

(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2004-509608

(P2004-509608A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	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	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00		4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00		4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02		4 C O 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-500769 (P2002-500769)	(71) 出願人	501394136
(86) (22) 出願日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		ボード オブ トラスティーズ オブ サ ユニヴァースティ オブ イリノイ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月26日 (2002.11.26)		アメリカ合衆国 61801 イリノイ州
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/017161		アーバナ サウス ライト ストリート
(87) 国際公開番号	W02001/092578		506 ヘンリー アドミニストレイシ ョン ビルディング 352
(87) 国際公開日	平成13年12月6日 (2001.12.6)	(74) 代理人	100083806
(31) 優先権主張番号	60/207,535		弁理士 三好 秀和
(32) 優先日	平成12年5月26日 (2000.5.26)	(74) 代理人	100068342
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 三好 保男
		(72) 発明者	ロニンソン、 イゴール ピー、 アメリカ合衆国 イリノイ州 60091 ウィルメット リンカーン レーン 2 731

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レチノイドにより調節される遺伝子の発現を同定する試薬及び方法

## (57) 【要約】

本発明は、レチノイドにより誘導される成長抑制遺伝子を同定する。本発明は、これらの細胞遺伝子の発現を誘導するレチノイド以外の化合物を同定するための、試薬及び方法を提供する。本発明はまた、組換え哺乳動物細胞であり、レチノイドにより調節される遺伝子のプロモーターの転写制御下でリポーター遺伝子を発現する組換え発現作成物を含む試薬、および、該細胞を使用して、これらの細胞遺伝子の発現を調節するレチノイド以外の化合物を同定する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

発現がレチノイドにより誘導される遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結したリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物であって、該プロモーターは R A R E 部位を含まない、前記発現作成物。

## 【請求項 2】

リポーター遺伝子が、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼをコードする、請求項 1 に記載の組換え発現作成物。

## 【請求項 3】

レチノイドが、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナートまたはレチノールである、請求項 1 に記載の組換え発現作成物。

## 【請求項 4】

プロモーターが、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 ; 配列番号 1 )、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3 ( 配列番号 2 )、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N ; 配列番号 3 )、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 ( 配列番号 4 )、プロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ; 配列番号 5 )、M a c - 2 結合タンパク質 ( M a c - 2 B P ; 配列番号 6 )、プロテイン C 阻害剤 ( P C I ; 配列番号 7 )、T 細胞受容体 ( 配列番号 8 )、レチナルオキシダーゼ ( 配列番号 9 )、B e n e ( 配列番号 1 0 )、H I F - 2 / E P A S - 1 ( 配列番号 1 1 ) またはセレクトイン L ( 配列番号 1 2 ) に由来するプロモーターである、請求項 1 に記載の組換え発現作成物。

## 【請求項 5】

プロモーターが細胞遺伝子由来のプロモーターであり、哺乳動物細胞におけるその発現はレチノイドにより誘導され、それにより細胞の成長を阻害する、請求項 1 に記載の組換え発現作成物。

## 【請求項 6】

プロモーターが、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 ; 配列番号 1 )、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3 ( 配列番号 2 )、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N ; 配列番号 3 )、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 ( 配列番号 4 )、またはプロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ; 配列番号 5 ) に由来するプロモーターである、請求項 5 に記載の組換え発現作成物。

## 【請求項 7】

請求項 1、2、3、4、5 または 6 に記載の組換え発現作成物を含む、組換え哺乳動物細胞。

## 【請求項 8】

哺乳動物細胞においてレチノイド誘導性遺伝子の発現を誘導する化合物を同定する方法であって、該方法は、

- ( a ) 化合物の存在下及び不在下で請求項 7 に記載の組換え哺乳動物細胞を培養し；
- ( b ) 化合物の存在下での該細胞におけるリポーター遺伝子発現を、化合物の不在下での該細胞におけるリポーター遺伝子発現と比較し；そして
- ( c ) リポーター遺伝子発現が、化合物の不在下よりも化合物の存在下の方がより高い場合に、レチノイド誘導遺伝子発現を誘導する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

