente o a quien se le administra el producto correspondiente. Tales ensayos pueden detectar un aumento de las cantidades, disponibilidad o actividades de proteínas producidas como resultado de una traducción regulada por incremento de estos ARNm. El grado al que se aumenta, se regula por incremento o se modula de otro modo la traducción de proteínas marcadoras puede determinarse mediante comparación de resultados de prueba con controles. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, tal traducción aumentada puede verse facilitada por la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y/o la inhibición del complejo ternario.

La divulgación permite someter a ensayo una muestra de un producto alimenticio, nutracéutico o medicinal para determinar actividades beneficiosas detectando productos de ácido nucleico de genes cuya transcripción se aumenta, se regula por incremento o se modula de otro modo en presencia de EPA u otros PUFA 3-n contenidos en tal muestra.

La divulgación proporciona además la detección de transcritos génicos que se aumentan, se regulan por incremento o se modulan de otro modo en presencia de EPA, otros PUFA 3-n u otros agentes beneficiosos. Tales transcritos pueden incluir, de manera no limitativa, aquellos que codifican para ATF-4, BiP, CHOP, Xpb-1 y aminoácido sintetasas. Determinadas divulgaciones proporcionan la detección de transcritos de ARNm que codifican para tales proteínas, tales como mediante transcripción inversa, amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR o métodos de amplificación isotérmica conocidos en la técnica) o métodos de hibridación de ácidos nucleicos. La detección de transcripción génica aumentada, regulada por incremento o modulada de otro modo también puede realizarse usando ensayos de genes indicadores, por ejemplo, de manera que el promotor del gen de interés se une operativamente a un gen indicador antes del contacto con la muestra de prueba o de control en un sistema que permite que se produzca la transcripción de ADN. El grado en el que se aumenta o se modula de otro modo la transcripción se determina mediante comparación de niveles de transcripción o la actividad de gen indicador observada en la muestra de prueba con los observados para un patrón o control externo o interno (por ejemplo, indicador doble).

Determinadas divulgaciones proporcionan el ensayo de productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales detectando proteínas codificadas por transcritos génicos que se aumentan, se regulan por incremento o se modulan de otro modo en presencia de EPA, otros PUFA 3-n u otros agentes beneficiosos. Tales proteínas pueden incluir, de manera no limitativa, ATF-4, BiP, CHOP, Xbp-1 y aminoácido sintetasas.

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 otro aspecto, se proporciona un método de determinación de homogeneidad de series de una pluralidad de composiciones individuales que comprende las etapas de detectar la inhibición, regulación por incremento u otra actividad de modulación del inicio de la traducción de al menos una de las composiciones individuales, y comparar la inhibición, regulación por incremento u otra actividad de modulación del inicio de la traducción de la al menos una de las composiciones individuales con un patrón para determinar la homogeneidad de series.

Por consiguiente, en determinadas divulgaciones, 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 segunda muestra que incluye una segunda secuencia de ARNm que tiene al menos dos marcos de lectura abiertos en su 5'-UTR, en el que la segunda secuencia de ARNm codifica para una segunda proteína biomarcadora, poner en contacto la segunda muestra con la sustancia, y detectar niveles de traducción de las proteínas biomarcadoras primera y segunda, en el que el nivel de traducción de la segunda proteína biomarcadora es mayor que el nivel de traducción del primer biomarcador si la sustancia tiene una o más propiedades biológicas, nutracéuticas o medicinales beneficiosas. En determinadas divulgaciones, la primera muestra se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otras divulgaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia. En otras divulgaciones, la primera proteína biomarcadora y la segunda proteína biomarcadora son la misma proteína. En determinadas divulgaciones, las proteínas biomarcadoras primera y segunda se seleccionan del grupo que consiste en producto de transcrito b de gen de propensión a cáncer de mama 1 (BRCA1), factor de transcripción activador 4 (ATF-4), proteína tumoral controlada por la traducción (TCTP), protectina (CD59) y control general no desreprimible 4 (GCN4). En otras divulgaciones, la etapa de detectar niveles de traducción se realiza mediante uno o más de análisis de tipo Western, ELISA e inmunocitoquímica. En determinadas divulgaciones, la muestra es un animal, una célula o un sistema libre de células (por ejemplo, un sistema de lisado de reticulocitos de conejo) en el que puede producirse la transcripción de ADN y/o traducción de ARNm, según sea apropiado. Pueden derivarse células de seres humanos, otros mamíferos (incluyendo, sin limitación, ratones y ratas), pollos u otras aves o levadura. Los sistemas libres de células incluyen reticulocito de conejo, germen de trigo o extractos

citoplasmáticos de células de mamífero tales como extractos de HeLa S100. En determinadas divulgaciones, la 5'-UTR se produce de manera natural o es sintética.

- 5 En otras divulgaciones, la 5'-UTR está operativamente unida a una secuencia codificante que codifica para una proteína indicadora. En determinadas divulgaciones, los niveles de traducción se determinan sometiendo a ensayo una o más actividades de la proteína indicadora. En otras divulgaciones, el nivel de traducción de la segunda proteína biomarcadora es de al menos el 150% del nivel de traducción del primer biomarcador. En determinadas divulgaciones, la sustancia está sometiendo a ensayo para determinar una actividad de ácido graso poliinsaturado n-3 (PUFA) (por ejemplo, un ácido eicosapentaenoico (EPA)). En determinadas divulgaciones, la sustancia es una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutracéutico o una muestra de producto farmacéutico.
- 10 En determinadas divulgaciones, 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 5'-UTR, en el que la secuencia de ARNm codifica para una proteína biomarcadora, poner en contacto la muestra con la sustancia, detectar un nivel de traducción de la proteína biomarcadora, y detectar un nivel de traducción de una proteína de patrón interno, en el que el nivel de traducción de la proteína biomarcadora 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 determinadas divulgaciones, la proteína de patrón interno se codifica por una secuencia de ARNm que tiene uno o ningún marco de lectura abierto en su 5'-UTR. En otras divulgaciones, la proteína biomarcadora se selecciona del grupo que consiste en producto de transcrito b de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4. En otras divulgaciones, la etapa de detectar el nivel de traducción se realiza mediante uno o más de análisis de tipo Western, ELISA e inmunocitoquímica. En aún otras divulgaciones, la 5'-UTR se produce de manera natural o es sintética. En otras divulgaciones, la 5'-UTR está operativamente unida a una secuencia codificante que codifica para una proteína indicadora. En otras divulgaciones, los niveles de traducción se determinan sometiendo a ensayo una o más actividades de la proteína indicadora. En otras divulgaciones, el nivel de traducción de la proteína biomarcadora es de al menos el 150% del nivel de traducción del patrón interno. En determinadas divulgaciones, la sustancia está sometiendo a ensayo para determinar una actividad de PUFA n-3 (por ejemplo, EPA). En determinadas divulgaciones, la sustancia es una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutracéutico o una muestra de producto farmacéutico.
- 20
- 25
- 30 Se da a conocer adicionalmente 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 transcripcional de un gen 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, detectar niveles de transcripción de las secuencias de ARNm primera y segunda, comparar el nivel de transcripción de los ARNm primero y segundo y determinar si el nivel de transcripción de la segunda secuencia de ARNm es mayor que el nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm, e identificar la sustancia como regulador por incremento del gen biomarcador si el nivel de transcripción del segundo ARNm es mayor que el nivel de transcripción del primer ARNm, si la sustancia media en la regulación por incremento transcripcional del gen biomarcador. En determinadas divulgaciones, los sistemas de prueba primero y segundo son un ensayo con animales, un ensayo basado en células o un ensayo libre de células. En determinadas divulgaciones, el primer sistema de prueba se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otras divulgaciones 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 determinadas divulgaciones, los niveles de transcripción se determinan mediante PCR en tiempo real (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en células)). En determinadas divulgaciones, la actividad transcripcional se determina detectando una o más actividades de proteína indicadora. En otros aspectos, el gen biomarcador codifica para una proteína proapoptótica o una proteína supresora tumoral (por ejemplo, CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1, una aminoácido sintetasa o similares). En determinadas divulgaciones, transcripción de la segunda secuencia de ARNm es de al menos el 150% del nivel de transcripción de la primera secuencia de ARNm. En determinadas divulgaciones, la sustancia está sometiendo a ensayo para determinar una actividad de PUFA n-3 (por ejemplo, EPA). En determinadas divulgaciones, la sustancia es una muestra de producto alimenticio, una muestra de producto nutracéutico o una muestra de producto farmacéutico.
- 40
- 45
- 50
- 55 En determinadas divulgaciones, la invención 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 biomarcadora, 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 biomarcadora, poner en contacto la segunda muestra, que comprende los niveles de traducción e identificar con el producto de aceite de pescado, detectar niveles de traducción de las proteínas biomarcadoras primera y segunda, en el que el nivel de traducción de la segunda
- 60

