

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518222

(P2005-518222A)

(43) 公表日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 B O 2 4
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	4 B O 6 3
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 B O 6 5
		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-571701 (P2003-571701)	(71) 出願人	503063593
(86) (22) 出願日	平成14年8月29日 (2002. 8. 29)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月21日 (2004. 4. 21)		ザ ユニバーシティ オブ イリノイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027584		アメリカ合衆国 6 1 8 0 1 イリノイ
(87) 国際公開番号	W02003/073062		アーバナ サウス ライト ストリート
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003. 9. 4)		5 0 6 アドミニストレーション ビルデ
(31) 優先権主張番号	60/315, 791		イング 3 5 2
(32) 優先日	平成13年8月29日 (2001. 8. 29)	(74) 代理人	100083806
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 三好 秀和
		(72) 発明者	ロニンソン、 イゴア ビィ.
			アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 9 1
			ウィルメッテ リンカン レーン 2 7
			3 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CDKインヒビターによって調節される遺伝子の発現を同定および調整するための薬剤および方法

(57) 【要約】

本発明は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターによって誘導される遺伝子のような、ウイルス感染、癌および加齢関連疾患に関与する遺伝子の誘導を阻害する化合物を同定するための方法および薬剤を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイクリン依存性キナーゼインヒビターによって誘導された、哺乳動物のウイルス遺伝子または細胞遺伝子からのプロモーターに動作可能に連結したレポーター遺伝子をコードしている組換え発現構築物。

【請求項 2】

前記レポーター遺伝子が、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼをコードしている、請求項 1 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 3】

前記プロモーターが、CDKインヒビターによって誘導される、ヒトのウイルス遺伝子または細胞遺伝子からのプロモーターである、請求項 1 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 4】

前記プロモーターが、表 I I または表 V にて同定される、ヒト遺伝子からのプロモーターである、請求項 3 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 5】

前記プロモーターが、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチビン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリン (配列番号 11)、p 6 6^{s h c} (配列番号 12)、カテプシン B (配列番号 14)、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、組織トランスグルタミナーゼ (t - T G a s e、配列番号 16)、クラステリン (配列番号 17)、プロスタサイクリン刺激因子 (配列番号 18)、血管内皮増殖因子 - C (配列番号 19)、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター (配列番号 20) に由来するプロモーター、1 つまたは多数のタンデムリピート NF κ B 認識配列を含むプロモーター、SV 40 早期プロモーター (配列番号 81)、ヒト免疫不全ウイルスプロモーター (配列番号 85) またはサイトメガロウイルス早期プロモーター (配列番号 82) である、請求項 2 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 6】

前記プロモーターが、ヒトナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、組織トランスグルタミナーゼ (配列番号 16)、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、プロサポシン (配列番号 7)、SV 40 早期プロモーター (配列番号 81)、ヒト免疫不全ウイルスプロモーター (配列番号 85) またはサイトメガロウイルス早期プロモーター (配列番号 82) である、請求項 4 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 7】

前記組換え発現構築物が、p L u N K 4 である、請求項 4 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 8】

請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 に記載の組換え発現構築物を含む、哺乳動物細胞。

【請求項 9】

A . T . C . C . 受け入れ番号第 P T A 3 3 8 1 号 (H T 1 0 8 0 L u N K 4 p 2 1) によって同定される、請求項 8 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 10】

前記組換え発現構築物の発現が、NF κ B によって調節される、請求項 8 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 11】

哺乳動物 CDK インヒビター遺伝子をコードしている第二組換え発現構築物をさらに含

10

20

30

40

50

む、請求項 8 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 2】

前記 C D K インヒビターの発現が、哺乳動物細胞内で実験的に誘導される、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 3】

哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子をコードしている前記組換え発現構築物が、誘導可能なプロモーターの転写制御下にあり、前記組換え発現構築物からの C D K インヒビターの発現が、前記組換え細胞を、前記誘導可能プロモーターからの転写を誘導する誘導薬剤と接触させることによって、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害する薬剤を除去することによって媒介される、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

10

【請求項 1 4】

前記哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子が、ヒト p 2 1 遺伝子またはその C D K 結合断片である、請求項 1 3 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 5】

前記哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子が、ヒト p 1 6 遺伝子またはその C D K 結合断片である、請求項 1 3 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 6】

前記哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子が、マウス p 2 7 またはヒト p 2 7 遺伝子またはその C D K 結合断片である、請求項 1 3 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 7】

細菌ラクトースリプレッサーをコードしている組換え発現構築物をさらに含み、その転写が、哺乳動物プロモーターによって制御され、哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子をコードしている前記組換え発現構築物が、ラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素を含み、C D K インヒビター遺伝子の転写が、前記ラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素によって制御され、そして、組換え発現構築物からの C D K インヒビター遺伝子の発現が、前記組換え細胞を、ラクトースリプレッサー特異的誘導薬剤と接触させることによって媒介される、請求項 1 3 に記載の哺乳動物細胞。

20

【請求項 1 8】

前記細胞がヒト H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞である、請求項 8 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 9】

前記細胞がヒト H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞である、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

30

【請求項 2 0】

前記細胞がヒト H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞である、請求項 1 7 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 1】

前記第二発現構築物が、L N p 2 1 C O 3 である、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 2】

A . T . C . C . 受け入れ番号第 P T A 1 6 6 4 号 (H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9) によって同定される、請求項 2 1 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 3】

前記第二発現構築物が、L N p 1 6 R O 2 である、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

40

【請求項 2 4】

A . T . C . C . 受け入れ番号第 P T A - 4 0 2 0 号 (H T 1 0 8 0 p 1 6 - 5) によって同定される、請求項 2 3 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 5】

前記第二発現構築物が、L N p 2 7 R O 2 である、請求項 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 6】

A . T . C . C . 受け入れ番号第 P T A - 4 0 2 1 号 (H T 1 0 8 0 p 2 7 - 2) によって同定される、請求項 2 5 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 7】

前記ラクトースリプレッサー特異的誘導薬剤が、 - ガラクトシドである、請求項 1 7

50

に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 28】

哺乳動物細胞内で、CDKインヒビターによって誘導される、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を阻害する化合物を同定する方法であって、以下の

(a) 化合物の存在下および不存在下で、哺乳動物細胞においてCDKインヒビターによって誘導されるウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現を誘導する条件下で、請求項8に記載の組換え哺乳動物細胞を培養すること、

(b) 化合物の存在下での、前記細胞内でのレポーター遺伝子発現を、化合物の不存在下での、前記細胞内でのレポーター遺伝子発現と比較すること、および

(c) 化合物の存在下において、化合物の不存在下よりも、レポーター遺伝子発現が低い場合に、CDKインヒビターによって誘導される遺伝子の誘導を阻害する化合物を同定

10

の段階を含む、方法。

【請求項 29】

前記細胞内でCDKインヒビターの発現を誘導する条件下で、前記細胞を培養する、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

前記CDKインヒビターが、p21、p27またはp16、またはそれらのCDK結合断片である、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞が、哺乳動物CDKインヒビター遺伝子をコードしている第二組換え発現構築物をさらに含む、請求項28に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記第二組換え発現構築物が、誘導可能プロモーターの転写制御下で、哺乳動物CDKインヒビター遺伝子を含み、前記組換え発現構築物からのCDKインヒビターの発現が、組換え細胞を、誘導可能プロモーターからの転写を誘導する誘導薬剤と接触させることによって、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害する薬剤を除去することによって、媒介される、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記哺乳動物CDKインヒビター遺伝子が、ヒトp21遺伝子またはそのCDK結合断片である、請求項32に記載の方法。

30

【請求項 34】

前記哺乳動物CDKインヒビター遺伝子が、ヒトp16遺伝子またはそのCDK結合断片である、請求項32に記載の方法。

【請求項 35】

前記哺乳動物CDKインヒビター遺伝子が、ヒトp27遺伝子またはそのCDK結合断片である、請求項32に記載の方法。

【請求項 36】

前記細胞がヒトHT1080線維肉腫細胞である、請求項32に記載の方法。

【請求項 37】

前記哺乳動物細胞が、細菌ラクトースリプレッサーをコードしている組換え発現構築物をさらに含む、その転写が、哺乳動物プロモーターによって制御され、哺乳動物CDKインヒビター遺伝子をコードしている前記組換え発現構築物が、ラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素を含み、CDKインヒビター遺伝子の転写が、前記ラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素によって制御され、そして、前記組換え発現構築物からのCDKインヒビター遺伝子の発現が、前記組換え細胞をラクトースリプレッサー特異的誘導薬剤と接触させることによって媒介される、請求項32に記載の方法。

40

【請求項 38】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害する化合物を同定するための方法であって、以下の

50

(a) 哺乳動物細胞内で、C D K インヒビターの発現を生成すること、
 (b) C D K インヒビターによって発現が媒介される細胞遺伝子の発現における変化に
 関して、化合物の存在下で、前記細胞をアッセイすること、
 (c) 段階 (b) の細胞遺伝子の発現が、化合物の存在下で、より少ない程度まで変化
 する場合に、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現の C D K インヒビター媒介調節のイ
 ンヒビターとして、化合物を同定すること、
 の段階を含む、方法。

【請求項 39】

前記 C D K インヒビターが、p 16、p 27 または p 21 である、請求項 38 に記載の
 方法。

10

【請求項 40】

前記哺乳動物細胞が、誘導可能異種プロモーターの転写制御下で、哺乳動物 C D K イン
 ヒビターをコードしている組換え発現構築物を含み、前記組換え発現構築物からの C D K
 インヒビターの発現が、誘導可能プロモーターからの転写を誘導する誘導薬剤と、前記組
 換え細胞を接触させることによって、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害
 する薬剤を除去することによって媒介される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記 C D K インヒビターが p 16 である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 C D K インヒビターが p 21 である、請求項 40 に記載の方法。

20

【請求項 43】

前記 C D K インヒビターが p 27 である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 44】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現が、p 21 によって誘導される、請求項 3
 8 に記載の方法。

【請求項 45】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現が、p 16 によって誘導される、請求項 3
 8 に記載の方法。

【請求項 46】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現が、p 27 によって誘導される、請求項 3
 8 に記載の方法。

30

【請求項 47】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子が、表 I I または表 V において同定される、請求
 項 38 に記載の方法。

【請求項 48】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子が、表 I I または表 V において同定される、請求
 項 40 に記載の方法。

【請求項 49】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現を、免疫学的薬剤を用いて検出する、請求
 項 38 に記載の方法。

40

【請求項 50】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現を、細胞遺伝子産物の活性に関するアッセ
 イによって検出する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 51】

前記ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現を、相補的核酸に対するハイブリッド形成
 によって検出する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 52】

哺乳動物細胞におけるウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現の C D K インヒビター媒
 介誘導を阻害する化合物を同定するための方法であって、以下の

(a) 化合物の存在下または不存在下で、前記哺乳動物細胞を薬剤で処理すること、ま

50

たは、老化を誘導する条件下にて、哺乳動物細胞を培養すること、

(b) C D K インヒビター遺伝子発現によって誘導される、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導に関して、前記哺乳動物細胞をアッセイすること、および

(c) C D K インヒビターによって誘導される遺伝子が、化合物の不存在下よりも、化合物の存在下において、より少ない程度に誘導される場合に、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現の C D K インヒビター媒介誘導のインヒビターとして、化合物を同定すること、

の段階を含む、方法。

【請求項 5 3】

前記 C D K インヒビターが、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である、請求項 5 2 に記載の方法。 10

【請求項 5 4】

前記遺伝子が、表 I I または表 V において同定される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記遺伝子の発現を、免疫学的薬剤を使用して検出する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記遺伝子の発現を、遺伝子産物の活性に関するアッセイによって検出する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記遺伝子の発現を、相補的核酸に対するハイブリッド形成によって検出する、請求項 5 2 に記載の方法。 20

【請求項 5 8】

哺乳動物細胞におけるウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現の C D K インヒビター媒介誘導を阻害する化合物を同定するための方法であって、以下の

(a) 化合物の存在下または不存在下で、哺乳動物細胞を薬剤で処理すること、または、老化を誘導する条件下にて、哺乳動物細胞を培養すること；ここで、前記細胞は、その発現が C D K インヒビターによって調節される、哺乳動物ウイルス遺伝子または細胞遺伝子に関するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を含む、

(b) 前記レポーター遺伝子の発現における変化に関して、前記細胞をアッセイすること、および 30

(c) 前記レポーター遺伝子の発現が、化合物の不存在下よりも、化合物の存在下において、より少ない程度に変化する場合に、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現の C D K インヒビター媒介誘導のインヒビターとして、化合物を同定すること、
の段階を含む、方法。

【請求項 5 9】

前記 C D K インヒビターが、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記哺乳動物遺伝子プロモーターが、表 I I または表 V において同定される哺乳動物遺伝子プロモーターである、請求項 5 8 に記載の方法。 40

【請求項 6 1】

前記細胞遺伝子の発現を、免疫学的薬剤を使用して検出する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記細胞遺伝子の発現を、細胞遺伝子産物の活性に関するアッセイによって検出する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記細胞遺伝子の発現を、相補的核酸に対するハイブリッド形成によって検出する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 4】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害するための方法であって、請求項28に記載の方法にしたがって生成した化合物と、前記細胞を接触させる段階を含む方法。

【請求項65】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害するための方法であって、請求項38に記載の方法にしたがって生成した化合物と、前記細胞を接触させる段階を含む方法。

【請求項66】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害するための方法であって、請求項52に記載の方法にしたがって生成した化合物と、前記細胞を接触させる段階を含む方法。

10

【請求項67】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害するための方法であって、請求項58に記載の方法にしたがって生成した化合物と、前記細胞を接触させる段階を含む方法。

【請求項68】

ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害するための方法であって、有効量の、NF B活性を阻害する化合物と、前記細胞を接触させる段階を含む方法。

【請求項69】

CDKインヒビター誘導遺伝子発現に伴う、動物における疾患を治療するための方法であって、有効量の、NF B活性を阻害する非ステロイド抗炎症薬(NSAID)を、前記動物に投与する段階を含む方法。

20

【請求項70】

前記疾患が、大腸癌以外の癌である、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記疾患が、腎不全である、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

前記疾患が、アルツハイマー病であり、NSAIDがアスピリンまたはサリチル酸塩以外である、請求項69に記載の方法。

30

【請求項73】

前記疾患がアテローム性動脈硬化症であり、NSAIDがアスピリン以外である、請求項69に記載の方法。

【請求項74】

前記疾患が関節炎であり、NSAIDがアスピリン、スリダクまたはサリチル酸塩以外である、請求項69に記載の方法。

【請求項75】

哺乳動物細胞において、老化の病因結果と関連した、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子を阻害する化合物であって、以下の、

(a) 前記化合物の存在下において、薬剤で前記哺乳動物細胞を処理すること、または、老化を誘導する条件下で、哺乳動物細胞を培養すること、

40

(b) CDKインヒビター遺伝子発現によって誘導される、細胞遺伝子の誘導に関して、前記哺乳動物細胞をアッセイすること、および

(c) CDKインヒビターによって誘導される遺伝子が、化合物の存在下において、より少ない程度に誘導される場合に、老化のインヒビターとして、化合物を同定すること、の段階を含む方法によって生成される、化合物。

【請求項76】

前記CDKインヒビターが、p21、p16またはp27である、請求項69に記載の化合物。

【請求項77】

50

哺乳動物細胞における、CDKインヒビターによって誘導される、ウイルス遺伝子産物または細胞遺伝子産物の生成を阻害する化合物であって、以下の

(a) 化合物の存在下で、薬剤にて前記哺乳動物細胞を処理すること、または、CDKインヒビターの発現を誘導する条件下で、前記哺乳動物細胞を培養すること、

(b) CDKインヒビター遺伝子発現によって誘導される、ウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導に関して、前記哺乳動物細胞をアッセイすること、および

(c) CDKインヒビターによって誘導される遺伝子が、化合物の存在下において、より少ない程度に誘導される場合に、CDKインヒビター誘導のインヒビターとして、化合物を同定すること、

の段階を含む方法によって生成される、化合物。

10

【請求項78】

前記CDKインヒビターが、p21、p27またはp16である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

哺乳動物細胞における、抗アポトーシス因子またはマイトジェン因子の生成を阻害するための方法であって、細胞を、CDKインヒビターによる遺伝子発現の誘導を阻害する化合物と接触させる段階を含む、方法。

【請求項80】

前記哺乳動物細胞が、間質繊維芽細胞である、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記化合物が、NF- κ Bインヒビターまたはp300/CIPBインヒビターである、請求項79に記載の方法。

20

【請求項82】

CDKインヒビター誘導遺伝子発現に伴う疾患の効果を予防する、または改善するために、動物を処置するための方法であって、治療的に有効な用量の、請求項28、38、52または58に記載の方法にしたがって同定した化合物の薬剤の組成物を、それを必要とする動物に投与する段階を含む方法。

【請求項83】

哺乳動物細胞において、CDKインヒビターによって誘導された遺伝子の発現を阻害または予防するための方法であって、前記哺乳動物細胞を、CDKインヒビターによって誘導された遺伝子の発現を阻害または予防するために効果的な、請求項28、38、52または58に記載の方法にしたがって同定した、ある一定量の化合物と接触させる段階を含む方法。

30

【請求項84】

動物において、CDKインヒビターによって誘導された遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、NF- κ Bインヒビターを、そのような処置を必要としている動物に投与することを含む方法。

【請求項85】

前記NF- κ Bインヒビターが、非ステロイド抗炎症化合物である、請求項84に記載の方法。

40

【請求項86】

前記動物がヒトである、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項28に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

【請求項88】

前記動物がヒトである、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝

50

子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 38 に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

【請求項 90】

前記動物がヒトである、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 52 に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

【請求項 92】

前記動物がヒトである、請求項 91 に記載の方法。

10

【請求項 93】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 58 に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

【請求項 94】

前記動物がヒトである、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 75 に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

20

【請求項 96】

前記動物がヒトである、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 28、38、52または58に記載の方法によって生成される化合物を投与することを含む方法。

【請求項 98】

前記動物がヒトである、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

動物において、CDKインヒビターによって誘導されたウイルス遺伝子または細胞遺伝子の誘導を選択的に阻害するための方法であって、動物に、請求項 77 に記載の化合物を投与することを含む方法。

30

【請求項 100】

前記動物がヒトである、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

動物における、ウイルス感染を処置するための方法であって、動物に、治療的に有効な量の、請求項 77 に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 102】

前記動物がヒトである、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 103】

動物における、ウイルス感染を処置するための方法であって、動物に、治療的に有効な量の、請求項 28、38、52または58に記載の化合物を投与することを含む方法。

40

【請求項 104】

前記動物がヒトである、請求項 100 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本願は、2001年8月29日に出願された、米国仮出願番号第60/315、791号を基礎とする優先権を主張する。

50

【0002】

本願は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) からの補助金、第 R01 CA89636 号および第 R01 AG17921 号によってサポートされている。政府は本発明において一定の権利をもちうる。

【0003】

1. 発明の技術分野

本発明は、細胞老化およびストレス応答、ならびに、老化およびストレス応答を伴う細胞遺伝子の発現の変化に関する。特に、本発明は、その発現が、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターと呼ばれる一種の細胞遺伝子産物によって調整され、老化の開始において、および異なる形のストレスに応答して細胞中で誘導される、遺伝子の同定に関する。さらに具体的に言えば、本発明は、その発現がそのような CDK インヒビターによって誘導される遺伝子である、細胞老化およびストレス応答のマーカーを提供する。本発明は、そのような化合物の存在下で、CDK インヒビターによるこれらのマーカー遺伝子の誘導の阻害を検出することによって、細胞老化およびストレス応答の病因結果を阻害する化合物を同定するための方法を提供する。また、実験的に誘導可能な p21、p16 または p27 のような、異なる細胞の CDK インヒビターをコードする組換え発現構築物を含む組換え哺乳動物細胞、および、その発現が内因性または外因性の、実験的に誘導可能な CDK インヒビターによって誘導される遺伝子に対するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を発現する組換え発現構築物を含む組換え哺乳動物細胞である、薬剤が提供される。

10

20

【0004】

2. 関連技術の要約

細胞周期進行は、サイクリン依存性キナーゼ (CDKs) として知られている、一組のセリン/トレオニンキナーゼによって、大部分制御されている。CDK インヒビターとして知られる、特定のタンパク質群は、CDK と相互作用して CDK を阻害し、したがって、種々の生理学的状況において細胞周期停止を引き起こす (Sielecki ら、2000、J. Med. Chem. 43: 1~18 およびその参考文献を参照)。CDK インヒビターには 2 つのファミリーが存在する。Cip/Kip として知られる第一のものには、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}、p27^{Kip1} および p57^{Kip2} が含まれる。第二のファミリー、Ink4 には、p16^{Ink4A}、p15^{Ink4B}、p18^{Ink4C}、および p19^{Ink4D} が含まれる。特定の CDK インヒビターの発現は、異なる因子によって活性化される。たとえば、接触阻害は、p27 および p16 の発現を誘導し (Dietrich ら、1997、Oncogene 15: 2743~2747)、TGF のような細胞外抗マイトジェン因子は p15 の発現を誘導し (Reynisdottir ら、1995、Genes Dev. 9: 1831~1845)、血清飢餓は p27 の発現を誘導し (Polyak ら、1994、Genes Dev. 8: 9~22)、UV 放射は p16 の発現を誘導する (Wang ら、1996、Cancer Res. 56: 2510~2514)。さらに、上記の処置のすべて、ならびに異なる形の DNA 損傷は、もっとも多面発現性の公知の CDK インヒビターである p21 の発現を誘導する (Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471: M43-M56)。

30

40

【0005】

本発明の分野で特に重要なのは、2 つの CDK インヒビター、p21 と p16 が、哺乳動物細胞における老化の過程に密接に関連していることである。複製老化の開始 (Alcorta ら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13742~13747) および損傷により誘導される促進老化 (Robles & Adamis、1998、Oncogene 16: 1113~1123) において、p21 の誘導は結果として細胞増殖停止となる。p21 の発現のこの急増は一過性であるが、しかし、

50

p 1 6 の安定的な活性化が次に続き、これは、老化細胞における増殖停止の維持の原因となると考えられている。p 2 1 のロックアウト (Brownら、1997、Science 277:831~834) または p 1 6 のロックアウト (Serranoら、1996、Cell 85:27~37) は、老化の開始を遅らせるか、または防止する。さらに、p 2 1 または p 1 6 いずれかの異所性過剰発現は、正常細胞および腫瘍細胞の両方における老化の表現型マーカーが伴う増殖停止を誘導する (Vogtら、1998、Cell Growth Differ. 9:139~146; McConnellら、1998、Curr. Biol. 8:351~354; Fangら、1999、Oncogene 18:2789~2797)。

【0006】

p 2 1 は、CDK に結合し、阻害するタンパク質として (Harperら、1993、Cell 75:805~816)、野生型 p 5 3 によってアップレギュレートされる遺伝子として (el-Deiryら、1993、Cancer Res. 55:2910~2919)、および、老化繊維芽細胞において過剰発現した増殖阻害遺伝子として (Nodaら、1994、Exp. Cell Res. 211:90~98)、本技術分野で独立して同定されてきた。p 5 3 調節増殖停止におけるその重要な役割のために、p 2 1 は通常、腫瘍サプレッサーと考えられている。それにも関わらず、ヒト癌における p 2 1 変異はまれであり (Hall & Peters、1996、Adv. Cancer Res. 68:67~108)、p 2 1 ロックアウトマウスは正常に発育し、腫瘍化の速度の増加は示されていない (Dengら、1995、Cell 82:675~684)。

【0007】

p 2 1 の細胞レベルは、DNA 損傷剤および分化剤を含む、種々の刺激に対する応答で増加する。これらの応答のいくつかは、p 5 3 による p 2 1 遺伝子の転写活性化を介して媒介されるが、しかし p 2 1 はまた、種々の p 5 3 非依存性因子によって調節される (Gartel & Tyner、1999、Exp. Cell Res. 227:171~181にて概説されている)。

【0008】

p 2 1 の一過性誘導は、DNA 損傷または発癌性 RAS 導入 (Serranoら、1997、Cell 88:593~602) によって、正常な繊維芽細胞 (DiLeonardoら、1994、Genes Develop. 8:2540~2551; Robles & Adami、1998、Oncogene 16:1113~1123) および腫瘍細胞 (Changら、1999、Cancer Res. 59:3761~3767) で誘導される、細胞の DNA 損傷の修復を可能にする一過性停止、ならびに永続的増殖停止 (また「促進老化 (accelerated senescence)」とも呼ばれる) を含む、異なる型の損傷誘導増殖停止を媒介する。p 2 1 発現の急増はまた、加齢繊維芽細胞の複製老化 (Nodaら、1994、上記; Alcortaraら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13742~13747; Steinら、1999、Mol. Cell Biol. 19:2109~2117) および有糸分裂後細胞の末端分化 (el-Deiryら、1995、上記; Gartelら、1996、Exp. Cell Res. 246:280~289) の間の末端増殖停止の開始と同時に起こる。

【0009】

p 2 1 は転写因子それ自身でない一方で、その細胞の機能において役割を果たしうる細胞性遺伝子発現における間接的な効果を有する (Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471:M43-M56 およびその参考文献)。p 2 1 による CDK 阻害の結果の一つは、Rb の脱リン酸化であり、これはついで、DNA 複製および細胞周期進行に参与する多くの遺伝子を調節する E 2 F 転写因子を阻害する (Neivins、1998、Cell Growth Differ. 9:585~593)。p 2 1 - 発現細胞 (p 2 1 + / +) および p 2 1 - 非発現細胞 (p 2 1 - / -) の比較により、細胞周期進行に参与するいくつかの遺伝子の放射線誘発阻害における p 2 1 が示唆された (de

10

20

30

40

50

Toledoら、1998、Cell Growth Differ. 9:887~896)。p21の他の効果は、転写補助因子ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300の刺激であり、これは、NF Bを含む多くの誘導可能な転写因子を増強する(Perkinsら、1988、Science 275:523~527)。p300の活性化は、遺伝子発現において、多面発現性の効果を持ちうる(Snowden & Perkins、1988、Biochem. Pharmacol. 55:1947~1954)。p21はまた、JNKキナーゼ、アポトーシスシグナル調節キナーゼ1、Mycなどのような、CDK以外の多くの転写調節因子および調節補助因子と相互作用することを介して、遺伝子発現に影響を与えうる(Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471:M43-M56)。これらの相互作用は、相当する経路によって調節される遺伝子の発現に影響を与えうる。

【0010】

本発明に特に関連した他のCDKインヒビターは、p16^{INK4A}であり、ヒトタンパク質はSerranoら(1993、Nature 366:704~707)によって記述された。以上で言及したように、p16は、哺乳動物細胞における老化の重要な調節因子である。また、真の腫瘍抑制剤であり、ヒトの癌において、もっとも一般的に変異される遺伝子の一つである(Hall & Peters、1996、Adv. Cancer Res. 68:67~108)。p16は、直接CDK4およびCDK6を阻害することが知られており、またCDK2を間接的に阻害しうる(McConnellら、1999、Molec. Cell. Biol. 19:1981~1989)。

【0011】

本発明に特に関連したさらに別のCDKインヒビターは、p27^{Kip1}である。p27は最初に、接触阻害、TGF- またはロバスタチンによって増殖停止された細胞における、CDK2のインヒビターとして同定された(Hengstlerら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5291~5295; Polyakら、1994、Cell 78:59~66)。p27はまた、分化、血清飢餓、懸濁液中での増殖、および他の因子に対する応答における細胞増殖停止を媒介する。正常の組織と比べて、ヒト癌においては、p27発現のレベルがしばしば変化する(減少および増加の両方)(Philipp-Staheliら、2001、Esp. Cell Res. 264:148~161にて概説されている)。p27はまた、老化を導く経路の一つにおいて、腫瘍抑制剤PTENと共同で働くと提案されてきた(Bringold and Serrano、2000、Exp. Gerontol. 35:317~329)。

【0012】

その発現が、p21、p16またはp27のようなCDKインヒビターの誘導によって調節される遺伝子を同定する必要性が、本技術分野で残っている。また、細胞老化、発癌、ウイルス疾患および加齢関連疾患における化合物の効果を評価するための標的を開発する必要性も、本技術分野で存在している。

【0013】

本発明の概要

本発明は、その発現がCDKインヒビター遺伝子発現の誘導によって調節される遺伝子を同定するための薬剤および方法を提供する。本発明はまた、発癌、ウイルス疾患および加齢関連疾患のような、細胞老化およびストレス応答の病因結果を予防するための合理的な薬物デザインの第一段階として、細胞の遺伝子発現においてp21、p27およびp16のようなCDKインヒビターの効果を阻害する化合物を同定するための薬剤および方法を提供する。

【0014】

第一の観点において、本発明は、誘導可能なCDKインヒビター遺伝子を含む哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、CDKインヒビター遺伝子は、p21、p16またはp27をコードしている。好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、誘導

10

20

30

40

50

可能な p 2 1 遺伝子または誘導可能な p 1 6 遺伝子、または誘導可能な p 2 7 遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む、組換え哺乳動物細胞である。より好ましくは、構築物は、誘導可能なプロモーターの転写制御下で、p 2 1、もっとも好ましくはヒト p 2 1 をコードしているヌクレオチド配列を含む。他の実施形態において、前記構築物は、C D K 結合ドメインを含む、より好ましくは p 2 1 アミノ酸配列のアミノ酸 1 ~ 7 8 を含む、p 2 1 のアミノ末端部分をコードしているヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態において、構築物は、誘導可能なプロモーターの転写制御下で、p 1 6、もっとも好ましくはヒト p 1 6 をコードしているヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、構築物は、誘導可能なプロモーターの転写制御下で、p 2 7、好ましくはヒト p 2 7 またはマウス p 2 7 をコードしているヌクレオチド配列を含む。好ましい実施形態において、その
10
ような各構築物における誘導可能なプロモーターは、前記細胞を、誘導薬剤、もっとも好ましくは、誘導可能なプロモーターからの転写を誘導する、生理学的に中性な誘導薬剤と接触させることによって、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害する薬剤を除去することによって、誘導可能である。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態において、細胞は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっともこの好ましくは、ヒト HT 1 0 8 0 繊維肉腫細胞株およびその誘导体である。

【0015】

本発明の第一の観点の他の実施形態において、レポーター遺伝子が、その発現が C D K インヒビター、もっとも好ましくは p 2 1、p 1 6 または p 2 7 によって調節される、細胞
20
遺伝子に由来するプロモーターの転写制御下にある、組換え発現構築物を含む、組換え哺乳動物細胞が提供される。好ましい実施形態において、プロモーターは、その発現が、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 のような C D K インヒビターによって誘導される、細胞遺伝子に由来する。これらの実施形態において、プロモーターは、もっとも好ましくは、表 I および表 V にて同定された遺伝子に由来するが、しかし、当業者は、その発現が C D K インヒビター遺伝子発現によって誘導される任意の遺伝子に由来するプロモーターが、そのような構築物中で有利に使用されうることを認識するであろう。もっとも好ましくは、
30
プロモーターは、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチピン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、
30
Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリン (配列番号 11)、p 6 6^{shc} (配列番号 12)、カテプシン B (配列番号 14)、
- アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、組織トランスグルタミナーゼ (t - T G a s e、配列番号 16)、クラステリン (配列番号 17)、プロスタサイクリン刺激因子 (配列番号 18)、
血管内皮増殖因子 - C (配列番号 19)、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター (配列番号 20)、1 つ (配列番号 79) または多数のタンデムリピート N F B 認識
40
配列を含むプロモーター (5 倍のタンデムリピート N F B 認識配列を含むプロモーターは配列番号 78 にて列記されている)、S V 4 0 早期プロモーター (配列番号 81)、または C M V 早期遺伝子プロモーター (配列番号 82) に由来する。本発明の組換え発現構築物を含む好ましいレポーター遺伝子には、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼが含まれる。