## 【請求項 9】

リポーター遺伝子の発現が、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項 8 の方法。

## 【請求項 10】

リポーター遺伝子の発現が、リポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項 8 の方法。

## 【請求項 11】

10

20

30

40

50

リポーター遺伝子の発現が、相補的核酸に対するハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 8 の方法。

【請求項 12】

哺乳動物細胞におけるレチノイド誘導遺伝子の発現を誘導する化合物を同定する方法であって、

(a) 化合物の存在下及び不在下で細胞を培養し；

(b) 発現がレチノイドにより誘導される少なくとも 1 つの細胞遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし、ここでのプロモーターは R A R E 部位を含まず；そして

(c) 下位区分 (b) の細胞遺伝子の発現が、化合物の存在下でより高い場合に、レチノイド誘導遺伝子発現の誘導物質として化合物を同定する段階を含む、前記方法。

10

【請求項 13】

細胞遺伝子が、インシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 ; N C B I 受託番号 M 3 5 8 7 8 . 1 )、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3 ( 受託番号 A C 0 0 4 5 0 3 . 1 )、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N ; 受託番号 A H 0 0 9 3 8 2 . 1 )、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 ( 受託番号 A L 0 3 1 9 8 3 )、M a c - 2 結合タンパク質 ( M a c - 2 B P ; 受託番号 U 9 1 7 2 9 )、プロテイン C 阻害剤 ( P C I ; 受託番号 A L 0 4 9 8 3 9 . 3 )、T 細胞受容体 ( 受託番号 A C 0 0 6 0 3 3 . 2 )、レチナルオキシダーゼ ( 受託番号 A F 0 1 0 2 6 0 )、B e n e ( 受託番号 A P 0 0 1 2 3 4 . 3 )、H I F - 2 / E P A S - 1 ( 受託番号 N T \_ 0 0 5 0 6 5 . 3 )、セレクチン L ( 受託番号 A L 0 2 1 9 4 0 . 1 )、またはプロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ; 受託番号 A L 1 3 6 2 9 5 . 2 ) である、請求項 13 の方法。

20

【請求項 14】

細胞遺伝子が、哺乳動物細胞におけるその発現がレチノイドにより誘導され、それにより細胞の成長を阻害する遺伝子である、請求項 12 の方法。

【請求項 15】

細胞遺伝子が、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 )、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N )、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 またはプロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ) である、請求項 12 の方法。

30

【請求項 16】

細胞遺伝子の発現が、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項 12 の方法。

【請求項 17】

細胞遺伝子の発現が、細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項 12 の方法。

【請求項 18】

細胞遺伝子の発現が、相補的核酸に対するハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 12 の方法。

【請求項 19】

癌の作用を予防または寛解するように動物を処置する方法であって、該方法は、それを必要とする動物に、請求項 8 または 12 の方法に従って同定した化合物の医薬組成物の治療有効量を投与する段階を含む、前記方法。

40

【請求項 20】

動物がヒトである、請求項 19 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、2000年5月26日に提出された、米国仮特許出願番号第60/207,535号の優先権を主張する。

【0002】

50

本出願は、国立衛生研究所からの補助金、R O 1 C A 6 2 0 9 9 により支援された。政府は、本発明にある権利を有し得る。

#### 【0003】

##### 1. 発明の分野

本発明は、細胞遺伝子発現の変化、及び、細胞遺伝子発現の変化をもたらす化合物に関する。特に、本発明は、その発現が、レチノイン酸及びビタミンAに化学的に関連しているレチノイドとして知られる分類の化合物により調節される遺伝子の同定に関する。より具体的には、本発明は、これらの細胞遺伝子の発現を調節するレチノイド以外の化合物を同定する方法を提供する。本発明はまた、レチノイドにより調節される遺伝子のプロモーターの転写制御下でリポーター遺伝子を発現する組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物細胞である試薬、及び、これらの細胞遺伝子の発現を調節するレチノイド以外の化合物を同定するために該細胞を使用する方法を提供する。