5 proteína biomarcadora 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 nivel de traducción mayor como producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinadas divulgaciones de la presente invención, la primera muestra se pone en contacto con una sustancia patrón o una sustancia de control. En otras divulgaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm tienen la misma secuencia. En aún otras divulgaciones, la primera proteína biomarcadora y la segunda proteína biomarcadora son la misma proteína (por ejemplo, producto de transcrito b de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4).

10 En determinadas divulgaciones, la solicitud proporciona 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 la secuencia de ARNm, en el que la secuencia de ARNm codifica para una proteína biomarcadora, poner en contacto la muestra con el producto de aceite de pescado, detectar a nivel de traducción de la proteína biomarcadora, detectar un nivel de traducción de una proteína de patrón interno, comparar e identificar en el que el nivel de traducción de la proteína biomarcadora 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, nutracéuticas o medicinales beneficiosas a un sujeto, y seleccionar un producto de aceite de pescado que tiene un nivel de traducción mayor como producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinadas divulgaciones, la proteína biomarcadora se selecciona del grupo que consiste en producto de transcrito b de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4.

20 En determinadas divulgaciones, la solicitud proporciona 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 niveles de transcripción de las secuencias de ARNm primera y segunda, comparar y seleccionar 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, nutracéuticas o medicinales beneficiosas a un sujeto, y seleccionar un producto de aceite de pescado que tiene un nivel de traducción mayor como producto de aceite de pescado de calidad controlada. En determinadas divulgaciones, 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 mediante inhibición del inicio de la traducción.

35 En determinadas divulgaciones adicionales, se proporcionan métodos para la detección, usando métodos de detección de ácidos nucleicos, tales como PCR en tiempo real de transcritos que aumentan en una muestra como resultado de actividad de ácido graso omega-3. Adicionalmente se proporcionan métodos para la detección de transcritos en una muestra que aumentan como resultado de actividad de ácido graso omega-3 mediante detección de actividad de proteínas indicadoras codificadas por genes bajo la influencia de promotores que se regulan por incremento de manera transcripcional mediante ácidos grasos omega-3. Adicionalmente se dan a conocer métodos para la detección de traducción aumentada de transcritos que tienen dos o más marcos de lectura abiertos en sus 5'-UTR. Todavía adicionalmente se dan a conocer métodos para la fabricación de productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales de calidad controlada usando el método de detección de transcritos en una muestra que aumentan como resultado de actividad de ácido graso omega-3.

#### Breve descripción de los dibujos

45 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 tomadas junto con los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 es una inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos anti-eIF2 $\alpha$  total o  $\beta$ -actina, el carril 1 son células transducidas con el vector pLVTHM sin ARNhc, los carriles 2 y 3 son células transducidas con el vector pLVTHM que contiene eIF2 $\alpha$ -WT y ORF de eIF2 $\alpha$ -S51A y casetes de ARNhc n.º 1098.

50 La figura 2 es un gráfico que muestra niveles de ARNm de eIF2 $\alpha$  endógeno determinados mediante PCR en tiempo real en células con eIF2 $\alpha$ WT/RFP o eIF2 $\alpha$ -S51A/RFP y eIF2 $\alpha$ -WT (GFP) maternas (Mat) y recombinantes (Rec). El carril 1 son células transducidas con pLVTHM sin ARNhc, los carriles 2 y 3 son células transducidas con el vector pLVTHM que contiene eIF2 $\alpha$ -WT y ORF de eIF2 $\alpha$ -S51A y casetes de ARNhc n.º 1098.

55 La figura 3 es una inmunotransferencia de tipo Western. Las células en la figura 2 se trataron con vehículo o EPA y se analizaron lisados con sonda con anticuerpos frente a pS51-eIF2 $\alpha$  (parte superior) o eIF2 $\alpha$  total (parte inferior). Rec= recombinante, End = eIF2 $\alpha$  endógeno.

La figura 4 es un gráfico que muestra células que expresan eIF2 $\alpha$ -S51A que son resistentes a la inhibición de proliferación celular inducida por EPA mientras que la proliferación de células PC-3 maternas (MAT) o células PC-3

transducidas con eIF2 $\alpha$  RFP recombinante y ARNhc son sensibles a la inhibición de proliferación celular inducida por EPA de una manera dependiente de la dosis.

### Descripción detallada de la invención

5 Se realizó la observación paradójica de que algunos ARNm se traducen de manera más eficaz cuando el complejo ternario es escaso que cuando es abundante (Aktas *et al.*, 2004, Journal of Nutrition 134(9): 2487S-2491 S; Halperin y Aktas, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2008/008333). Estos incluyen el ARNm que codifica para el factor de transcripción ATF-4, que regula por incremento de manera transcripcional muchos de los genes de respuesta a estrés de ER tales como proteína homóloga a C/EBP 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, denominada  
10 ARNmb, también se traduce más eficazmente cuando el complejo ternario es escaso. Se observó que el ácido graso poliinsaturado n-3, ácido eicosapentaenoico (EPA), reguló por incremento CHOP (número de registro de GenBank S40706) y proteína regulada por glucosa 78 (BiP, número de registro de RefSeq NM005347) en células cancerosas y en tumores escindidos o bien de modelos de cáncer de animales o bien de pacientes humanos, y que aumentó la traducción de ARNmb de BRCA1 en líneas celulares de cáncer de mama y tumores de animales.

15 Cada uno del ARNm de BRCA1 y el ARNm que codifica para factor de transcripción activador 4 (ATF-4, número de registro de RefSeq NM\_001675) contiene múltiples marcos de lectura abiertos (ORF) en su región no traducida en 5' (5'-UTR). Sin pretender limitarse a la teoría científica, ahora se han identificado ARNm adicionales que contienen dos o más ORF en sus 5'-UTR respectivas. Tales ARNm incluyen, sin limitación, los transcritos de ARNm de los genes que codifican para proteína tumoral controlada por la traducción (TCTP, número de registro de RefSeq  
20 NM\_003295.2), protectina (CD59) y control general no desreprimible 4 (GCN4, registro de RefSeq NC\_00113). Según determinadas divulgaciones, una muestra de un producto alimenticio, nutracéutico o medicinal puede someterse a ensayo para determinar su capacidad para aumentar la presencia, nivel o actividad biológica de una proteína codificada por un transcrito de ARNm que tiene múltiples ORF en su 5'-UTR. En particular, una muestra de este tipo puede someterse a ensayo para determinar su capacidad para mediar en un aumento de la presencia, nivel  
25 o actividad de uno o más de BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 y GCN4.