【0016】

さらに好ましい実施形態において、本発明は、その発現が、C D K インヒビター、もっとも好ましくは p 2 1、p 1 6 または p 2 7 によって調整される、哺乳動物遺伝子に対するプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードしている第一組換え発現構築物、および、哺乳動物 C D K インヒビター遺伝子をコードしている第二組換え発現構築物を含む、哺乳動物細胞を提供し、ここで、C D K インヒビターの発現は、それによって哺乳動物細胞にて実験的に誘導される。好ましい実施形態において、C D K インヒビター遺伝
50

子は、p 2 1、p 1 6またはp 2 7である。好ましい実施形態において、哺乳動物CDKインヒビター遺伝子をコードしている組換え発現構築物は、誘導可能な異種プロモーターの転写制御下にあり、ここで前記組換え発現構築物からの前記CDKインヒビターの発現は、前記組換え細胞を、誘導可能なプロモーターからの転写を誘導する誘導薬剤と接触させること、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害する薬剤を除去することで媒介される。好ましくは、構築物は、p 2 1、もっとも好ましくはヒトp 2 1をコードしているヌクレオチド配列を含む。他の実施形態において、構築物は、CDK結合ドメインを含む、より好ましくはp 2 1アミノ酸配列のアミノ酸1~78を含む、p 2 1のアミノ末端部分をコードしているヌクレオチド配列を含む。他の好ましい実施形態において、前記構築物は、p 1 6、もっとも好ましくはヒトp 1 6をコードしているヌクレオチド配列を含む。他の好ましい実施形態において、前記構築物は、p 2 7、好ましくはヒトp 2 7またはマウスp 2 7をコードしているヌクレオチド配列を含む。レポーター遺伝子をコードしている前記第二組換え発現構築物の好ましい実施形態において、プロモーターは、その発現がp 2 1、p 1 6またはp 2 7のようなCDKインヒビターによって誘導される、細胞遺伝子に由来する。これらの実施形態において、プロモーターは、もっとも好ましくは、表IIまたは表Vにて同定された遺伝子、または、1つ(配列番号79)または多数のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーター(たとえば、5倍のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーターは配列番号78のように列記される)、SV40早期プロモーター(配列番号81)、CMV早期遺伝子プロモーター(配列番号82)を含むプロモーターに由来する。本発明の前記第二組換え発現構築物を含む好ましいレポーター遺伝子には、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼが含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくはヒトHT1080繊維肉腫細胞株およびその誘導體である。前記レポーター遺伝子またはCDKインヒビターによって誘導される内因性遺伝子の産物は、好ましくは、免疫学的薬剤を用いて、遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、または相補的核酸に対するハイブリッド形成によって、検出する。

10

20

【0017】

第二の観点において、本発明は、哺乳動物内でのマイトジェンまたは抗アポトーシス因子の、CDKインヒビター誘導発現を阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供する。好ましい実施形態において、前記方法には、化合物の存在下または不存在下で、細胞内において、CDKインヒビター、もっとも好ましくはp 2 1、p 1 6またはp 2 7の発現を誘導すること、および、ならし培地(conditioned media)中で、1つのマイトジェンまたは抗アポトーシス化合物または多数のそれらのものの発現を比較すること、の段階が含まれる。CDKインヒビター効果のインヒビターは、ならし培地中で、化合物の存在下において、化合物の不存在下においてより少ない量のマイトジェンまたは抗アポトーシス化合物または多数のそれらのものを有することにより、同定される。本発明のこの観点で提供される方法において、任意のCDKインヒビター発現細胞が有用であり、もっとも好ましくは、p 2 1、p 1 6またはp 2 7を発現している細胞が有用であり、そのような細胞でのp 2 1、p 1 6またはp 2 7の発現は、内因性p 2 1、p 1 6またはp 2 7を誘導することによって、または、本発明にしたがってp 2 1、p 1 6またはp 2 7をコードしている誘導可能な発現構築物を含む細胞を使用することによって、実施可能である。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくはヒトHT1080繊維肉腫細胞株およびその誘導體である。マイトジェンまたは抗アポトーシス化合物発現は、免疫学的薬剤を用いて、遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、または相補的核酸に対するハイブリッド形成によって検出する。

30

40

【0018】

50

他の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞における、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子のCDKインヒビター誘導発現を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、ここで、細胞は、p 21、p 16またはp 27のようなCDKインヒビターによって誘導される、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子をコードしている細胞遺伝子のプロモーターの転写調節下で、レポーター遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む。好ましい実施形態において、プロモーターには、結合組織増殖因子（CTGF、配列番号3）、アクチビンA（配列番号5）、グラニューリン/エピセリン（配列番号11）、ガレクチン-3（配列番号9）、プロサポシン（配列番号7）、クラスチリン（配列番号17）、プロスタサイクリン刺激因子（配列番号18）、血管内皮増殖因子-C（配列番号19）、およびメタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター（配列番号20）のプロモーター、1つ（配列番号79）または多数のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーター（5倍のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーターは配列番号78にて列記されている）、SV40早期プロモーター（配列番号81）、またはCMV早期遺伝子プロモーター（配列番号82）が含まれる。好ましいレポーター遺伝子には、限定はしないが、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が含まれる。これらの実施形態において、レポーター遺伝子発現のCDKインヒビター媒介誘導の阻害は、CDKインヒビター発現細胞における、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子の誘導を阻害する化合物を同定するために使用される。

10

【0019】

この観点において、本発明はまた、哺乳動物細胞内での、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子または化合物の生成を阻害するための方法も提供し、本方法は、前記細胞を、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子の生成を阻害する化合物と接触させる段階を含み、ここで前記化合物は、本発明のこの観点における前述の方法によって同定する。好ましい実施形態において、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子の生成が阻害される阻害化合物と接触させた前記哺乳動物細胞は、繊維芽細胞、もっとも好ましくは間質繊維芽細胞である。好ましい実施形態において、前記化合物は、核因子カッパ-B（NF B）活性または発現のインヒビターである。

20

【0020】

第三の観点において、本発明は、細胞またはウイルス遺伝子発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害する化合物を同定するための方法を提供する。これらの方法には、哺乳動物細胞におけるCDKインヒビター遺伝子の発現を誘導することまたは生ずること、その発現がCDKインヒビターによって誘導される細胞遺伝子の発現における変化に関して、化合物の存在下で細胞をアッセイすること、および、細胞遺伝子の発現が、化合物の不存在下よりも化合物の存在下で、より低い程度に変化する場合に、細胞遺伝子発現のCDKインヒビター媒介誘導を阻害する化合物を同定すること、の段階が含まれる。好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p 21、p 16またはp 27である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子は、CDKインヒビターによって誘導され、細胞遺伝子発現のこの誘導を阻害する化合物は、CDKインヒビターが化合物の不存在下で発現する場合に検出されるものよりも低いレベルで、遺伝子発現を検出することによって、検出される。本発明の方法のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p 21、p 16またはp 27である。好ましい実施形態において、遺伝子は、表IIにて同定される。さらに他の実施形態において、方法は、その発現がCDKインヒビターによって誘導される遺伝子に由来するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を使用することで、実施される。CDKインヒビターによって誘導される遺伝子に由来するプロモーターを含む構築物を使用する場合、前記レポーター遺伝子産物は、前記化合物がCDKインヒビター媒介遺伝子発現調節を阻害するかまたは干渉する時に、その化合物の不存在下よりも存在する場合に、より低いレベルで生成される。本方法のこの観点の好ましい実施形態において、前記CDKインヒビターは、p 21、p 16またはp 27である。これらの実施形態において、前記プロモーターは、もっとも好ましく

30

40

50

は、表 I I および表 V において同定された遺伝子に由来する。もっとも好ましくは、前記プロモーターは、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチビン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリン (配列番号 11)、p 6 6^{shc} (配列番号 12)、カテプシン B (配列番号 14)、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、組織トランスグルタミナーゼ (t-TGase、配列番号 16)、クラスチリン (配列番号 17)、プロスタサイクリン刺激因子 (配列番号 18)、血管内皮増殖因子 - C (配列番号 19)、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター (配列番号 20)、1 つ (配列番号 79) または多数のタンデムリピート NF κ B 認識配列を含むプロモーター (5 倍のタンデムリピート NF κ B 認識配列を含むプロモーターは配列番号 78 にて列記されている)、SV 40 早期プロモーター (配列番号 81)、または CMV 早期遺伝子プロモーター (配列番号 82) に由来する。本発明の組換え発現構築物を含む好ましいレポーター遺伝子には、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼが含まれる。他の好ましい実施形態において、細胞は、その発現が CDK インヒビターによって誘導される哺乳動物遺伝子に対するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードしている第一組換え発現構築物、および、哺乳動物 CDK インヒビター遺伝子をコードしている第二組換え発現構築物を含み、ここで、CDK インヒビターの発現は、それによって哺乳動物細胞内で実験的に誘導される。レポーター遺伝子または CDK インヒビターによって誘導される内因性遺伝子の産物は、免疫学的薬剤を使用して、遺伝子産物の活性をアッセイすることによって、または、相補的な核酸に対するハイブリッド形成によって、好ましくは検出される。

【 0 0 2 1 】

第四の観点において、本発明は、哺乳動物細胞における老化の病因結果を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、そこで、そのような病因結果が、CDK インヒビターによって誘導される遺伝子の発現によって少なくとも部分的に媒介される。これらの方法には、化合物の存在下において哺乳動物を薬剤で処理すること、または、CDK インヒビター遺伝子発現を誘導する条件下で、前記哺乳動物細胞を培養すること、CDK インヒビターによって誘導される遺伝子の誘導に関して、哺乳動物細胞をアッセイすること、および、CDK インヒビターによって誘導される遺伝子の発現が、前記化合物の不存在下より存在下で、より少ない程度まで誘導される場合に、老化または老化の病因結果のインヒビターとして、化合物を同定すること、の段階が含まれる。本発明の方法のこの観点の好ましい実施形態において、CDK インヒビターは、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である。好ましい実施形態において、遺伝子は、表 I I および表 V にて同定される。さらに他の実施形態において、前記方法は、その発現が CDK インヒビターによって調整される遺伝子に由来するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を用いて、実施される。これらの実施形態において、CDK インヒビターによって誘導される遺伝子に由来するプロモーターを含む構築物を用いた、化合物の不存在下より存在下で、より少ないレベルでの、前記レポーター遺伝子の産物の生成は、化合物が細胞老化の病因結果のインヒビターである場合に、検出される。本発明方法のこの観点の好ましい実施形態において、前記 CDK インヒビターは、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である。前記プロモーターは、好ましくは、表 I I および表 V において同定された遺伝子に由来する。もっとも好ましくは、前記プロモーターは、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチビン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリ

ン（配列番号11）、p66^{shc}（配列番号12）、カテプシンB（配列番号14）、
- アミロイド前駆体タンパク質（配列番号15）、組織トランスグルタミナーゼ（t -
T G a s e、配列番号16）、クラステリン（配列番号17）、プロスタサイクリン刺激
因子（配列番号18）、血管内皮増殖因子 - C（配列番号19）、メタロプロテイナーゼ
- 1の組織インヒビター（配列番号20）、1つ（配列番号79）または多数のタンデム
リピートNF B認識配列を含むプロモーター（5倍のタンデムリピートNF B認識配
列を含むプロモーターは配列番号78にて列記されている）、SV40早期プロモーター
（配列番号81）、またはCMV早期遺伝子プロモーター（配列番号82）に由来する。
他の好ましい実施形態において、細胞は、その発現がCDKインヒビターによって誘導さ
れる哺乳動物遺伝子に対するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードし
ている第一組換え発現構築物、および、哺乳動物CDKインヒビター遺伝子をコードして
いる第二組換え発現構築物を含み、ここで、CDKインヒビターの発現は、それによって
哺乳動物細胞内で実験的に誘導される。本発明方法のこの観点の好ましい実施形態にお
いて、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。とりわけ好ましい実施
形態は、繊維肉腫細胞であり、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくはヒ
トHT1080繊維肉腫細胞株およびその誘导体である。レポーター遺伝子またはCDK
インヒビターによって誘導される内因性遺伝子の産物は、免疫学的薬剤を使用して、遺伝
子産物の活性をアッセイすることによって、または、相補的な核酸に対するハイブリッド
形成によって、好ましくは検出される。

10

【0022】

第五の観点において、本発明は、CDKインヒビターによるウイルス遺伝子発現誘導を
阻害するため、または防止するための方法を提供する。好ましい実施形態において、本方
法には、細胞、好ましくはウイルスに感染した細胞（急性または潜在性いずれか）、また
はウイルス感染のリスクを持つ細胞を、CDKインヒビターによるウイルス遺伝子発現誘
導を阻害または防止する化合物を同定するための本発明方法によって同定した化合物と、
接触させる段階が含まれる。好ましい実施形態において、有効量の化合物は、医薬適合性
の担体または他の薬剤を用いて薬剤の組成物内に処方され、動物、もっとも好ましくは、
CDKインヒビター誘導遺伝子発現によって引き起こされるウイルス疾患を患っている動
物に投与される。好ましい実施形態において、疾患は、サイトメガロウイルス（CMV）
、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびシミアンウイルス40（SV40）による感
染である。

20

30

【0023】

第六の観点において、本発明は、抗ウイルス化合物、およびウイルス遺伝子のp21誘
導発現を阻害する抗ウイルス化合物を同定するための方法を提供する。好ましい実施形態
において、抗ウイルス化合物は、サイトメガロウイルス（CMV）、ヒト免疫不全ウイル
ス（HIV）、およびシミアンウイルス40（SV40）を含むが、これらに限定されな
い、ウイルスに対して効果的である。

【0024】

第七の観点において、本発明は、発癌または加齢関連疾患のような、細胞老化の病因結
果を阻害するための方法を提供し、本方法は、本発明の先に言及した観点において提供さ
れた方法を用いて決定されたように、老化または老化の病因結果を阻害する化合物と、細
胞とを接触させる段階を含む。

40

【0025】

第八の観点において、本発明は、本明細書で開示したような本発明の任意の方法を用い
て同定される化合物を提供する。

【0026】

第九の観点において、本発明は、CDKインヒビターによる遺伝子発現誘導を阻害する
ため、または防止するための方法を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、C
D K イ ン ヒ ビ タ ー に よ る 遺 伝 子 発 現 誘 導 を 阻 害 ま た は 防 止 す る 化 合 物 を 同 定 す る た め の 本
発明の方法によって同定された化合物と、細胞とを接触させる段階を含む。好ましい実施

50

形態において、有効量の化合物は、医薬適合性の担体または他の薬剤を用いて、薬剤の組成物内に処方され、動物、もっとも好ましくは、CDKインヒビター誘導遺伝子発現によって引き起こされる疾患を患っている動物に投与される。好ましい実施形態において、疾患は、癌、アルツハイマー病、腎臓疾患、関節炎またはアテローム性動脈硬化症である。好ましい実施形態において、本発明は、NF Bインヒビターである化合物を使用する。

【0027】

本発明の特に好ましい実施形態は、特定の好ましい実施形態の以下のより詳細な記述、および請求項より明らかになるであろう。

【0028】

10

好ましい実施形態についての詳細な説明

本発明は、老化およびストレス応答のCDKインヒビター誘導病因結果を媒介することに関与する遺伝子を同定するための薬剤および方法を提供し、哺乳動物細胞における老化およびストレス応答の病因結果を阻害可能な化合物を提供する。とりわけ、CDKインヒビターp21、p27またはp16によって誘導される遺伝子を同定するためのそのような薬剤および方法の実施形態が提供される。

【0029】

本発明の目的に関して、語句「CDKインヒビター(CDK inhibitor)」は、サイクリン依存性キナーゼ阻害の生化学的活性を持つ、哺乳動物遺伝子のファミリーのメンバーを含むことが意図される。この定義に明らかに含まれるものは、CDKインヒビターp15、p14、p18であり、とりわけp21、p16またはp27であり、後者3つは、本発明の薬剤および方法のとりわけ好ましい実施形態である。

20

【0030】

本発明の目的に関して、「細胞(cell)」または「細胞群(cells)」との記述は、同等であることが意図され、とりわけ、本技術分野で知られているように増殖および維持される哺乳動物細胞のインビトロ培養物が含まれる。

【0031】

本発明の目的に関して、複数形での「細胞遺伝子(cellular genes)」の表記は、単一の遺伝子ならびに2つまたはそれ以上の遺伝子を含むことが意図される。細胞遺伝子発現、または細胞遺伝子に由来するプロモーターの転写制御下でのレポーター構築物の調節効果が、第一遺伝子内で検出可能であり、ついで、その効果が、第二または任意の数の追加的遺伝子またはレポーター遺伝子構築物を試験することによって反復されることが、当業者によって理解されるであろう。あるいは、2つまたはそれ以上の遺伝子またはレポーター遺伝子構築物の発現が、本発明の範囲内で同時にアッセイ可能である。

30

【0032】

本発明の目的のために、複数形での「ウイルス遺伝子(viral genes)」の表記は、単一の遺伝子ならびに2つまたはそれ以上の遺伝子を含むことが意図される。ウイルス遺伝子発現、またはウイルス遺伝子に由来するプロモーターの転写制御下でのレポーター構築物の調節効果が、第一遺伝子内で検出可能であり、ついで、その効果が、第二または任意の数の追加的遺伝子またはレポーター遺伝子構築物を試験することによって反復されることが、当業者によって理解されるであろう。あるいは、2つまたはそれ以上の遺伝子またはレポーター遺伝子構築物の発現が、本発明の範囲内で同時にアッセイ可能である。

40

【0033】

本明細書で使用するところの語句「ならし培地(conditioned media)」は、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子を含む、CDKインヒビター発現細胞の増殖によって条件付けられる、細胞培養培地を含むことが意図される。ならし培地は、CDKインヒビター発現細胞を、哺乳動物細胞培養培地中で培養することによって、好ましい実施形態で生成され、もっとも好ましくは、血清添加物を含まない合成培地である。任

50

意のCDKインヒビター発現細胞が、前記ならし培地の生成のために有用であり、そのような細胞内でのCDKインヒビター発現は、(たとえば、DNA損傷薬剤による処理、電離放射線または紫外線放射または接触阻害によって)内因性CDKインヒビターを誘導することで実施可能であり、または、本発明にしたがった誘導可能なCDKインヒビター発現構築物を含む細胞を使用し、生理学的に中性な誘導薬剤中で細胞を培養することによって実施可能である。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、および、もっとも好ましくはヒトHT1080繊維肉腫細胞株およびその誘導體である。

10

【0034】

本発明の目的に関して、語句「老化」は、正常細胞の増殖の寿命の最後で起こるか、または、細胞毒性薬剤、DNA障害または他の細胞損傷に対する応答にて、正常細胞または腫瘍細胞で起こるような、DNA複製の永久停止および増殖因子による非可逆的細胞増殖が含まれると理解されるであろう。

【0035】

老化は、多くの方法で、哺乳動物細胞にて誘導可能である。第一は、インビボまたはインビトロいずれかでの、正常細胞増殖の通常の結果であり、正常細胞が老化になるまえに実行可能である、細胞分裂、継代または世代の数は限られている。正確な数字は、細胞の型およびもとの種によって変化する(Hayflick & Moorhead、1961、Exp. Cell Res. 25:585~621)。任意の細胞型において老化を誘導するための他の方法は、ほとんどの抗癌剤、放射線および細胞分化剤のような、細胞毒性薬剤での処理である。Changら、1999、Cancer Res. 59:3761~3767を参照のこと。老化はまた、細胞内へ、(p53、p21、p16またはRbのような)腫瘍抑制遺伝子を形質導入すること、および、そこで遺伝子を発現させることにより、任意の哺乳動物細胞内に迅速に誘導可能である。Sugrueら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9648~9653; Uhrbomら、1997、Oncogene 15:505~514; Xuら、1997、Oncogene 15:2589~2596; Vogtら、1998、Cell Growth Differ. 9:139~146を参照のこと。

20

30

【0036】

本発明の目的に関して、語句「老化の病因結果(pathological consequences of senescence)」は、癌、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、アミロイド沈着症、腎臓疾患および関節炎のような疾患を含むことが意図される。

【0037】

本発明の目的に関して、「ウイルス疾患(viral disease)」は、哺乳動物、もっとも好ましくはヒトの細胞中での、ウイルスの感染、複製、遺伝子発現または生成によって引き起こされるか、または関連する疾患である。とりわけ、本語句は、その発現が、p21に応答性であるか、またはp21により誘導される、少なくとも1つの遺伝子をもつウイルスを含むことが意図される。とりわけ、本語句は、DNAウイルス、特に、二本鎖DNAウイルス、または、二本鎖DNA型でその生存周期の一部を持つウイルスを意味する(レトロウイルスおよびレンチウイルス、とりわけHIVを含むが、これらに限定されない)。

40

【0038】

本発明の薬剤には、CDKインヒビター、もっとも好ましくはp21、p16またはp27の発現を誘導可能な、任意の哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウス細胞、およびもっとも好ましくはヒト細胞が含まれ、ここで、そのような遺伝子は、内因性遺伝子または遺伝子工学によって誘導された外因性遺伝子のいずれかである。実施例は、誘導可能なp21、p27およびp16遺伝子をコードしている組

50

換え発現構築物を含む、組換え哺乳動物細胞を開示しているけれど、これらの実施形態が、単に実験的な設計の選択および利便性の問題であること、および本発明が、p 21、p 27およびp 16のような内因性CDKインヒビター遺伝子の誘導を完全に含むこと、が理解されるであろう。

【0039】

好ましい実施形態において、本発明は、誘導可能な哺乳動物p 21遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む、哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、p 21遺伝子は、本明細書で参考文献にて組み込まれた、米国特許第5、424、400号に列記されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を持つ、ヒトp 21である。他の実施形態において、p 21遺伝子は、ヒトp 21遺伝子のアミノ末端部分であり、好ましくは(参考文献にて組み込まれた、米国特許第5、807、692号にて記述されているような)ネイティブヒトp 21タンパク質のアミノ酸残基1~78を含み、より好ましくは、ネイティブヒトp 21タンパク質のアミノ酸21~71を含むCDK結合ドメインを含む(Nakanishiら、1995、EMBO J. 14:555~563)。好ましい宿主細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、およびより好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくは、ヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒトHT1080線維肉腫細胞株およびその誘導体である。もっとも好ましい細胞株は、受け入れ番号第PTA1664号にて、2000年4月6日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p 21 - 9として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0040】

他の好ましい実施形態において、本発明は、誘導可能な哺乳動物p 16遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む、哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、p 16遺伝子は、NCBI RefSeq NM_000077およびNP_000068に列記されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を持つ、ヒトp 16である。好ましい宿主細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、および、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくは、ヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒトHT1080線維肉腫細胞株およびその誘導体である。もっとも好ましい細胞株は、受け入れ番号第PTA-4020号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p 16 - 5として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0041】

他の好ましい実施形態において、本発明は、誘導可能な哺乳動物p 27遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む、哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、p 27遺伝子は、NCBI RefSeq NM_004064およびNP_004055に列記されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を持つヒトp 27、または、NCBI RefSeq NM_009875およびNP_034005に列記されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を持つマウスp 16である。好ましい宿主細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、および、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくは、ヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒトHT1080線維肉腫細胞株およびその誘導体である。もっとも好ましい細胞株は、受け入れ番号第PTA-4021号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p 27 - 2として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0042】

組換え発現構築物は、当業者によって理解されるように、適切な哺乳動物細胞内に導入

可能である。前記構築物の好ましい実施形態は、本技術分野で知られているように、遺伝性ベクター、より好ましくはウイルスベクター、および、もっとも好ましくはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターである。一般的に、MOLECULAR VIROLOGY: A PRACTICAL APPROACH、(Davison & Elliott, ed.)、Oxford University Press: New York、1993を参照のこと。

【0043】

さらに好ましい実施形態において、本発明の組換え細胞には、誘導可能なCDKインヒビター遺伝子をコードしている構築物が含まれ、ここで前記遺伝子は、誘導可能なプロモーターの転写制御下にある。より好ましい実施形態において、誘導可能なプロモーターは、その効果が、誘導薬剤によって調節されうる、トランス作用因子に応答性である。誘導薬剤は、温度、およびもっとも好ましくは誘導薬剤の存在または不存在を含む、実験的に操作可能である任意の因子でありうる。好ましくは、誘導薬剤は、化学化合物、もっとも好ましくは、トランス作用因子に特異的である生理学的に中性な化合物である。本明細書で開示したような、誘導可能なプロモーターを含む構築物の使用において、前記組換え発現構築物からのCDKインヒビターの発現は、組換え細胞を、誘導可能なプロモーターからの転写を誘導する誘導薬剤と接触させること、または、そのようなプロモーターからの転写を阻害する薬剤を除去することによって、媒介される。本発明の方法のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p27またはp16である。種々の誘導可能なプロモーターおよび同起源のトランス作用因子が、本技術分野で公知であり、細胞培養の温度を上昇させることによって活性化可能であるヒートショックプロモーター、および、より好ましくは、たとえば、tetプロモーター、およびその同起源のtetリプレッサーおよび哺乳動物転写因子とのその融合体(米国特許第5、654、168号、第5、851、796号、および第5、968、773号にて開示されたように)、ならびに、ラクトースオペロンの細菌lacプロモーターおよび同起源のlacIリプレッサータンパク質が含まれる。好ましい実施形態において、組換え細胞は、lacIリプレッサータンパク質と、1つまたは多数のlac応答性要素を含むプロモーターの制御下で、ヒトp21をコードしている組換え発現構築物とを発現しており、ここでp21の発現は、細胞を、生理学的に中性な誘導薬剤、イソプロピルチオ-β-ガラクトシドと接触させることによって誘導可能である。この好ましい実施形態において、lacIリプレッサーは、3' SSとして同定された、組換え発現構築物によってコードされている(ストラタジーン(Stratagene, LaJolla, CA)より市販されている)。他の好ましい実施形態において、組換え細胞は、lacIリプレッサータンパク質と、1つまたは多数のlac応答性要素を含むプロモーターの制御下で、ヒトp16をコードしている組換え発現構築物とを発現しており、ここでp16の発現は、細胞を、生理学的に中性な誘導薬剤、イソプロピルチオ-β-ガラクトシドと接触させることによって誘導可能である。この好ましい実施形態において、lacIリプレッサーは、3' SS組換え発現構築物(ストラタジーン)によってコードされている。他の好ましい実施形態において、組換え細胞は、lacIリプレッサータンパク質と、1つまたは多数のlac応答性要素を含むプロモーターの制御下で、ヒトp27またはマウスp27をコードしている組換え発現構築物とを発現しており、ここでp27の発現は、細胞を、生理学的に中性な誘導薬剤、イソプロピルチオ-β-ガラクトシドと接触させることによって誘導可能である。この好ましい実施形態において、lacIリプレッサーは、3' SS組換え発現構築物(ストラタジーン)によってコードされている。

【0044】

本発明はまた、レポーター遺伝子が、その発現がp21、p16またはp27のようなCDKインヒビターによって調節される遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、組換え発現構築物も提供する。これらには、その発現がCDKインヒビターによって誘導される遺伝子も含まれる。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビタ

10

20

30

40

50

-は p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である。好ましい実施形態において、プロモーターは、その発現が、CDKインヒビター発現によって誘導される、または増加する遺伝子に由来し、表 I I または表 V にて同定されている。もっとも好ましくは、前記プロモーターは、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチビン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリン (配列番号 11)、p 6 6^{S^hC} (配列番号 12)、カテプシン B (配列番号 14)、-アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、組織トランスグルタミナーゼ (t - T G a s e、配列番号 16)、クラステリン (配列番号 17)、プロスタサイクリン刺激因子 (配列番号 18)、血管内皮増殖因子 - C (配列番号 19)、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター (配列番号 20)、1 つ (配列番号 79) または多数のタンデムリピート NF B 認識配列を含むプロモーター (5 倍のタンデムリピート NF B 認識配列を含むプロモーターは配列番号 78 にて列記されている)、SV 40 早期プロモーター (配列番号 81)、または CMV 早期遺伝子プロモーター (配列番号 82) に由来する。これらのレポーター遺伝子は、そこで、CDKインヒビター遺伝子発現の効果の、感度がよく便利な指標として使用され、そして、哺乳動物細胞内での CDKインヒビターの発現の効果を増害する化合物を、簡単に同定可能にする。これらの構築物に対する宿主細胞には、CDKインヒビター遺伝子発現が誘導されうる任意の細胞が含まれ、好ましくは、上述したような誘導可能な CDKインヒビター遺伝子を含む、組換え発現構築物をもまた含む細胞が含まれる。本発明のこの観点の実施において有用なレポーター遺伝子には、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼが含まれるが、これらに限定されない。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒト HT 1 0 8 0 繊維肉腫細胞およびその誘導体である。もっとも好ましい細胞株は、受け入れ番号第 P T A - 3 3 8 1 号にて、2001年5月17日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A. に委託された、HT 1 0 8 0 / L U N K 4 p 2 1 として同定された、HT 1 0 8 0 繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0045】

好ましい実施形態において、本発明のしたがった細胞は、その発現が、CDKインヒビターによって調節される、哺乳動物遺伝子に対するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードしている、第一組換え発現構築物、および、哺乳動物 CDKインヒビター遺伝子をコードしている第二組換え発現構築物の両方を含み、ここで、CDKインヒビター発現は、哺乳動物細胞内で、それによって実験的に誘導可能である。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p 2 1、p 1 6 または p 2 7 である。他の実施形態において、本発明は、その発現が CDKインヒビターによって誘導される、哺乳動物遺伝子に対するプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む哺乳動物細胞を提供し、ここで、前記プロモーターは、血清アミロイド A (配列番号 1)、補体 C 3 (配列番号 2)、結合組織増殖因子 (配列番号 3)、インテグリン - 3 (配列番号 4)、アクチビン A (配列番号 5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 (配列番号 6)、プロサポシン (配列番号 7)、Mac 2 結合タンパク質 (配列番号 8)、ガレクチン - 3 (配列番号 9)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (配列番号 10)、グラニューリン/エピセリン (配列番号 11)、p 6 6^{S^hC} (配列番号 12)、カテプシン B (配列番号 14)、-アミロイド前駆体タンパク質 (配列番号 15)、組織トランスグルタミナーゼ (t - T G a s e、配列番号 16)、クラステリン (配列番号 17)、プロスタサイクリン刺激因子 (配列番号 18)、血管内皮増殖因子 - C (配列番号 19)、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター (配列番号 20)、1 つ (配列番号 79) または多数のタンデムリピート NF B 認識配列を含むプロ

モーター（５倍のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーターは配列番号78にて列記されている）、SV40早期プロモーター（配列番号81）、またはCMV早期遺伝子プロモーター（配列番号82）をコードしている遺伝子からのものである。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。

【0046】

本発明はまた、哺乳動物細胞における、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子のCDKインヒビター誘導発現を阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供する。好ましい実施形態において、CDKインヒビター発現は、化合物の存在下または不存在下において、哺乳動物細胞培養にて誘導され、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子のCDKインヒビター誘導発現のインヒビターとして同定される。化合物は、細胞内でCDKインヒビターの発現を誘導することによって、および、前記化合物の存在下におけるマイトジェンまたは抗アポトーシス因子または多数のそれらのものの発現の程度を、前記化合物の不存在下においてと比較することによって、インヒビターとして同定され、また、インヒビターは、前記化合物の存在下でマイトジェンまたは抗アポトーシス因子または多数のそれらのものの発現量が削減されている化合物として同定される。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターはp21、p16またはp27である。任意のCDKインヒビター発現細胞は、前記ならし培地の産生のために有用であり、そのような細胞内でのCDKインヒビター発現は、（DNA損傷薬剤および他の細胞毒性化合物での処理、および、電離放射線または紫外線放射、または接触阻害によってのような）内因性CDKインヒビターを誘導することによって、または、本発明にしたがって、誘導可能なCDKインヒビター発現構築物を含む細胞を使用し、生理学的に中性な誘導薬剤中で前記細胞を培養することによって、達成可能である。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒトHT1080繊維肉腫細胞およびその誘導体である。本発明のとりわけ好ましい実施形態にしたがった例示的細胞株は、受け入れ番号第PTA1664号にて、2000年4月6日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p21-9として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。例示的細胞集団は、受け入れ番号第PTA-2580号にて、2000年10月10日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080/LNp16RO2として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。本発明のとりわけ好ましい実施形態にしたがった他の例示的細胞株は、受け入れ番号第PTA-4020号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p16-5として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。本発明のとりわけ好ましい実施形態にしたがった他の例示的細胞株は、受け入れ番号第PTA-4021号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080 p27-2として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0047】