10

#### 【0004】

##### 2. 関連分野の要約

レチノイドは、ビタミンAの天然または合成誘導体である。それらは、リガンド依存的な転写因子として作用する核受容体に結合することにより、転写レベルで細胞成長及び分化を調節する分類の臨床的に重要な分化剤を含む。これらの化合物は、レチノイド受容体を発現するインビロ及びインビトロで多くの腫瘍細胞型における、細胞分化または末端増殖停止を誘導し(Warrell, 1997, 癌、腫瘍学の原理及び実践(Devitaら編)、483~490頁(Lippincott-Raven, フィラデルフィア)、これによりそれらは、前骨髄球性白血病などのいくつかの癌の処置及び癌化学防御に有用となっている。

20

#### 【0005】

レチノイド作用の標的は細胞核であり、レチノイドは、RAR(レチノイン酸受容体)及びRXR(レチノイドX受容体)と呼ばれる、2種類の受容体に結合する(Mangelsdorfら、1994、「レチノイド受容体」レチノイド:生物学、化学及び医学、Spornら編、ニューヨーク;Raven Press、319~351頁)。レチノイド結合受容体分子は、転写因子として作用する、ホモ(RXR-RXR)及びヘテロダイマー(RAR-RXR)を形成する。これらのダイマーは、RARE(レチノイン酸応答エレメント)と呼ばれるレチノイド応答性標的遺伝子のプロモーターにおける特異的シス調節配列に結合し、その転写を調節する。遺伝子発現の生じた変化は、標的遺伝子発現のレチノイド受容体調節により直接に、または、レチノイド活性化シグナル伝達経路、例えば、転写因子AP-1により活性化される経路の作用により間接的に引き起こされる。これらの遺伝子発現変化は、最終的に、レチノイドの成長抑制作用に關与する(Warrell, 同上)。

30

#### 【0006】

レチノイドは、癌処置においていくつかの臨床的な成功を示したが、その使用は、耐性の発達(Millerら、1998, Cancer 83: 1471~1482)または毒性という、少なくとも2つの因子により制限されている。耐性の発達は、一部には、レチノイン酸受容体及びレチノイド受容体を介した経路の変化による(Millerら、同書)。

毒性は、一般に、レチノイドによる処置により生じる遺伝子発現の多面発現変化から生じる、レチノイドの広範な生理的結果に帰せられる。

40

#### 【0007】

以前、上皮細胞において数個の成長抑制遺伝子が、レチノイドにより誘導されることが判明した。しかし、これらの遺伝子のいずれも、単独ではレチノイドの成長抑制作用に關与していないことが示された。

#### 【0008】

Adamoら、1992, Endocrinology 131: 1858~1866は、乳癌細胞系におけるインシュリン様成長因子結合タンパク質3(IGFBP-3)の誘導を開示した。

50

## 【0009】

Swissheilmら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4472~4476は、別のインシュリン様成長因子結合タンパク質であるIGFBP-7（インシュリン様成長因子結合タンパク質関連タンパク質1すなわちIGFBP-rP1、及びmac25としても知られる）を、フェンレチニド（4-ヒドロキシフェニルレチナミド、4-HPR）による細胞の処置により誘導されるタンパク質として同定した。このタンパク質はまた、哺乳動物癌細胞系において下方制御されることが示された。

## 【0010】

Katoら、1996、Oncogene 12: 1361~1364は、mac25c DNAの骨肉腫細胞系への導入により成長が阻害されたことを示した。

10

## 【0011】

Gucevら、1996、Cancer Res. 56: 1545~1550は、IGFBP-3を、全トランスレチノイン酸（RA）及びトランスフォーミング成長因子（TGF-）の両方により、乳癌細胞で誘導されるタンパク質として同定した。これらの細胞におけるRA媒介成長抑制は、IGFBP-3発現を阻害する細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより、または、外来性IGFBP-3を細胞に導入することにより軽減した。