También se produce una transcripción aumentada de determinados genes en presencia de inhibidores del complejo ternario. Además de genes que codifican para ATF-4, BiP y CHOP, genes que muestran una transcripción aumentada en presencia de inhibidores del inicio de la traducción son aquellos que codifican para proteína de unión a X-box 1 (Xbp-1, número de registro de RefSeq NM\_001079539.1) y aminoácido sintetasas. Tales genes  
30 proporcionan biomarcadores de prueba apropiados para inhibidores del inicio de la traducción sometidos a ensayo según la invención, tales como los encontrados en aceite de pescado. Estos transcritos génicos pueden detectarse, y cuantificarse sus niveles, antes y después de la exposición de animales de prueba, células o sistemas libres de células a la muestra de producto alimenticio, nutracéutico o medicinal de prueba mediante métodos conocidos en la técnica, y compararse los niveles de los transcritos para determinar el grado al que la muestra de prueba facilitó la transcripción del gen 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  
35 manera similar, los productos de proteína de los transcritos de biomarcador pueden detectarse y cuantificarse, y compararse sus niveles con los de animales, células o sistemas libres de células sin tratar o con animales, células o sistemas expuestos a un patrón o control de actividad biológica conocida.

El término "nutracéutico", tal como se usa en el presente documento, es una combinación de "nutricional" y "farmacéutico", y se refiere a una sustancia ingerible que tiene uno o más efectos beneficiosos sobre un organismo tal como un ser humano. El término nutracéutico también puede referirse a uno o más compuestos que están presentes en una sustancia ingerible. Las sustancias ingeribles incluyen, pero no se limitan a, suplementos  
45 alimenticios, alimentos, bebidas y similares. Los términos "nutracéutico" y "suplemento nutricional" pueden usarse de manera intercambiable. Una sustancia (por ejemplo, un producto alimenticio, un producto nutracéutico o un producto farmacéutico) que tiene propiedades biológicas, nutracéuticas o medicinales beneficiosas se refiere a la capacidad de la sustancia para proporcionar un beneficio para la salud individual o más 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  
50 en el presente documento).

Los productos nutracéuticos de la presente invención incluyen aceites derivados de pescado tales como peces de agua fría, peces de agua templada, peces de agua dulce, peces de agua marina, peces de agua salobre, peces silvestres, peces de piscifactoría y similares, y preparaciones de ácidos grasos tales como las que contienen ácidos grasos omega-3.

55 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 azul tal como caballa, salmón, sardinas y similares, o fuentes vegetales tales como las semillas de chía, perilla, lino, nuez, verdolaga, arándano rojo, espinazo amarillo, cáñamo y similares, y frutos de plantas tales como la palma de azaí. Los ácidos grasos omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido  $\alpha$ -linoleico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y similares.  
60

La presente invención se refiere a un método de determinación de la potencia de una composición para inhibir, regular por incremento o modular el inicio de la traducción o la transcripción génica. Se pretende que el término “potencia”, tal como se usa en el presente documento, incluya, pero no se limite a, la eficacia de un compuesto, por ejemplo, un producto nutracéutico, para inhibir, regular por incremento o regular de otro modo el inicio de la traducción o la transcripción génica. La potencia de una composición puede definirse como la capacidad de la composición para inhibir, regular por incremento o modular de otro modo el inicio de la traducción o la transcripción génica con respecto a un patrón o control.

Un patrón o control de la presente invención es un compuesto o una composición que tiene una actividad de inhibición del inicio de la traducción tal como se determina mediante uno o más de los bioensayos descritos en el presente documento. Pueden obtenerse patrones 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 a partir de fuentes comerciales. Un patrón puede diluirse o concentrarse para disminuir o aumentar su actividad de inhibición de la traducción, respectivamente. Alternativamente, un patrón o control puede ser interno al 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 sustancialmente no se ve afectada por la sustancia de prueba, por ejemplo,  $\beta$ -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 transcripcional de un gen o promotor génico, o regulación de la traducción de un transcrito de ARNm o proteína, el término “sustancialmente insensible” significa o bien que no se ve afectado en absoluto o bien modulado 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.

En determinados aspectos, una muestra de prueba se calibra de manera que sus componentes activos están en el intervalo lineal y no saturan el sistema de prueba. Los métodos de calibración se conocen bien en la técnica e incluyen diluciones simples, diluciones en serie y similares.

La presente invención proporciona ensayos en los que la actividad de inhibición de la traducción de una composición se compara con un patrón usando uno o más de los 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%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, o más del 1000% de la actividad del patrón o control.

En determinados aspectos, actividad de inhibición con respecto al inicio de la traducción 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 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 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 actividad de inhibición con respecto al inicio de la traducción 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 aproximadamente el 110% de la actividad del patrón, o entre aproximadamente el 95% y aproximadamente el 105% de la actividad del patrón o control.

El término “alrededor de” o “aproximadamente” significa habitualmente dentro de un intervalo de error aceptable para el tipo de valor y método de medición. Por ejemplo, puede significar dentro del 20%, más preferiblemente dentro del 10%, y lo más preferiblemente todavía dentro del 5% de un valor o intervalo dado. Alternativamente, en especial en sistemas biológicos, el término “aproximadamente” significa dentro de aproximadamente un log (es decir, un orden de magnitud), preferiblemente dentro de un factor o dos de un valor dado.

En determinadas divulgaciones, un control o patrón puede tener una actividad nula. 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 medirá en una escala absoluta o en comparación con un patrón que tiene al

menos alguna actividad de un nivel conocido.

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

5 La presente invención también proporciona ensayos en los que se determina la homogeneidad de series 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 usa en el presente documento, se pretende que los términos “homogeneidad de series” u “homogeneidad de lotes” se refieran, pero no se limiten a, la actividad de inhibición del inicio de la traducción relativa de dos o más composiciones en una serie o lote. Tal como se usa en el presente documento, los términos “serie” o “lote” se refieren, pero no se limitan a, un grupo de dos o más composiciones. Una serie 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 “serie” o “lote” también puede referirse a una única combinación de una composición, a partir de la cual van a extraerse o producirse unidades de productos o muestras de prueba, o que se dividirá o fraccionará adicionalmente de otro modo.

Al menos en determinados ejemplos, los productos 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). Se pretende que el tratamiento de trastornos proliferativos celulares incluya la inhibición de la proliferación incluyendo la proliferación rápida. Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno proliferativo celular” incluye trastornos caracterizados por una 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 neoplasmas malignos, la mayoría de los cuales pueden invadir tejidos circundantes, y pueden metastatizarse a diferentes sitios (véase, por ejemplo, PDR Medical Dictionary 1ª edición, 1995). Los términos “neoplasma” y “tumor” se refieren a un tejido anómalo que crece mediante proliferación celular más rápidamente de lo normal y sigue creciendo tras retirarse el estímulo que inició la proliferación (véase, por ejemplo, PDR Medical Dictionary 1ª edición, 1995). Tal tejido anómalo muestra una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal que puede ser o bien benigna (es decir, tumor benigno) o maligna (es decir, tumor maligno).

Se pretende que la expresión “tratamiento de trastornos proliferativos celulares” incluya la prevención de la inducción, aparición, establecimiento o crecimiento de neoplasmas en un sujeto o una reducción en el crecimiento de neoplasmas preexistentes en un sujeto. La expresión también puede describir la inhibición de la invasión de células neoplásicas en tejidos circundantes o la metástasis de un neoplasma de un sitio a otro. Los ejemplos de los tipos de neoplasmas que se pretende que queden abarcados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los neoplasmas asociados con cánceres de mama, piel, hueso, próstata, ovarios, útero, cuello uterino, hígado, pulmón, cerebro, laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, glándula paratiroidea, glándula tiroidea, glándula suprarrenal, sistema inmunitario, tejido neuronal, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios y/o riñones.

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

Al menos en determinados ejemplos, los productos 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 balance energético, tales como trastornos metabólicos incluyendo, pero sin limitarse a, diabetes, obesidad, enfermedades de almacenamiento de glicógeno, trastornos de almacenamiento de lípidos, enfermedades mitocondriales y similares (véase también el sitio de la World Wide Web: [emedicine.com/ped/GENETICS\\_AND\\_METABOLIC\\_DISEASE.htm](http://emedicine.com/ped/GENETICS_AND_METABOLIC_DISEASE.htm)). En determinados aspectos, los productos nutracéuticos sometidos a ensayo y/o producidos según los métodos dados a conocer en el presente documento modulan la ganancia de peso al interactuar con la 5'-UTR 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 dado a conocer 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 el polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden 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 interactúen y se unan, formando por tanto un complejo que puede retirarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden llevarse a cabo de varias maneras.