他の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞内での、マイトジェンまたは抗アポトーシス因子のCDKインヒビター誘導発現を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、ここで、細胞は、CDKインヒビターによって誘導される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードしている組換え発現構築物を含む。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターはp21、p16またはp2

10

20

30

40

50

7である。好ましいプロモーターには、結合組織増殖因子（配列番号3）、アクチビンA（配列番号5）、グラニューリン/エピセリン（配列番号11）、ガレクチン-3（配列番号9）、プロサポシン（配列番号7）、クラステリン（配列番号17）、プロスタサイクリン刺激因子（配列番号18）、血管内皮増殖因子-C（配列番号19）、メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター（配列番号20）に関するプロモーター、1つ（配列番号79）または多数のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーター（5倍のタンデムリピートNF B認識配列を含むプロモーターは配列番号78にて列記されている）、SV40早期プロモーター（配列番号81）、またはCMV早期遺伝子プロモーター（配列番号82）が含まれる。好ましいレポーター遺伝子には、これらには限定されないが、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が含まれ、すべてが市販されている。これらの実施形態において、CDKインヒビター発現は、細胞内で誘導され、レポーター遺伝子の発現の程度が、化合物の存在下において、化合物の不存在下における発現と比較される。インヒビターは、化合物の不存在下よりも、化合物の存在下で、レポーター遺伝子の発現量の減少を起こす化合物として同定される。任意のCDKインヒビター発現細胞が、本発明のこの観点で有用であり、そのような細胞内でのCDKインヒビター発現は、（例えば、DNA損傷薬剤および他の細胞毒性化合物での処理、電離放射線または紫外線放射、または接触阻害によつてのような）内因性インヒビター遺伝子を誘導することによつて、または、本発明にしたがって、誘導可能なCDKインヒビター発現構築物を含む細胞を使用し、生理学的に中性な誘導薬剤中で前記細胞を培養することによつて、達成可能である。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞が含まれる。とりわけ好ましい実施形態は、繊維肉腫細胞、より好ましくはヒト繊維肉腫細胞、もっとも好ましくは、ヒトHT1080繊維肉腫細胞およびその誘導体である。もっとも好ましい細胞株は、受け入れ番号第PTA-3381号にて、2001年5月17日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された、HT1080/LUNK4p21として同定された、HT1080繊維肉腫細胞株誘導体である。

【0048】

本発明は、細胞老化の病因結果を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、それによつて、化合物の効果は、化合物が、その発現がCDKインヒビターによつて誘導される遺伝子の誘導を阻害するかどうかを測定することによつて、アッセイされる。本発明の本方法の実施において、そこでCDKインヒビターが誘導されうる、培養哺乳動物細胞は、たとえば、電離放射線または放射線照射によつて、または接触阻害処置または細胞毒性薬剤での処理によつて、インヒビター遺伝子を誘導するために処理され、または、CDKインヒビターをコードしている遺伝性のベクターで形質導入される。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターは、p21、p16またはp27である。より好ましくは、p21が細胞をIPTGと接触させることによつて誘導可能である、HT1080p21-9細胞（受け入れ番号第PTA-1664号にて、2000年4月6日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された）が使用され、または、HT1080p16-5細胞（受け入れ番号第PTA-4020号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された）が、p16がIPTGにて誘導可能であるように、使用され、または、HT1080p27-2細胞（受け入れ番号第PTA-4021号にて、2002年1月31日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A.に委託された）が、p27がIPTGにて誘導可能であるように、使用される。典型的には、細胞を適切な培養培地で増殖させる（たとえば、HT1080誘導体に対して、1

0%ウシ胎仔血清(FCS)を添加したDMEM)。HT1080p21-9、HT1080p16-5、またはHT1080p27-2細胞において、CDKインヒビター遺伝子発現は、約50 μ Mの濃度で、培養培地にIPTGを加えることによって誘導される。典型的には、CDKインヒビターは、化合物の存在下または不存在下において、これらの細胞内で誘導され、本発明の方法にしたがって試験される。ついでmRNAを、CDKインヒビターが誘導される細胞より単離し、CDKインヒビターによって制御された遺伝子の発現を解析する。発現を、化合物の存在下においてCDKインヒビターが誘導される細胞内で、化合物の不存在下で誘導された発現と比較し、そして、差違を、本明細書に列記した方法にしたがって、細胞遺伝子発現に影響を与える化合物を同定するために使用する。一定の実施形態において、細胞遺伝子発現を、(たとえば、ゲノム システムズ社(Genome Systems, Inc.) St. Louis, MO)からのような)市販されているような、オリゴヌクレオチドまたは細胞cDNAのマイクロアレイを用いて解析する。他の実施形態においては、CDKインヒビターによって誘導されることが知られている遺伝子をアッセイする。遺伝子発現は、1つまたは多数のCDKインヒビター調節遺伝子に対して、細胞mRNAまたはタンパク質を解析することのいずれかによって、アッセイ可能である。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターはp21、p16またはp27である。もっとも好ましくは、これらのアッセイで使用する遺伝子は、表IIおよび表Vにて同定される遺伝子である。

10

【0049】

他の実施形態において、そのような化合物は、CDKインヒビター指向実験操作と独立して同定される。そのようなアッセイにおいては、細胞は、細胞毒性薬剤、放射線または細胞分化剤での処理、または腫瘍抑制遺伝子の導入を含むがこれらに限定されない、上記において開示された任意の方法で、老化を誘導するために処理される。CDKインヒビターによって誘導される遺伝子の発現は、試験化合物の存在下または不存在下で解析される。もっとも好ましくは、これらのアッセイで使用する遺伝子は、表IIにて同定される遺伝子であり、遺伝子発現解析に関して、上記において議論したmRNAおよびタンパク質アッセイの型を使用する。

20

【0050】

他の実施形態において、その中でCDKインヒビターが誘導される細胞は、CDKインヒビターによって誘導される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードしている組換え発現構築物をさらに含む。本発明のこの観点の好ましい実施形態において、CDKインヒビターはp21、p16またはp27である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子は、CDKインヒビターによって誘導される遺伝子であり、プロモーターは表IIおよび表Vにて同定された遺伝子に由来する。そのような遺伝子に関して知られているプロモーターの例には、血清アミロイドA(配列番号1)、補体C3(配列番号2)、結合組織増殖因子(配列番号3)、インテグリン-3(配列番号4)、アクチピンA(配列番号5)、ナチュラルキラー細胞タンパク質4(配列番号6)、プロサポシン(配列番号7)、Mac2結合タンパク質(配列番号8)、ガレクチン-3(配列番号9)、スーパーオキシドジスムターゼ2(配列番号10)、グラニューリン/エピセリン(配列番号11)、p66^{shc}(配列番号12)、カテプシンB(配列番号14)、

- アミロイド前駆体タンパク質(配列番号15)、組織トランスグルタミナーゼ(t-TGase、配列番号16)、クラスチリン(配列番号17)、プロスタサイクリン刺激因子(配列番号18)、血管内皮増殖因子-C(配列番号19)、メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター(配列番号20)、1つ(配列番号79)または多数のタンデムリピートNF κ B認識配列を含むプロモーター(5倍のタンデムリピートNF κ B認識配列を含むプロモーターは配列番号78にて列記されている)、SV40早期プロモーター(配列番号81)、またはCMV早期遺伝子プロモーター(配列番号82)が含まれる。好ましいレポーター遺伝子には、これらには限定されないが、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が含まれ、すべてが市販されている。

30

40

50

【0051】

本発明は、ウイルス感染、ウイルス遺伝子発現またはその病因結果を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、それによって、化合物の効果は、化合物が、その発現がCDKインヒビターによって誘導されるウイルス遺伝子の誘導を阻害するかどうかを決定することによって、アッセイされる。

【0052】

本発明は、ウイルス感染の病因結果と関連したウイルス遺伝子の誘導を阻害する化合物を同定するための方法を提供する。そのような化合物は、遺伝子発現のCDKインヒビター媒介誘導におけるその効果によって、ウイルス疾患を予防、遅延または逆転させる能力を表すことが予想される。

10

【0053】

1つの実施形態において、本発明は、p21、p16またはp27のようなCDKインヒビターによって誘導される遺伝子発現を阻害するための方法を提供する。好ましい実施形態において、そのような阻害は、細胞を、DNAウイルス、もっとも好ましくは、ヒトに感染する二本鎖DNAウイルスからのプロモーターにおける遺伝子発現を阻害する、有効量の化合物と接触させることによって、実施される。さらなる好ましい実施形態において、化合物は、レンチウイルス遺伝子発現、もっとも好ましくはHIV遺伝子発現およびHIV感染性を阻害する。

【0054】

本発明はしたがって、ウイルス遺伝子発現のCDKインヒビター誘導を阻害することによって、細胞、もっとも好ましくはヒト細胞のウイルス感染を阻害するための方法を提供する。本発明の方法によって同定された化合物を使用して、治療または予防しうる疾患には、これらには限定されないが、HIV、サイトメガロウイルス、1型および2型単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、EBウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、肝炎ウイルス、ヒトポリオマウイルス、および任意のこれらのウイルスでの感染によって引き起こされる、または起こりやすい疾患が含まれる。とりわけ、本発明は、前記ウイルス、とりわけHIVおよび帯状疱疹ウイルスによる潜在的感染細胞におけるウイルス遺伝子発現を阻害するための方法を提供する。

20

【0055】

本発明はまた、細胞老化および老化の病因結果と関連した、または、CDKインヒビター誘導細胞老化の効果を媒介する、遺伝子を同定するための方法も提供する。CDKインヒビターの誘導は、老化に関連した細胞増殖停止、末端分化および細胞障害への応答の、不可欠な部分であることがわかった。以下の実施例で記述しているように、cDNAアレイハイブリッド形成は、これらの効果が、遺伝子発現におけるp21誘導変化によるものであることを示していた。p21は、細胞老化および加齢に関連した、または、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、アミロイド沈着症、腎臓疾患および関節炎を含む、加齢に関連した疾患に関与している、遺伝子を選択的に誘導する。これらの発見は、生物におけるp21誘導の累積効果が、癌および加齢関連疾患の病因に関与する可能性があることを示唆した。さらに、多くのp21活性化遺伝子が、細胞増殖およびアポトーシスにおける潜在的なパラクリン効果を持つ、分泌タンパク質をコードしている。本発見と一致

30

40

【0056】

さらに、以下の実施例に提示された結果により、p16またはp27の発現の誘導が、p21遺伝子発現の効果を模倣すること、および、その発現がp21遺伝子発現によって調節された同一の遺伝子もまた、p16またはp27遺伝子発現によって調節されたことが実証された(図6を参照のこと)。したがって、本発明の方法は、内因性p16またはp27の遺伝子の誘導によって、あるいは、p16またはp27をコードしている誘導可能な発現構築物を含む組換え細胞内でのいずれかで、p16またはp27遺伝子発現が誘導される細胞を含むように、拡張された。

50

【0057】

遺伝子発現における、CDKインヒビター誘導、とりわけp21、p16およびp27誘導の観察された結果は、細胞老化および生物加齢に関連した変化との多くの関連性を示している。これらの関連性のいくつかは、CDKインヒビターによって阻害される遺伝子の解析より生ずる。したがって、老化した繊維芽細胞は、p21誘導において観察されたように、より低レベルのRbを発現すると報告された(Steinら、1999、Mol. Cell. Biol. 19:2109~2117)。CDKインヒビターによって阻害される3つの遺伝子、CHL1、CDC21およびRAD54が、ヘリカーゼファミリーのメンバーをコードしていることも興味深い。ヘリカーゼ群の他のタンパク質の欠損が、ワーナー症候群、すなわち早期老化に関連した臨床状態の原因として、および、細胞レベルで、培地中にある細胞の促進老化の原因として同定された(Grayら、1997、Nature Genet. 17:100~103)。

【0058】

しかしながら、老化表現型とのもっとも強力な関連性は、CDKインヒビター誘導遺伝子の同定より発生しており、その多くは、複製老化または生物加齢の間に、そのレベルが増加することが知られている。細胞外マトリックス(ECM)タンパク質の過剰発現は、複製老化の知られた特質であり、この群の2つのCDKインヒビター誘導遺伝子、フィブロネクチン1およびプラスミノゲン活性化インヒビター1(PAI-1)は、しばしば細胞老化と関連してきた(Crisofalo & Pignolo、1996、Exp. Gerontol. 31:111~123にて概説されている)。老化した繊維芽細胞にて過剰発現しているとも報告された、他のCDKインヒビター誘導遺伝子には、組織型プラスミノゲン活性化剤(t-PA; Westら、1996、Exp. Gerontol. 31:175~193)、カテプシンB(diPaololaら、1992、Exp. Cell Res. 201:500~505)、インテグリン3(Hashimotoら、1997、Biochem. Biophys. Res. Commun. 240:88~92)およびAPP(Adlerら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:16~20)が含まれる。t-PAおよびPAI-1(Hashimotoら、1987、Thromb. Res. 46:625~633)、カテプシンB(Bernsteinら、1990、Brain Res. Bull. 24:43~549)、アクチピンA(Loriaら、1998、Eur. J. Endocrinol. 139:487~492)、プロサポシン(Mathurら、1994、Biochem. Mol. Biol. Int. 34:1063~1071)、APP(Ogomoriら、1988、J. Gerontol. 43:B157-B162)、SAA(Rosenthal & Franklin、1975、J. Clin. Invest. 55:746~753)およびt-TGase(Singhalら、1997、J. Invest. Med. 45:567~575)を含む、いくつかのCDKインヒビター誘導タンパク質の発現が、生物老化に関連することが示された。

【0059】

もっとも一般的に使用される、細胞老化のマーカーは、SA-gal活性である(Dimriら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9363~9367)40。この遺伝子は、IPTG-処理HT1080 p21-9細胞内で強く上昇する(Changら、1999、Oncogene 18:4808~4818)。SA-galは、リソソームのβ-ガラクトシダーゼの活性の増加および局在の変化を示すと示唆され(Dimriら、1995、上記)、他の研究により、老化細胞でのリソソーム活性の増加が記述された(Cristofalo & Kabakjian、1975、Mech. Aging Dev. 4:19~28)。N-アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ(GALNS)、カテプシンB、酸性β-グルコシダーゼ、酸リパーゼAおよびリソソームペプスタチン不感受性プロテアーゼを含む、5つのリソソーム酵素が表IIにて見られる。p21はまた、ミトコンドリアタンパク質SOD2、メタジンおよび2、4-ジエノイル-CoAリダクターゼに関する遺伝子をアップレギュ 50

レートし、これは、老化細胞内で過剰発現する異なるミトコンドリア遺伝子のレポートと関連する (Doggettら、1992、Mech. Aging Dev. 65: 239 ~ 255、Kodamaら、1995、Exp. Cell Res. 219: 82 ~ 86、Kumazakiら、1998、Mech. Aging Dev. 101: 91 ~ 99)。

【0060】

ひとときわ、p21、p16またはp27によって誘導されることを本発明者らが発見した多くの遺伝子の産物は、アルツハイマー病、アミロイド沈着症、アテローム性動脈硬化症および関節炎を含む、加齢関連疾患に関連してきた。したがって、APPは、アルツハイマー病のアミロイドプラークの主要な成分である、 - アミロイドペプチドを生じさせる。補体C3 (Veerhuisら、1995、Virchows Arch. 426: 603 ~ 610) およびAMPデアミナーゼ (Simsら、1998、Neurobiol. Aging 19: 385 ~ 391) もまた、アルツハイマー病で役割を果たすと示唆された。p21によってもっとも早く誘導され、細胞分化、発癌、アポトーシスおよび老化の多面的なメディエーターとして記述されてきた (Parkら、1999、J. Gerontol. A Biol. Sci. 54: B78 ~ B83)、t-TGaseが、アルツハイマー病およびアミロイド沈着症の両方に関連したプラークの形成に関与することは、特に興味深い (Dudek & Johnson、1994、Brain Res. 651: 129 ~ 133)。後者の疾患は、他のCDKインヒビター誘導遺伝子産物、SAAの沈着によるものであり、これはまた、アテローム性動脈硬化症、変形性関節炎および慢性関節リウマチに関連してきた (Jensen & Whitehead、1998、Biochem. J. 334: 489 ~ 503)。分泌タンパク質をアップレギュレートする2つの他のCDKインヒビター、CTGFおよびガレクチン3は、アテローム性動脈硬化症に関連する (Oemarら、1997、Circulation 95: 831 ~ 839、Nachtigalら、1998、Am. J. Pathol. 152: 1199 ~ 1208)。さらに、カテプシンB (Howieら、1985、J. Pathol. 145: 307 ~ 314)、PAI-1 (Cerinicら、1998、Life Sci. 63: 441 ~ 453)、フィブロネクチン (Chevalier、1993、Semin. Arthritis Rheum. 22: 307 ~ 318)、GALNSおよびMac-2結合タンパク質 (Sekiら、1998、Arthritis Rheum. 41: 1356 ~ 1364) が、変形性関節炎および/または慢性関節リウマチに関連してきた。さらに、PAI-1発現の増加のような、ECMタンパク質における老化関連変化が、皮膚および他の組織の構造における年齢特異的変質という結果となることが、提案された (Campisi、1998、J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 3: 1 ~ 5)。加齢細胞によるフィブロネクチン生成の増加はまた、ECMにおけるフィブロネクチンネットワークの密度の増加を示唆し、これは、加齢個体における傷治癒が遅くなることに寄与する可能性がある (Albinら、1988、Coll. Relat. Res. 8: 23 ~ 37)。

【0061】

p21およびp21誘導遺伝子はまた、糖尿病性腎症および慢性腎不全に関連してきた。Kuanら (1998、J. Am. Soc. Nephrol. 9: 986 ~ 993) は、p21が、糖尿病性腎症のインビトロモデルである、グルコース誘導メサンギウム細胞肥大の条件下で誘導されることを発見した。Megyesiら (1996、Am. J. Physiol. 271: F1211 ~ 1216) は、p21が、急性腎不全のいくつかの動物モデルにおいて、インビボで誘導され、このp21誘導がp53に依存しないことを示した。これらの発病過程におけるp21の機能的役割については、Al-Douahjiら (1999、Kidney Int. 56: 1691 ~ 1699) によって、p21 (-/-) マウスでは実験的糖尿病の条件下で、糸球体肥大が生じないことを発見した、ということが実証され、および、Megyesiら (1999、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 10830 ~ 10835) によって、p21 (-/-)

10

20

30

40

50

マウスにおいて、部分的腎臓切除の後に、慢性腎不全が生じないことを示した、ということが実証されてきている。注目すべきことに、Kuanら(1998、J. Am. Soc. Nephrol. 9:986-993)によって使用されたのと同様のインビトロモデルで研究をしている、Murphyら(1999、J. Biol. Chem. 274:5830~5834)は、メサンギウム細胞肥大が、p21によって誘導可能であると本明細書で示されているいくつかの遺伝子のアップレギュレーションに関与することを報告した。これらには、CTGF、フィブロネクチンおよびプラスミノゲン活性化インヒビター-1が含まれる。後者の研究はまた、CTGFが、このモデル系で、メサンギウムマトリックス蓄積において、機能的役割を果たしていることを示した(Murphyら、1999、J. Biol. Chem. 274:5830~5834)。これらの結果は、腎不全の病因における、p21および遺伝子発現のp21媒介誘導を示唆している。 10

【0062】

特に興味深いものとして、p21は、ストレス耐性の増加および寿命のかなりの延長を示しているp66(-/-)マウスで、酸化障害を増強すると最近わかった(Migliaccioら、1999、Nature 402:309~313)遺伝子である、p66^{shc}の発現を誘導する。これらの観察は、p21の遺伝子発現における効果が、多数の疾患の病因および哺乳動物の寿命の総合的な制限に関与する可能性を示唆している。

【0063】

臨床試験中の主な新規種類の抗癌薬は、血管新生阻害物である。これらの薬剤は、腫瘍細胞を標的とはせず、間質毛細血管の増殖を標的とし、腫瘍分泌血管新生因子によって刺激される(最近の概説に関して、Kerbel、2000、Carcinogenesis 21:505~515を参照のこと)。しかしながら、脈管構造は、腫瘍増殖に必要な唯一の間質要素ではない。多数の研究で、間質繊維芽細胞がまた、インビトロおよびインビボにて腫瘍細胞の増殖を支えること、および、正常および不死化繊維芽細胞が、腫瘍形成性を促進し癌腫細胞の死を阻害する、パラクリン因子を分泌することが示された(Gregoire and Lieubeau、1995、Cancer Metastasis Rev. 14:339~350; Campsら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:75~79; Noelら、1998、Int. J. Cancer 76:267~273; Olumiら、1998、Cancer Res. 58:4525~4530)。そのような因子は、繊維芽細胞ならし培地(Chung、1991、Cancer Metastasis Rev. 10:263~74)および共生培養研究にて同定された。とりわけ、Olumiら(1998、Cancer Res. 58:4525~4530)は、正常の前立腺繊維芽細胞との、前立腺癌腫細胞の共生培養が、癌腫細胞死を非常に減少させ、異種移植腫瘍形成を促進する。繊維芽細胞のパラクリン効果はまた、初期前立腺上皮細胞に関して示されたように、発癌における腫瘍促進活性をも持つ(Olumiら、1999、Cancer Res. 59:5002~5011)。これらの結果にもかかわらず、腫瘍関連繊維芽細胞の、このパラクリン発癌活性および腫瘍刺激活性は、薬理的介入の標的としてはまだ利用されてはこなかった。本発明は、そのような間質繊維芽細胞からのマイトジェン生成を阻害することが可能な化合物を検出し、同定するための方法を提供し、したがって、腫瘍細胞増殖を阻害する方法を提供する。 40

【0064】

このパラクリン腫瘍促進活性は、最近、p21およびp16の誘導を含む工程である、正常のヒト繊維芽細胞の複製老化の間に選択的に増加することが示された(Krtolicaら、2000、Proc. Amer. Assoc. Can. Res. 41, Abs. 448)。間質組織の腫瘍促進効果はまた、間質繊維芽細胞における高いp21レベルを生成する処理(Meyerら、1999、Oncogene 18:5795~5805)である、電離放射線によって誘導されるべき、マウス乳癌発癌モデルにおいても示された(Barcellos-Hoff and Ravanì、2000、Cancer Res. 60:1254~60)。これらの結果より、p21過剰発現細胞のならし培地 50

において、本明細書で開示したパラクリン抗アポトーシス活性およびマイトジェン活性が、同一の生物学的現象を示す可能性があることが示唆された。

【0065】

本明細書で開示した結果は、CDKインヒビター誘導が、癌または加齢関連疾患の発現の可能性を増加させる方法にて、細胞遺伝子発現に影響を与えることを示唆している。CDKインヒビター発現の急上昇は、正常複製老化においてのみではなく、細胞損傷への応答においてもおこり、両方の場合で、CDKインヒビター誘導の望まない効果が、年齢依存的様式で蓄積すると予想される。

【0066】

本明細書で開示した結果は、CDKインヒビター誘導がまた、異なるウイルス遺伝子のプロモーター機能を増加させることを示唆しており、したがって、CDKインヒビターの転写効果がまた、異なる型のウイルス感染およびその病因結果を促進することを示唆している。

【0067】

したがって、本発明は、細胞老化の病因結果と関連した遺伝子、とりわけ老化の間に誘導される遺伝子、および、とりわけCDKインヒビター発現によって誘導される遺伝子の誘導を阻害することが可能である化合物を同定するための方法を提供する。そのような化合物は、遺伝子発現のCDKインヒビター媒介誘導におけるその効果によって、加齢関連疾患を予防、遅延または逆行させる能力を示すことが、予想される。そのような化合物はまた、ウイルス疾患を予防、処置、遅延または治療することが、予想される。

【0068】

1つの実施形態において、本発明は、p21、p16またはp27のようなCDKインヒビターによって誘導された遺伝子発現を阻害するための方法を提供する。好ましい実施形態において、そのような阻害は、細胞を、核因子カッパ-B (NF- κ B)の活性、発現または核転座を阻害する、有効量の化合物と、接触させることによって達成される。NF- κ B活性は少なくとも以下の3つの方法にて、細胞内で阻害されることが、当業者によって理解されるであろう。第一に、NF- κ Bヘテロダイマーを作り上げる遺伝子いずれかの、転写、プロセッシングおよび/または翻訳のダウンレギュレーションまたは阻害；第二に、細胞内でのI κ B発現および/または活性の不活性化を阻害することに依存しうる、細胞質から核へのNF- κ Bの転座の阻害；第三に、NF- κ Bそれ自身の活性の阻害。本発明は、これらの方法のいずれかまたはすべてにより、NF- κ B活性を阻害し、そしてそれによってCDKインヒビターによる遺伝子の誘導を阻害するための方法を含む。本技術分野で知られているNF- κ Bインヒビターの例には、N-複素環カルボキシイミド誘導體（たとえば、国際出願公開番号第WO01/02359号にて開示されたような）、アニリド化合物（たとえば、国際出願公開番号第WO00/15603号にて開示されたような）、4-ピリミジノアミノインダン誘導體（たとえば、国際出願公開番号第WO00/05234号にて開示されたような）、4H-1-ベンゾピラン-4-オン誘導體（たとえば、日本国出願番号第JP11193231号にて開示されたような）、キサントニン誘導體（たとえば、日本国出願番号第JP9227561号にて開示されたような）、カルボキシアルケニルベンゾキノンおよびカルボキシアルケニルナフトール誘導體（たとえば、日本国出願番号第JP7291860号にて開示されたような）、ジスルフィドおよびその誘導體（たとえば、国際出願公開番号第WO99/40907号にて開示されたような）、プロテアーゼインヒビター（たとえば、欧州出願公開番号第EP652290号にて開示されたような）、フルルビプロフェン、サリドマイド、デキサメタゾン、ピロリジンジチオカルバメート、ジメチルフマレート、メサリジン、ピモベンダン、スルファサラジン、メチルクロロゲナート、クロロメチルケトン、コハク酸アルファ-トコフェロール、テボキサリン、ならびに、アスピリン、サリチル酸ナトリウムおよびスリダクを含む、特定の非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) が含まれる。

【0069】

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態をさらに例示するためであり、事実

10

20

30

40

50

上は制限しているのではない。

【0070】

実施例1 誘導可能な p21 遺伝子を含む哺乳動物細胞の生成

ヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 p21-9 の組換え誘導体を、Changら (1999、Oncogene 18:4808~4818、本明細書で参考文献にて組み込まれている) に基本的にしたがって、生成した。この細胞株は、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) によって制御されたプロモーターの転写制御下で、p21コード配列を含んだ。p21の発現は、十分な量の IPTG の存在下でこれらの細胞を培養し、それによって、内因性 p21 遺伝子の誘導が誘発されうる任意のさらなる効果がない状態で、p21発現の結果 (sequella) を研究可能にすることで、誘導可能である。この細胞株は、2000年4月6日に、American Type Culture Collection、Manassas、Virginia U.S.A. に委託され、受け入れ番号 PTA1664 を付与された。

10

【0071】

簡単に記すと、マウスのエコトロピックレトロウイルスレセプターを発現している HT1080 のサブライン、および、プラスミド 3' SS (ストラタジーン) (Chang & Roninson、1996、Gene 33:703~709 に記述された、参考文献にて組み込まれている) によってコードされた改変細菌 lacI リプレッサーを、組換えレトロウイルス LNp21CO3 を含むレトロウイルス粒子に感染させた。その構造は図1に示している。このレトロウイルスベクターは、レトロウイルス長末端繰り返しプロモーターの転写制御下で、細菌ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を含む。p21コード配列を、改変ヒトサイトメガロウイルスプロモーターの制御下、neo 遺伝子の転写方向と逆方向でクローン化する。とりわけ、CMVプロモーターは、プロモーターからの発現を、細胞内で発現した lacI リプレッサーに対して感受性にする、細菌 lac オペレーター配列の三倍繰り返しを含む。LNp21CO3 は、親ベクター、LNXC03 (Chang & Roninson、上記にて開示された) の NotI および BglII 部位内に、p21コード配列を含む 492bp の DNA 断片をクローン化することにより、構築された。

20

【0072】

感染の後、LNp21CO3 X ベクターに感染させた細胞は、400 μg/ml の G418 (BRL-GIBCO、Gaithersburg、MD より得た) の存在下で細胞を培養することにより、選別された。クローン株 HT1080 p21-9 は、形質導入された LNp21CO3、G418 耐性細胞株から、クローン細胞株が得られるまで終点希釈することにより、誘導された。

30

【0073】

実施例2 細胞増殖アッセイ

実施例1にて記述したようにして生成した HT1080 p21-9 細胞を、細胞増殖アッセイにて使用し、p21が細胞内で発現したときに、細胞増殖にどのような変化が起こるか、を決定した。

40

【0074】

HT1080 p21-9 細胞中の LNp21CO3 ベクターからの p21 発現は、前記細胞を、10% ウシ胎仔血清 (HyClone、Logan、UT) および IPTG を含む DMEM 培地中で培養することによって、誘導された。これらのアッセイの結果を図2A および 2B に示している。図2Aは、50 μM IPTG の存在下で培養した細胞内での、p21タンパク質生成の時間経過を示している。p21 遺伝子発現は、増殖培地内に IPTG を導入した後 6~12 時間の間で増加し、その発現は、誘導後約 24 時間の時点でピークとなった。IPTG 含有培地から細胞を除去すると、p21 発現が、上昇したのとほぼ同様に急速に減少し、IPTG 除去後約 24 時間の時点で、誘導前のレベルにま

50

で戻った(図2B)。

【0075】

IPTGの存在下での細胞増殖を、3つの方法でアッセイした：³H-チミジン取り込み(「標識指標」と表記)、培地中の有糸分裂細胞数の顕微鏡による観察(「有糸分裂指標」と表記)、および、細胞周期の異なる部分での、培養細胞の分布の決定(「細胞周期分布」と表記)。

【0076】

³H-チミジン取り込みアッセイを、実質上、Dimriら(1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9363~9367)によって記述されたように実施した。細胞を、3時間、³H-チミジンの存在下で培養し、ついで、オートラジオグラフィによって解析した。DNA複製は、培養培地へのIPTGの添加後9時間までで完全に停止される、オートラジオグラフィによって決定された。有糸分裂指標は、顕微鏡で細胞を観察し、5μg/mlの4、6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた染色後、有糸分裂の細胞数を計算することにより決定され、そして、イメージは、ライカ(Leica)DMIRB蛍光顕微鏡およびVaytek(Fairfield, Iowa)イメージングシステムを用いて回収された。顕微鏡で検出可能な有糸分裂細胞は、IPTG処理の14時間までに、これらの培養物から消失した。

10

【0077】

細胞周期分布を、Becton Dickinson FACSsortを用いて、Jordanら(1996、Cancer Res、56:816~825)によって記述されたように、ヨウ化プロピジウムで染色した後に、DNA含量のFACS解析を用いて、決定した。細胞周期分布は、IPTG処理の24時間後に安定した。このときまでに、42~43%のIPTG処理細胞が、それぞれG1およびG2で停止し、約15%の細胞が、S期DNA含量にて停止した。IPTG処理HT1080 p21-9細胞もまた、形態学的老化マーカー(形態の拡大および平坦化、ならびに粒度の増加)を発達させ、同様に、SA-gal活性を発達させた(Changら、1999、上記)。これらの結果は、p21の誘導発現が、細胞周期停止、および、細胞老化に特徴的な、他の種々の変化の両方を生じることを示唆している。

20

【0078】

30

実施例3 p21遺伝子発現によって媒介される遺伝子発現の解析

実施例2にて開示された結果は、p21誘導の形態学および細胞周期結果は、遺伝子発現における多数の変化を反映している可能性があることを示唆していた。細胞遺伝子発現におけるp21誘導の効果を以下のように試験した。