## 【0012】

DiSepioら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14811~14815は、推定腫瘍サプレッサー遺伝子である、タザロテン誘導遺伝子3（TIG-3、レチノイド誘導性遺伝子1、すなわちRIG-1としても知られる）は、初期ヒトケラチノサイトにおいて誘導されることを示した。TIG-3は、癌細胞での発現の減少を示し、発現時には癌細胞の成長を阻害し、そして、既知の腫瘍サプレッサー遺伝子H-rev107と配列相同性を共有する。

20

## 【0013】

Huangら、2000、Molec. Cell. Endocrinol. 159: 15~24は、TIG-3が、インビトロでの胃癌細胞系においてレチノイドにより誘導されたことを示した。

## 【0014】

Liuら、2000、J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 126: 85~90は、肝癌細胞系における転移サプレッサー遺伝子nm23-H1のRA誘導発現を報告した。

30

## 【0015】

従来技術の教義により、レチノイド媒介成長抑制の1つの機序は、腫瘍サプレッサー遺伝子、及び、抑制されているか、または、その発現が腫瘍細胞において下方制御されている、腫瘍サプレッサー遺伝子及び他の成長抑制遺伝子の活性化（または再活性化）であることが示唆される。しかし、当分野の報告は、レチノイド誘導成長停止の条件下で活性化される成長抑制遺伝子の実体または数を示すことができていない。かかる報告はまた、レチノイド誘導遺伝子が、そのプロモーター中のRARE部位を通して直接誘導されたのか、または間接的に誘導されたのかを示すことができていない。後者の場合、レチノイドに

40

## 【0016】

当分野には、発現がレチノイドにより調節される遺伝子、特に、レチノイドにより間接的に誘導される成長抑制遺伝子を同定する必要があるが依然としてある。また、当分野には、レチノイド調節される細胞遺伝子、特に成長抑制遺伝子の発現に対する、化合物の作用を評価する方法を開発する必要がある。さらに、現在の臨床使用において、耐性が容易に発達せず、レチノイドの毒性及び他の全身的副作用のない、細胞遺伝子発現に対するレチノイドの作用を模倣した代替の化合物を開発する必要がある。

## 【0017】

（発明の要約）

50

本発明は、発現がレチノイドにより調節される遺伝子、並びに、該化合物に対する耐性または毒性を引き起こすことなく、レチノイドの作用を模倣する化合物を同定するための試薬及び方法を提供する。

【0018】

第一の態様において、本発明は、遺伝子の発現がレチノイドにより誘導され、RARE部位を含まない、遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結したリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を提供する。好ましい実施形態において、リポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼをコードする。好ましいレチノイドは、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナートおよびレチノール(ビタミンA)を含む。本発明の組換え発現作成物を含む最も好ましいプロモーターは、レチノイドにより誘導され、成長抑制活性を示すことが知られている、細胞遺伝子由来のプロモーターである。好ましい実施形態において、細胞遺伝子プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3(IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質IG-H3(配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質(EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質FAT10(配列番号4)、プロテアソームアクチベーターPA28サブユニット(PA28; 配列番号5)、Mac-2結合タンパク質(Mac-2BP; 配列番号6)、プロテインC阻害剤(PCI; 配列番号7)、T細胞受容体(配列番号8)、レチナルオキシダーゼ(配列番号9)、Bene(配列番号10)、HIF-2/EPAS-1(配列番号11)またはセレクチンL(配列番号12)に由来する。特に好ましい実施形態において、プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3(IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質IG-H3(配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質(EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質FAT10(配列番号4)、またはプロテアソームアクチベーターPA28サブユニット(PA28; 配列番号5)である。