Por ejemplo, un método para llevar a cabo un ensayo de este tipo implicará 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 diana de secuencia de ADN, secuencia de ARN, proteína o polipéptido de interés/sonda anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una divulgación de un método de este tipo, una muestra que va a someterse a ensayo para determinar la presencia y/o concentración de marcador, puede anclarse sobre un portador o soporte de fase sólida. En otra realización, la situación inversa es posible, en la que puede anclarse la sonda a una fase sólida y puede dejarse que reaccione una muestra de un sujeto como componente no anclado del ensayo.

Hay muchos métodos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas de marcador o sonda que se inmovilizan mediante 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 divulgaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados pueden prepararse por adelantado y almacenarse.

Otros portadores o soportes de fase sólida adecuados para tales ensayos incluyen cualquier material que puede 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, poliacrilamidas, gabra y magnetita.

Con el fin de llevar a cabo ensayos con los enfoques mencionados anteriormente, el componente no inmovilizado se añade a la fase sólida sobre la que está anclado el segundo componente. Tras completarse la reacción, los componentes no complejados pueden retirarse (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado sobre 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 con varios métodos explicados resumidamente en el presente documento.

En determinadas divulgaciones, la sonda, cuando es el componente de ensayo no anclado, puede marcarse con fines 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 de metales, parejas de unión proteína-proteína, parejas de unión proteína-anticuerpo y similares. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína verde fluorescente (GFP), proteína cian fluorescente (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 elatérico y similares), luciferina, aequorina y similares. Los ejemplos de sistemas enzimáticos que tienen señales visualmente detectables incluyen, pero no se limitan a, galactosidasas, glucorinidasas, fosfatasas, peroxidadas, colinesterasas y similares. Los marcadores identificables también incluyen compuestos radiactivos tales como <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H o <sup>32</sup>P. Hay marcadores identificables comercialmente disponibles de una variedad de fuentes.

Las etiquetas fluorescentes y su unión a nucleótidos y/u oligonucleótidos se describen 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). En la siguiente muestra de bibliografía se dan a conocer metodologías particulares aplicables a la invención: patentes estadounidenses n.ºs 4.757.141, 5.151.507 y 5.091.519. En un aspecto, se usan uno o más colorantes o más fluorescentes como etiquetas, por ejemplo, tal como se da a conocer por las patentes estadounidenses n.ºs 5.188.934 (colorante 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 sustituidos 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 con etiquetas también puede llevarse a cabo 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 "etiqueta fluorescente" incluye un resto de señalización que transmite información a través de las propiedades de absorción y/o emisión fluorescentes de una o más moléculas. Tales propiedades

fluorescentes incluyen intensidad de fluorescencia, vida útil de fluorescencia, características de espectro de emisión, transferencia de energía y similares.

En otras divulgaciones, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un marcador puede lograrse sin marcar con etiqueta ningún componente de ensayo (sonda o marcador) usando una tecnología tal como análisis de interacción biomolecular (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 con etiqueta ninguno de los compuestos que interactúan (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 otras divulgaciones, pueden llevarse a cabo ensayos análogos de detección y/o cuantificación 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 complejadas se separan de 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 equilibrios de sedimentación diferentes de complejos basándose en sus tamaños y densidades diferentes (véase, por ejemplo, Rivas y Minton (1993) Trends Biochem Sci. 18:284). También pueden usarse 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 mediante el uso 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, 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 pueden aprovecharse para distinguir el complejo de componentes no complejados, por ejemplo mediante el uso 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 la 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 proceso electroforético, normalmente se prefieren condiciones y materiales de matriz de gel no desnaturizantes en ausencia de agente reductor. Las condiciones apropiadas para el ensayo particular y los componentes del mismo las conocerá bien un experto en la técnica.

En determinadas divulgaciones, el nivel de una secuencia de ARNm de interés puede determinarse mediante formatos *in situ* y/o *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*, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione frente al aislamiento de ARNm puede usarse para la purificación de ARN a partir 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 de una sola etapa de Chomczynski (1989, patente estadounidense n.º 4.843.155).

El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de tipo Southern o Northern, análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, un método de diagnóstico para la detección de 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 parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica para un marcador dado a conocer. Otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en el presente documento.

En un formato dado a conocer, se inmoviliza el ARNm sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo pasar el ARNm aislado por un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato dado a conocer alternativo, se inmoviliza(n) la(s) sonda(s) sobre una superficie sólida y se pone en contacto el ARNm con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz 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 por los marcadores de la presente invención.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm correspondiente a un marcador dado a conocer en una

muestra implica el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante rPCR (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), Q-beta replicasa (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, se define que cebadores de amplificación son un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse con regiones en 5' o 3' de un gen (cadenas positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre las mismas. En general, los cebadores de amplificación tienen aproximadamente desde 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 se necesita aislar ARNm de la muestra (por ejemplo, un líquido corporal (por ejemplo, células sanguíneas)) antes de la detección. En tales métodos, se prepara/procesa una muestra celular o tisular usando métodos histológicos conocidos. Después se inmoviliza la muestra sobre un soporte, normalmente un portaobjetos de vidrio, y después se pone en contacto con una sonda que puede hibridarse con ARNm que codifica para el marcador.

Como una alternativa a realizar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluta 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 absoluta 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 divulgaciones, un agente para detectar un polipéptido dado a conocer es un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención, tal como un anticuerpo con una etiqueta 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')<sub>2</sub>). Se pretende que el término "marcado con etiqueta", con respecto a la sonda o el anticuerpo, abarque el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, conexión física) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como marcaje con etiqueta indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado con etiqueta directamente. Los ejemplos de marcaje con etiqueta indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con etiqueta fluorescente y marcaje con etiqueta en extremo de una sonda de ADN con biotina de tal manera que puede detectarse con estreptavidina marcada con etiqueta fluorescente.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales inmunizando un sujeto adecuado con una proteína o polipéptido de elección. El título de 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. En un momento apropiado tras la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos del anticuerpo anti-proteína de elección son los más altos, pueden obtenerse células que producen anticuerpos del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497) (véase 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 del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.* (1983) Immunol. Today 4:72), la técnica del hibridoma de VEB (Cole *et al.* (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas del trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véase generalmente 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; Gefter *et al.* (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36). En resumen, se fusiona una línea celular inmortal (normalmente un mieloma) con linfocitos (normalmente esplenocitos) procedentes de un mamífero inmunizado con una proteína de elección tal como se describió anteriormente, y se examinan los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes 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 mediante inmunotransferencia de tipo Western, ensayo de inmunoabsorción

ligado a enzimas (ELISA) y similares. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de proteínas/anticuerpos para su uso en la determinación de si células (por ejemplo, células de líquidos corporales tales como células sanguíneas) expresan un marcador dado a conocer.

5 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, generalmente es preferible inmovilizar el anticuerpo o las proteínas sobre un soporte sólido. Los portadores o soportes de fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte que puede unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los portadores o soportes bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabro, magnetita y similares.

10 Un experto en la técnica conocerá muchos otros portadores adecuados para unirse a anticuerpo o antígeno, y podrá adaptar tal soporte para su uso con la presente invención. Por ejemplo, puede hacerse pasar proteína aislada de células (por ejemplo, células de líquidos corporales tales como células sanguíneas) por una electroforesis en gel de poliacrilamida e inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida tal como nitrocelulosa. Entonces puede lavarse el soporte con tampones adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo marcado con etiqueta detectable.  
15 Entonces puede lavarse el soporte de fase sólida con el tampón una segunda vez para eliminar anticuerpo no unido. Entonces puede detectarse la cantidad de etiqueta unida sobre el soporte sólido mediante medios convencionales.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, pueden realizarse ensayos de la invención en modelos de animales (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).