【0079】

ポリ(A)⁺RNAを、未処理HT1080 p21-9細胞、および、50μM IPTGで3日間処理した細胞から単離した。cDNAをポリ(A)⁺RNAより調製し、4、000以上の配列が実証された既知のヒト遺伝子および3、000ESTsを含む、Human UniGEM V cDNAマイクロアレイ(ゲノムシステムズ社(Genome Systems, Inc., St. Louis, MO)での特異的なハイブリッド形成のためのプローブとして使用した。2、500を超える遺伝子およびESTsが、未処理およびIPTG-処理HT1080 p21-9細胞の両方からのプローブによって、測定可能なハイブリッド形成シグナルを示した。平衡ディファレンシャル発現(balanced differential expression) 2.5にてダウンレギュレートされたか、または、平衡ディファレンシャル発現 2.0にてアップレギュレートされた遺伝子は、それぞれ表IおよびIIに列記されている。

40

【0080】

69のこれらの遺伝子の発現を、RT-PCRまたはノーザンハイブリダイゼーションによって個々に試験した。RT-PCR解析を、基本的にNoonanら(1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7160~7164)によって記

50

述されたように実施した。ノーザンハイブリダイゼーションに対するプローブは、マイクロアレイ中に存在するcDNAクローンの挿入物に由来し、これらのcDNAは、ゲノムシステムズ社より得た。さらに、いくつかのp21-調節遺伝子産物の発現における変化を、免疫プロットングによって解析した。以下の第一抗体を、免疫プロットングのために使用した：Cdc2 (Santa Cruz)、サイクリンA (NeoMarkers)、Plk1 (Zymed) およびRb (PharMingen) に対するマウスモノクローナル抗体；MAD2 (BadCo)、p107 (Santa Cruz)、CTGF (Fisp-12; Dr. L. Lauより頂いた)、Prc1 (Dr. W. Jiang および Dr. T. Hunterより頂いた)、およびトポイソメラーゼII (Ab0284、Dr. W. T. Beckより頂いた) に対するウサギポリクローナル抗体、およびSOD2 (Calbiochem) に対するヒツジポリクローナル抗体。使用したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) - 共役第二抗体は、ヤギ抗マウスおよびヤギ抗ウサギIgG (Santa Cruz) およびウサギ抗ヒツジIgG (KPL) であった。すべての試料中のタンパク質濃度を、BioRadタンパク質アッセイキットで測定した後に、均一にした。免疫プロットングを、標準の手順にて実施し、シグナルを、LumiGlo (KPL) を用いて化学ルミネッセンスにより検出した。

【0081】

これらの結果は、図3Aから図3Cにて示している。上記のマイクロアレイアッセイによって予想された遺伝子発現の変化が、38/39ダウンレギュレート遺伝子および27/30アップレギュレート遺伝子に関して確認された。試験した遺伝子のほとんどに関する、ノーザンハイブリダイゼーションまたはRT-PCRにおける、観察されたシグナルの差違 (図3A~3C) は、cDNAアレイ (表IおよびII) から決定された平衡ディファレンシャル発現の値よりも、より高いことが明らかになり、このことは、cDNAアレイハイブリッド形成が、遺伝子発現におけるp21効果の程度を過小評価する傾向にあることを示唆している。6つのダウンレギュレートされた遺伝子および4つのアップレギュレートされた遺伝子の発現における変化はまた、免疫プロットング (図3B) またはザイモグラフィ (示していない) によってタンパク質レベルで試験され、試験したすべての場合で確認された。

【0082】

遺伝子発現におけるp21-媒介変化が、p21誘導細胞増殖停止の次にくる、短期効果および長期効果からなることが認識された。この目的のために、IPTGの添加および除去後のp21-阻害遺伝子 (図3B) およびp21-誘導遺伝子 (図3C) のサブセットのRNAレベルにおける変化の時間経過を決定した。免疫プロットングを、(電気泳動移動度によって示されたような) Rbリン酸化における、および、cDNAアレイにしたがってp21によって阻害されるRbおよびいくつかのタンパク質の細胞レベルにおける、p21誘導変化の時間経過を解析するために使用した。これらの結果を図3Bに示している。Rbは、IPTG添加後、6時間ほどで脱リン酸化されるようになることがわかった。さらに、Rbタンパク質レベルは、12~24時間の間で急激に減少し (図3Bにて示されている)、しかし、Rb mRNAレベルにおいては何の変化も検出されなかった (データは示していない)。同様の減少が、Rb関連タンパク質p107に関して観察された (図3Aにて示されている)。

【0083】

1. p21によって阻害される遺伝子発現

すべての試験したp21阻害遺伝子は、p21誘導および放出に対して迅速な応答を示した。これらの遺伝子のうち5つ (トポイソメラーゼII、ORC1、PLK1、PRC1 およびXRCC9) は、IPTG添加後、4~8時間の間で、RNAおよびタンパク質レベルの両方で、有意な阻害を示した (図3B)。このパターンは、「即時型応答 (immediate response)」と表現されてきており、細胞増殖停止の速度論と、Rb脱リン酸化の速度論に並行する。他のp21阻害遺伝子 (CDC2またはDHF

Rのような)は、DNA複製および有糸分裂の停止にわずかに遅れる、「早期応答 (early response)」パターンを示し、IPTG添加後わずか12時間のみで検出することができる、mRNAレベルが大きく減少した。しかしながら、すべてのp21阻害遺伝子は、細胞がいまだに増殖停止していた場合に、および、DNA複製および有糸分裂の再開の前に、IPTGの除去後12~16時間、その発現が再開した(図3B)。この解析により、p21阻害遺伝子の発現における変化が、p21誘導および放出の短期効果であって、細胞増殖停止および回復の結果ではなかったことを示唆している。

【0084】

要約すると、69個の遺伝子および3個のESTsが、p21誘導細胞内でダウンレギュレートされたとして、2.5~12.6の平衡ディファレンシャル発現で、cDNAマイクロアレイによって同定された(表IA);細胞周期進行に関連し、IPTG処理細胞においてダウンレギュレートされたとして、本発明者らの分離アッセイによって同定された、5つのさらなる遺伝子を表IBに列記している。cDNAアレイによって同定されたダウンレギュレートされた遺伝子(69のうち43)の著しく高い画分が、有糸分裂、DNA複製、分離および修復およびクロマチンアセンブリに関連し、このことは、遺伝子発現のp21媒介阻害の、非常に選択的な特性を示唆している。

【0085】

p21-ダウンレギュレート遺伝子のもっとも大きな群は、有糸分裂のシグナル伝達、実行および制御に関与しているものである。多くのp21阻害遺伝子は、DNA複製および分離、クロマチンアセンブリおよびDNA修復に関連している。これらの遺伝子のいくつかは、ヌクレオチド生合成に関連する酵素をコードしており、他のタンパク質はDNA複製に関連している。いくつかのp21-阻害遺伝子は、DNA修復に関連している。これらの結果は、治療的介入のための標的であり得る、p21誘導増殖停止の細胞プログラムの成分を発見するための機会を示唆している。

【0086】

2. p21によって誘導される遺伝子発現

p21発現によって抑制される遺伝子に加えて、上記アッセイは、p21によって誘導される遺伝子を検出した。p21誘導遺伝子の遺伝子発現のパターンを図3Cに示している。p21阻害遺伝子に対して、p21アップレギュレート遺伝子は、その発現を、IPTG添加後、すなわちすべての細胞における増殖停止の開始後、わずか48時間のみで増加させた。試験した遺伝子のただ一つ、組織トランスグルタミナーゼ(t-TGase)が、IPTGの添加後12時間で検出可能な増加を示したが、その発現は、わずか48時間までには最大に達した(図3Cにて示されている)。さらに、すべての試験した遺伝子(t-TGase以外)の発現の上昇が、IPTGからの放出後少なくとも3日間、細胞周期の回復のかなり後において、持続した(示していない)。この「遅延応答(late response)」速度論は、そのような遺伝子のp21誘導が、p21媒介増殖停止に関連した、遅延効果であることを示唆した。

【0087】

48の既知の遺伝子および6つのESTsまたは未知の機能を持つ遺伝子が、2.0~7.8の平衡ディファレンシャル発現で、p21誘導細胞内でアップレギュレートされたとして、同定された(表II)。この群中の、非常に高い画分(20/48)の同定可能な遺伝子は、細胞外マトリックス(ECM)成分(たとえばフィブロネクチン1、ラミニン2、Mac-2結合タンパク質)、他の分泌タンパク質(たとえばアクチビンA、結合組織増殖因子、血清アミロイドA)、またはECMレセプター(インテグリン3のような)をコードしている。これらの分泌タンパク質のいくつか、ならびに大きな群のp21誘導細胞内タンパク質(表II)が、異なる形態のストレス応答にて誘導されること、または、ストレス関連シグナル伝達において役割を果たすことが、知られている。注目すべきことに、p21によって誘導されることがわかった多くの遺伝子がまた、細胞老化、生物加齢、または、異なる加齢関連疾患においてアップレギュレートされ、このことは、

p 2 1 媒介遺伝子誘導の抑制が、そのような疾患の発生を予防するための方法を提供することを示唆している。以下の実施例 5 にて開示されるように、いくつかの p 2 1 誘導遺伝子は、パラクリン抗アポトーシス活性およびマイトジェン活性を持つ分泌因子をコードしており、p 2 1 誘導細胞からのならし培地が、p 2 1 アップレギュレート遺伝子の特性から予測される 2 つの生物学的効果、すなわち、細胞増殖の刺激およびアポトーシスの抑制を示している。この発見は、p 2 1 の「パラクリン」効果が、近接細胞における腫瘍促進効果を介して、発癌に關与する可能性があることを示唆している。このことは、p 2 1 媒介遺伝子誘導の抑制がまた、抗発癌効果を達成するための方法を提供する可能性を上昇させる。

【 0 0 8 8 】

10

実施例 4 I P T G 処理および血清飢餓 H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞と比較することによる、p 2 1 誘導の特異性の同定

細胞増殖停止の結果である可能性のある、細胞遺伝子発現における p 2 1 誘導変化の同定を、以下のように決定した。

【 0 0 8 9 】

増殖停止（休止）は、細胞を、血清フリー培地中で 4 日間培養することにより生成した血清飢餓によって、H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞中で誘導された。血清飢餓細胞内では、I P T G 処理 H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞とは違い、細胞は、老化形態を発達させず、ただ非常に弱い S A - g a l 発現を示した。血清飢餓細胞内での p 2 1 レベルは、I P T G 処理細胞内で見られる 1 5 ~ 2 0 倍の増加に対して、ただ約 2 倍増加した。図 3 D は、血清フリー培地中で 4 日後、または 5 0 μ M I P T G の存在下 3 日後に増殖停止した、H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞中の p 2 1 - 阻害遺伝子および p 2 1 - 誘導遺伝子の群の発現の、上述したように実施した R T - P C R 解析を示している。培養培地が 5 0 μ M I P T G を含んだ場合に、H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞内で完全に阻害された遺伝子はまた、血清飢餓細胞においても阻害されたが、しかし、これらの遺伝子のほとんどは、I P T G 処理細胞内においてよりも、より低い程度に阻害された。

20

【 0 0 9 0 】

その発現が p 2 1 によって誘導される遺伝子は、3 つの異なるパターンを示した。第一の群は、その発現が、老化細胞においてと同様に強く、停止細胞において誘導される、遺伝子である。これらには、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、補体 C 3 およびプロサポンが含まれ、このことは、その誘導が、細胞増殖停止の結果であること、または、そのような遺伝子は、わずかに上昇した p 2 1 レベルに非常に感受性であったことを示唆している。第二の群は、停止細胞においてアップレギュレートされたが、しかし、老化細胞内においてと同様の強さではない遺伝子である。これらの遺伝子には、フィブロネクチン - 1、M a c 2 結合タンパク質およびアルツハイマー前駆タンパク質血清アミロイド A が含まれる。第三の群は、停止細胞では検出可能なほど誘導されないが、老化細胞で強く誘導されている、遺伝子である。これらの遺伝子には、C T G F、プラスミノゲン活性剤インヒビター 1、組織トランスグルタミナーゼまたはナチュラルキラー細胞マーカータンパク質 N K 4、インテグリン 3 およびアクチビン A が含まれる。

30

40

【 0 0 9 1 】

p 2 1 の I P T G 誘導過剰発現を介した、血清飢餓および細胞老化による、停止の誘導に対する特定の遺伝子の応答の間の差違が、これらの遺伝子を、老化の診断マーカーとして同定した。さらに、新規の老化マーカーが、p 2 1 発現細胞および停止細胞間でのその発現を比較することによって、同定可能である。

【 0 0 9 2 】

実施例 5 マイトジェン因子を含む、ならし培地の生成とマイトジェン活性アッセイ

いくつかの p 2 1 アップレギュレート遺伝子（表 I I ）は、C T G F（B r a d h a m ら、1 9 9 1、J . C e l l B i o l . 1 1 4 : 1 2 8 5 ~ 1 2 9 4）、アクチビン A

50

(Sakuraiら、1994、J. Biol. Chem. 269:14118~14122)、エピセリン/グラニューリン(Shoyabら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7912~7916)およびガレクチン-3(Inoharaら、1998、Exp Cell Res. 245:294~302)を含む、増殖因子として作用する分泌タンパク質をコードしている。さらに、ガレクチン-3(Akahaniら、1997、Cancer Res. 57:5272~5276)およびプロサボシン(Hiraiwaら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4778~4781)が、抗アポトーシス活性を持つことが示された。パラクリン抗アポトーシス活性またはミトジェン活性はまた、cDNAマイクロアレイハイブリッド形成における、その平衡ディファレンシャル発現値が1.8~1.9であるので、表IIで列記されていないいくつかのp21誘導可能遺伝子産物に関する報告されてきた。これは、本発明者が、この表の中に含めるために、またはRT-PCRによって確認するために使用した、任意に選択した最小値2.0より低い。これらのタンパク質は、クラスチリン(Koch-Brandt and Morgans、1996、Prog. Mol. Subcell. Biol. 16:130~149)、プロスタサイクリン刺激因子(PSF)(Yamauchiら、1994、Biochem. J. 303:591~598)、血管内皮増殖因子C(VEGF-C)(Joukovら、1996、EMBO J. 15:290~298)、ゲルソリン(Ohtsuら、1996、EMBO J. 16:4650~4656)およびメタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター(TIMP-1)(Liら、1999、Cancer Res. 59:6267~6275)である。

【0093】

p21による分泌ミトジェン因子および抗アポトーシス因子の誘導を確認するために、IPTG処理HT1080 p21-9細胞からのならし培地を、細胞増殖およびアポトーシスにおいて効果を有するかどうかを調査するために試験した。これらの実施形態において、ならし培地を、DMEM/10%FCSの存在下で、15cmプレートあたり 10^6 HT1080 p21-9細胞をプレATINGすることにより、調製した。次の日、IPTGを50 μ Mの最終濃度で加え、この培地を3日後に、0.5%FCSおよび50 μ M IPTGを添加したDMEMで置換した。2日後(IPTG処理の3~5日目)に、このならし培地を回収し、使用前15日まで、4にて保存した。コントロール培地を、IPTG処理細胞と同様の密度まで増殖した未処理細胞に、IPTGフリーDMEM/0.5%FCSを加えることにより、および、その2日後に培地を回収することにより、調製した。

【0094】

遅増殖ヒト繊維肉腫細胞株HS15.Tを使用して、これらのならし培地中でのミトジェン活性を検出した。ミトジェン活性アッセイに関して、両方の型のならし培地、ならびに、新鮮な培地、ならびに、ならし培地および新鮮な培地の1:1混合物を使用して、ミトジェン活性を試験した。これらの実験において、ならし培地に、1%または2%FCSを加えた。簡単に記すと、HS15.T細胞を、1ウェルあたり15、000細胞にて、12ウェルプレートにまいた。2日後、これらの細胞を異なる型の培地中で培養した。細胞を、60時間ならし培地で培養し、3.13 μ Ci/mlの濃度の³H-チミジンを加え、24時間インキュベートした。ついで細胞を回収し、その³H-チミジン取り込みを、Moscaら(1992、Mol. Cell. Biol. 12:4375~4383)によって記述されたように測定した。

【0095】

新鮮な培地へのIPTGの添加は、このアッセイでは何の効果もなかった。未処理HT1080 p21-9細胞からの、新鮮な培地およびならし培地における細胞増殖間で、有意な差はなかった。対照的に、IPTG処理細胞からのならし培地は、3倍まで³H-チミジン取り込みが増加した。IPTG処理細胞からのならし培地によるHS15.Tの増殖刺激もまた、メチレンブルー染色によって検出可能であった。

【0096】

アポトーシスにおけるこのならし培地の効果もまた測定した。これらの実験では、マウス胎児繊維芽細胞株C8を用い、E1Aによって不死化した。この細胞株は、血清飢餓(Loweら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2026~2030)を含む、異なる刺激によって誘導されたアポトーシスに対して非常に感受性である(Loweら、1994、Science 266:807~810; Nikiforovら、1996、Oncogene 13:1709~1719)。アポトーシスは、6cmプレートあたり 3×10^5 C8細胞をまき、そして、次の日に、0.4%血清を添加した新鮮な培地で、または、ならし培地(新鮮な血清は加えない)で、前記培地を置換することにより、解析された。DNA含量解析およびDAPI染色を、24時間後および48時間後に実施し、関連する細胞の数を、低血清培地中で、48時間後に、メチレンブルー染色(Perryら、1992、Mutat. Res. 276:189~197)によって測定した。

【0097】

低血清の新鮮な培地、または、IPTG処理または未処理細胞からのならし培地の添加は、DAPI染色後に大部分の細胞にて検出可能な、細胞分離およびアポトーシス形態によって証明されたように(示していない)、C8細胞においてアポトーシスを急速に誘導した。しかしながら、IPTG処理細胞からのならし培地は、48時間後に結合したままであった細胞のメチレンブルー染色によって測定されたように、新鮮な培地および未処理細胞からのならし培地と比較して、細胞生存を強く増加させた。p21誘導細胞からのならし培地の効果は、培地交換の24時間後および48時間後、結合および浮遊C8細胞を併せて実施した、細胞DNA含量のFACS解析によって、いっそうより明らかであった。多くの他の細胞株と違って、C8細胞のアポトーシスは、少ない(sub-G1)量のDNAを持つ少しの細胞のみを生成し、G2/M DNA含量を持つ細胞の選択的な消失によって特徴づけられる(Nikiforovら、1996、上記)。IPTG処理細胞からのならし培地における血清飢餓細胞は、G2/M画分を保持し、血清リッチな培地中で増殖しているコントロール細胞に似ている、細胞周期プロファイルを示した。それ自身によるIPTGの添加は、C8細胞におけるアポトーシスにおいて何の効果もなかった。したがって、HT1080細胞中のp21誘導は、p21-非調節遺伝子の性質によって予想されるように、結果として、ミトジェン因子および抗アポトーシス因子の分泌となる。

【0098】

実施例6 誘導可能なp16^{Ink4A}またはp27^{Kip1}遺伝子を含む哺乳動物細胞の生成

誘導可能なCDKインヒビターp16^{Ink4A}(CDK4/6を選択的に阻害する; Serranoら、Nature 16、704~707、1993)、またはp27^{Kip1}(CDK2を選択的に阻害する; Blainら、1997、J. Biol. Chem. 272:25863~25872)を含む哺乳動物細胞株を、誘導可能なp21含有細胞株の生成のために実施例1で記述しように、一般的に生成した。細菌lacI遺伝子をコードし、および、マウスのエコトロピックレトロウイルスレセプターを発現している、組換え発現構築物を含むヒトHT1080繊維肉腫細胞株の組換え誘導体(HT1080 3' SS6; Chang & Roninson、1996、Gene 183:137~142)を使用して、誘導可能株を作製した。p16の誘導可能発現に関して、ヒトp16の471bpコード配列を含んでいるDNA断片を(参考文献にて組み込まれている、米国特許第5、889、169号にて記述されているような)、IPTG調節レトロウイルスベクターLNXR02(Chang & Roninson、1996、Gene 183:137~142)内にクローン化した。このレトロウイルスベクターは、レトロウイルス長末端繰り返しプロモーターの転写制御下で、細菌ネオマイシン耐性遺伝子(neo)を含み、G418(BRL-GIBCO)を用いて選別可能である。結果と

して得られたLNp16RO2と称する構築物を、図4にて概略的に描いた。p27の誘導可能発現に関しては、同様のLNp27RO2ベクター中にマウスp27 cDNA (NCBI RefSeq NM_009875)を持つ、ベクターLNp27RO2が、Kokontisら、1998、Mol. Endocrinol. 12: 941~953によって開発および記述され、Dr. N. Hay (University of Illinois at Chicago)によって本発明者らに提供された。

【0099】

LNp16RO2およびLNp27RO2構築物を、従来のレトロウイルス感染方法を用いて、個々に、HT1080 3' SS細胞内に導入した。感染細胞を、400 μg/ml G418 (BRL-GIBCOより入手)の存在下で細胞を培養することによって、選別した。LNp16RO2形質導入細胞のG418選別集団を、HT1080/LNp16RO2と命名した。この細胞集団を、2000年10月10日に、American Type Culture Collection (A.T.C.C)、Manassas, VAに委託し、受け入れ番号PTA-2580を得た。

【0100】

この細胞集団をサブクローン化し、20個のクローン細胞株を単離し、IPTG誘導増殖阻害に関して試験した。もっとも強い増殖阻害を示している細胞株をHT1080 p16-5と命名した。この細胞株を、2002年1月31日にAmerican Type Culture Collection (A.T.C.C)、Manassas, VAに委託し、受け入れ番号PTA-4020を得た。図5Aは、50 μM IPTGの添加におけるHT1080 p16-5細胞の細胞周期分布の変化を示している。異なる細胞周期の位相の細胞画分を、Becton Dickinson FACS Sortを用いて、Jordanら(1996、Cancer Res. 56: 816~825)によって記述されたように、ヨウ化プロピジウムによる染色の後、DNA含量のFACS解析を用いて測定した。細胞周期分布は、IPTG処理の24時間後に安定化し、その時間までに、93%のIPTG処理細胞がG1で停止した。そのようなG1停止は、p16によるCDK4/6の阻害から予想される。

【0101】

同様に、LNp27RO2形質導入細胞のG418選別集団をサブクローン化し、38個のクローン細胞株を単離し、IPTG誘導増殖阻害に関して試験した。もっとも強い増殖阻害を示している細胞株をHT1080 p27-2と命名した。この細胞株を、2002年1月31日にAmerican Type Culture Collection (A.T.C.C)、Manassas, VAに委託し、受け入れ番号PTA-4021を得た。図5Bは、50 μM IPTGの添加におけるHT1080 p27-2細胞の細胞周期分布の変化を示している。細胞周期分布は、IPTG処理の24時間後に安定化し、その時間までに、89%のIPTG処理細胞がG1で停止した。そのようなG1停止は、p16によるCDK4/6の阻害から予想される。

【0102】

実施例7 p21誘導可能遺伝子の発現におけるp16およびp27の効果 40

実施例6で記述したようにIPTGにて誘導可能なp16またはp27遺伝子をもつ、HT1080誘導体、HT1080 p16-5およびHT1080 p27-2を、以下のように、遺伝子発現アッセイにて使用した。

【0103】

RNAをこれらの細胞株より得、3日間、50 μM IPTGの存在下または不存在下で培養した。ついでこれらのRNA試料を、 β -ミクログロブリンのかわりに β -アクトチンを正規化のために使用したことをのぞいて、基本的に実施例3にて上述したように実施されるRT-PCRにて使用した。p21によって誘導されると上記に示された18個の遺伝子を、これらの細胞のIPTG処理によって誘導されたp16またはp27遺伝子発現の効果に関して、解析した。試験した遺伝子には、誘導p21発現に関して上述した

ように、アルツハイマー病、アミロイド沈着症、関節炎、アテローム性動脈硬化症およびパラクリンアポトーシスおよびマイトジェン効果に関連した遺伝子が含まれた。p 16に関する結果を図6Aに、p 27に関する結果を図6Bに示している。すべての試験したp 21誘導遺伝子はまた、IPTG誘導p 16発現によって誘導され、試験した遺伝子のほとんどすべて(t - P AおよびCTGFを除く)もまたp 27によって誘導された。図6にて示した結果もまた、p 16またはp 27発現が、p 21発現における効果を検出しなかったことを示している。

【0104】

実施例8 p 21 応答性プロモーターによって発現したレポーター遺伝子を含む組換え発現構築物の生成

プロモーターレポーター構築物を、以下のように、NK4、SAA、補体C3(C C 3)、プロサポシン、APPおよびt - T G a s eを含む、いくつかのp 21誘導可能ヒト遺伝子のプロモーターより調製した。C C 3遺伝子のプロモーター領域を、C C 3 c D N A (V i k ら、1991、B i o c h e m i s t r y 30:1080~1085)の5'末端に隣接したものとして、ヒトゲノム配列内で同定した(N C B I受け入れ番号M 63423.1号)。NK4遺伝子のプロモーター領域を、NK4 c D N A (受け入れ番号M 59807号)の5'末端に隣接したものとして、ヒトゲノム配列内で同定した(受け入れ番号第A J 003147号)。先に記述されたSAA遺伝子のプロモーター(E d b r o o k e ら、1989、M o l . C e l l . B i o l . 9:1908~1916)を、ヒトゲノム配列内で同定した(受け入れ番号第M 26698号)。APP遺伝子のプロモーター領域を、APP c D N A (受け入れ番号第X M 009710号)の5'末端に隣接したものとして、ヒトゲノム配列中に同定した(受け入れ番号第X 12751号)。t - T G a s e 遺伝子のプロモーター領域を、t - T G a s e c D N A (受け入れ番号第M 55153号)の5'末端に隣接したものとして、ヒトゲノム配列内で同定した(受け入れ番号第Z 46905号)。プロモーター特異的D N Aのポリメラーゼ連鎖反応(P C R)増幅を、鋳型としてH T 1080 p 21 - 9細胞からのゲノムD N Aを用いて、実施した。P C Rを、P f u T u r b o D N Aポリメラーゼ(ストラタジーン)および表I I I aにて列記したプライマーセットを用いて実施した。各プライマーセットに対するP C R条件を表I I I bにて記述している。本実施例に開示されたように使用した遺伝子プロモーターを含む、C D Kインヒビターによって誘導されたいくつかの遺伝子からのプロモーター配列の増幅のための、プライマーセットを表I I I cにて列記している。

【0105】

P C R生成物を得、T O P O T Aクローニングベクター、p C R 2 . 1 / T O P O (S A A、C C 3、APPおよびt - T G a s eに対して)またはp C R I I / T O P O (NK4に対して)内にクローン化した。これらの構築物を、配列決定によって確認し、ついで、正しい方向でプロモーターを含んでいるK p n I - X h o I断片を、標準の組換え遺伝子技術(S a m b r o o k ら、上記)を用いて、ホタルルシフェラーゼ - レポーターベクターp G L 2 - b a s i c (P r o m e g a、M a d i s o n、W I)内のK p n IおよびX h o I部位内に挿入した。ホタルルシフェラーゼ発現を駆動している、480bpのプロサポシンプロモーターの配列を含むクローンは、S u n ら(1999、G e n e 218、37~47)にて記述され、D r . G r a b o w s k i (C h i l d r e n ' s H o s p i t a l M e d i c a l C e n t e r、C i n c i n n a t i、O H)より提供された。

【0106】

それぞれのプロモーター構築物に関するプラスミドクローンを、一過性トランスフェクションアッセイによって、p 21調節に関して試験した。H T 1080 p 21 - 9細胞の一過性トランスフェクションを、基本的にB i o - R a dプロトコールにおいて記述されたように、エレクトロポレーションによって実施した。各エレクトロポレーションに関

10

20

30

40

50

して、HT1080 p21-9細胞を、10% FC2血清が添加され、またペニシリン、ストレプトマイシンおよびグルタミンを含むDMEMを用いて、15cmプレートにおいて、95%コンフルエントまで増殖させた。ついで細胞をトリプシン処理し、DMEMまたはOpti-MEM培地(GibcoBRL)中に再懸濁させ、IEC HN-SII遠心分離機にて10分間、1,000rpmにてスピンドウンした。遠心分離に続いて、培地を吸引し、細胞を、1800万~2000万細胞/mlの濃度にて、再びOpti-MEM中に再懸濁した。400 μ lの再懸濁液(およそ700万~800万細胞)を、4cmギャップのエレクトロポレーションのキュベット(Bio-Rad)に移した。10~20 μ gのプロモータールシフェラーゼ構築物を細胞に加えた。いくつかの実験で、CMVプロモーターからの細菌-ガラクトシダーゼを発現しているコントロールプラスミドpCMVbgalを、正規化のために、1:10の比で混合液に加えた。他の実験では、正規化は、CMVプロモーターからのウミシイタケルシフェラーゼを発現しているベクターpRL-CMVを、1:20のモル比で加えることにより実施し、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性を、Dual Luciferase Assayキット(Promega)を用いて、同一の試料で測定した。エレクトロポレーションを、0.22ボルトにて、960 μ FDに設定した電気容量増強器を備える、Bio-Rad Gene Pulserを用いて実施し、27~30の値を得た。予備実験にて、エレクトロポレーション後の細胞生存および接着が、およそ33%であると測定された。細胞を、12ウェルプレートに、およそ50,000接着細胞/ウェルの開始濃度にて、三組で(in triplicate)まいた。細胞を3~6時間沈降させた後、培地を吸引し、50 μ M IPTGを含む、または含まない新鮮な培地で置換した。2~4日後、細胞を、リン酸緩衝生理食塩水にて2回洗浄し、300 μ lの1xPassive Lysis BufferまたはReporter Lysis Buffer(Promega)中に回収した。溶解物を短時間、10,000gにて遠心し、残余物を沈殿させ、50 μ l分液を、Firefly Luciferaseアッセイ(Promega)にて使用するために、新しいチューブに移した。ルシフェラーゼ活性を、Turner 20/20ルミノメーターを用いて、5秒遅延期間(delay period)および10~15秒統合時間(integration time)にて、52.1%感度で測定した。

【0107】

図7は、代表的な実験の結果を示している。形質導入細胞におけるp21-誘導の2~4日後、p21誘導遺伝子のプロモーター構築物からの発現は、NK4に関して約7.0倍、SAAに関して3.7倍、CC3に関して12.5倍、プロサポシンに関して3.0倍、APPに関して2.6倍、およびt-TGaseに関して2.3倍増加した。これらの結果は、そのプロモーターを調節することによって、p21がこれらの遺伝子の発現をアップレギュレートすること、および、そのような遺伝子のプロモーター構築物は、遺伝子発現のp21媒介調節に関してアッセイするために使用可能であること、を示唆している。そのようなアッセイは、実施例9にて以下で記述したように、p21媒介遺伝子活性化を阻害する化合物を同定するために使用可能である。

10

20

30

40

【表 I I I a】

表IIIa. プライマー配列

プロモーター	センスプライマー(5' → 3')	アンチセンスプライマー(5' → 3')
CC3	GCTAAGAGGATATTGACATTAGA CAGG (SEQ ID NO: 21)	AGGGGGAGGTGGGTTAGTAG (SEQ ID NO: 22)
NK4	TGGAGCTAGAAGAGCCCGTAGG (SEQ ID NO: 23)	GCCAAAAGTTCAAGGAGCCAA (SEQ ID NO: 24)
SAA	CAGAGTTGCTGCTATGTCCACCA (SEQ ID NO: 25)	CACTCCTTGIGTGCTCCTCACC (SEQ ID NO: 26)
βAPP	TTGCTCCTTTGGTTCGTTCT (SEQ ID NO: 27)	GCTGCCGAGGAAACTGAC (SEQ ID NO: 28)
t-TGase	CCCAGGGAGAAATATCCACTGAA GCAAC (SEQ ID NO: 29)	TCGGGCGGGGGCGGTGGCTCCT TCCACT (SEQ ID NO: 30)