10

20

【0019】

第二の実施形態において、本発明は、レチノイド誘導性細胞遺伝子由来のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする、発明の組換え発現作成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、リポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼをコードする。好ましいレチノイドは、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナート及びレチノールを含む。発明の組換え発現作成物を含む最も好ましいプロモーターは、レチノイドにより誘導され、成長抑制活性を有することが知られている細胞遺伝子由来の、または、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3(IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質IG-H3(配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質(EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質FAT10(配列番号4)、プロテアソームアクチベーターPA28サブユニット(PA28; 配列番号5)、Mac-2結合タンパク質(Mac-2BP; 配列番号6)、プロテインC阻害剤(PCI; 配列番号7)、T細胞受容体(配列番号8)、レチナルオキシダーゼ(配列番号9)、Bene(配列番号10)、HIF-2/EPAS-1(配列番号11)またはセレクチンL(配列番号12)由来のプロモーターである。特に好ましい実施形態において、プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3(IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質IG-H3(配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質(EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質FAT10(配列番号4)、またはプロテアソームアクチベーターPA28サブユニット(PA28; 配列番号5)に由来する。

30

40

【0020】

第三の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞においてレチノイド誘導性遺伝子の発

50

現を誘導する化合物を同定する方法を提供する。この方法では、レチノイド誘導性細胞遺伝子由来のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする本発明の組換え発現作成物を含む本発明に記載の組換え哺乳動物細胞を、化合物の存在下及び不在下で哺乳動物細胞において少なくとも1つのレチノイド誘導遺伝子の発現を誘導する条件下で培養する。化合物の存在下における細胞のリポーター遺伝子発現を、化合物の不在下における該細胞のリポーター遺伝子発現と比較する。リポーター遺伝子発現が、化合物の不在下よりも化合物の存在下の方が高い場合に、レチノイド誘導遺伝子発現を誘導する化合物と同定する。好ましい実施形態において、リポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼをコードする。好ましいレチノイドは、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナート及びレチノールを含む。本発明の組換え発現作成物を含む最も好ましいプロモーターは、レチノイドにより誘導され、成長抑制活性を示すことが知られるか、または、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3 (IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質 IG-H3 (配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質 (EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質 FAT10 (配列番号4)、プロテアソームアクチベーター PA28 サブユニット (PA28; 配列番号5)、Mac-2 結合タンパク質 (Mac-2BP; 配列番号6)、プロテインC阻害剤 (PCI; 配列番号7)、T細胞受容体 (配列番号8)、レチナルオキシダーゼ (配列番号9)、Bene (配列番号10)、HIF-2 / EPAS-1 (配列番号11) またはセレクチンL (配列番号12) に由来する、細胞遺伝子のプロモーターである。特に好ましい実施形態において、プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3 (IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質 IG-H3 (配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質 (EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質 FAT10 (配列番号4)、またはプロテアソームアクチベーター PA28 サブユニット (PA28; 配列番号5) に由来する。好ましい実施形態において、リポーター遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して、相補的で検出可能なように標識された核酸に対するハイブリダイゼーションにより、または、リポーター遺伝子産物の活性を検出することにより検出する。

10

20

30

#### 【0021】

第四の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞においてレチノイド誘導性遺伝子の発現を誘導する化合物の同定法を提供する。本発明のこの態様において、哺乳動物細胞を、化合物の存在下及び不在下で培養する。その後、細胞を、発現がレチノイドにより誘導される少なくとも1つの細胞遺伝子の発現についてアッセイする。下位区分 (b) の細胞遺伝子の発現が、化合物の不在下よりも化合物の存在下の方が高い場合、哺乳動物細胞においてレチノイド誘導性遺伝子の発現を誘導する化合物と同定する。好ましいレチノイドは、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナートまたはレチノールを含む。遺伝子は、レチノイドにより誘導され、成長抑制活性またはヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3 (IGFBP-3; NCBI 受託番号 M35878.1)、分泌細胞接着タンパク質 IG-H3 (受託番号 AC004503.1)、新生物に欠失した上皮タンパク質 (EPLIN; 受託番号 AH009382.1)、ユビキチン様タンパク質 FAT10 (受託番号 AL031983)、Mac-2 結合タンパク質 (Mac-2BP; 受託番号 U91729)、プロテインC阻害剤 (PCI; 受託番号 AL049839.3)、T細胞受容体 (受託番号 AC006033.2)、レチナルオキシダーゼ (受託番号 AF010260)、Bene (受託番号 AP001234.3)、HIF-2 / EPAS-1 (受託番号 NT\_005065.3)、セレクチンL (受託番号 AL021940.1)、またはプロテアソームアクチベーター PA28 サブユニット (PA28; 受託番号 AL136295.2) を有することが知られている細胞遺伝子である。特に好ましい実施形態において、遺伝子は、ヒトIGFBP-3、IG-H3、EPLIN、FAT10 または PA28 であ