20 Debe entenderse que las realizaciones de la presente invención que se han descrito son simplemente ilustrativas de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Los expertos en la técnica pueden realizar numerosas modificaciones basándose en las enseñanzas presentadas en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se exponen como representativos de la presente invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención ya que estas y otras realizaciones equivalentes resultarán evidentes a la vista de la presente divulgación, figuras, tablas y reivindicaciones adjuntas.

#### EJEMPLO 1

30 Preparación de muestras para bioensayo

El principio activo de muchos productos nutracéuticos tales como aceite de pescado se libera tras la digestión. Por tanto, es necesario imitar esta digestión en el tubo de ensayo con el fin de someter a prueba la actividad *in vitro* de aceite de pescado (tal como cultivo celular). Hay varias maneras de lograr esto, a continuación se describe un método de este tipo como ejemplo no limitativo.

35 Hidrólisis de aceite de pescado

Se mezclaron aceite de pescado (10 g, ~12 mmol) y NaOH (2,16 g, 54 mmol) en agua (50 ml), etanol absoluto (70 ml) y tolueno (10 ml). Se sometió la mezcla a agitación magnética y se sometió a reflujo bajo N<sub>2</sub> durante 1,5 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se trató con HCl 1 N (81 ml) y se extrajo con n-hexano (100 ml). Se lavó la fase orgánica con una mezcla de etanol/agua (1:1, v/v) hasta que se obtuvo una fase acuosa  
40 con un pH de 5. Se secó la fase orgánica separada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío a temperatura ambiente. El residuo obtenido es el hidrolizado de aceite de pescado que se somete a análisis de composición cuantitativo y caracterización de actividad biológica.

#### EJEMPLO 2

Detección de ARNm de biomarcador mediante PCR en tiempo real

45 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 propaoptóticos o supresores tumorales regulados por incremento de manera transcripcional 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 $\alpha$  inducida por ácidos grasos omega-3. Se ha determinado que este nuevo ensayo también ha  
50 mostrado una notable correlación con los obtenidos mediante el uso de un ensayo basado en células de ATF-4 existente que depende altamente de la disponibilidad del complejo ternario. Por tanto, es un método mejorado para el control y la garantía de calidad de productos alimenticios, nutracéuticos y medicinales con respecto a la actividad de ácidos grasos omega-3 y otros compuestos beneficiosos que influyen sobre 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 humano, de ratón o de rata tales como, por ejemplo, hepatocitos de rata, fibroblasto de ratón o humano que se hace crecer en medios de cultivo convencionales tales como, por ejemplo, DMEM o RPMI 1640 con suero de ternero o bovino fetal al 5-10% (o bien tres pocillos en una placa de 6 pocillos o 100 mm, o bien otro recipiente) para cada condición;
2. Tratar con compuesto que va a evaluarse o con vehículo de control/patrón;
3. Recoger las células después de seis horas;
4. Aislar el ARN;
5. Someter el ARN a transcripción inversa;
6. Amplificar 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);
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 en muestras tratadas de diferente manera (por ejemplo, tratadas con compuestos de prueba o vehículo).

En células, ensayo de PCR en tiempo real

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. Someter las células a lisis después de 6 horas;
4. Realizar transcripción inversa en los mismos pocillos;
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 en muestras tratadas de diferente manera (por ejemplo, tratadas con compuestos de prueba o vehículo).

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

EJEMPLO 3

- 30 Detección de la actividad transcripcional de genes biomarcadores mediante ensayo de gen indicador

Otro medio mediante el cual someter a ensayo la presencia y actividad de ácidos grasos omega-3 en composiciones alimenticias, nutracéuticas y medicinales es medir la regulación por incremento de la actividad transcripcional de gen marcador usando constructos de gen indicador. Según este método, cada constructo de este tipo contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa, proteína verde fluorescente, rojo, rojo lejano, dsRed, dsRed2, naranja, amarillo, 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 de detección mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica). Operativamente unida a la secuencia que codifica para la proteína indicadora del constructo hay una región de promotor que se produce de manera natural o sintética que se regula por incremento de manera transcripcional en presencia de ácidos grasos omega-3 u otros inhibidores adecuados del inicio de la traducción de ARNm, por ejemplo, inhibidores del complejo ternario. Los promotores adecuados incluyen, de manera no limitativa, los de los genes que codifican para biomarcadores tales como CHOP, BiP, ATF-4, Xbp-1 o aminoácido sintetasa. En condiciones que permiten que se produzca la transcripción de ácido nucleico y 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 que no se pone en contacto o se trata de ese modo, o uno que se pone en contacto o se trata con una muestra de patrón apropiada. Tanto en el sistema de prueba como en el de control, se detecta la función de proteína indicadora y se cuantifica mediante métodos bien conocidos en la técnica, y se comparan los niveles de función indicadora en los sistemas de prueba y de patrón para determinar la potencia de 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 5'-UTR de ATF-4 nativa

se amplifica a un mayor grado de lo que se amplificarían las resultantes del uso de los otros promotores, ya que ATF-4 se regula por incremento tanto de manera transcripcional como por traducción en presencia de ácidos grasos omega-3. Pueden diseñarse constructos indicadores teniendo esto en cuenta, para mantener niveles de señal en el intervalo lineal para el nivel de actividad indicadora que se prevé que resulte de la exposición a muestras de prueba, dependiendo de su potencia estimada antes del ensayo, por ejemplo, basándose en resultados obtenidos con muestras o de origen, procesamiento o similares comparables.

Determinados constructos indicadores dados a conocer también combinan promotores de la transcripción de alta eficacia y 5'-UTR de traducción de alta eficacia, tales como con el promotor de CHOP y la 5'-UTR de ATF-4, para proporcionar una amplificación de señal que es preferiblemente geométrica proporcionando así una relación señal ruido ventajosa en comparación con constructos indicadores que sólo incluyen uno de los dos elementos. Un constructo 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 etapas tempranas de procesamiento o cuando se detecta una actividad poco frecuente. Los promotores y las 5'-UTR pueden combinarse para dar un único constructo indicador usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y tal como se describe en el presente documento. Los promotores útiles incluyen, de manera no limitativa, los de los genes que codifican para biomarcadores tales como CHOP, BIP, ATF-4, Xbp-1 o aminoácido sintetetasas y similares y otros conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Las 5'-UTR útiles incluyen ATF-4, ARNm de BRCA1, CD59, TCTP y GCN4 y similares y otros conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Un constructo indicador útil que incluye ambos elementos es particularmente ventajoso cuando los elementos seleccionados, es decir parejas de 5'-UTR y promotor, responden ante un agente o señal igual o similar.

#### EJEMPLO 4

##### Detección de aumento de la traducción de proteínas biomarcadoras

Para determinar la potencia de ácidos grasos omega-3 u otros agentes beneficiosos en productos alimenticios, nutracéuticos o medicinales, transcritos de ARNm en los que secuencias de 5'-UTR que contienen dos o más ORF están operativamente unidas a secuencias que codifican para proteínas indicadoras se exponen a condiciones en las que se permite que se produzca la traducción de proteínas, por ejemplo, un animal, célula o sistema de traducción libre de células, tal como un lisado de reticulocitos de conejo u otro sistema *in vitro* que contiene los componentes celulares necesarios para producir la traducción de ARNm para dar proteína. Los transcritos pueden producirse dentro del sistema (por ejemplo, expresarse en un animal, célula u otra mezcla que contiene el constructo indicador y un 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 indicador interno u otro de control cuya eficacia de traducción no se ve afectada por la presencia de ácidos grasos omega-3 u otros agentes beneficiosos que se pretende que detecte el ensayo, permitiendo así normalizar niveles de actividad de traducción de prueba y de control frente a las cantidades relativas de transcritos de prueba y de control disponibles para traducirse. Alternativamente, pueden normalizarse niveles de ARNm indicador entre diversas muestras de prueba y compararse niveles de función indicadora.