10

【表 I I I b】

表IIIb. PCR条件

プロモーター	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物サイズ
CC3	95°, 1 min	63°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	31	1018 bp
NK4	94°, 1 min	65°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	877 bp
SAA	94°, 1 min	68°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	1000 bp
βAPP	94°, 1 min	62.9°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	30	623 bp
t-TGase	94°, 1 min	66.5°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	33	1600 bp

20

30

p 2 1 調節ルシフェラーゼ発現にて安定に形質導入した細胞株を開発するために、実施例 8 にて記述され、p L u N K 4 と称される、N K 4 プロモータールシフェラーゼ構築物を、選別可能マーカーとして、ピューロマイシン N - アセチルトランスフェラーゼをもつ p B a b e P u r o とのコトランスフェクションによって、I P T G 誘導 p 2 1 をもつ、H T 1 0 8 0 p 2 1 - 9 細胞に導入した。形質導入は、1 0 : 1 比の p L u N K 4 および p B a b e P u r o を用いて、L I P O F E C T A M I N E 2 0 0 0 (L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) を使用して実施した。安定なトランスフェクタントを、5 日間、1 μ g / m l のピューロマイシンを用いて、選別した。5 4 個のピューロマイシン耐性細胞株を単離し、5 0 μ M I P T G の存在下または不存在下、(L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m , P r o m e g a を用いて) ルシフェラーゼ活性に関して試験した。

【 0 1 0 8 】

本アッセイは以下のように実施した。細胞を、ペニシリン / ストレプトマイシン、グルタミンおよび 1 0 % ウシ胎仔血清 (F C S) を含む 1 m l の培地中で、1 2 ウェルプレートにて、4 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの密度でまいた。接着後、細胞を、異なる時間、5 0 μ M I P T G にて処理するか、または処理せずに静置した。ついでルシフェラーゼ活性を、上記実施例 8 にて記述したように測定した。追加分液を細胞溶解物より除去し、B i o - R a d タンパク質アッセイキット (B r a d f o r d a s s a y) を用いて、タンパク質濃度を測定した。各試料に関するルシフェラーゼ活性を、タンパク質含量に対して正規化し、ルシフェラーゼ活性 / μ g タンパク質として表した。すべてのアッセイは三組で行い、平均および標準偏差として表示した。

【 0 1 0 9 】

5 4 のうち 2 1 の試験細胞株が、測定可能なルシフェラーゼ活性を示したが、ただ 1 つの細胞株、H T 1 0 8 0 L u N K 4 p 2 1 と命名されたもののみが、I P T G 不存在下においてよりも存在下において、より高いルシフェラーゼ発現を示した。p 2 1 L u N K 4 細胞株で実施したアッセイの結果を、図 8 A および 8 B で示している。図 8 A は、I P T G 処理の 2 4 時間後の、ルシフェラーゼ発現の I P T G 用量依存性を示しており、図 8 B は、5 0 μ M I P T G の添加における、ルシフェラーゼ発現の時間経過を示している。この解析によって、ほとんどの誘導は、5 μ M ほどの I P T G を使用して、1 7 時間ほどの短い処理時間で実施可能であることが示されている。

【 0 1 1 0 】

これらの結果は、p L u N K 4 レポーター構築物が、レポーター遺伝子転写の p 2 1 誘導に対して応答性である、安定に形質導入した細胞株を生成するために使用可能であることを、示している。そのような構築物および細胞は、p 2 1 媒介遺伝子活性化を阻害する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイに対して基礎を提供する。ルシフェラーゼ誘導で必要である比較的短い時間 (約 1 7 時間) 、ならびに、I P T G 処理細胞内での言明された (およそ 3 倍) ルシフェラーゼレベルの増加により、L u N K 4 p 2 1 細胞株が、p 2 1 の誘導効果を阻害しうる化合物のハイスループットスクリーニングに好適となる。同様の (そして潜在的によりよい) 誘導性を持つ他の細胞株もまた、L u N K 4 p 2 1 を誘導するために使用される、本明細書で開示した方法を介して開発しうる。実施例 8 にて記述された結果は、同型のスクリーニングがまた、安定に形質導入した細胞株よりむしろ、p 2 1 誘導可能遺伝子のプロモーター構築物での一過性トランスフェクションアッセイを用いて実施可能であることを示している。ルシフェラーゼ発現に基づくハイスループットスクリーニングに関する方法は、本技術分野でよく知られている (一過性トランスフェクションに基づくアッセイの最近の例に関しては、S t o r z ら、1 9 9 9、A n a l y t . B i o c h e m . 2 7 6 : 9 7 ~ 1 0 4 を、および、安定に形質導入した細胞株に基づくスクリーニングの例に関しては、R o o s ら、2 0 0 0、V i r o l o g y 2 7 3 : 3 0 7 ~ 3 1 5 を参照のこと) 。これらの細胞およびアッセイを使用して同定した化合物は、加齢関連遺伝子の p 2 1 媒介誘導を阻害するか、または予防することが可能である治療的薬剤を開発するために有用である。

【0111】

実施例10 一過性トランスフェクションアッセイにおいて、p21媒介誘導を阻害するための、NF Bおよびp300/CBPインヒビターの使用

p21誘導可能遺伝子のプロモーター配列の実験により、NK4を含む、これらのプロモーターの多くが、既知のまたは潜在的なNF B結合部位を含むことが示された。スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)(Jonesら、1997、Mol. Cell. Biol. 17:6970~6981)、t-TGase(Mirzazら、1997、Amer. J. Physiol. 272:G281~G288)、アルツハイマー - アミロイド前駆体タンパク質(APP)(Grilliら、1996、J. Biol. Chem. 271:15002~15007)および炎症性タンパク質血清アミロイドA(SAA)(Jensen and Whitehead、1998、Biochem J. 334:489~503)を含む、いくつかのp21誘導遺伝子が、NF Bによって正に制御されることが知られている。p21は、一過性トランスフェクション実験によって、ヒト免疫不全ウイルスにおいて、NF B依存性転写を活性化することがすでに示されてきており(Perkinsら、1997、Science 275:523~527)、このことは、ウイルスの長末端繰り返し(配列番号85)に存在するHIVプロモーターが、NF Bに応答性であり、NF Bにより調節されていることを示唆している。p21のこの効果は、転写補助因子p300およびCBPの刺激によるものと示されており(Perkinsら、1997、Science 275:523~527)、p300/CBPまたは関連する転写補助因子の活性化が、いくつかのアプレギュレートされた遺伝子におけるp21の効果の原因である可能性がある。したがって、NF Bまたはp300/CBPのインヒビターは、潜在的にp21による転写の誘導を予防する。

【0112】

HT1080 p21-9細胞におけるIPTG誘導可能p21発現が、NF Bの転写活性を刺激するかどうかを決定するために、本発明者らは、一過性トランスフェクションアッセイを使用して、ストラタジーンより市販されているプラスミドpNF B-Lucからのルシフェラーゼ発現における、p21誘導の効果調べてきた。このプラスミドは、5回タンデムリピートNF Bコンセンサス配列を含む人工プロモーターからのホタルルシフェラーゼを発現する。本発明者らはまた、配列番号80および83として同定されたプライマーを用いて、ただ1つのNF Bコンセンサス配列のみを含む同一のプロモーターのバージョンを、PCRにより作製した。これらの2つのプロモーターの配列は、配列番号78および79として同定される。

【0113】

これらのプロモーターを誘導するp21の能力を、異なるレベルまでp21を誘導する、異なる濃度のIPTGを使用して、実施例8にて記述したように、一過性トランスフェクションアッセイによって、試験した。図9Aおよび図9Bにて示したように、両方のプロモーターが、IPTGによる用量依存的誘導を示したが、IPTGによる活性の基底レベルおよび誘導倍率(fold induction)の両方は、5つのNF B部位を含むプロモーターにおいてさらに高かった。これらの結果は、p21が、本発明者らのシステムにおいて、NF B依存性転写を誘導すること、および、1つまたはそれ以上のNF B部位を含むプロモーターが、p21誘導可能細胞遺伝子のプロモーターの代替物として使用しうることを示唆している。

【0114】

pNF B-Lucからのルシフェラーゼ発現における、NF Bの遺伝的インヒビターの効果を評価するために、20μgの後者のプラスミドを、NF Bを選択的に阻害するI Bキナーゼのドミナント変異体を発現しているプラスミドMAD3(a.k.a. pRC/Akchin-HA-IKK)と、(モル比1:2で)混合した(DiDonatoら、1996、Mol. Cell. Biol. 16:1295~1304)(Dr. M. Karin、University of California San Di

e g oより提供された)。このプラスミドを以下、I K Kと呼ぶ。p N F B - L u cからのルシフェラーゼ発現におけるp 3 0 0 / C B P阻害の効果を決定するために、後者のプラスミドを、C - 末端欠損 { C R 2 (1 2 0 - 1 4 0) }のあるアデノウイルスE 1 Aタンパク質に関する切断遺伝子を発現しているベクターとともに、別のアッセイにて同様に混合した。C - 切断E 1 A (E 1 A C R 2と呼ぶ)は、p 3 0 0 / C B Pおよび関連因子(例えば、P C A F)を阻害することが知られているが、E 1 AのC - 末端ドメインの標的である、R bは阻害しない(Chakravartiら、1999、Cell 96:393~403)。陰性コントロールとして、p N F B - L u cを、C - 末端およびN - 末端 { N (2 - 3 6) }両方に欠損のあるE 1 Aの機能的に不活性な型であって、E 1 A N / C R 2と称されるものと混合した。E 1 A C R 2およびE 1 A N / C R 2構築物は、Dr. V. Ogrzyzko(NICHHD、NIH)によって提供された。I K K、E 1 A C R 2またはE 1 A N / C R 2とのp N F B - L u cの混合物を、実施例8で記述したように(p R L - C M Vプラスミドを正規化のためにさらに加えて)、エレクトロポレーションによってHT 1 0 8 0 p 2 1 - 9細胞内に形質導入した。エレクトロポレーション後、同数の形質導入した細胞を、3日間、50 μ M I P T Gで処理するか、または処理しなかった(三組で)。各形質導入試料にて、ホタルルシフェラーゼ活性を測定し、測定したウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した(I P T G不存在下)。

10

【0115】

本解析の結果を図9Cにて示している。陰性コントロール(E 1 A N / C R 2)と混合したp N F B - L u cは、I P T Gの存在下で15倍までの誘導を示し、このことは、HT 1 0 8 0 p 2 1 - 9細胞におけるNF B転写活性の増加を示している。p N F B - L u cを、I K Kインヒビターと混合することにより、I P T G処理または未処理細胞におけるルシフェラーゼ発現が、ほとんど完全になくなり、このことは、このインヒビターの効能を示している。E 1 A C R 2は、I K Kと同様であるが、より弱い効果を有し、このことは、HT 1 0 8 0 p 2 1 - 9細胞におけるNF B活性に関して、p 3 0 0 / C B Pが必要であることを意味している(図9C)。

20

【0116】

同一の解析を、6つのp 2 1誘導可能遺伝子に関して、プロモータールシフェラーゼ構築物を使用して実施した。S A Aに関する結果を図9Dに、プロサポシンに関しては図9Eに、A P Pに関しては図9Fに、t - T G a s eに関しては図9Gに、補体C 3に関しては図9Hに、そしてNK 4に関しては図9Iに示している。I K KおよびE 1 A C R 2の両方が、I P T Gの存在下で、試験したプロモーターすべての誘導を阻害し、このことは、p 2 1によるこれらのプロモーターの調節が、p 3 0 0 / C B PおよびNF Bを介して部分的に媒介されていることを示唆している。しかし、定量的には、これらのインヒビターの効果は、プロモーター間で変化する。S A A(図9D)およびNK 4(図9I)の試験したプロモーターのほとんどの、基底発現およびI P T G刺激発現の両方が、NF Bのものとはほぼ同じ強さで、I K KおよびE 1 A C R 2によって阻害される。一方で、これらのインヒビターは、プロサポシン(図9E)、A P P(図9F)、t - T G a s e(図9G)または補体C 3(図9H)のプロモーターからの基底発現においては、ほとんどまたは全く効果を持たないが、しかし、I P T Gの存在下で、これらのプロモーターの誘導を妨害した。しかしながら、I P T Gによるプロサポシンプロモーター(図9E)の誘導におけるI K Kの効果は、実質上、他のプロモーターのものよりも弱かった。

30

40

【0117】

これらの結果は、これらの因子の、p 2 1の効果への相対的寄与が、プロモーターによって変化する可能性があるけれども、p 3 0 0 / C B PおよびNF Bが、p 2 1によるすべての試験したプロモーターの誘導に関与することを、示唆している。

【0118】

50

実施例 11 p 2 1 媒介遺伝子誘導を阻害するための非ステロイド抗炎症剤の使用

臨床使用においてよく研究された NF- κ B インヒビターは、アスピリン、サリチル酸ナトリウムおよびスリダクなどの一定の非ステロイド抗炎症剤 (NSAID) である (Kopp and Ghosh, 1994, *Science* 265: 956~959; Yinら, 1998, *Nature* 396: 77~80; Yamamotoら, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 27307~27314)。上述の実施例 9 で説明した LuNK 4 p 2 1 細胞株を用いて、この細胞株において、NF- κ B 阻害活性をもつ NSAID によって、p 2 1 によるルシフェラーゼ発現の誘導が阻害されるかどうか、測定した。

【0119】

実質上実施例 9 で説明したように、ルシフェラーゼ分析を行なった。50 μ M の IPTG 存在下または不存在下で 16 時間インキュベーションした後、ルシフェラーゼ活性を測定し、続いて、20 mM のサリチル酸ナトリウム、1 mM のスリダク、または 10 mM のアスピリンの存在下または不存在下でさらに 20 時間処理した。さらに、NF- κ B を阻害しない 2 種の NSAID、インドメタシンおよびイブプロフェン (それぞれ 25 μ M) について試験した (Yamamotoら, 1999, 上記)。NSAID 濃度は、抗炎症性を示すのに必要な、患者の血清中でのそれらの薬剤の薬理的濃度に基づいて決定した (Yinら, 1998, 上記)。

【0120】

これらの分析結果を図 10 に示す。NSAID の存在下で、IPTG によりルシフェラーゼ発現がおよそ 3~4 倍増加したが、この誘導は、サリチル酸塩、スリダク、またはアスピリンの存在下では、完全にまたはほぼ完全に消失した。対照的に、インドメタシンおよびイブプロフェンでは IPTG によるルシフェラーゼ誘導に対する有意な違いは見られなかった。

【0121】

NF- κ B 阻害 NSAID が、NK 4 プロモーターからの転写の誘導だけでなく、内因性 p 2 1 誘導可能遺伝子の RNA 発現をも阻害することを測定するために、LuNK 4 p 2 1 細胞は 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 125、000 細胞をプレATING し、スリダク 250 μ M、500 μ M または 1 mM の存在下または不存在下で、48 時間 (p 2 1 誘導可能遺伝子の最大刺激に必要な時間; Changら, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4291~4296)、50 μ M の IPTG で処理し、または、処理しなかった。インキュベーションした後、Qiagen RNeasy Mini Kit を用いて細胞から RNA を抽出し、いくつかの p 2 1 誘導可能遺伝子の相対 RNA 濃度を、cDNA 正規化のために β -ミクログロブリンではなく β -アクチンを用いたことを除いて、本質的に Noonanら (1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7160~7164) に記載の方法で、逆転写 PCR (RT-PCR) により決定した。試験した遺伝子それぞれの PCR プライマー配列を、表 I Va に示す。PCR サイクルは次のとおりであった: 第一サイクルは、3 分間変性、2 分間アニーリング、および 2 分間伸長、そして残りのサイクルは、30 秒間変性; 30 秒間アニーリング; 1 分間伸長。PCR サイクルの温度条件および PCR 産物の大きさは表 I V b に示す。

【0122】

RT-PCR 解析の結果を図 11 に示す。NK 4 (そのプロモーターが、LuNK 4 p 2 1 細胞においてルシフェラーゼ発現をさせるのに用いられた) では、スリダクの添加は、IPTG 不存在下における遺伝子発現にほとんど影響を及ぼさなかったが、IPTG 存在下においては、すべてのスリダク濃度で、用量に依存した NK 4 RNA 濃度の減少がみられた。t-TGase RNA でも非常に似た結果が得られた。その他のすべての試験遺伝子では、IPTG 不存在下において、スリダクによる、用量に依存した遺伝子発現の増加がみられた。この作用の結果、スリダクの最高試験濃度 (1 mM) では、IPTG 存在下において遺伝子発現が減少しなかったが、それより低いスリダク濃度で

10

20

30

40

50

はIPTG作用の顕著な減少がみられた。特に、APP遺伝子に対しては、250 μMおよび500 μMのスリダクによりIPTG作用が減少したが、p66^{SHC}、CTGFおよびMac2結合タンパク質(Mac2-BP)遺伝子に対しては、250 μMスリダクによってのみ減少した。プロサポシンまたはスーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)のIPTG誘導RNA濃度においては、試験されたどのスリダク濃度でも、有意な減少はみられなかった。プロサポシンに対してスリダクによる影響がないことは、プロサポシンプロモーターに対するIKKインヒビターの中程度の効果に一致する(上記実施例10を参照のこと)。よって、適度な用量(250 μM)のスリダクにより、試験遺伝子のほとんどにおいてp21の転写誘導能が阻害される。

10

【表IVa】

表IVa. プライマー配列

遺伝子	センスプライマー(5' → 3')	アンチセンスプライマー(5' → 3')
NK4	AGCACCAGGCCATAGAAAGA (SEQ ID NO: 13)	GGTGTCAGCTCCTCCTTGTC (SEQ ID NO: 49)
T-TGASE	ACTACAACCTCGGCCCATGAC (SEQ ID NO: 50)	GCCAGTTTGTTCAGGTGGTT (SEQ ID NO: 61)
BAPP	CTCGTTCCTGACAAGTGCAA (SEQ ID NO: 62)	TGTTTCAGAGCACACCTCTCG (SEQ ID NO: 63)
P66 ^{SHC}	GAGGGTGTGGTTCGGACTAA (SEQ ID NO: 64)	GCCCAGAGGTGTGATTTGTT (SEQ ID NO: 65)
CTGF	GGAGAGTCCTTCCAGAGCAG (SEQ ID NO: 66)	ATGTCTTCATGCTGGTGACAG (SEQ ID NO: 67)
MAC2-BP	ACCATGAGTGTGGATGCTGA (SEQ ID NO: 68)	ACAGGGACAGGTTGAACTGC (SEQ ID NO: 69)
グラニューリン	ACCACGGACCTCCTCACTAA (SEQ ID NO: 70)	ACACTGCCCCTCAGCTACAC (SEQ ID NO: 71)
プロサポシン	CCAGAGCTGGACATGACTGA (SEQ ID NO: 72)	GTCACCTCCTTCACCAGGAA (SEQ ID NO: 73)
SOD2	CAAATTGCTGCTTGTCCTAAA (SEQ ID NO: 74)	CATCCCTACAAGTCCCCAAA (SEQ ID NO: 75)
B-アクチン	GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG (SEQ ID NO: 76)	TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG (SEQ ID NO: 77)

20

30

【表 I V b】

表IVb. PCR温度(°C)

遺伝子	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物サイズ
NK4	94	58	72	24	481
t-TGase	94	58	72	24	499
B-APP	94	58	72	20	500
p66 ^{shc}	94	58	72	22	514
CTGF	94	64	72	28	499
MAC2-BP	94	58	72	21	517
グラニューリン	94	64	72	25	446
プロサポシン	94	58	72	21	500
SOD2	94	58	72	23	505
β-アクチン	94	60	72	17	275

10

これらの結果により、p21誘導可能遺伝子のプロモーター由来のレポーター発現のp21媒介誘導の妨害に関する分析により、発癌性および加齢関連疾患に関連した遺伝子のp21媒介誘導を阻害する薬剤を同定することが可能であることが、実証された。特に、LuNK4p21細胞株を用いた、プロモーターに基づいた分析において効果的なインヒビターであるとして最初に同定された薬剤(スリダク)は、p21によるいくつかの加齢に関連する遺伝子の誘導を阻害することが分かった。これらの結果により、NF- κ Bインヒビターとして活性をもつNSAIDによって、CDKインヒビターによる加齢に関連する遺伝子の誘導を阻害できることも、さらに実証された。

20

【0123】

CDKインヒビターによる転写の誘導を阻害する薬剤は、アルツハイマー病、アミロイド沈着症および関節炎などの加齢関連疾患の化学防御、または進行を減速させるために、臨床的に有効でありうる。さらに、それらの化合物は、分泌された増殖因子(CTGFなど)の発現における効果により、癌の治療または予防において有用でありうる。事実、NF- κ B阻害活性をもつNSAIDの、利用できる臨床データは、これらの利用範囲を裏付けている。したがって、スリダク、アスピリンおよびサリチル酸塩を含む、いくつかのNSAIDは、結腸直腸癌および他の様々な種類の癌に対し化学防御的な有用性を持ち、結腸ポリープの消失を促進することが、明らかになっている(Leeら、1997、「アスピリンおよびその他の非ステロイド抗炎症剤の利用と癌進展の危険性(Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of cancer development)」: DeVitaら編、CANCER. PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY、Lippincott-Raven: Philadelphia、pp. 599~607に掲載)。アスピリンおよびその他のNSAIDの利用により、アルツハイマー病の危険性が減少することも明らかになっている(Stewartら、1997、Neurology 48: 626~632)。さらに、長期間のアスピリン治療によりアテローム性動脈硬化症の発生率が減少することも、さらに報告されている(Sloop、1998、Angiology 49: 827~832)。最後に、スリダクは、関節炎の治療において臨床的な効果が立証されている、最も一般的に使用されている薬剤の一つである(Brogdenら、1978、Drugs 16: 97~114)。NSAIDのこれらの有益な効果のいくらかは、シクロオキシゲナーゼ2インヒビターとしての活性にあるとされているが(Pennisi、1998、

30

40

50

Science 280:1191~1192)、本明細書に開示した結果から、これらの臨床的活性はまた、おそらくそれらの化合物のNF- κ B阻害活性による、p21誘導遺伝子発現の阻害に起因していることが示唆される。本発明の提供する分析およびスクリーニングシステムにより、当業者は、この活性を向上させるために様々なNSAID誘導体について試験することが可能になる。さらに、これらの結果から、癌および加齢関連疾患の化学防御または治療に利用する薬剤として、NF- κ Bおよびp300/CBPインヒビターといった一般的な種類を利用するための基礎が提供される。

【0124】

実施例12 p16およびp27によるp21誘導可能遺伝子のプロモーターの刺激

実施例7で実証したように、p21誘導可能遺伝子の発現もまた、その他のCDKインヒビター、p16^{Ink4A}およびp27^{Kip1}によりアップレギュレートされる。p21誘導可能遺伝子のプロモーターが後者のCDKインヒビターにより刺激されるかどうかを決定するために、pNF- κ B-Lucおよび実施例8に記載のプロモータールシフェラーゼ構築物のいくつか(SAA、NK4、補体Cおよびプロサポシン)を、実施例6に記載の、p16をIPTG誘導可能に発現しているHT1080誘導体(HT1080 p16-5)またはp27をIPTG誘導可能に発現しているHT1080誘導体(HT1080 p27-2)中に、形質導入した。対照として、p21をIPTG誘導可能に発現しているHT1080 p21-9細胞において、同一の分析を行なった。ついで、実施例8でp21誘導系について記載したように、これらのプロモーターの発現におけるIPTGの影響を分析した。NF- κ Bについて観察された誘導の特異性を、IKKインヒビターを用いたコトランスフェクションにより決定した。図12に示すように、すべての試験プロモーターは、p21によってだけでなく、p16およびp27によっても誘導された。NF- κ BインヒビターIKKは、プロサポシンを除くすべての試験プロモーターにおいて、3つのCDKインヒビターすべてに対し強い阻害作用を示したが、プロサポシンでは、IKKは3つのCDKインヒビターすべてに対し弱い効果しか見られなかった(図12E)。

【0125】

これらの結果から、p21誘導可能プロモーターは、p21によってだけでなく、p16およびp27などのその他のCDKインヒビターによっても活性化され、CDKインヒビターの影響はかなりの程度でNF- κ Bに媒介されていることが、示唆される。

【0126】

実施例13 ウイルス遺伝子プロモーターのp21誘導

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のプロモーターは、p300/CBP依存性の様式でp21により誘導可能であることが、以前に示されている(Perkinsら、1997、Science 275:523)。p21誘導性が異なるウイルスプロモーターにおいて一般的な性質であるかどうかを決定するために、霊長類のウイルス由来の、他の2つの完全プロモーターについて、p21誘導性、およびそのような誘導性のp300/CBPに対する依存の可能性を試験した。これらのプロモーターは、哺乳動物の発現ベクターにおいて一般に利用されているが、CMV(エンハンサーおよび早期プロモーター)およびSV40(早期エンハンサー/プロモーター)から得た。これらのプロモーターは、プロメガ社(Promega, Inc.)から入手し、レポーター遺伝子としてウミシイタケルシフェラーゼを発現している、pRL-CMVおよびpRL-SV40構築物中で試験した。

【0127】

pRL-CMVおよびpRL-SV40について、上記実施例1および2において説明したように、イソプロピル- β -D-チオ-ガラクトシド(IPTG)誘導可能p21発現をもつHT1080 p21-9細胞(ATCC、受け入れ番号PTA-1664)中に、一過性に形質導入することにより試験した。p300/CBPの役割を調べるため

に、p300/CBPおよびRbの両方を阻害する、アデノウイルスタンパク質E1Aを発現しているベクターを用いた。レポーター構築物をモル比1:2で、野生型E1A、Rb阻害に必要なCR2ドメイン欠失E1A変異体(E1A-CR2)、または、N-末端(p300/CBP阻害の原因であるE1Aタンパク質の一部)およびCR2欠失のE1Aの非機能的切断型(E1A-N/CR2)を発現している、pcDNA3ベクターと混合した(上記実施例10で開示したように)。

【0128】

形質導入後(上記実施例3で説明したように、エレクトロポレーションにより)、細胞を3日間、50 μ MのIPTGで処理し、または処理しなかった(三組で)。Promegaウミシタケルシフェラーゼ分析キットを用いて、ウミシタケルシフェラーゼ活性を測定した。この分析結果を以下の表に示す。

10

【表V】

表V

レポータープラスミド	この欄に表示されたものとトランスフェクト	50 μ M IPTG (+または-)	ウミシタケルシフェラーゼユニット(平均 \pm SD)	IPTGによる誘導倍率
pRL-CMV	E1A (w.t.)	-	671 \pm 3	
pRL-CMV	E1A (w.t.)	+	758 \pm 8	1.1
pRL-CMV	E1A Δ CR2	-	654 \pm 26	
pRL-CMV	E1A Δ CR2	+	927 \pm 9	1.4
pRL-CMV	E1A Δ N/ Δ CR2	-	915 \pm 7	
pRL-CMV	E1A Δ N/ Δ CR2	+	2970 \pm 100	3.2
pRL-SV40	E1A (w.t.)	-	326 \pm 3	
pRL-SV40	E1A (w.t.)	+	716 \pm 10	2.2
pRL-SV40	E1A Δ CR2	-	318 \pm 9	
pRL-SV40	E1A Δ CR2	+	1329 \pm 16	4.2
pRL-SV40	E1A Δ N/ Δ CR2	-	1308 \pm 8	
pRL-SV40	E1A Δ N/ Δ CR2	+	8433 \pm 109	6.4

20

30

上記の分析の結果により、CMVおよびSV40プロモーターの両方が、非機能的コントロール(E1A-N/CR2)との混合物中でp21により誘導されることが、実証された。p300/CBPを阻害する、野生型E1AおよびE1A-CR2の両方もまた、p21によるCMVプロモーターの誘導を阻害したが、しかし、p21が誘導されない場合に、このプロモーターの活性に対して大きな影響を与えなかった。野生型E1AおよびE1A-CR2もまた、p21誘導がある場合でも、ない場合でも、SV40プロモーターを強く阻害する。これらの結果から、CMVおよびSV40プロモーターの両方のp21誘導は、他のE1A結合タンパク質の役割を排除できないけれども、p300/CBPを必要とするであろう、ということが示唆される。CMVではなくSV40プロモーターはまた、その基底発現のために、p300/CBPまたはいくつかの他のE1A結合タンパク質を必要とする。

40

【0129】

したがって、異なる霊長類ウイルスの試験した3つのプロモーターのすべて(CMV、SV40および、Perkinsらにより1997年に試験されたHIV)が、p21による誘導を示した。興味深いことに、p21誘導は、ヒト細胞における最も一般的なストレス応答の一つであるが、ウイルス感染の結果しばしば起こるものでもある。例えば、C型肝炎ウイルスはp53非依存性の様式でp21発現を誘導し(Majumderら、2

50

001、J. Virol. 75:1401~7に開示)、B型肝炎ウイルス-Xタンパク質によりp21発現がアップレギュレートされる(Parkら、2000、Oncogene 19:3384)。p21の過剰発現もまた、ヒトT細胞リンパ親和性ウイルス1型-感染細胞において観察された(de La Fuenteら、2000、J. Virol. 74:7270)。CMV感染により、p21発現の一過性の増加が起こり、続いて感染の後期においてp21のダウンレギュレーションが起こる(Chenら、J. Virol. 75:3613)。Schmidt-Grimmingerら(1998、Am. J. Pathol. 152:1015)は、種々のパピロマウイルスに感染したヒト組織においてp21発現を観察し、p21誘導はウイルスDNAの複製を阻害する宿主応答である、と提案した。ウイルス遺伝子発現を増加させるためにこの宿主応答を利用することは、種々のウイルスにとって、合理的で一般的な進化の戦略であると思われる。

【0130】

これらの考察に基づいて、遺伝子発現のp21媒介誘導を妨害する化合物は、種々のウイルス性疾患の治療または予防において治療的に有益であると思われる。

【0131】

以上の開示は、本発明のある特定の実施例を強調しており、それに対して同等の改変または代替はすべて、添付の特許請求の範囲に記述の本発明の意図および範囲内であると理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0132】

【図1】図1は、ヒトHT1080線維肉腫細胞株変異体HT1080 p21-9を生成するために使用した、IPTG調節レトロウイルスベクターLNp21CO3の概略図である。

【図2】図2Aは、50μM IPTGの添加後のp21誘導の時間経過のグラフであり、p21レベルは、ELISAによって測定した。図2Bは、IPTG除去後の、p21減少の時間経過のグラフである。

【図3】図3Aは、RT-PCR実験のゲル電気泳動パターン(左)、細胞mRNA発現のノーザンプロット解析(中央)、および、表示した遺伝子の発現におけるIPTG誘導変化に関する免疫ブロッキングアッセイ(右)の写真である。C:コントロール未処理HT1080 p21-9細胞、I:50μM IPTGにて3日間処理した細胞。2-ミクログロブリン(2-M)を、RT-PCRに関する正規化のコントロールとして使用し、S14リボソームタンパク質遺伝子を、ノーザンハイブリダイゼーションに関して使用した。図3Bは、IPTG添加および放出における、表示したp21阻害遺伝子の発現における変化の時間経過を示している、RT-PCR実験のゲル電気泳動(左)および免疫ブロッキング解析(右)の写真である。図3Cは、IPTG添加における、表示したp21-誘導遺伝子の発現における変化の時間経過の、RT-PCR実験のゲル電気泳動パターン(左)およびノーザンハイブリダイゼーション解析(右)の写真である。

【図3D】図3Dは、未処理コントロールHT1080 p21-9細胞(C)、血清飢餓停止細胞(Q)およびIPTG処理老化細胞(I)における遺伝子発現の比較である。

【図4】図4は、ヒトHT1080線維肉腫細胞株変異体HT1080/LNp16RO2を生成するために使用した、IPTG調節レトロウイルスベクターLNp16RO2の概略図である。

【図5】図5Aおよび5Bは、50μM IPTGの添加における、HT1080 p16-5(図5A)またはHT1080 p27-2(図5B)細胞の、細胞周期分布における変化の図である。