40

50

る。好ましい実施形態において、細胞遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して、相補的に検出可能なように標識された核酸に対するハイブリダイゼーションにより、または、遺伝子産物の活性を検出することにより検出する。

【0022】

本発明は、癌を有する動物を処置して、疾患を予防または寛解するための方法も提供する。この態様において、レチノイド誘導遺伝子の発現を誘導する本発明により同定される化合物の治療有効投与量を、それを必要とする動物、最も好ましくはヒトに投与する。

【0023】

本発明の特に好ましい実施形態は、ある好ましい実施形態及び特許請求の範囲の以下のより詳細な説明から明らかとなる。

【0024】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、レチノイドにより発現が誘導される遺伝子を提供する。本発明はまた、レチノイドの遺伝子発現誘導特性を模倣しているが、レチノイド処理に特徴的である毒性及び細胞が耐性を発達する傾向のない、化合物を同定するための、試薬及び方法も提供する。

【0025】

本発明者らは、ヒト乳癌MCF-7細胞などのレチノイド感受性細胞のレチノイドによる処理は、レチノイド誘導性遺伝子のコホートを含む遺伝子群の発現を誘導すると決定した。これらの遺伝子のいくつかは成長抑制遺伝子、すなわち、その発現が腫瘍細胞の成長または腫瘍原性を阻害する遺伝子である。これらの遺伝子は、とりわけ、腫瘍細胞、及び、不適切にまたは病的に増殖する他の細胞において、その成長を阻害するために、誘導すべき標的として重要である。発現がレチノイドにより調節可能である遺伝子は、RAREと呼ばれる、そのプロモーターに特定のクラスの配列を含むことが当分野では知られていた(Mangelsdorfら、1994、レチノイド：生物学、化学、及び医学、(Spornら編)、327~330頁(Raven Press、ニューヨーク)。しかし、驚くべきことに、本発明者らにより決定されたMCF-7細胞でレチノイドにより最も強力に誘導される1つの遺伝子を除く全ての遺伝子が、そのプロモーターに該RARE配列を含まなかった。この意外な結果により、レチノイドは、これらの遺伝子のRARE配列へのRXRホモダイマーまたはRAR-RXRヘテロダイマー結合を必要としない機序により、これらの遺伝子を間接的に活性化することが示された。この結果により、レチノイド以外の化合物は、レチノイド感受性及びレチノイド非感受性細胞の両方において、これらの(及び、おそらく他の)成長抑制遺伝子の発現を誘導できるはずであることが示唆された。本発明より前には、レチノイド非感受性細胞を、レチノイド誘導性成長抑制遺伝子を発現するように誘導できることを疑う理由はなかった。

【0026】

本明細書に開示したのは、哺乳動物細胞において成長抑制効果を有する数個の遺伝子を含む、13個のレチノイド誘導性遺伝子の本発明者らによる発見である。当業者は、これらの結果は完全ではなく、他の成長抑制遺伝子も、哺乳動物細胞においてレチノイドにより誘導され得ることを理解するだろう。本結果を鑑みて、当業者はまた、これらの追加的な遺伝子のいくつかは、そのプロモーターにRARE配列を欠き、従って、レチノイドにより間接的に誘導されると期待されることを理解するだろう。本明細書に開示したように、プロモーターにRARE配列を欠いたレチノイド誘導性遺伝子は、細胞増殖に対する生理学的に基づいた成長抑制効果を模倣したレチノイド以外の化合物を同定するための有用な標的である。該化合物の同定は、有利には、哺乳動物細胞、特に腫瘍細胞及び不適切または病的に増殖する他の細胞において、成長停止を引き起こす代替的な薬剤を提供する。該化合物は、レチノイドの成長抑制効果を模倣できるので有益である。