Las 5'-UTR apropiadas para transcritos de prueba incluyen, de manera no limitativa, las de los genes o transcritos de ARNm que codifican para proteínas biomarcadoras tales como BRCA1, ATF-4, TCTP, CD59 o GCN4. Las 5'-UTR 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 5'-UTR respectivas.

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 de control (por ejemplo, dentro de una muestra de prueba; entre una muestra de prueba y una muestra sin tratar; 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 se cuantifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, en los que niveles elevados de función indicadora se correlacionan de manera positiva con actividad de traducción de los ARNm indicadores de prueba y, por consiguiente, la potencia de un ácido graso omega-3 u otro agente beneficioso contenido en la muestra de prueba.

#### EJEMPLO 5

##### Fabricación de producto nutracéutico de calidad controlada y otros productos 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 en gran medida de unos a otros en cuanto al 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 y uniforme de ácidos grasos omega-3.

Los peces se pescan y, mientras están vivos o recién sacrificados, se prensan en condiciones de fabricación de calidad alimenticia para la extracción de aceite de la carne. Se eliminan metales pesados y otros contaminantes medioambientales mediante filtración, quelación y/u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica relevante. Opcionalmente, entonces puede procesarse adicionalmente el aceite de pescado, por ejemplo, para

mejorar el sabor, aroma y/o aspecto, para añadir otros agentes beneficiosos (incluyendo, de manera no limitativa, fitoesteroles u otros compuestos beneficiosos) o para concentrar ácidos grasos omega-3 y/u otros agentes beneficiosos. Opcionalmente, el aceite de pescado sin procesar, procesado parcialmente (por ejemplo, destoxificado), fraccionado o procesado de otro modo puede envasarse, por ejemplo, en botellas u otros recipientes no consumibles, o en recipientes consumibles, tales como cápsulas de calidad alimenticia o farmacéutica, por ejemplo, cápsulas de gel 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 etapas de fabricación mencionadas anteriormente, la capacidad del aceite de pescado, producto intermedio o producto acabado para producir 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 sintetasas, o, alternativamente, aumento de la traducción de ARNm que contienen en sus 5'-UTR dos o más ORF, incluyendo, de manera no limitativa, 5'-UTR 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 de ensayo obtenidos durante etapas tempranas de fabricación pueden permitir realizar ajustes en la concentración de ácidos grasos omega-3 durante etapas de producción adicionales, o pueden guiar de otro modo la combinación, el mezclado 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 ácidos grasos omega-3. Opcionalmente, pueden someterse a ensayo muestras del producto acabado (por ejemplo, una alícuota de un líquido o polvo, o un único comprimido oblongo, cada uno representativo de la serie o del lote del que se extrajo o se seleccionó) antes de la distribución, permitiendo así realizar etiquetas u otras afirmaciones comerciales con respecto al nivel de una propiedad biológica, nutracéutica o medicinal beneficiosa que presenta el producto, por ejemplo, con respecto a la inhibición del inicio de la traducción, o propiedades terapéuticas o preventivas asociadas con la inhibición, regulación por incremento u otra modulación de la transcripción de genes biomarcadores o traducción de ARNm.

#### EJEMPLO 6

Desarrollo de ensayos basados en células sensibles y robustos que permiten la cuantificación de la actividad biológica anticancerígena de preparaciones/series de aceite de pescado de calidad nutracéutica (NFO).

#### Diseño del estudio:

Generación de líneas celulares de cáncer de próstata humano transgénicas que expresan eIF2 $\alpha$  mutante (eIF2 $\alpha$ -S51A resistente a EPA) o silvestre (eIF2 $\alpha$ -WT<sub>2</sub> sensible a EPA).

Objetivo: Determinar la relación causa-efecto entre la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la actividad anticancerígena de PUFA n-3 en líneas celulares de cáncer de próstata humano. Se modificaron por ingeniería células que expresaban eIF2 $\alpha$  mutante no fosforilado (eIF2 $\alpha$ -S51A) o silvestre recombinante (eIF2 $\alpha$ -WT) y proteínas roja fluorescente o verde fluorescente, respectivamente en ausencia de eIF2 $\alpha$  endógeno. Para distinguir proteínas eIF2 $\alpha$  recombinantes de proteínas eIF2 $\alpha$  endógenas, se marcó eIF2 $\alpha$  recombinante en el extremo N-terminal con una etiqueta de hemaglutinina (HA) para garantizar la coexpresión de eIF2 $\alpha$  recombinante (mutante S51A o WT) y la proteína fluorescente. Se usó una técnica recientemente dada a conocer en la que pueden traducirse dos proteínas a una razón de 1:1. Esto se logró clonando sus secuencias codificantes como un único ARNm monocistrónico con la condición de que las secuencias de aminoácidos de estas dos proteínas estén separadas mediante un sitio de corte por proteasa 2A. Dicho de otro modo, se corta una proproteína traducida a partir de un único marco de lectura abierto (ORF) mediante la proteasa 2A para generar eIF2 $\alpha$  marcado con etiqueta de HA (WT o S51A) y proteínas RFP o GFP. En el constructo específico en el presente documento, la escisión mediante proteasa 2A creó eIF2 $\alpha$  nativo marcado con etiqueta de HA y una fusión de proteína fluorescente con la secuencia de reconocimiento de proteasa 2A. Con el fin de silenciar el eIF2 $\alpha$  endógeno con ARNhc sin afectar al eIF2 $\alpha$  recombinante (WT o S51A), se escindieron del plásmido todos los elementos de 5' y 3'-UTR del gen de eIF2 $\alpha$ .

Diseño experimental: El diseño requirió regular de manera temporal la sustitución de eIF2 $\alpha$  endógeno por proteína eIF2 $\alpha$  recombinante (WT o S51A). Para lograr esto se usó un vector lentiviral pLVTHM. Este vector contiene un casete controlado por promotor de factor de elongación humano 1 para la expresión de un ORF en células de mamífero y un casete controlado por LTR/SIN viral para el silenciamiento génico mediado por ARNhc. Se usaron secuencias codificantes de eIF2 $\alpha$ -WT en tándem con GFP y de eIF2 $\alpha$ -S51A en tándem con RFP. Se insertó el sitio de corte por proteasa 2A entre eIF2 $\alpha$  (WT o S51A) y proteínas fluorescentes. Se usaron RFP y GFP para marcar con etiqueta las células. Se seleccionaron estos dos indicadores porque pueden distinguirse fácilmente con el microscopio usando filtros apropiados *in vitro* e *in vivo*. Para una traducción óptima, los ORF estuvieron precedidos por una secuencia consenso de Kozak perfecta (GCCACCATGG). Para identificar la mejor secuencia de ARNhc que selecciona como diana eIF2 $\alpha$  endógeno pero no recombinante, se examinaron varios ARNhc lentivirales candidatos que seleccionan como diana 5' o 3'-UTR de eIF2 $\alpha$  endógeno usando análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western para evaluar cada ARNhc. Mediante estos estudios se demostró que una de las secuencias de ARNhc, ARNhc n.º 1098, provocó una eliminación casi total de la expresión de eIF2 $\alpha$  endógeno. Se clonó este ARNhc en el

casete de expresión de ARNhc del vector pLVTHM.

Generación de líneas celulares de cáncer de próstata humano transgénicas que sustituyen la expresión de eIF2 $\alpha$  endógeno por proteína recombinante (eIF2 $\alpha$ -S51A o eIF2 $\alpha$ -WT).