【図6】図6Aおよび6Bは、HT1080 p16-5細胞におけるp16(図6A)またはHT1080 p27-2細胞におけるp27(図6B)のIPTG誘導発現において、表示した遺伝子の発現における、IPTG誘導変化を検出するための、RT-PCR実験のゲル電気泳動パターンの写真である。-:コントロール未処理細胞;+:50μM IPTGにて3日間処理した細胞。-アクチンを、RT-PCRについての正規化

のコントロールとして使用した。

【図7】図7は、表示したp21誘導可能遺伝子のプロモーターによって駆動される、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現における、HT1080 p21-9細胞におけるp21誘導の効果を図示している。アッセイは、一過性形質導入に続き、50 μM IPTGの存在下または不存在下で、培養の2日後（プロサポシンプロモーターに関して）、培養の3日後に（他のすべてのプロモーターに関して）、実施した。アッセイは、三組（プロサポシンに関して）、四組で（in quadruplicate）（他のすべてのプロモーターに関して）実施した。

【図8】図8Aおよび8Bは、IPTG処理の24時間後、LuNK4 p21におけるルシフェラーゼ発現のIPTG用量依存（図8A）、および50 μM IPTGの添加におけるルシフェラーゼ発現の時間経過（図8B）を示しているグラフである。

【図9】図9A～9Iは、NF B依存性プロモーターによって（図9A～9C）、または表示したp-21誘導可能遺伝子のプロモーターによって（図9D～9I）駆動される、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現におけるHT1080 p21-9でのp21誘導の効果を例示している。図9C～9Iでの実験において、プロモーターレポーター構築物を、NF Bのドミナントインヒビター（IKK）、p300/CBPを阻害するC切断E1A変異体（E1A CR2）、または、E1Aの非機能的N-およびC-切断型（E1A N/CR2）を発現しているベクターと、モル比1：2で混合した。ルシフェラーゼレベルを、図9Aおよび9Bにおいては表示した濃度で、他のすべての図では50 μMにて使用した、IPTGの存在下または不存在下で、3日後に測定し、そして、IPTGの不存在下においてコトランスフェクトpRL-CMVプラスミドから発現したウミシイタケルシフェラーゼのレベルによって、または、（図9Eにおいて）細胞タンパク質レベルによってのいずれかにより、正規化した。実験は三組で行った。

【図10】図10は、IPTGの存在下または不存在下において、および、異なる量のNSAIDとインキュベートした、LuNK4 p21細胞におけるルシフェラーゼ活性の棒グラフである。

【図11】図11は、異なる量のスリダクによる表示した遺伝子の発現における、IPTG誘導変化の阻害を検出するための、LuNK4 p21を用いた、RT-PCR実験のゲル電気泳動パターンの写真である。 -アクチンを、RT-PCRについての正規化のコントロールとして使用した。

【図12】図12A～12Eは、NF B依存性プロモーターによって（図12A）、または、表示したp21誘導可能遺伝子のプロモーターによって（図12B～12E）駆動される、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現における、HT1080 p16-5細胞でのp16誘導、HT1080 p21-9細胞でのp21誘導、HT1080 p27-2細胞でのp27誘導の効果、および、そのような誘導におけるNF Bのドミナントインヒビター（IKK）の効果を図示している。IPTGまたはコトランスフェクトしたIKKが存在するか、またはしないかを、各実験に関して示している。ルシフェラーゼレベルを、IPTGの存在下または不存在下で、3日後に測定し、そして、コトランスフェクトしたpRL-CMVプラスミドから発現したウミシイタケルシフェラーゼのレベルによって、正規化した。

【表 I】

Table I

p21 誘導によってダウンレギュレートされた遺伝子

A. UniGemVアレイによって同定されたp21阻害遺伝子:

遺伝子	受け入れ 番号	平衡ディファレンシャル 実験	確認した 方法 ^(a)
有糸分裂に関連するもの:			
CDC2	X05360	2.5	R, W
CKsHs1 (CDC2 kinase)	X54941	5.5	R
PLK1 (polo-like kinase)	U01038	5.1	R, W
XCAP-H condensin homolog	D38553	6	R
CENP-A (centromere protein A)	U14518	5.3	R
CENP-F (centromere protein F)	U30872	2.5	R
MAD2	U65410	6.6	R, W
BUBR1	AF053306	5.9	R
MCAK (mitotic centromere-associated kinesin)	U63743	3.8	R
HSET kinesin-like protein	AL021366	3.6	R
CHL1 helicase	U75968	3.3	R
AIK-1 (aurora/IPL1-related kinase)	D84212	4.6	R
AIM-1 (AIK-2; aurora/IPL1-related kinase)	AF004022	10.2	R
PRC1 (protein regulating cytokinesis 1)	AF044588	12.6	R, W
Citron kinase	H10809	2.7	R
Lamin B1	L37747	7	
Lamin B2	M94362	2.7	
LAP-2 (lamin-associated protein 2)	U18271	4.6	R
MPP2 (M phase phosphoprotein 2)	U74612	3.7	R
MPP5 (M phase phosphoprotein 5)	X98261	3.7	
DNA複製、分離およびクロマチンアセンブリに関連するもの:			
Thymidine kinase 1	K02581	2.9	R
Thymidylate synthase	X02308	3.9	R
Uridine phosphorylase	X90858	2.5	
Ribonucleotide reductase M1	X59543	4.6	R
Ribonucleotide reductase M2	X59518	10.7	R
CDC47 homolog (MCM7)	D55716	9.6	R
CDC21 homolog (MCM4)	X74794	2.7	R
CDC45 homolog (Perc-PI)	AJ223728	4.1	R
HsORC1 (origin recognition complex 1)	U40152	2.7	R
DNA polymerase α	X06745	2.8	R
Replication factor C (37-kD subunit)	M87339	2.6	
B-MYB	X13293	9.1	
HPV16 E1 protein binding protein	U98131	3.7	
Topoisomerase II α	JQ4088	8.6	R
Chromatin assembly factor-I (p60 subunit)	U20980	2.7	R
High-mobility group chromosomal protein 2	X62534	3.7	R
High-mobility group chromosomal protein 1	D63874	3.6	R
Histone H2A.F/Z variant	AA203494	2.8	
DNA修復に関連するもの:			
XRCC9	U70310	3.6	R
RAD54 homolog	X97795	5.4	R
HEX1 5'-3' exonuclease (RAD2 homolog)	AF042282	5.2	R
ATP-dependent DNA ligase I	M36067	2.5	R
RAD21 homolog	D38551	2.9	R

10

20

30

40

Table I

転写およびRNAプロセシングに関連するもの:

Putative transcription factor CA150	AF017789	2.8		
Transcriptional coactivator ALY	AF047002	3.3		
WHSC1/MMSET (SET domain protein)	AA401245	2.9		
NN8-4AG (SET domain protein)	U50383	2.8		
EZH2 (enhancer of zeste homolog 2)	U61145	2.8		
PTB-associated splicing factor	X70944	2.5		
AU-rich element RNA-binding protein AUF1	U02019	2.8		
U-snRNP-associated cyclophilin	AF016371	2.8		

その他の遺伝子:

3-phosphoglycerate dehydrogenase	AF006043	4.8		
L-type amino acid transporter, subunit LAT1	M80244	4.1	R	
Hyaluronan-mediated motility receptor	U29343	4		
Phorboln I (PKC-inducible)	U03891	3.9		20
PSD-95 binding family protein	D13633	3.7	R	
HTRIP (TNF receptor component)	U77845	3.6		
NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	X16396	3.4		
Membrane glycoprotein 4F2 antigen heavy chain	J02939	3.2		
Mucin-like protein	D79992	3.2		
MAC30 (differentially expressed in meningiomas)	L19183	2.9		
P52rIPK (regulator of interferon-induced protein kinase)	AF007393	2.8		
Putative phosphoserine aminotransferase	AA192483	2.8		
Glucose 6-phosphate translocase	Y15409	2.7		
Calcyclin binding protein	AF067356	2.6		
Ornithine decarboxylase 1	X16277	2.6	R	
Trophinin assisting protein (tastin)	U04810	2.5		
Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase	L21934	2.5		
Pinin/SDK3	Y10351	2.5		30

未知の機能を持つ遺伝子:

EST	AA975298	2.7		
EST	AA034414	2.5		
EST	AA482549	2.5		

B. RT-PCRによって同定されたp21阻害遺伝子:

遺伝子	受け入れ番号	UniGemVの結果 ^(b)	
Cyclin A1	U66838	IS	
Cyclin B1	M25753	IS	
CDC25A	NM_001789	A	
Dihydrofolate reductase	J00140	1.5	40
ING1	NM_005537	A	

^a略語: R、RT-PCR; W、ウエスタンブロットティング

^b略語: IS、不十分なシグナル; A、このアレイにおいては検出せず

【表 I I】

Table II

p21 誘導によってアップレギュレートされた遺伝子

遺伝子	受け入れ 番号	平衡ディファレン シャル実験	確認した 方法 ^(a)	
分泌タンパク質および細胞外マトリックスに関連したタンパク質:				
Fibronectin 1	X02761	5.7	R	
Plasminogen activator inhibitor, type I	M14083	3.7	R, N	
Plasminogen activator, tissue type	M15518	2.8	Z	
Laminin β2	X79683	2.1		
Desmocollin 2a/bb	X56807	3.5		
Podocalyxin-like protein	U97519	2		
Activin A (Inhibin βA)	J03634	2	R	
Galectin 3 (Mac-2)	AB006780	2.4	N	
Mac-2 binding protein	L13210	2	R, N	
Prosaposin	J03077	2.9	N	
CTGF (connective tissue growth factor)	M92934	3.3	N	20
Granulin/epithelin	AF055008	2.1	N	
Cathepsin B	L04288	2.4	N	
Tissue transglutaminase	M55153	2.5	R, N, W	
P37NB (slit homolog)	U32907	2.1		
Serum amyloid A protein precursor	M28152	4	R, N, W	
Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor	D87675	2	R, N	
Complement C3 precursor	K02765	5.9	R, N	
Testican	X73608	2.1	N	
Integrin β3	M35999	2.1	R, N	
リソソームタンパク質:				
N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	U06088	2.3	N	
Acid alpha-glucosidase	X55079	2.4	N	30
Acid lipase A (cholesterol esterase)	X76488	2.1	N	
Lysosomal pepstatin-insensitive protease (CLN2)	AF017456	2.5		
ミトコンドリアタンパク質:				
Superoxide dismutase 2	X07834	3.5	R, N, W	
Metaxin	J03060	3.4		
2,4-dienoyl-CoA reductase	U78302	2		
ストレス応答およびシグナル伝達に関連する他の遺伝子:				
Ubiquitin-conjugating enzyme (UbcH8)	AF031141	2		
Ubiquitin-specific protease 8	D29956	2		
RTP/Cap43/Drg1/Ndr1 (Inducible by nickel, retinoids, homocysteine and ER stress)	D87953	2.5		
C-193 muscle ankyrin-repeat nuclear protein (cytokine-inducible)	X83703	3		40
LRP major vault protein associated with multidrug resistance	X79882	2.2	N	
β-arrestin related HHCPA78 homolog (upregulated by vitamin D3)	S73591	4.1	N	
R-RAS	M14949	2.4		
RAB 13 small GTPase	X75593	2.2		
P66 SHC (ski oncogene)	U73377	2	N	
MK-STYX (MAP kinase phosphatase-like protein)	N75168	2		
H73 nuclear antigen/MA-3 apoptosis-related/TIS (topoisomerase-inhibitor suppressed)	U96628	2.4		

Table II

その他の遺伝子:

Natural killer cells protein 4	M59807	4.4	R	
TXK tyrosine kinase (T-cell specific)	L27071	3.8		
X-linked PEST-containing transporter	U05321	2.1		
AMP deaminase 2	M91029	2	N	10
FIP2/HYPL huntingtin-interacting protein	AF061034	2		
DNASE I homolog	X90392	2.5	N	
Transcription factor 11	X77366	2		
Histone H2A.2	L19779	2.8		
Histone H2B	AL021807	2.4		

未知の機能を持つ遺伝子:

23808	AF038192	2.1		
CGI-147	AA307912	2.1	N	
EST	W69120	2.8		
EST	AI026140	2.5		
EST	AA218982	2.4		
EST	W63684	2		20

^a略語: R、RT-PCR; N、ノーザンハイブリダイゼーション;
W、ウエスタンブロットイング; Z、ザイモグラフィー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Board of Trustees of the University of Illinois
 Poole, Jason
 Roninson, Igor

<120> Reagents And Methods For Identifying And Modulating
 Expression Of Genes Regulated By CDK Inhibitors

<130> 01-1156-B

<140> PCT/US02/
 <141> 2002-02-01

<150> US 09/861,925
 <151> 2002-05-21 10

<150> US 60/265,840
 <151> 2002-02-01

<160> *ATP*

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Human serum amyloid A (SAA) gene, 5' flank (AN: M26698) 20

<400> 1
 ttgccccaggc tgggacctcaa atttctgggt tcaagcaggc ctctctgctt ggccctcccaa 60
 gtagctggga catatggcac atgccaccat gctctggcca tttctaaatt gcttgtttgt 120
 ttgttattac aaatgcctag cccctcaggg tatgaacatg gactggagaa gaagaaacca 180
 gagttgctgc tatgtccacc agcctctctg catgtctctg cctcagcccc cctgggctct 240
 ggtactgacc catctctggc caccatgctc ctccataage ctctgcagag ctaatctgac 300
 cctgttgatg ttctcatgag agagtgatct gaatgcccc tgaaccctc cgtgataata 360
 cagcagacca agagctctcc cacccttccc tgcctggatg ctgggcacgt cccagctgg 420
 gctgcctatt taacgcacca cactctcatt ctcccaagggt ggggctccag gactaggctg 480
 gggcagcaga aagtccccct ctctacattg tocttggctc aggagccaac ttagaaaaag 540
 catttccaaa ttggctaagc cagcggagca gagattttct gtgctgagaa atatcaggac 600
 atccagaggg gtggaaggag gcttccaggg cacacatgag atgtggcagg ggtaggctgt 660
 ccgttttaaa gcttaaagct ttagacatga actcacaggg acttcagtca gggctcatctg 720
 ccatgtggcc cagcagggcc catcctgagg aatgaccgg tatagtcagg agctggetga 780
 agagctgcc tcactccaca ccttccagca gccaggtgc cgccatcacg gggctccac 840
 tggcatctct gcagctgcac ttcccccaat gctgaggagc agagctgac tagcacctg 900
 tccattgcc aaggcacgca aacctctott gttcccatag gttacacaac tgggataaat 960 40

gacccgggat gaagaaacca cggcatcca ggaacttgtc ttagatcagtttctgtag 1020
aatgacctgc agggactttc ccagggagc acatccagct tttcttcctt cccaagagac 1080
cagcaaggct cactataaat agcagccacc tctccctggc agacagggac ccgcagctca 1140
gctacagcac agatcagggtg aggagcacac aaggagtgat ttttaaaact tactctgttt 1200

<210> 2
<211> 1018
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Human complement C3 gene, exon 1 (AN M63423)

10

<400> 2
gatcaatatg aatatattat acacacagac acacacacag acacacacac acacacacac 60
acaaacaata caatttaata tccaaagagg atattgacat tagacaggta caaaagctct 120
agaaatgagg actttcctca gtgatgactt ttttcaccac caaagtcact caggcatcct 180
gacaagggta agtgagggga gcctccttgg aaaataaact cacttggata gtgaactcct 240
gcacatacct caaagcccat ctgaaatgtc cctcctaca ggaagtttcc cctgaccctc 300
caagaagcag agttctatth cactggggaa aacatttctt ctctctcttt tttttccctg 360
ccctgcacat gagctagaaa acatttcatg aaactgggag tttctgtgct gggctctgtc 420
cctcccccat tctacttccc ctccctcagc atggaagcct ctggaagtgg ggctctgact 480
cccagcctac agagagattc ctaggaagtg ttcgactgat aaacgcatgg ccaaagtga 540
actgggggat aggtccaaga catctgcggt ggggggttct ccagacctta gtgttcttcc 600
actacaaagt gggccaaca gagaaaggtc tgtgttcacc aggtggcctt gaccctggga 660
gagtccaggg caggggtcag ctgcattcat gctgctgggg aacatgcctt caggttactc 720
accccatgga catggttgcc ccagggactg aaaagcttag gaaatggtat tgagaaatct 780
ggggcagccc caaaagggga gaggccatgg ggagaagggg gggctgagtg ggggaaagca 840
gagccagata aaaagccagc tccagcaggc gctgctcact cctcccctcc ctctccctct 900
gtccctctgt ccctctgacc ctgcactgtc ccagcaccat gggaccacc ctaggtcca 960
gcctgctgct cctgctacta acccacctcc cctggctctt ggggagtccc atgtgagt 1018

20

30

<210> 3
<211> 687
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CTGF gene and promoter region (AN: X92511)

40

<400> 3
cgaatttttt aggaattcct gctggttgcc tcttcagcta cctacttcct aaaaaggatg 60

tatgtcagtg gacagaacag ggcaaaccta ttcgaaaag aaataagaaa taattgccag 120
 tgtgtttata aatgatatga atcaggagtg gtgcgaagag gatagggaaa aaaaaattct 180
 atttggtgct ggaaatactg cgcttttttt tttccttttt ttttttttct gcgagctgga 240
 gtgtgccagc tttttcagac ggaggaatgc tgagtgtcaa ggggtcagga tcaatccggt 300
 gtgagttgat gaggcaggaa ggtggggagg aatgcgagga atgtccctgt ttgtgtagac 360
 tccattcagc tcattggcga gcgcgcgcc cggagcgtat aaaagcctcg gcgcgccgcc 420
 ccaaaactcac acaacaactc ttccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca 480
 gtcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccgcccg gtcccggctc 540
 ccaccctcga ccaccgccag cgctccagc cccgcgctcc ccgctcgcgc ccaccgccgc 600
 ctcccgtccg ccgcgagtg caaccatgac cgcgccagc atggggcccc tccgcgtcgc 660
 cttcgtggtc ctctcgccc tctgcag 687

<210> 4
 <211> 584
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Intergin beta-3 subunit gene, promoter region (AN: L28832)

<400> 4
 aagcctggga tgtggtcttg cctcaacag gtaggtagtc taccggaaaa ccaactaag 60
 gcaagaaaaa aattagtgaa taataaagga ctgaaccggt tcagagaagg cattcagcag 120
 atgtttgccg gtcaaatgaa ttaaagtgtg aatgaatgaa actcagagta gtgggtgaat 180
 gtgtcccgaag aatccagcga aacagggtct ccaggaggc gggactggaa ggtccggag 240
 agggggccaca ggctcctggc ctttctaagc acaccaagtg cccagtcgcg gacccccggg 300
 accaggatgc gctgacgacc cggctggcag gcgggtcctc gtgggcgagg cgagggaggc 360
 ggcgagagag gagcaatagt ttcccaccgc tcctctcag gcgcagggtc tagagaagcg 420
 cgaggggcatc tagagaagcc ggaggggagg aagcgcgagc ccgcggcccg ccccgttgcg 480
 tcccaccac cgcgtcccct ccctcccct cccgctgcgg aaaagcggcc gcgggcggcg 540
 gcgcccactg tggggcgggc ggagcgcgc gggaggcggga cgag 584

<210> 5
 <211> 760
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Activin beta-A gene, regulatory sequence of 5' upstream region (A
 N: D17357
 <400> 5

10

20

30

40

```

tgattccaat gtttttctaa aaggtagagt aatcctagcc agaggttggc tggccttcc 60
gcatcaccca gtagtgtctc agaagccagg aagggtcttc cattagataa tgaattatga 120
aatgtctcac actggaaaaa ccagtcaccc gctgagtcac gctgattcca accaatccca 180
aacaagccc cagccctcct ctgtttcagt ggtaccaatg tgtggtgtac aataaagtag 240
tacagtataa aacttcacag tgccaatacc atgaagagga gctcagacag ctcttaccac 300
atgatacaag agccggctgg tggagagtg gggaccagaa aggtaatgct ttttaactct 360
tactctgag ctctttacac attcaaagat aggaaagcta ggaggaatth tacaactaat 420
tggcatttcc aatgtgcatt gtgatgtgta cctttttata ttattcaggc aggttaatac 480
agcttttaat agtctagag catgcaaata gattatatgt ttatacaagc cactcagcac 540
atatatacaa gtacatatgc caaagagaaa gctatthtta agagttacat tgcgaaacag 600
taaattcagg gaacacacac atactcagat gcagagagaa tccaaatatt gataagttgc 660
acttatctaa atgctgctat taggactcct gagttgttta gagccattaa acttttggtt 720
gtatttcaga ctttcttgta aaacttaatt gaactgcaaa 760

```

10

```

<210> 6
<211> 1140
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

20

```

<220>
<221> misc_feature
<223> NK4 gene, regulatory sequence of 5' upstream region (AN: D17357)

```

```

<400> 6
ggagaaacct gaacagaatc ccagctcggg gccctcagaa ggaccccacg ctgccacat 60
tgaccttggg cctccagcct gcagatcgtg agggagaga cgtottogac ttagggcccc 120
ttgtcgtggt acttccttag tttggcccc gaaaccatc ccaaaggcaa gggcgtggtt 180
gtgctcagct gggggaaggg gctggggggc cgtgaggagg aggtgggagg cccagccagg 240
ctggagggtc agaaccctg gagctagaag agccctagg ggagcccaa gattgctgag 300
accagtgaac ttggccccca gatggccttg ccttggcccc gaagggtcag aaggacctgg 360
tcagccaagc tcagacagcc ggcaggatgc cttccacct gcagagggtc ctatottgtc 420
ccacaggtag atctacatca cactagcca cccctccaac gtgcacagcc cctgcctc 480
acggcgcccc tcttaggtcc ggcagttcct gcctccttct gatccagaag tttctctggc 540
ctctggagcc ggggcacacc tcatgcaagg acaggggtcca aattccttg tccttggtc 600
ccacttggtc gacgtcacct tcctgtactc agggagtthc cccagccagc tgtcccagat 660
ctggactthc cctctgcccc tcccactct caggctggtg ggggtgggaa agcagcccat 720
tcctgggctc agagactccc accccagctc agagggagca ggggcccagc cagggacgga 780
ccctcattcc tcccaggac cccagacctc tgtctctctc gggttaagtct ccctctctgt 840

```

30

40

ctgtctctgt ctctgtctct gtctctgtct gtttttccag cactcagcaa ggctctctgc 900
 cctgagagag gctccgccca ctacccccca ctttccccat aaaaccagct gagtatttgt 960
 gccaggaaga ctgctgcag aagggtgactg tctcagtggg gctgggtcat ctcagggtggg 1020
 gagttggggg ccccgaagggt gaggacctc tggggaggag ggtgcttctc tgagacactt 1080
 tcttttccctc acacctgttc ctgccagca ggctttggct cettgaactt ttggccgccca 1140

<210> 7
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> misc_feature
 <223> prosaposin gene, 5'-flanking region, exon 1, and partial cds (AN: AF057307)

<400> 7
 ggtttaagca atttctggcc tctgcctcct gaaatagctg gaaccaacag gcgagactgc 60
 cacacgtga ctaattttgt attttttagta gagacagggt ttcaccatat tggccaggct 120
 ggtcttgaac tcttggacct catgatccgc ccgcctcggc ctcccaaagt gttaggatta 180
 caggagtgag acagcatgcc cagcccagac ttgcctttga ccagggtgcca ccacctgccc 240
 ccacgtgccc ctggccagga ctgagccctg tacctgtta cagcactact tattctatgt 300
 gaaaccccaa gctattctat gtgaaaccog ctactacaat gggctaattt ttttgtattt 360
 tttttttgta gagatggggg ttcaccacgt tgcccaggct agtcttgaac cctccgcccg 420
 cctcggcctc ccaagtgttg ggattacaga cgtgtcagcc acacgtgcag gccggccaac 480
 aatgtggaga tttaaaagggt attttacata tataatctct gacctattca attagtaggg 540
 cttttctttt atgaccttcc ctttcccttt ctccaagttc ttctcactc ctcccactat 600
 agcccttctt ttgcacctc ccattgccc ctctatttgg cctccccttc cggcagcgcc 660
 ctcagaggcg ctgagtcagg gcgctgttga gctcgggcag gccgggatgg ggcgggggta 720
 cgcgcctcgc ctctggacgg cctttggggc agggcagatt tatactcgcg ggggatcagc 780
 tgacgtccgc attgcagact ggggagtcag acggcgctat gtacgccctc ttctcctcgg 840
 ccagcctcct gggcacgtcg ggtaagccct gggaccctca tcttggggag gaggatttga 900
 ccctcgcagc gtccatgtga cccctcggc ctcccaaagt gatgggatta caggcgtgac 960

20

30

<210> 8
 <211> 3271
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 90K (Mac-2 BP) promoter region (AN: U91729)

40

<400> 8
 aagcctcccg aatagctggg attaaaggcg cctaccacca tgtttggcta attatttcta 60
 tttttttgta gacacggggt ttcaccatct tgaaccaggct ggtcttgaac tctgacctc 120
 gtgatctacc cacctcagcc tctgaagtg ctgggtagtt tcttaaaaag gtaacatat 180
 atctaccata tgaccagta atcctgctcc taggtattta cacaaaataa atacttattt 240
 tcacacaaaag acttgatcc aaatgtttcc agcagcttta tgcataatag tggaagatgg 300
 aatgacccaa atgtccatca gtgcaaacat gtattaacag tgggtttctg tccatacagt 360
 gggccgccac ccagcaaac ccaggagccag ttactgattg ttgagatagc atggatggat 420
 ctcagaagca ctgtggaag taaaagaagc cacatgcaaa atattaaata ctgtatgatt 480
 ccatttagag ggaattctag ggtccaggag tgggtcctca tgctgtaat ccagcactt 540
 tgggaggcag aggcagggcg ggatcacctg agttcagggg ttcgaggcca gcctggccaa 600
 tgtggagaaa ccccttctct actaaaaata caaaaattag ctggccgtgg tgggtggcgc 660
 acctgtaatc ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa tcacttgga ctagaggca 720
 gagattgcag tgagccgaga ttgttccact gcactccagc ctgggcaatg gaggagact 780
 gtgtcttaaa aaagaagaca aaatagaggg aattctagga aaggcaacca gcagtggcag 840
 aagctgagag gtggttgctg ggaaggggct gggggagggtg gtggctgcag agggghataa 900
 gagaattctt aggggtgatt gaaacgccct aggtaatgat tgttgcctg ataccatcgc 960
 tacacatttg ccaaaacttt gcacgtaaat tatatgccaa gaaagccaat ttttaaaaag 1020
 aaggaaagga tgggtttgaa accccagttc ttccctacc agctgcacaa cttagccga 1080
 ttacgtcgcc tcaactgagcc tctgtttct catctgtaac agggaatata agagcagctg 1140
 ctcccacatc tggctggaag tattaatgc attcatttgt ggcaaggctt atagtaatgc 1200
 ctggcgaaat ccatattagc tattataggg agcgttctc aatttgcgga gaggtttggg 1260
 gtagaggcac aaaagatgac cttacaggcc agttaaccat tctcatctct gaaatgccc 1320
 gcactttccc ttccatgtct tgggagcggc ttctgatga cagcagttct gtccacacga 1380
 atctgaggct ttcaccagc tgtcttctca gagccgagcc gctgccctt cccctgcctg 1440
 tcccctgtca gcgcttccct ccaccccatg gtcctgcac accggaagg ccttgcgagc 1500
 cccaggggag cagatgktyg gtgctccgat tccacgagga ggcctctggg ttttccattt 1560
 tacctgcctg gatggcttag gactttccc gactctggg ctaaagattc ggcacctgag 1620
 ttttaaaacc tttccagca ctcccagag atgccctccc gtctctgca ctctgtctt 1680
 tcctggcca cttgggcaga agtcattagc actgctgaga agggatgatg ctggggtttc 1740
 tgtgcaetca ggccttaat ccggatgaga tttttttaa cccccacag ccagttctat 1800
 ttccagctgc acctgcccct ggatcttca aagttctct ggaggggatt aggcaaaccc 1860
 tgcagctgcc taaaacctca caccttgaag gaaatagtca ttgaatgtct gacctctggg 1920

10

20

30

40

ctggctgtct cggactctaa gggccaggg aaccagggcc ttccaccagc tgggagc 1980
 tgggggcttt taaatgcccc tgcctgtccc ctactcccag agatgggtgac ttcctgggtc 2040
 taggcattag gagtttgtaa aactccctga tgattccttc tgtccagccc aggctgagaa 2100
 ccaactgggtca gaggcctggg cacatcccaa ggctcatcca gaaccatggg gtgcaagtga 2160
 cagaacaacag agcggctgct gattgctca ctgagcagtg aagcccagcc ttgaccatgg 2220
 attaggccag ctggaccocag gagctcaggg cggaggatgc ctgcttcctt ctgctctgcc 2280
 ccaccggccc cagcagcctg ggcccacatc ctctcagtca gaagctggct ctccaccggct 2340
 ggctgggctc acagcccac cctgaaaaca gcagtgtggc ccggggcccc cgcaggctca 2400
 gacagccagg ccttgggtgg ttgaaggcca agagctgggg gccctctggg aaccacacag 2460
 ccgggaatgg gaggggtgct tcccacaggg acagttgagg tgccggcttt cagtgggagg 2520
 aaagggaaatg ggtatgagct ggacagagcc attatgtcac ccagagaggg tctgtcccc 2580
 gccccgctga gggggagaca gtaggagagt ggccacaggt ccagcagtggt ctagcacagg 2640
 ctctggggctc aggtgttggg gcagggctca gctcctccac tggccagctg catacctggg 2700
 tctcagtgcc tccctccctt ggggacaggg gacagtgcca tgcaaccttg tggggcacag 2760
 gccctctgtg tggtcagcat gccaaagca cagagagggg ggatttgcac atgagcagcc 2820
 ccctgtgtgg tgttcaccca gccagcaacg tgctagacc aggaaaagac tcggagcgtt 2880
 ctgtcagagt ccacagccac accaccaggt gcagactgct tgggcccaga gcctctgctt 2940
 ctcccccctc cgtccaccaa acgccagccc ctgaccactt ggccggccttt ccaactgagt 3000
 gtggctgtta gtctcttgc aggccttctt ccagccagac tcccaccttg ggctctgcc 3060
 agcctggcac tgatagccac aggcagagct gagacaaaag agaggggccc tggggagtat 3120
 cagcagcagc caatcccga agacatctat gtcaggtggt ttctggaaat cgaagtaga 3180
 ctctttcttg aagcatttc tgggatcagc ctgaccaagc tccatactgg gagaggcttc 3240
 tgggtcaaag gaccagtctg cagagggatc c 3271

10

20

30

<210> 9
 <211> 1403
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> galectin 3 (LGALS3) gene, exon 1 (AN: AF031421)

<400> 9
 tccaggccag cagatttgat gtctgggtgag ggctgcttt ctgggtcaca gagggagcct 60
 tctggctgtg ttttcacaag gtggaagtgg caaggggact ctctccggcc tcttttatta 120
 aggcaccaat ctcatcacc ctatgacctc atcacttccc aaggcctcca ctccctaata 180
 catcaccgtg aggggttagga tttcaacata tgaactttgg cgggatataa acattcagac 240

40

tatagcacc tgacagtaaa aacgagataa taataactta tctcttctt ccaalca 300
gataaggatga agttaaagg agggatatata tataatatata atgtgaattt cctgtgtaaa 360
atgtgttaaa gagttgtctg attaattgct ttataagggg attgctttga gactaggcct 420
attgatctag aataagtagt caattttagt tcagttccct agggaaataga cattgaaaag 480
atttttgggt ttgtattota caaataaagc aacctattaa ttgaattcct ctcagcgaat 540
tcttcaactca ggtgattctg gagagggcgg gggacagacg cggccgcagc ccaggctccg 600
ggagcgccac ggaacctaac ggtggcagcg gaggtcgcgc cctcagtgcc ccgcgctctc 660
cccgctcggga gcttctcggg cggccctgcg gcggcggctc ggggtgtcag gccggcggcg 720
ggctcgccca gcctggctcg gggagaggac tggctgggca gggcgccgc ccgcctcgg 780
gagagggcgg ccgggggggg ctgggagtat ttgaggctcg gagccaccgc ccgcccggcg 840
ccgcgagcac ctctcgcca gcagccgtcc ggagccagcc aacgagcggg gagctgcgcg 900
gggcccgggg gacgcggctc cggccgggca ggggagaggg cggccggcg ctgcttgggg 960
cgcgggtccg agaggggtcg gctccccggg accgggcccg ggcgcgcgcg gagagcccca 1020
cagcctgtgc tctgcctcc aggagcgggg cggcgggag cgatctgggc ccggggcagt 1080
cgcctttgat tctcgagggc gctggcgttc ggggaagggt ggcagcacc taccagacc 1140
acacacgtcc ccggggcggc accggccacc ttctcgggag cctcgtgcgg cttegcgcgc 1200
gtgcacctc cgcgcctgc gcctctgcgc gcccagagt aagccaccatc cggtgacgag 1260
ccgcagctctg gtcacccag tcccaccagg tcccgtgcg aggggaggcg gaggggctcg 1320
ctcagcaaac cagacggccg ctccagtttc tctaattggg gttggagccc cgtcaccctt 1380
ccccagatca cggccgcggg gga 1403

<210> 10
<211> 859
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> manganese superoxide dismutase (SOD2) gene (AN: 877127)

<400> 10
gatttcacta ttactagaat caataatacc aacctaggg gtaaaaataa agataaatgt 60
gtgcaaatcc tgctgcagc ctcgggcagc tcgtgggtgt ccaagaactg ttcttaggca 120
gccggtgggg acaaagtctg tgtgcctcct gtccctggaat aggtcccaag gtcggcttac 180
ttgcaaagca agggtagggc gcaagagtac tgaatacggg ttggaagggc gctggctcta 240
ccctcagctc ataggccggc tgggcgggc tgaccagcag ctaggccccg tcttccctag 300
gaacggccac gggggcctgg gagggtatga atgtcttttt gcagtgaggc ctctggacc 360
cgcggccccc cggcagcgc accaaaaactc aggggcaggc gccgcagccg cctagtgcag 420

10

20

30

40