【0027】

該化合物の別の利点は、従来技術で既知の他の成長抑制化合物で見られる全身性副作用を引き起こすことなく、成長抑制効果を示すことを期待できることである。例えば、従来技術で既知の多くの成長抑制薬物及び化合物は、不利には、p21遺伝子発現を誘導し、こ

10

20

30

40

50

れは、その発現が、本明細書に参考として取込んだ、疾患、特に年齢関連疾患、例えばアルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、腎疾患、及び関節炎の発達に関連している（2001年2月1日に提出された共所有及び同時係属米国特許出願番号第60/\_\_\_\_（代理人名簿番号99, 216-E）及び2001年5月21日に提出された米国特許出願番号第09/\_\_\_\_（代理人名簿番号99, 216-F）、複数の遺伝子を活性化することにより老化、成長停止及びアポトーシスを誘導する。これに対し、MCF-7細胞におけるレチノイン酸誘導成長抑制は、p21を誘導しない（Zhuら、1997、Exp. Cell. Res. 234: 293~299）。レチノイドにより誘導される本明細書に同定した遺伝子は、動物で発現した場合に、疾患或いは不利または病的な作用に関連していないことが知られている。従って、本明細書に同定した1つまたは複数の遺伝子の発現を誘導することによるレチノイドの成長抑制効果を模倣した該化合物の同定により、かかる副作用は減少または全く示さないことが期待でき、これによりそれらは、抗腫瘍及び他の療法より良好な薬剤となる。従って、当分野で既知の成長抑制化合物の毒性副作用を引き起こすことなくレチノイドの成長抑制効果を模倣した化合物の発見は、有利には、本発明により提供される。

10

## 【0028】

本明細書に提供したように、レチノイドに応答性であるがそのプロモーターにRARE部位を含まない哺乳動物遺伝子は、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3（IGFBP-3；NCBI受託番号M35878.1）、分泌細胞接着タンパク質IG-H3（受託番号AC004503.1）、新生物に欠失した上皮タンパク質（EPLIN；受託番号AH009382.1）、ユビキチン様タンパク質FAT10（受託番号AL031983）、Mac-2結合タンパク質（Mac-2BP；受託番号U91729）、プロテインC阻害剤（PCI；受託番号AL049839.3）、T細胞受容体（受託番号AC006033.2）、レチナルオキシダーゼ（受託番号AF010260）、Bene（受託番号AP001234.3）、HIF-2/EPAS-1（受託番号NT\_005065.3）、セレクトインL（受託番号AL021940.1）またはプロテアソームアクチベーターPA28サブユニット（PA28；受託番号AL136295.2）を含む。

20

## 【0029】

本発明の目的では、「細胞」または「細胞群」なる言及は等価であるとし、特に、当分野で既知のように育成及び維持された哺乳動物細胞のインビトロ培養物を包含する。

30

## 【0030】

本発明の目的では、複数形の「細胞遺伝子」の言及は、単一の遺伝子並びに2つ以上の遺伝子を包含するものとする。また、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にあるリポーター作成物の調節の効果を、第一遺伝子で検出でき、その後、該効果を、第二または任意の数の追加的な遺伝子またはリポーター遺伝子作成物を試験することにより複製できることが当業者により理解されるだろう。または、2つ以上の遺伝子またはリポーター遺伝子作成物の発現を同時に本発明の範囲内でアッセイできる。

## 【0031】

本明細書に使用したような、「RARE部位」なる語は、1つ、2つまたは5つのヌクレオチドだけ離れた、2つの六量体コアモチーフ（Mangelsdorfら、1994、レチノイド：生物学、化学、及び医学（Spornら編）、327~330頁（Raven Press、ニューヨーク）に定義の通り）を包含するものとし、ここでの六量体モチーフは、直列、逆方向または回文構造反復として整列している。