5 Se transdujeron líneas celulares de cáncer de próstata humano PC-3 con el vector pLVTHM que codifica para eIF2 $\alpha$ -S51A o eIF2 $\alpha$ -WT y RFP y se seleccionaron células que expresaban niveles similares de RFP mediante clasificación por FACS. Se expandieron las células y se caracterizaron para determinar la expresión de eIF2 $\alpha$  transgénico (WT o S51A) con respecto a eIF2 $\alpha$  endógeno usando electroforesis SDS-PAGE de alta resolución y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos de cabra anti-eIF2 $\alpha$  que reconocen eIF2 $\alpha$  tanto endógeno como y recombinante y anticuerpos anti-cabra conjugados con Alexa-680. Células de cáncer de  
10 próstata transducidas con el vector lentiviral descrito anteriormente expresan dos isoformas de eIF2 $\alpha$ , una proteína que migra más rápido que corresponde a eIF2 $\alpha$  endógeno y una proteína que migra más despacio que corresponde a eIF2 $\alpha$  recombinante marcado con etiqueta (la etiqueta de HA añade aproximadamente 1,5 kd). Se confirmó que esta proteína que migraba más despacio era en realidad eIF2 $\alpha$  transgénico sometiendo a inmunotransferencia los mismos geles con anticuerpos monoclonales anti-HA y anticuerpos anti-ratón conjugados con Alexa-800 (no mostrado). Dado que el anticuerpo anti-eIF2 $\alpha$  puede reconocer eIF2 $\alpha$  tanto endógeno como recombinante, supuestamente con la misma afinidad, la expresión relativa de eIF2 $\alpha$  endógeno y recombinante puede cuantificarse mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western con un único anticuerpo anti-eIF2 $\alpha$ .

Se transdujeron líneas celulares de cáncer de próstata humano PC-3 con el vector pLVTHM que codifica para eIF2 $\alpha$ -S51A/RFP o eIF2 $\alpha$ -WT/RFP y ARNhc n.º 1098 y se sometieron lisados celulares a inmunotransferencia con anticuerpos anti-eIF2 $\alpha$  total o  $\beta$ -actina. En la figura 1, el carril 1 son células transducidas con vector pLVTHM sin ARNhc, los carriles 2 y 3 son células transducidas con vector pLVTHM que contiene eIF2 $\alpha$ -WT o ORF de eIF2 $\alpha$ -S51A y cassetes de ARNhc n.º 1098. Las células transducidas con el vector pLVTHM sin el inserto de ARNhc expresaron aproximadamente la misma cantidad de proteína recombinante que de eIF2 $\alpha$  endógeno.

La expresión de proteína eIF2 $\alpha$  endógena se redujo drásticamente en células transducidas con el vector pLVTHM que contenía el ARNhc n.º 1098. Este vector viral redujo sistemáticamente la expresión de ARNm de eIF2 $\alpha$  endógeno en ~85% (figura 2.). Estos datos indican que se substituyó satisfactoriamente eIF2 $\alpha$  endógeno por eIF2 $\alpha$  recombinante (o bien WT o bien mutante S51A) al tiempo que se mantenían los niveles de eIF2 $\alpha$  global lo más próximos posibles a los de células parenterales.

Se caracterizaron las líneas celulares transgénicas por su respuesta a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida por EPA. El EPA provocó la fosforilación tanto de eIF2 $\alpha$  endógeno como de eIF2 $\alpha$ -WT recombinante pero no de eIF2 $\alpha$ -S51A recombinante (véase por ejemplo la figura 3 para los efectos de EPA). Por consiguiente, el EPA provocó una fosforilación significativa de eIF2 $\alpha$  en células que expresaban eIF2 $\alpha$ -WT maternas o recombinantes pero no en células que expresaban eIF2 $\alpha$ -S51A recombinantes.

Células PC-3 maternas (MAT) o células PC-3 transducidas con vector de expresión de eIF2 $\alpha$  RFP recombinante y ARNhc (n.º 1 en la posición 1098 en 3'-UTR de ARNm endógeno pero no recombinante) que selecciona como diana la expresión de eIF2 $\alpha$  endógeno se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de EPA. Se cuantificó la proliferación celular neta mediante ensayo de SRB tras cinco días de incubación y se expresó como porcentaje de células de control tratadas con vehículo. Tal como se muestra en la figura 4, las células PC-3 que expresaban eIF2 $\alpha$ -WT recombinante eran sensibles a la inhibición de proliferación celular mediante EPA de una manera dependiente de la dosis mientras que las que expresaban eIF2 $\alpha$ -S51A recombinante eran resistentes.

En conclusión, en el presente documento se ha descrito un ensayo basado en células que usa células modificadas por ingeniería molecular para medir la actividad específica inhibidora del inicio de la traducción de concentrados de omega-3 u otros productos nutracéuticos que ejercen su actividad biológica mediante la inhibición del inicio de la traducción mediada por eIF2 $\alpha$ . Los ensayos son precisos y sensibles porque miden la actividad en una muestra en ausencia de actividad de eIF2 $\alpha$  endógeno.

Estos hallazgos demuestran que las células cancerosas humanas transgénicas dadas a conocer en el presente documento son herramientas excelentes para evaluar la actividad biológica de las preparaciones nutracéuticas de la presente invención y concentrados de omega-3 que inducen la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y para el control de calidad de tales preparaciones.

50 Se depositaron cultivos celulares de PC-3 eIF2 $\alpha$ -WT (cepa 351) y PC-3 eIF2 $\alpha$ -S51A (cepa 411) en la colección americana de cultivos tipo (ATCC Manassas, VA) el 22 de junio de 2012 y recibieron los n.ºs de registro de ATCC PTA-13010 y PTA-13011, respectivamente.

El ensayo basado en células de la presente invención se realiza de la siguiente manera:

55 Células: Se cultivan entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 2000 células eIF2 $\alpha$ -S51A o eIF2 $\alpha$ -WT en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente un

## ES 2 656 941 T3

día.

Medios: Medios de cultivo tisular completos (suero de ternero fetal al 5% añadido) RPMI-1640 (Invitrogen, CA)

Materiales:

Placas de cultivo tisular de 96 pocillos

- 5 Colorante de sulforodamina B (SRB, al 0,57% v/p, Sigma, IL)  
Ácido tricarbocilicacético (TCA, al 10%, Sigma IL)  
Ácido acético glacial (al 1%, Sigma, IL)  
Tris-base 10 mM (Sigma, IL)  
Disolución madre de compuesto 100 mM
- 10 Preparar/sembrar en placa las células  
Hacer crecer células cancerosas hasta una confluencia del 80%  
Tratar con tripsina según protocolo convencional  
Neutralizar tripsina, disociar células y contar  
Sembrar en placa 1000 células en 100  $\mu$ l de medios por cada pocillo de la placa de 96 pocillos
- 15 Dejar los pocillos en los bordes vacíos  
Se necesita 1 placa para 4 compuestos  
Sembrar en placa células en otra placa (12 pocillos por línea celular), marcar esto como placa del "día 0"  
Añadir compuestos (día siguiente)  
Añadir 50  $\mu$ l de TCA al 10% a la placa del día 0, almacenar a 4°C
- 20 Preparar compuesto 40, 12, 3,6, 1,62 y 0 (disolvente)  $\mu$ M en medio de cultivo  
Mantener la concentración de disolvente (DMSO) igual en las diluciones  
Añadir 100  $\mu$ l de cada dilución de compuesto a tres pocillos de cada placa para una línea celular  
Las concentraciones de compuestos finales son 20, 6, 1,8, 0,54 y 0  $\mu$ M  
Devolver las células a la incubadora
- 25 Cinco días después de las adiciones de compuesto añadir 100  $\mu$ l de TCA al 10%  
Incubar a 4°C como mínimo durante 1 h.  
Tinción con SRB  
Seguir el protocolo de Vichai y Kirtikara (Nature Methods 2006, vol. 1: 1112-1115)  
a) Teñir las células
- 30 Retirar las células de la sala fría  
Decantar el contenido  
Lavar cuatro veces con H<sub>2</sub>O destilada de manera individual  
Retirar el exceso de HO  
Secar las placas (secado mediante soplado o secado al aire)
- 35 Añadir 100  $\mu$ l de disolución de SRB al 0,057% a cada pocillo  
Incubar a TA durante 30 min