```

ccagatcccc gccggcacc cccggggcgg acgggaggca gggcctccg ggcgaccc 420
tccaaggggg cagggggcgc ctcccttcgg ccggggccca ctcaagtacg gcagacaggc 540
agcgagggtg ccgaggccga ggctagcctg cagcctcctt tctcccgtag cctggggcgg 600
gggtgtacgg caagcggcgg cggggcggac aggcacgcag ggcacccccg ggggtggggc 660
cggcggggcg ggggcggggc ccgcgggggg gggggcgggg cggcggtgcc cttgcggggc 720
agctggggtc gcggccctgc tccccgcgct ttcttaaggc ccgcggggcg cgcaggagcg 780
gcactcgtgg ctgtgggtgg ttcggcagcg gcttcagcag atcggcggca tcagcggtag 840
caccagcact agcagcctg 859

```

10

```

<210> 11
<211> 2877
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature<223> granulin gene (AN: L32588)

```

```

<400> 11
cgggaatgcg gtaattacgc tttgttttta taagtccagat ttttaattttt attccttaac 60
ataacgaaag gtaaaataca taaggcttac taaaagccag ataacagtat gcgtatttgc 120
gcgctgattt ttgcggtata agatatatac tgatatgtat acccgaagta tgtcaaaaag 180
agggtgtgcta tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gcgacagcta tcagttgctc 240
aaggcatatg atgtcaatat ctccggtctg gtaagcacia ccattgcagaa tgaagcccgt 300
cgtctgcgty ccgaacgctg gaaagcga aatcaggaag ggatggctga ggtcgcgccg 360
tttattgaaa tgaacggctc ttttgctgac gagaacaggg actggtgaaa tgcagtttaa 420
ggtttacacc tataaaagag agagccgcta tcgtctgttt gtggatgtac agagtgatat 480
tattgacacg cccgggttca agcagatctc tgccctggcc tcctgagtag ggaattacag 540
acctcgttat cgtggcaact taccctctg atgttaaaaa aaaaaaaaaa aagagcgaga 600
gagagagaga gaaacatttg tgaagtaggt tgttgagtct cagcactatt gaccttttgg 660
gcaggatact tctttgttgt gggggattgt tctgtgtgtc gtgtgatgtt tagtgggatt 720
gctggccctt acctaccaga tcgccagtgt cctccaccc tgagttgtga caaccagat 780
tgtctccaga cactcctaaa tgtccctggc gcaaaattgc cgtgctcaa gaatcacgga 840
ctttgacgat tagactttgt gatatttgtt tcagctctgt taggtttttt ttcttctacc 900
tgtatttttt tctgggtctg ggtgggtgta attagtaggt tattgatoga ttcacctaac 960
atthcatgaa agtttcatgt gtgtgtgtgt ttcaatagaa gcataaacta tactccctag 1020
tctcaagata gccaggaagg aaaataagca caaatgtgtc accagggcac agactagtac 1080
taggtcctca gcaggccagg tgtcttatcc gctgtctggg tctgctctag ctccaggctt 1140
agaaccctg ccacacgact ccacagctcg gttggcacc tttccctct cogactctg 1200

```

20

30

40

ctgcctcgag cttgggttagc catccccctg cccctgcctc atcctcagct ccagttcctt 1260
 gctcaggetg cagcagctctc catccccctgt gcagacactg ccgttcctcc acggcccagt 1320
 atcaggettt cctggggcct ctctctctctc ctggcccctc tcccctcctc catctctgcc 1380
 tggcccaggc cctttggcac caagcaggct gactcttgct actggcctaat ctgttctgtg 1440
 gtacattttc tctctcacc ctcccctcctc aattcctcga aggcagggcg atctggagac 1500
 taggaagcca cttctctttc gacagcccc accacagccc agcccgtgcc aggcacccag 1560
 cagctcctga agcccactgg cattgaacat ggcattcaat ccttgccaag cctgcctctc 1620
 ccatctgggt tcccagggtc cttcccaca cctctcctc cacctgccag ttaaaatctt 1680
 cccagactca gctcaaggag atgctcctaa ggtggaatga aatctctctt tcccacctg 1740
 gagacaatct acttctctc cctacacctg gcaactggcg cacaccttg tatcttaaat 1800
 tagattcagc ctgagactgt ctcccaccaa tccctgctcc ctgtctgct gagcacctg 1860
 aggaaagggc tttggggctg tttatctttg tcttgaaaac catccttcaa ctactctgg 1920
 ggctctccta gcatgtcaac cgagtttggg gaatagggca gaatagggca ggacaggaca 1980
 ggacaagaca gggcaggata ggataggagc gagccagctc agtagctcac atttgtaatc 2040
 ccagcgtctg gggggctgct gtaggagaat cgtcttggga gcaggagtgg caggcccgag 2100
 tgagctatga tcagcttggg cgactgagcg agaccctgct tctaaaacaa acacacaagt 2160
 ccgggcggcg tggctcatgc ctgtaatctt agcactttgg gagggcgggg tgggcggatc 2220
 acgaggtcaa gaaatcgaga ccatcctggc caacatgggt aaaccccgct tctactaaaa 2280
 atacaaaaat tagctggggc tgggtgtgct cgcctgtagt cccagctact cgggaggtg 2340
 aggcaggaga atcgctttaa cccgggagcc agaggttgca gtgagccgag atcgtgccac 2400
 tgcactccag cctggcgaca gactgagact ccgtctcaga acaaacaaac aaaaggatag 2460
 aaaggcgagc acaaatattc ccaattcata acactcctc gcaactgtcaa tgcccagac 2520
 acgctctatc atctctagca aactccccca ggcgctgca ggatgggtta aggaaggcga 2580
 cgagcaccag ctgcccctgt gaggctgtcc cgacgtcaca tgattctcca atcacatgat 2640
 ccctagaaat ggggtgtggg gcgagaggaa gcagggagga gactgattg agtagaaaag 2700
 aacacagcat tccaggctgg ccccacctct atattgataa gtagccaatg ggagcgggta 2760
 gccctgatcc ctggccaatg gaaactgagg tagggggctc atcgcgctgg ggtctgtagt 2820
 ctgagcgcta cccggttgct gctgcccag gaccgaggag tcggacgcag gcagacc 2877

10

20

30

<210> 12
 <211> 2040
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

40

<223> p66SHC gene, 5' upstream (2.0 kb) region (AF004522)

<400> 12

```

tccccggcct tgtgctgctt cagtctggcc ctctccctc tttaagagga ctccatggca    60
ccttcagcct ggggtgtggt gggtgccct tctctctcat cgtcatcagg gggccctggg    120
gtagagaccg ggggccagc gggggctgac tgctcccaga atcgagctag agagaggcgg    180
aagggtgtcca ggtggccatt ggagaggtcg aggcacagcg gggatgcagc agcggtagag    240
gggtgtgggt agtgggggtg tgcctcgtcc ttggggcgc gtcgggtgcg caoctccagg    300
cagttctggc ctttgagggtg gcgctgcagg tggctctctc tggcgaaagc cttgtggcac    360
aggtggcact catagggccg gtcctctgtg tgcagggtca tgtggttctt gaggtcgtag    420
ctgtgcagga agcgggctgg gcagtgccgg catgagtagg ggcgctctcc cgtgtgcttc    480
cgcatgtgga tcttcagctt gtcgttctcg gcacaggcag gggtgagggg cagggagggtg    540
ttcaggatgg gatccctggc tctctctggt catcccacc tggccttgtc ccatccctgt    600
tctcaccat ttgttaccac actattgcc caggagatac cctgctagct cacctctagc    660
ttaactaggc cttgtcatta tccactctc tgettccagc actgccctcc tgggcaccga    720
atcctccatg ctccagatcc acccctgct ggcttgtttt cttctgctct cctcactcca    780
gtaaccacc catgcccag tccctccagg accacctacc accacctcgg gtctcctaac    840
ttcttcccca tctctccca cctgtcccc taecatggc cctgcgggg ccttcccccc    900
cttctgctc acctggtgaa tcgaacaccg cagacctgc agcacaaggg cttctcgct    960
gtgtgggtcc tcatgtggcg aggcagttt cctgccccat ggtatgctt gtggcagaca   1020
gggcactcct gaggcactct ggagcggcgt ttgcgcacca gcttgtcttg gctgtccagg   1080
cctggtgcca ggttgcctcg gtgcaggag cttaggtagg ccatcaggtc aggatcggatg   1140
gcatoctcat ctgagcccag ctctctctgg gacagcgggg gcccgccacc ctgcgccagc   1200
ccataggctg ggggatatac cagctctctc tcttcttctc caccctcata gggttcgtag   1260
ctctggggac cctcaggagg ggaggcagtt cctgtgggag ggtctgtagct gtccccggc   1320
cactgcccc cactgctgcc cactctgcc gccacctcct cctctcata ggtcaaggga   1380
tggcggggca ctgtgggcac ctcagggact aggtggtttg ctctggcccc cttggtttgc   1440
aggaaagctt tccggggctt gcggtgcgg cgggcaacag gccgaggtgg cgggtggcga   1500
gggtgtggga ggggcacctg tggaggactg tottaccat tgggaactcc cagaggccgt   1560
ggctgtggca aaggcctcca gatactggcg ggctcgtca cagtcactct cgtccgggct   1620
gggagcttct agcccactgc cctgcagaat ctccatgcaa gcagcgtga cacacgggat   1680
ctccagcagg cgggcagcct ggagcacagc tggcatgttg gcgctgctgg tggtcagtgt   1740
ggctgtatag gcaaatcaa ggaggcgcct tagtgcctct ggcctacaa agtccagctc   1800
acacacaccg gccctgctc ccccagtgcc cgtcccgcta cccccggccc ccatgacagc   1860

```

10

20

30

40

tccgccaccg ccctcagtga aaagcttctt gaagtagtgg ctacagctcag ctacagctcag 1920
 cctgtggggtg cggatttcaa ggccctgcgt ccggatgggtg aggtcacata ggtggcccag 1980
 ctggcgtctg tcattgaggc agctcaggag ctcactgctg tggtcggga atggaatccc 2040

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for NK4

10

<400> 13
 agcaccaggc catagaaaga 20

<210> 14
 <211> 1774
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> cathepsin B gene, promoter region (AN: AF086639)

<400> 14
 ccttatagag gtctgaaatg atttggagtc cagagtccat ggctgtcagg atatgactag 60

20

ggtgagcagg cagttgggac caccttgacc tccagcctcc tggctctcag ttcctcgggt 120

atcccactct gctgggggct tagtgaccat gtttgggctc cagagattat tttttccttc 180

cactcctatc cttagtttgt tactaaccag gcgggagtac aggcattgct ctgaagacag 240

gctcagggct gtgtgacagc tgacgaccag gctgcaggga accaggctcc atgcagtcct 300

actgcctctt tttttttttt tttttttttt ttttttgagg cggagtctcg cttttcgccc 360

aggctggagt gcagtggcac gatctcagct cacgggttca cgcattctc ctgcctccgc 420

ctcccagata gctgggacta cagggcctcg ccaccaagcc cggctaattt tttgtatttt 480

tactagagac gggtttcacc gtgttagcca ggataatctt gatctcctga cctgtgatcc 540

30

gcccgcctcg gctcccaaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccactgca cccggctact 600

gcctcttac tgtgccaca gcctggataa aatacattc ttctgagcct tttttttttt 660

tttaatacag agtttctctc ttgttgctta ggtggagtg caatagtggc atctctggtc 720

accgcaacct ccgctcccgg gttcaagcga ttctcctgct tcagtctccc gagtagctgg 780

gattactgac acgcccacc acgcccggct agttttgtat ttttagtaga gacggggttt 840

ctccatgttg gtcaggatgg tctcgaactc ccgacctcag gtgactcacc ggctcggcc 900

tcccaaaatg ctgggattac agcgtgagc caccgaacc agcccctctg agcctcttga 960

atacaactgg ggtcatgtgc ctttgacggt ttgtcttaag gattaaagct gtttggggag 1020

40

tgtctggagg agggtagtc ttgagccaac cctgcatct ccttccagg gcctcccgg 1080

aataaacccc aagtaaatgt gcactttgtc cgtcctctcg gagcaggtct ccgggtactc 1140
ctgtgccaaa cagatttccg cccccaaggt ccttctctctc ttagaaatcc tgacgcagct 1200
cctaggttcc ttcgcagtga cagccactct tttctatttg tacgtagctg tagtgttttg 1260
tgggtacggt ctctgaacaa caaagtggcc cttctaaagg ctgttctgtg ggggccacag 1320
cctcgccacc cccagcctct gcagcggcct ctgaatgaat gaaataagcg acggcgccct 1380
ctccaccacc ccacccccgc caactcggca ggcagggatc ccaggcgcgg gttctggcgg 1440
aggcggctcc gcgaggcggg gggacttttc taggcggggg gggggccttg ggaccacctt 1500
taggggcttt tccccatcc cctggcccca attcgcagcg tttcgccacc caggggccgc 1560
agggtcccaa gccctcttc cccagccgc gcgctcaggc ccccgccgc ccccggcggg 1620
ggccccggac cccgagcggg agggggcggg ggggtgtcgg ggcggggaag cggggagcgc 1680
gggcggcggg aggtggcggg agggggggg ggtcgggaag caccgtgcgc gggcggcggg 1740
agggcccggg cggggctgcg cggtggtcac gtgg 1774

<210> 15
<211> 3804
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Promoter DNA for Alzheimer's disease amyloid A4 precursor protein
(PAD, AD-AP, AAP, CVAP) (AN: X12751)

<400> 15
ggatcctaac ccaatatctg ctgtccttat aacaagagga gattagggca cagtaagaca 60
cagaggggaag accatgtgag aatacagga gaaggtggcc atctgcaagc caaggagaga 120
ggcctcagaa gtaaccaact cagccaacac ctcgatttca gacttccagc ctctgaaat 180
gtgaggaat acatttctg tgtttgatcc atccagtcta tggtaaagta tggcacctg 240
cagggttcat ctggctcaga cttaacgatt gcttttgggt atatttatag ggcacagata 300
acagcctaaa cacaagacga cagaaacgcg gcccagcaga ctatgcataa aatagaaatg 360
gggtatctgg accaattgga gtctgcagtg ggatgcggtt actaaaacag tcaaatgcaa 420
catgaggctc caggcagagt agtgggcaac atctcccag ttgcagcagt cagagcacac 480
ttcgagtact gtaaaaagac acagacaagg cagaacactt tagagaatgg ccaaggtgtg 540
gaaggaacga gaaacatgc cattatgcaa ctgttgaagg aagtgcctgt tttaccttgt 600
gaagagaaga ctctagagga agaagtagca tgaaaacagc tggcaaattt gtaaagatct 660
gaagtgtgca aaagaattat tctgcttgg cactgggcaa tacaaggata tctgagtggg 720
agtttaaagg cgggggatgt gagctttaa tgggataaga acattctagt aaccagaaat 780
gcccaaagat agaatgcaca gtctggagag ccagtgaata tctcacaat ggagacactt 840

10

20

30

40

gaaactagga tggggatgct gttgtaggaa ttccagcaga caagtgttg tgggttggg 900
 ccccaacttt gtagggttat aactagggat gttcctgctt tttctgcttg gaggatctgc 960
 aagacacctc agggcaggaa atggcattaa atgcagaaca gagctagtgg ctgaaaagca 1020
 aaaagccatc aggatctctg gagtagtgaa ggaaccagag aacatgcagg caatgtccat 1080
 cattctgacg caatcagcag cgataatcat ctccccag gaacatcttg accagggaat 1140
 gtgtcagtggt tggggaattt caacagtggg aagagaaact gctaaatcta agaactttaa 1200
 tttttatagg ttatgatctc atctctacaa ttttgaattt catgctcaat aaaagttcct 1260
 tactctcttt tttttttttt gagacggagt ctctctctgt cggccaggct ggagtgcagt 1320
 ggcgcgatct cggctcactt caagctcagc tcccgggttc acgccattct cctgcctcag 1380
 cctcccagta gctgggacta cagcgccttc caagcggccc ggctaatttt ttgtattttt 1440
 agtagagacg gggtttcacc gtgttagcca ggatgggtgt gatctcctga cctcgtgac 1500
 cgcgcgcctc agcctcccaa agaaaagtcc ctactctta aagttgcctc ctcttccca 1560
 gggctggctt catgggcatg caaccctgga gactctcaca ggccctggcg tgggaggagc 1620
 cccatgcttg gtttaacgct ctgccattgc catcttaaaa ttcttaattt aatttttttt 1680
 cttttttttt gaggtggagt ctctctctgt cggccaggct ggagtgcagt ggcacaatct 1740
 tggctcactg caacctcgc ctcccaggtt caagcgattc tctgcctca gcctctggag 1800
 tagctgggat tacagggcag agtaaccag ctctggctaat ttttgcattt ttagtagaga 1860
 tgggggttcc accatggttg ccaggctggt ctagaactcc tgacctcagg tgatctccca 1920
 ccttggcctt cctaaagtgc tgggattaca ggcattgagcc accaggcccg gccttaaaat 1980
 tcttaataat gtaacaaagg gtctcacggt tgcattttgc agtggactct gcaagattgt 2040
 agcttggacc acgttctctt gcattcagat acctctttt tgccttattt gctcatgcag 2100
 acccggaaca aatacggaat tgcggtggta aatgtggtgc agaaagtga caactgggtt 2160
 tgtcctghca cttaggett ttccctgtgt cccagcttca tgtcaactac ttgctattag 2220
 atttgggagt tcattagctt cttttcctg atgtataaat aggaataata gtaacagcct 2280
 ctttggcttt ttagggaagt aaatgacatg aagcgtataa acaaatactg catgacaata 2340
 aatatttgtc cttatttgtt gaggacatcc aaaggacatt caggggcaaa agtaatccaa 2400
 gagtcaagac tgaatgccta gtgcggaaaa agacacacaa gacaacattt aggggagctg 2460
 gtacagaaat gacttcccag aagaagtctg taccocgctg cctgagccat ccttcccggg 2520
 cctcggcacc ctgtcagcg caatgagcaa gggagagaag gcagcagtg agcctcagaa 2580
 gggccagcgc actccctggc ttcagtcctt cgtccaagc cctgtgtgga gtgggctgtg 2640
 gcttggtaac taaacgctac ttcaggtcaa gagcagggga tatactctggg cagttctaga 2700
 gcattctaaa ctatctggac actaactgga cagtggacgg tttgtgttta atccaggaga 2760
 aagtggcatg gcagaaggtt cttttctata attcaggaca gacacaatga agaacaaggg 2820

10

20

30

40

cagcgtttga ggtcagaagt cctcatttac ggggtcgaat acgaatgac tctcctaatt 2880
 tttccttett cccaactca gatggatgtt acatccctgc ttaacaacaa aaaaagacc 2940
 cccgccccgc aaaatccaca ctgaccacc cctttaacaa aacaaaacca aaaacaaca 3000
 aaaatataag aaagaaacaa aaccacaagc cagaaccctg ctttcaagaa gaagtaaatg 3060
 ggttgccgcg ttctttgccg gggcctgcgc cttgctcctt tgggtcgttc taaagataga 3120
 aattccaggt tgctcgtgac tgcttttgac gttgggggtt aaaaaatgag gttttgctgt 3180
 ctcaacaagc aaagaaaatc ctatttcctt taagettcac tggttotcat tctctccag 3240
 aaacgcctgc cccacctctc caaaccgaga gaaaaaacga aatgcggata aaaacgcacc 3300
 ctacagcagc tcctttatac gacacccccg ggaggcctgc ggggtcggat gattcaagct 3360
 cacggggacg agcaggagcg ctctcgactt ttctagagcc tcagcgtcct aggactcacc 3420
 tttcctgat cctgcaccgt cctctcctg gcccagact ctcctccca ctgttcacga 3480
 agcccaggty gccgtcggcc ggggagcggg gggggcgcgt ggggtgcagg cggcgcgaag 3540
 gcgctgcacc tgtgggcgcg gggcgagggc cctcccggc gcgagcgggc gcagttcccc 3600
 ggcggcgcgc ctagggggtct ctctcgggtg ccgagcgggg tgggcccgat cagctgactc 3660
 gcctggctct gagccccgcc gccgcgctc ggtcccgta gtttcctcgg cagcggtagg 3720
 cgagagcacg cggaggagcg tgcgcggggg ccccgggaga cggcggcggg ggcggcgcgg 3780
 gcagagcaag gacgcggcgg atcc 3804

10

20

<210> 16
 <211> 1741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc feature
 <223> Tissue transglutaminase gene, promoter region and 5' UTR (AN: U13
 920

<400> 16
 aagctttcac cagctggagg gagcagttc tgcaacaatc tctataaaat ggggcaatta 60
 cgggtcagct gggcccaaca ctctttgtgg gttgttcac tgagactcca gccagagccc 120
 gtttgacca gggagaaata tccactgaag caacacgggt tgttttcct gagccatag 180
 tcacctagga atggagacgg gggctactc tatcttcaa attcatcaat agatgtagag 240
 cttgttcgg aatgtacagc ttgttctgga atgtagagct tgctccggaa tgtagagctt 300
 gttttgaaa aagtgcggg gaagccccgt gggcctctgt ctctccggga acccttccc 360
 ctcacggctc acagtggatc cggaaacaca ggagaccaag agaccagaga taccaggatg 420
 agagatagga cccctgggtg ccaggttcga gaagtcctag gctgagtcce tggaaagtta 480
 gtcttctcc tttctggcac acagtggggc ctcaagaaag ctcagtggat ggaigggattg 540

30

40

```

agggagggag ggaagagaag ggggagggag ggaggggaaga gaaggcctgag ggaaggga 600
atgaagggat gaggtaggag ataggtagggg ggtagtagtga tgcattgggtg agtggatgga 660
tgggtagatg gatggctgat tagatggatg gctgattaga cagatacaag gatgggtgag 720
atcggaggat tatctgggtt tctacacagga agggacatgg gtgtgtctgt ttttggaggt 780
gtgtctgcat gtctgtacct gaggccatgc ctgcatgtgt gtctacctct gagtagccac 840
atctttgtgt gtctacctct gaggtagccac atctttgtgt gtctgtgggt gccctctctg 900
atctttgggtc cacatctgac agaggcattg gtgtctagga ggtctgtgtg tgtgccaggt 960
gccctctggac acctgctcat ctgtgtccac agatgtgtgt ggtctgaggga caaggctacc 1020
tggctgtgtc aggggtgata tatgtcctgg tgtgtgtctg ccatacgaat ctgaattgt 1080
atccatgtca ctgtgtctgc gtggccagcc gtgtttgtg aatctgtggg agtgtatctg 1140
tgtatgtgtg tgtatcacca cagccctgtc ttgggtgtgc tgcgtctgct ctccgtgat 1200
gtatatctga gtatgtgtgt gagggtgtgc gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1260
gtgttggggg tggggagggtg ttcttgatcc cagatctgac ctaagagtcc acatctgtgt 1320
gtccagggtc accccgggtc cgttgtgtgt ttctgtgagg gtgctgctgt tatctgtatc 1380
tgagtgtgtg tgtccagggtg tctgttctcc aaggctctgag actgtgggtc cagggtgtgtc 1440
tgtttctctg gctagttgtg tgtccctgtc cgtccccca gggggcgccc tctccgacc 1500
gcgctccctc cctcgggtct cgtccccctg ggtgagcccc agcgtggtgg gcgtgggccc 1560
gggactggac aatgggtgtc ctcccagggtc gccgccttcc cgcggggccc cgtccccggtc 1620
ccgccccaaa gggggctata agttagcgtc gctctccgctc tgggcagtgc cagccgcccag 1680
tggtcgcact tggaggggtct cgcggccagt ggaaggagcc accgcccccg cccgaccatg 1740
g 1741

```

10

20

```

<210> 17
<211> 1440
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<223> Clusterin (APOJ, SGP-2, SP-40, TRPM-2) protein gene (AN: M63376)

```

30

```

<400> 17
gacctgcagg tcaacggatc cattccccgat tctctatcgt ccagatggaa gaaactgagg 60
cccaagggca aagtgattag tccgagggtca ccagtggtct aggggcacac ctaggactgt 120
aatcagactt tcatggacct ggtctgggtt ctcccactta gtcattgggtc ttgaagattc 180
cccagggtct cctcctgaaa aggactgggg tctagtggcc cctggacgtt gggcaagcaa 240
gggactgggc ctccatgttg tgcctccata gtctgatcc tgaactggaa aactcagccc 300
ctgaccacgc agctctcctt taagccctt tgtttcacat ggttttcaa gtctgccacc 360

```

40

cacagtgggg ctgcctgtac ccgccctgtc caccattgc ccagctgtc agcccccga 420
 cttctctcct ggggcttaaa catccctggc tccaaaatgg gcagctcact ttcttccca 480
 agaagtagct gcacctccag ggttcctaga tttgcccctc cttgccaggg ggaggggtgg 540
 ctgcgacagg agattctccc tgctctcagc agaaggaact ccagcagttg gagaccagca 600
 aaccctctcg gacacagatc tgatttccca actgggaagg ctcagggcaa aataaaaatt 660
 caggtccact ggttcaaaaa ctatgaagaa tttcaagacc gtcacagtag ccattaaac 720
 caaacgtgga tctgcaaggg tcccacagcc atgaagccca cctgcttgg ttgggttcca 780
 aaaagatggg gacagtgatt gcttaagctc tgtggatcaa ggaccccgga gaggcctctc 840
 ggctctccac atatctgtc tgatcactcc taaacacaat tctgttctc ccaggcctgg 900
 cgggtcagtc cagggacccc catcagtggt atgtttccag gactagcgt tcaatactt 960
 cctgtgctct cttctccagc acaaggcccc tctccatccc acctcatta tgtctgactc 1020
 ttactattt aatgggtca agagaagtgg cgttgtgta atgtgaagg taaggtcagt 1080
 agggccaggg aactgtgaga ttgtgtcttg gactgggaca gacagccggg ctaaccgct 1140
 gagaggctc ccagatggca cgcgagtcca gctcttccc tactggaage gccagcgcg 1200
 cacctcaggg tctctcctgg agccagcaca gctattcgtg gtgatgatgc gccccccgc 1260
 gccccagccc ggtgctgcac cggccccac ctcccgctt ccagaaagct ccccttgcct 1320
 tccgggcat ttttgggcg tgagtcatgc aggtttgag ccagcccaa aggtgtgtgc 1380
 gcgaacggag cgtataaat acgggcctc ccagtgccca caacgggcg tcgccaggag 1440

<210> 18
 <211> 2000
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Prostacyclin stimulating factor (PSF, IGFBP-7, mac25) gene, 5' up
 stream (2.0 kb) region (AN: AC022483)

<400> 18
 gatgcccagt ctcttctctt ggggtggcagg tgctgggacc tgcaatgtgt attcttggat 60
 tttagagctt atgggtggagg gttggagcagt gactagggca tggatcctcg actcatgtct 120
 acagcaaaagt ggggcagagc aaccatattt agcaccaaat acaagcagga gtggatccag 180
 gctttgaagg gcctggggct taaacaattt ggggattctc ttttaagaaaa aaagatataa 240
 aattaagtat gtataaataa tgaatattta ttacttaata aatatttact attaataaat 300
 aatacacaaa tatttattat ttattcaaaa taaatattca tttggaataa gtgaagtaat 360
 aatagtaatt tttcaaatgt agaaatgctg gcagatatta caaacatcaa cacattttta 420
 aaaactaata tttttattca ttatctgtcc aacacacctc tataaatttt ttggtaattt 480
 ttatatgatt aataattctt aaaaatatat aaaactaatc tgaatataa atatacagaa 540

10

20

30

40

gagcaacttgt tttttttttt tttttgagat ggagttttgc tgttgttgcc caggctgcag	600	
tgcaatggcg tgatcttggc ccaactgcaac ctccgcccctc tgggttccga caattctcct	660	
gcctcggcct cctgagtagc tgggatgtca ggcacccacc accatgtctg gctagttttt	720	
gtatttttag tagaaacggg gtttactgt gttgccagc ctggctctga actcctgacc	780	
tcaagtgatc tgcccaccac agcctccccg gctaattttt gtattttcta gtagagatgg	840	
ggtttcacca tgttggccag gctggtcttg aactcctgac cttaagtgat ctgcccactt	900	
cagcctccca aagtgtctggg attagaggcg tgatccactg ggcccagcct cagaagagca	960	
attttaaatt gtacttgtgt tgaactatat tataattatt aatctaatta taattatgta	1020	10
atcaaatcatt tattacttac attgatttat taatgaatat gtataggagt tttgacataa	1080	
gaaaactcct caggccattt tgccatttct gtgtcaatgt tgtgtgcctt ttcgtcaatg	1140	
aacagacctc gtcagcccaa gagcatcaga tgtgctaaga ggtgatgtga tctgattgga	1200	
tgcataaaat gtgggacttc ccacacagat gggcttgctg ttggtgatac tgctacagtt	1260	
tatgccttac aaatccagga attgtgacca atcctatttt gtgacattcc catcaaaata	1320	
tatatgtgta ttatgtgtta ataattgtgt acactctcct atcaagtata tttctgatag	1380	
tagcaaacct ttgttttaac caggtatcaa tgagaactga atcttccatt taaaactgta	1440	
taoctctgat gattggaagc attttctgaa gactagcttt tggctccaga catttcaaac	1500	20
tgtattttcc ctccattact tacatatatt tctgggtggtg ggcaccgttg gacacgttca	1560	
taaccacaatt tgacccttgg ctctgcactt tgggtttatg aactagatg agttggctca	1620	
atgggattag gaatatttct ggaagtcatt cctacaccaa gagggctggt aatagcctaa	1680	
ctaaacataa aagcgactgc aaaccacata aatatatgcc actcaatcca aacttcatgt	1740	
atcccccaact caagttgtcc ttagtccagat gccaaaaatg cctgccacca actcatcact	1800	
actgaataga acgctgatgg tgagaaggtc agagaggaaa gacagtgatc ttaaacaat	1860	
gctgttaaaa tacttttatt ttccaaattg tataaaatca catggctata ggaacatatt	1920	
gttagggctg ctcaaggggt gttgcatggg gcacatgaat gtaaaacttg atctccaata	1980	30
gcttccctta gcaatacata	2000	

<210> 19

<211> 1127

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Vascular endothelial growth factor C gene, partial cds and 5' upstream region (AN: AF020393)

<400> 19

gttcttggat catcaggcaa ctttcaacta cacagaccaa gggagagagg ggaccctcc 60

40