Decantar el colorante

Lavar con ácido acético al 1% cuatro veces

Secar al aire las palcas

b) Medición de la DO

5 Añadir 200  $\mu$ l de TRIS-base 10 mM (~pH 10,5) a cada pocillo

Agitar la palca durante 5-10 min

Leer la DO a 510 nM en lector de microplacas

Calcular la inhibición del crecimiento celular en porcentaje como % de crecimiento celular de control =  $((DO \text{ media de muestra} - DO \text{ media de día } 0)/(DO \text{ media de vehículo} - DO \text{ media de día } 0)) \times 100$

10 % de inhibición del crecimiento =  $100 - \% \text{ de crecimiento celular de control}$

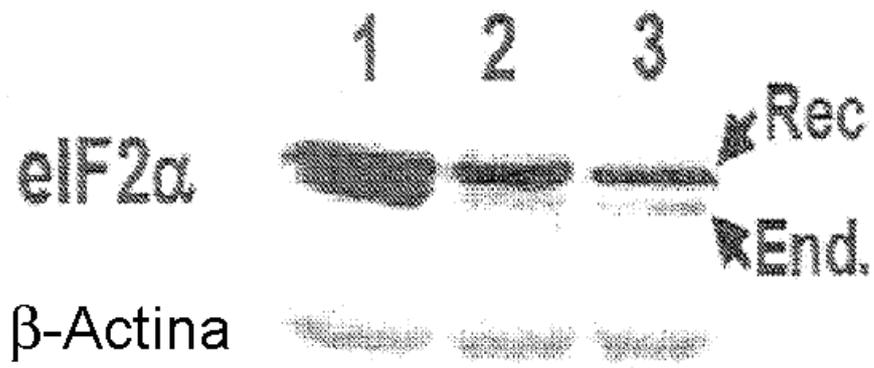
El ensayo usa un patrón con fines comparativos, que es un producto nutracéutico anteriormente sometido a ensayo o una cantidad predeterminada de EPA. Se preparan células eIF2 $\alpha$ -S51A y se usan como control negativo para sustancias que inhiben la proliferación celular independientemente de eIF2 $\alpha$ . La figura 4 es un ejemplo de una curva patrón. La curva patrón muestra que la cantidad de inhibición de la proliferación es proporcional a la cantidad de producto nutracéutico de la presente invención o EPA. El patrón se realiza con cada ensayo para determinar la cantidad de actividad en una muestra porque el grado de inhibición de la proliferación es proporcional a la cantidad de producto nutracéutico de la presente invención.

15

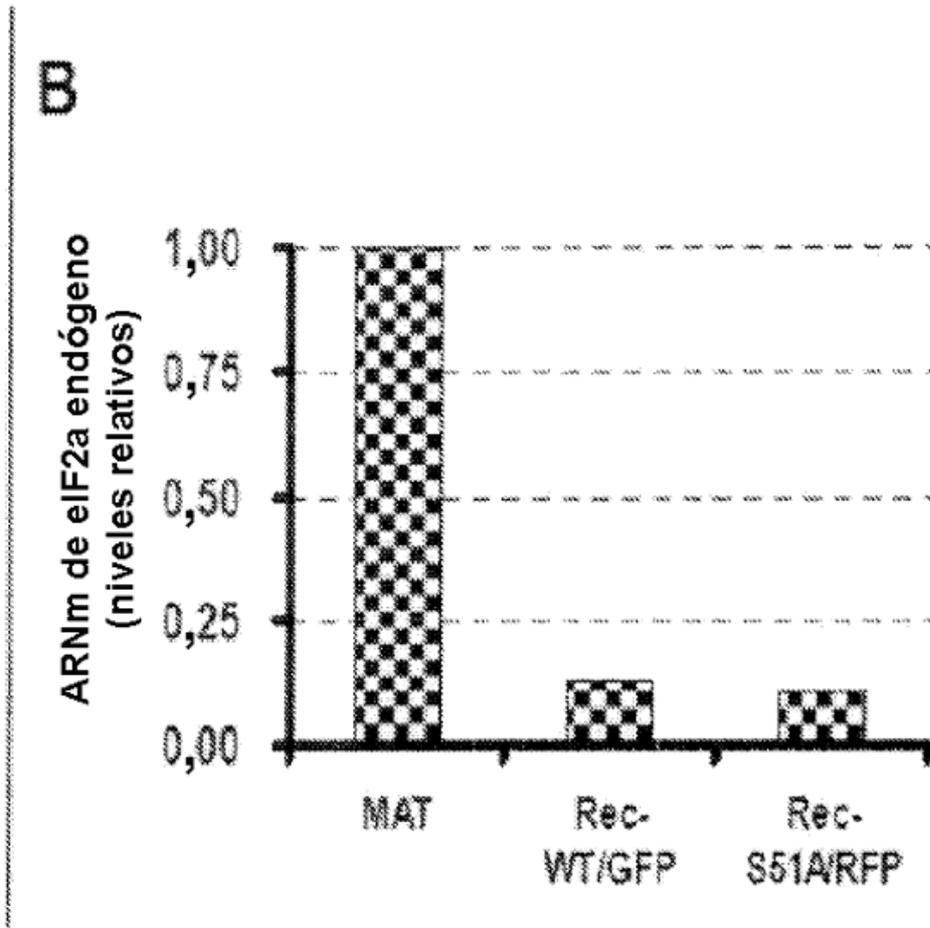
**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar la potencia inhibidora del inicio de la traducción de una composición que tiene un nivel desconocido de actividad inhibidora del inicio de la traducción, que comprende:
  - 5 • poner en contacto una célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010 con dicha composición durante un tiempo y a una temperatura eficaces para inhibir la proliferación de dicha célula;
  - poner en contacto una célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011 con dicha composición durante un tiempo y a una temperatura eficaces para inhibir la proliferación de dicha célula;
  - medir el nivel de inhibición de la proliferación de dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010 y dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011 inducido por dicha composición;
  - 10 • en el que la cantidad de dicha actividad inhibidora del inicio de la traducción en dicha composición es proporcional al nivel de inhibición de la proliferación de la célula con n.º de registro de ATCC PTA-13010;
  - comparar el nivel de inhibición de la proliferación inducido por dicha composición con el nivel de inhibición de la proliferación inducido por un patrón que tiene una cantidad conocida de dicha actividad;
  - 15 • identificar la composición como que no tiene actividad inhibidora del inicio de la traducción si dicha composición inhibe la proliferación de dicha célula con n.º de registro de ATCC PTA-13011; y
  - determinar la cantidad de actividad inhibidora del inicio de la traducción de dicha composición comparando la cantidad de dicha actividad en dicha composición con la cantidad de actividad inhibidora del inicio de la traducción en dicho patrón, en el que dicha actividad en dicha composición se expresa como porcentaje de la actividad en dicho patrón.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha composición es un producto nutracéutico o un concentrado de omega-3.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho patrón es una composición que comprende una cantidad conocida de dicha actividad inhibidora de inhibición de la traducción.
- 25 4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho patrón es una cantidad conocida de ácido eicosapentaenoico (EPA).
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha composición se hidroliza antes de dicha etapa de contacto.

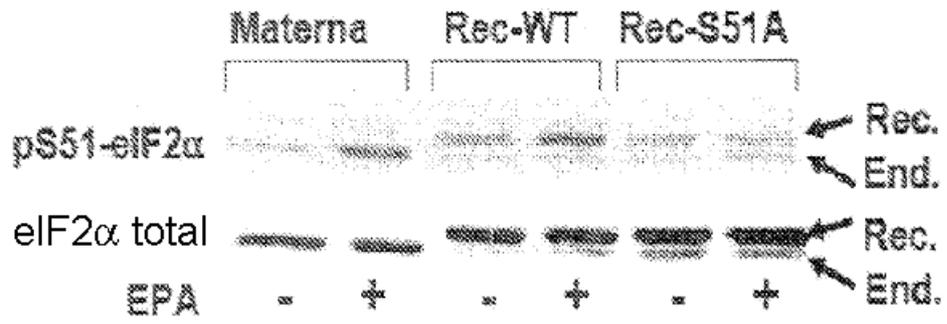
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