```

gaggccccat agggttctct gacatagtaga tgaccttttt ccaaaattttg #agcggg#d 120
tgggggccag gcgtgcggga gggaggacaa gaaactcggga gtggccgagg ataaagcggg 180
ggctccctcc accccacggg gccccagtttc tccccgctgc acgtggcca ggggtgctgc 240
atcacctcta aagccgggtcc cgccaaccgc cagccccggg actgaacttg cccctccggc 300
cgccccctcc ccgcagggga caggggcggg gagggagaga tccagagggg ggctggggga 360
ggtggggccg ccggggagga ggcgagggaa acggggagct ccagggagac ggcttccgag 420
ggagagttag aggggagggc agccccggct cggcacgctc cctccctcgg ccgctttctc 480
tcacataagc gcaggcagag ggcgcgtcag tcatgcctg cccctgggcc cgccgcggcc 540
gccgcggccg ctccagccgg ccgcctctgg aggatcctgc gccgcggcgc tcccgggccc 600
cgccgcggcc agccgcggcc ggggcctcc tcccgcgcc ggcaccgcc ccagcggccc 660
cgccgcagcg ccgcggccc ggctcctctc acttcgggga aggggagggg ggagggggac 720
gagggtctct ggggtttgg aggggtgaa catcgcggg tggtctggtg tcccgcgcc 780
cgctctcca aaaagctaca ccgacgcgga ccgcggcggc gtctcctc gcctcgtt 840
cacctcggg gctccgaatg cggggagctc ggatgtccgg tttcctgtga ggctttacc 900
tgacaccgc cgctttccc cggcactggc tgggagggcg cctgcaaag ttgggaaccg 960
ggagcccccg acccgtccc gccgcctcc gctcggccag ggggggtcgc cgggagggc 1020
ccgggggaga gggaccagga ggggcggcg gcctcggagg gggcccgcg ccccccccc 1080
tgccccgcc agcggaccgg tcccccccc ccggtccttc caccatg 1127

```

10

20

```

<210> 20
<211> 800
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) gene, promoter
region (AN: D26513

```

30

```

<400> 20
agaaccggta cccatctcag agatttgtt tgagctttga gtgagataaa atatgctgag 60
tgccctggata tcagtaggtg ctgtataata tgccggctat ttgcctgtgt tatttgagac 120
cctggctttg ctccctggcca cctgagttcc agtctcagtt ctgccatgta ttgactctgt 180
gatcctgggt aagtcactta accactccgt gcctcagttt ccccgatttt gtattcctcc 240
cctttcacct gccttatctc cctccactgc tgctacttaa tttgtttcct ctctgccacc 300
cctcaccagc atgtcagaca tacaaaatca aggcattttt gtgtgcttgg cacacagtag 360
atgcacaata aatgttgaag ggetgaacta atttgggttt gagtcatagg gagacttggg 420
ggagtgtggg tgattggata gattctggag actttagggg actgggcccg gggaaatgcg 480
gcctetaagc tctcgtgag gcggcttggg aggaatagtg actgacgtgg aggtggggga 540

```

40

ggtaggctggc ccggctgagg cccagggaga gggagaggag gcgggtggga gaggaggagg	600	
gtgtatctcc tttcgtcggc ccgccccttg gcttctgcac tgatgggtggg tggatgagta	660	
atgcatccag gaagcctgga ggctgtggt ttccgcaccc gctgccaccc ccgcccctag	720	
cgtggacatt tatcctctag cgctcaggcc ctgcccgcac ccgcccagat ccagcgccca	780	
gagagacacc agaggtacag	800	
<210> 21		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		10
<220>		
<221> misc_feature		
<223> Sense PCR primer for CC3 promoter (spec Table IIIa)		
<400> 21		
gctaagagga tattgacatt agacagg	27	
<210> 22		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> misc_feature		20
<223> Antisense PCR primer for CC3 promoter (spec Table IIIa)		
<400> 22		
agggggaggt gggtagtag	20	
<210> 23		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> misc_feature<223> Sense primer for NK4 promoter (Table IIIa)		
<400> 23		
tggagctaga agagcccgta gg	22	30
<210> 24		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> Antisense primer for NK4 promoter (Table IIIa)		
<400> 24		
gccaaaagtt caaggagcca a	21	
<210> 25		40
<211> 23		

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for SAA promoter (Table IIIa)

 <400> 25
 cagagttgct gctatgtcca cca 23

 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for SAA promoter (Table IIIa)

 <400> 26
 cactccttgt gtgctcctca cc 22

 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for beta-APP promoter (Table IIIa) 20

 <400> 27
 ttgctccttt ggttcgttct 20

 <210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for beta-APP promoter (Table IIIa)

 <400> 28
 gctgccgagg aaactgac 18 30

 <210> 29
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for t-TGase promoter (Table IIIa)

 <400> 29
 cccagggaga aatatccact gaagcaac 28

 <210> 30
 <211> 28 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for t-TGase promoter (Table IIIa)

 <400> 30
 tcgggcgggg gcggtggctc cttccact 28

 <210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for CTGF promoter

 <400> 31
 gcctcttcag ctacctactt cctaa 25

 <210> 32
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for CTGF promoter 20

 <400> 32
 cgaggaggac cacgaagg 18

 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for integrin B3 promoter

 <400> 33
 gattggtctt gccctcaaca g 21 30

 <210> 34
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for integrin B3 promoter

 <400> 34
 ccagcacagt cgcccaga 18

 <210> 35
 <211> 24 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for activin promoter

 <400> 35
 tgattccaat gtttttctaa aagg 24

 <210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for activin promoter

 <400> 36
 gaatgtctaa agagctcaga agt 23

 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for prosaposin promoter 20

 <400> 37
 ggtttaagca atttctggcc tct 23

 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for prosaposin promoter

 <400> 38
 cgtctgactc tccgcagtct gcaat 25 30

 <210> 39
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for Mac2-BP promoter

 <400> 39
 gtaaaactcc ctgatgatto ctct 25

 <210> 40
 <211> 22 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for Mac2-BP promoter

 <400> 40
 ctctgcagac tggtcctttg ac 22

 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for GAL-3 promoter

 <400> 41
 tgtcttcaca aggtggaagt gg 22

 <210> 42
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for GAL-3 promoter 20

 <400> 42
 ctggagggca gagcacag 18

 <210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for Mn-SOD promoter

 <400> 43
 taccaaccct aggggtaaaa ataaa 25 30

 <210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for Mn-SOD promoter

 <400> 44
 atgctgctag tgctggtgct ac 22

 <210> 45
 <211> 25 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for granulin promoter

 <400> 45
 gagactagga agccacttct ctttc 25

 <210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for granulin promoter

 <400> 46
 ctggaatgct gtgttctttt ctact 25

 <210> 47
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for p66shc promoter 20

 <400> 47
 gtggcagaca gggcactc 18

 <210> 48
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for p66shc promoter

 <400> 48
 ctctctgagct gctcctcaatg 19 30

 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for NK4

 <400> 49
 ggtgtcagct cctccttgtc 20

 <210> 50
 <211> 20 40

```

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Analytical sense primer for t-TGase

<400> 50
actacaactc ggcccatgac                20

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens                                10

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for cathepsin B promoter

<400> 51
ctcccagagta gctgggatta                20

<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for cathepsin B promoter                20

<400> 52
ccacgtgacc acgcgcga                    18

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for clusterin promoter

<400> 53
agccccttga cttctctcct                20                                30

<210> 54
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for clusterin promoter

<400> 54
ctcctggcga cgccgcgtt                19

<210> 55
<211> 24                                40

```

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for PSF promoter

 <400> 55
 aaagtgctgg gattagaggc gtga 24

 <210> 56
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for PSF promoter

 <400> 56
 tatgtattgc taaggaagc tattggag 28

 <210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for VEGF-C promoter 20

 <400> 57
 gttcttggat catcaggcaa ctt 23

 <210> 58
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for VEGF-C promoter

 <400> 58
 gtggaaggac cgggggtgg 19 30

 <210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Sense primer for TIMP-1 promoter

 <400> 59
 agaaccggta cccatctcag a 21

 <210> 60
 <211> 21 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Antisense primer for TIMP-1 promoter

 <400> 60
 ctgtacctct ggtgtctctc t 21

 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for t-TGase

 <400> 61
 gccagtttgt tcaggtggtt 20

 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for APP 20

 <400> 62
 ctcggttcctg acaagtgcaa 20

 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for APP

 <400> 63
 tgttcagagc acacctctcg 20 30

 <210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for p66(shc)

 <400> 64
 gaggggtgtgg ttcggactaa 20

 <210> 65
 <211> 20 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for p66(shc)

 <400> 65
 gccagaggt gtgattgtt 20

 <210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for CTFG

 <400> 66
 ggagagtctt tccagagcag 20

 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for CTFG 20

 <400> 67
 atgtcttcat gctggtgcag 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for MAC2-BP

 <400> 68
 accatgagtg tggatgctga 20 30

 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for MAC2-BP

 <400> 69
 acagggacag gttgaactgc 20

 <210> 70
 <211> 20 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for granulin

 <400> 70
 accacggacc tcctcactaa 20

 <210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for granulin

 <400> 71
 acactgcccc tcagctacac 20

 <210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for prosaposin 20

 <400> 72
 ccagagctgg acatgactga 20

 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for prosaposin

 <400> 73
 gtcacctcct tcaccaggaa 20 30

 <210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for SOD2

 <400> 74
 caaattgctg cttgtccaaa 20

 <210> 75
 <211> 20 40

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical antisense primer for SOD2

 <400> 75
 catccctaca agtccccaaa 20

 <210> 76
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Analytical sense primer for beta-actin

 <400> 76
 gggaaatcgt gcgtgacatt aag 23

 <210> 77
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature 20
 <223> Analytical antisense primer for beta-actin

 <400> 77
 tgtgttggeg tacaggtctt tg 22

 <210> 78
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 5x NFkB sequence 30

 <400> 78
 actcatcaat gtatcttatac atgtctggat ccaagctagg ggactttccg cttggggact 60
 ttccgctggg gactttccgc tggggacttt ccgctgggga ctttccgagg tgactctaga 120
 gggatataa tggaagctcg aattccagct tggcattccg gtactgttgg taaaatggaa 180

 <210> 79
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 1xNFkB sequence 40

<400> 79
 ccaagctgag ctctggggac ttccgcggt gactctagag ggtatataat ggaagctcga 60
 attccagctt ggcattccgg tactgttgg^t aaaatggaa 99

<210> 80
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 1xNFkB primer - sense

10

<220>
 <221> misc_feature
 <223> GC + SacI + NFkB + 8bp

<400> 80
 gcgagctctg gggactttcc gcggtgactc 30

<210> 81
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> Simian virus 40

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SV40 promoter

20

<400> 81
 agatctgcgc agcaccatgg cctgaaataa cctctgaaag aggaacttgg ttaggtacct 60
 tctgaggcgg aaagaaccag ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtga aagtccccag 120
 gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg 180
 gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag 240
 caaccatagt cccgccccta actccgccca tcccgccct aactccgcc agttccgcc 300
 attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg 360
 cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa 420
 agcttgattc ttctgacaca acagtctcga acttaagctg cagaagttag tcgtgaggca 480
 ctgggcaggt aagtatcaag gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggct 540
 tgtcgagaca gagaagactc ttgcgtttct gataggcacc tatttgtctt actgacatcc 600
 actttgcctt tctctccaca ggtgtccact ccagttcaa ttacagctct taaggctaga 660
 gtacttaata cgactcacta taggctagcc acc 693

30

<210> 82
 <211> 1067
 <212> DNA
 <213> Cytomegalovirus

40

<220>
 <221> misc_feature
 <223> CMV promoter

<400> 82
 agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatagcat aatcaatat 60
 tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc 120
 atgtccaata tgaccgccat gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
 tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
 tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
 tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
 aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt 420
 caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgacottac gggactttcc 480
 tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca 540
 gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat 600
 tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660
 taaccccgcc ccgttgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag 720
 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcac tagaagcttt attgaggtag tttatcacag 780
 ttaaattgct aacgcagtca gtgcttctga cacaacagtc tgaacttaa gctgcagaag 840
 ttggtcgtga ggcactgggc aggtaagtat caaggttaca agacaggttt aaggagacca 900
 atagaaactg ggcttgtcga gacagagaag actcctgcgt ttctgatagg cacctattgg 960
 tcttactgac atccactttg cctttctctc cacagggtgc cactcccagt tcaattacag 1020
 ctcttaaggc tagagtactt aatcagactc actataggct agccacc 1067

10

20

<210> 83
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial

30

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 1xNFkB primer - antisense

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 18bp 5' of last NFkB site + SacI + GC

<400> 83
 cggagctcag cttggatcca gacatg 26

<210> 84
 <211> 26

40

```

<212> DNA
<213> atificial

<220>
<221> misc_feature
<223> 1x NFkB Primer - antisense complement

```

```

<400> 84
catgtctgga tccaagctga gctccg

```

26

```

<210> 85
<211> 540
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus type 1

```

10

```

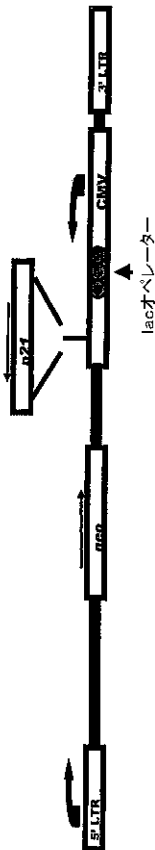
<400> 85
tgaagggt aattcaactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta ctccctgat tagcagaact acacaccagg gccaggagtc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtag cagttgagcc agataaggta gaagaggcca 180
ataaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg gatgaccctg 240
agagagaagt gtttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcacac gtggcccag 300
agctgcatcg ggagtaactc aagaactggt gacatcgagc ttgttacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg cgtggcctgg gccggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctgcatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta gctagggaac ccaactgctta agcctcaata aagctgcctt 540

```

20

【 図 1 】

Figure 1. IPTG調節シトロウイルスベクター-LINp21CO3



【 図 2 】

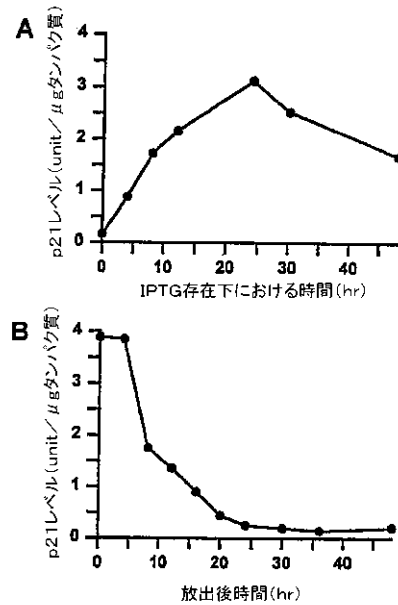


Fig. 2

【 図 6 】

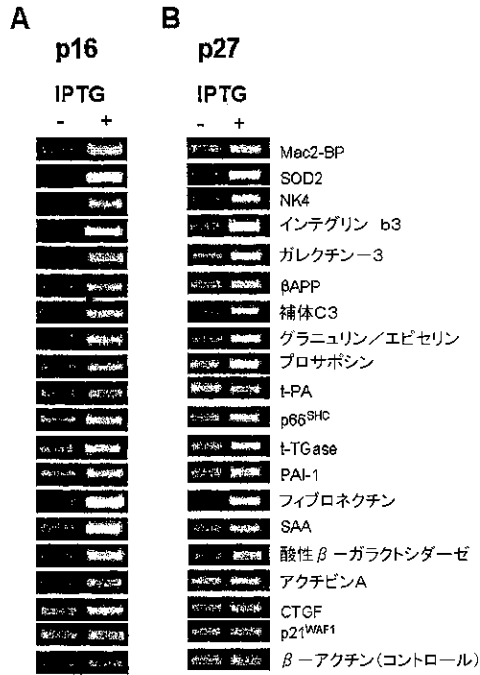
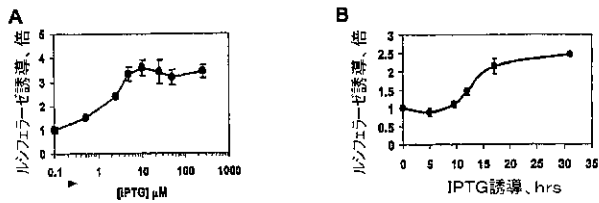


Fig. 6

【 図 8 】

Figure 8

HT1080 LuNK4p21細胞における、ルシフェラーゼ発現の、IPTG用量依存(24時間処理)(A) および時間経過(50 μM IPTG)(B)



【 図 7 】

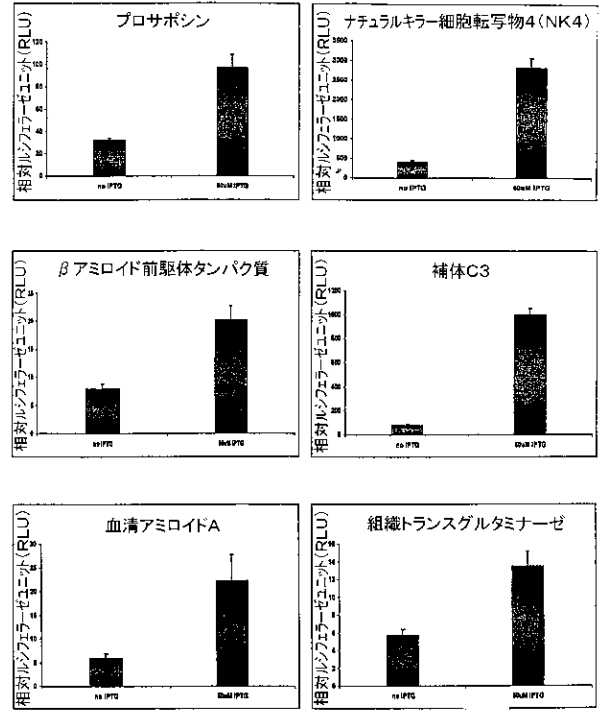


Figure 7

【 図 9 A . B 】

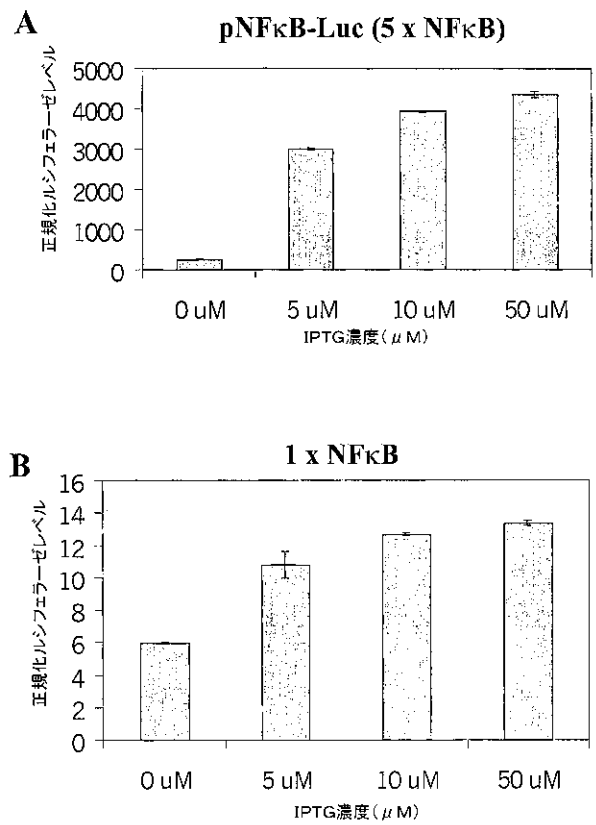


FIGURE 9

【 図 9 C . D 】

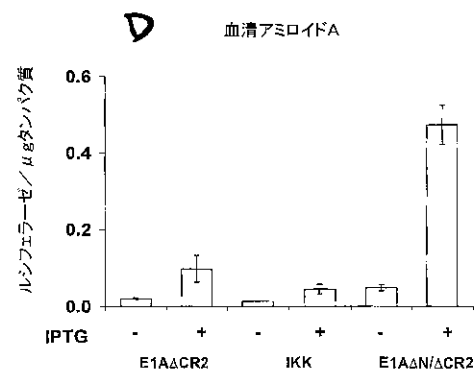
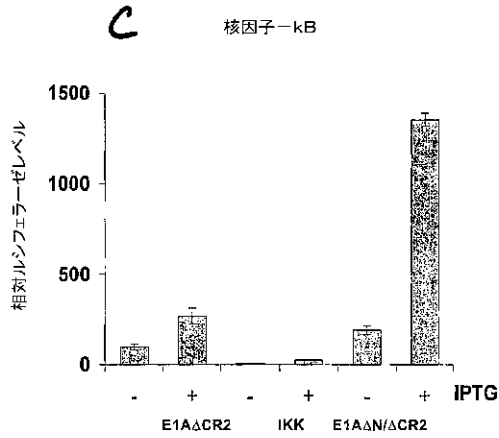


Fig. 9

【 図 9 E . F 】

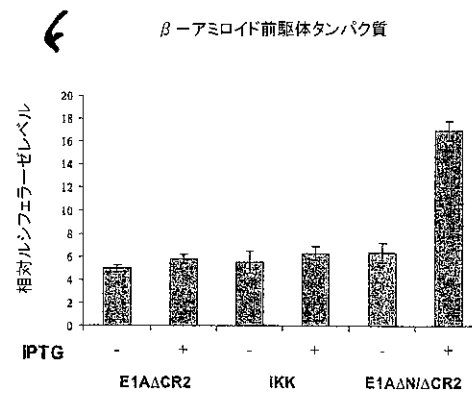
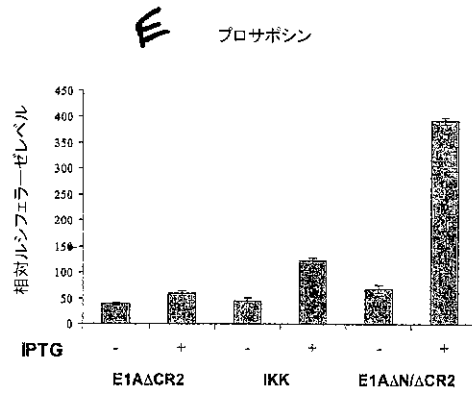


Fig. 9

【 図 9 G . H 】

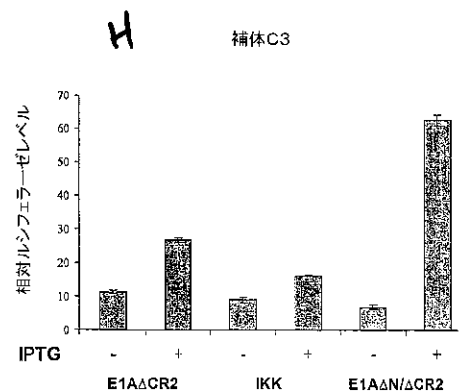
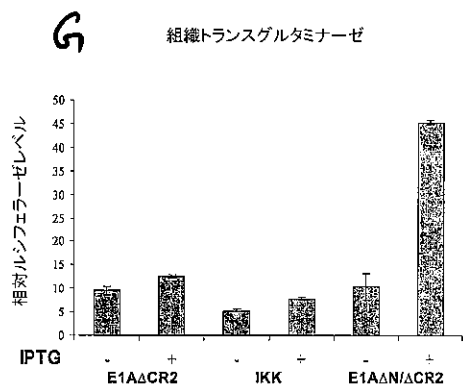


Fig. 9

【 図 9 I 】

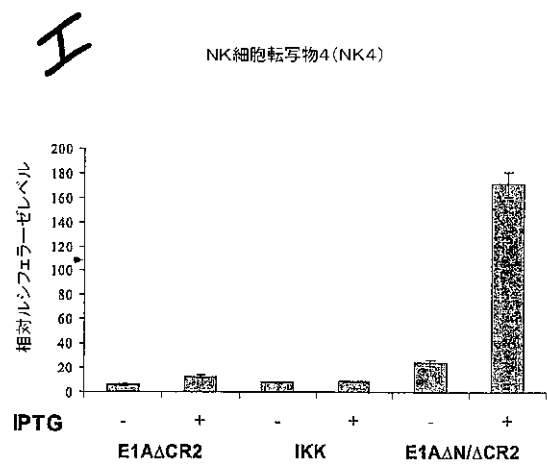
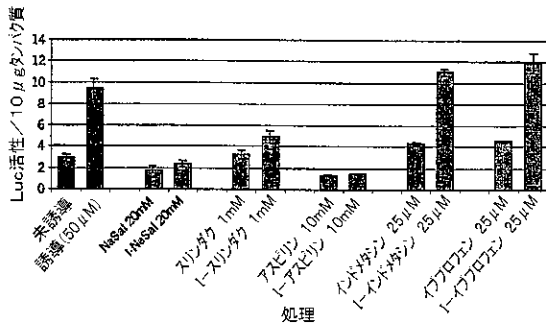


Fig. 9

【 図 1 0 】

Figure 10

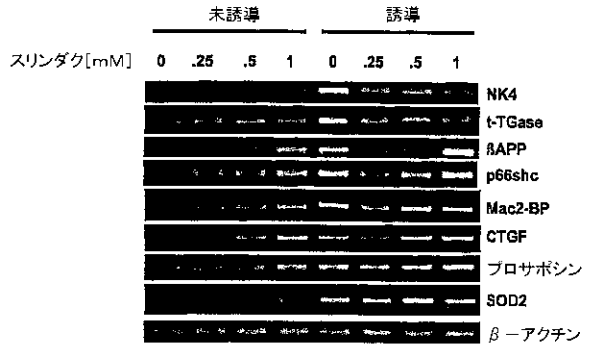
50 μM IPTGで未処理または処理(0)した、HT1080 Lu NK4p21細胞中での、ルシフェラーゼ発現における、表示したNSAIDの効果



【 図 1 1 】

Figure 11

表示した濃度のスリンダク存在下、2日間、IPTGで誘導しないか、または誘導した、LuNK4p21細胞のRT-PCR解析



【 図 1 2 A . B 】

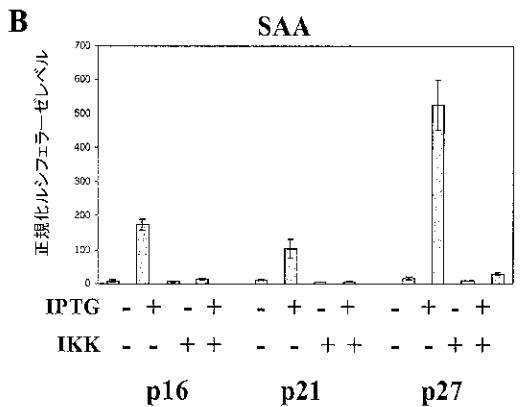
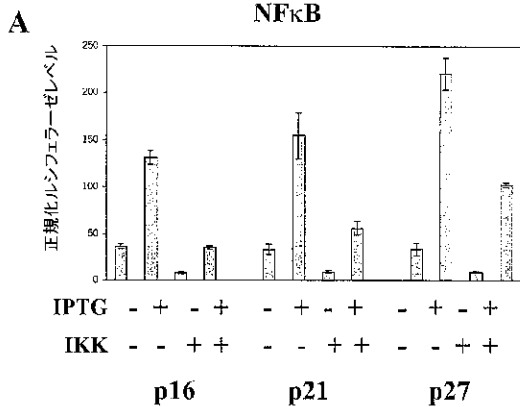


FIGURE 12

【 図 1 2 C . D 】

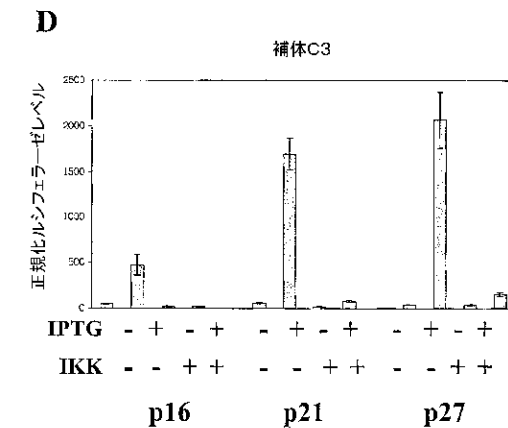
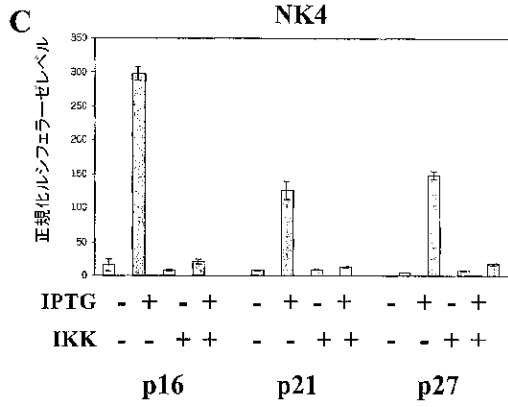


FIGURE 12

【 図 1 2 E 】

E

プロサボシン

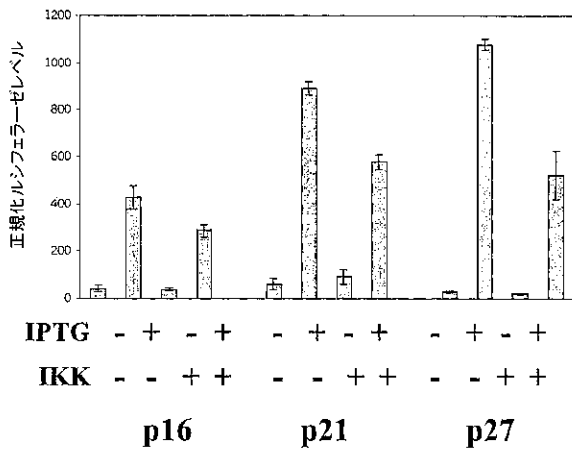


FIGURE 12

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 プール、 ジェイソン

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 1 2 シカゴ ナンバー 2 エス . ベル アベニュー 9
1 8

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB50 BB51 CB01 DA13 FB02 FB05
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 EA04 FA02 GA11 GA14
4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ13 QQ22 QQ33 QQ35 QQ79 QR32 QR60
QR80 QS36 QX02
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 BA03 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA16 ZA45 ZA81 ZB26

专利名称(译)	用于鉴定和调节由CDK抑制剂调节的基因表达的试剂和方法		
公开(公告)号	JP2005518222A	公开(公告)日	2005-06-23
申请号	JP2003571701	申请日	2002-08-29
申请(专利权)人(译)	伊利诺伊大学的董事会		
[标]发明人	ロニンソンイゴアビィ プールジェイソン		
发明人	ロニンソン、イゴアビィ、 プール、ジェイソン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/47 C12N5/02 C12N5/10 C12N7/01 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6897 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P9/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/4738 C12N2503/02 C12N2510/00 C12Q1/6897 G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/5023 G01N33/5091 G01N33/6893 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/GA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ22 4B063/QQ33 4B063/QQ35 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR60 4B063/QR80 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C084/ZA45 4C084/ZA81 4C084/ZB26		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/315791 2001-08-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定抑制诱导涉及病毒感染，癌症和年龄相关疾病的基因的化合物的方法和试剂，例如由细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂诱导的基因。

表IIIb. PCR条件

プロモーター	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物サイズ
CC3	95°, 1 min	63°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	31	1018 bp
NK4	94°, 1 min	65°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	877 bp
SAA	94°, 1 min	68°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	1000 bp
βAPP	94°, 1 min	62.9°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	30	623 bp
t-TGase	94°, 1 min	66.5°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	33	1600 bp