40

## 【0032】

本発明者らは、MCF-7ヒト乳癌細胞を、低用量のレチノイドで処理すると、最小限の細胞毒性を伴い次第に成長停止及び細胞老化の表現型特徴を誘導する（Changら、1999、Cancer Res. 59: 3761~3767）。比較的低用量のRAが、MCF-7細胞において不可逆的な成長停止を誘導することが判明したが、細胞死により

50

引き起こされる細胞数の減少はほんの僅かであった。「低用量」のRA(10~100nM)によるこの効果が顕現するのには、4~6日間の連続的なRAへの暴露が必要であった。低用量のレチノイド処理は、拡大し平坦な細胞形態の発達及び老化関連マーカーSA-galactosidase(SA-gal)の発現を含む、細胞老化に特徴的な処理細胞における表現型特徴の発達を伴った。SA-galの誘導も、フェンレチニドでの処理後にインビボでMCF-10T新哺乳動物上皮細胞の異種移植片で観察された。これらの結果により、レチノイド処理は、細胞分裂停止用量で投与した場合に、インビボ及びインビトロで、腫瘍細胞に老化を誘導することが示唆された。

#### 【0033】

老化は、当業者に既知の多くの方法で哺乳動物細胞に誘導できる。例えば、老化は、インビボまたはインビトロで、正常な細胞成長の当然の結果であり：正常細胞が老化する前に受けることのできる、細胞分裂、継代または世代の数は限定されている。正確な数は、細胞型及び起源種により変化する(Hayflick & Moorhead, 1961, Exp. Cell. Res. 25: 585~621)。老化はまた、大半の抗癌薬または照射などの細胞毒性薬物での処理により、正常及び腫瘍細胞の両方に誘導できる。Changら、1999, Cancer Res. 59: 3761~3767参照。老化はまた、その細胞に、腫瘍サプレッサー遺伝子(例えばp53、p21、p16またはRb)を形質導入し、そこで該遺伝子を発現することにより、任意の哺乳動物細胞で迅速に誘導できる。Sugrueら、1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9648~9653; Uhrbornら、1997, Oncogene 15: 505~514; Xuら、1997, Oncogene 15: 2589~2596; Vogtら、1998, Cell Growth Differ. 9: 139~146参照。哺乳動物細胞に老化を誘導するこれら及び他の手段並びに方法は、当業者により認識及び理解され、本発明の範囲内に該当する。

#### 【0034】

本発明の試薬は、レチノイドに応答して細胞遺伝子発現を誘導できる、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、最も好ましくはヒト細胞を含み、該遺伝子は、遺伝子工学により導入した内因性遺伝子または外来性遺伝子である。好ましい細胞は、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を含む。

#### 【0035】

組換え発現作成物は、当業者に理解されているような適切な哺乳動物細胞に導入できる。該作成物の好ましい実施形態は、当分野で既知のような、感染性ベクター、より好ましくはウイルスベクター、最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、アデノ随伴ウイルスベクター、及びワクシニアウイルスベクターで作成する。一般に、哺乳動物細胞、生物学：実践的なアプローチ(Butler編)、オックスフォード大学出版：ニューヨーク、1991、57~84頁参照。

#### 【0036】

本発明はまた、リポーター遺伝子が、発現がレチノイドにより誘導される遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、組換え発現作成物を提供する。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、レチノイドは、全トランスレチノイン酸、フェンレチニド、9-シスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、エトレチナートまたはレチノールである。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現が、レチノイドによる細胞の処理によって誘導または別様に増加する遺伝子に由来し、好ましくは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質-3(IGFBP-3; 配列番号1)、分泌細胞接着タンパク質IG-H3(配列番号2)、新生物に欠失した上皮タンパク質(EPLIN; 配列番号3)、ユビキチン様タンパク質FAT10(配列番号4)、プロテアソームアクチベーターPA28サブユニット(PA28; 配列番号5)、Mac-2結合タンパク質(Mac-2BP; 配列番号6)、プロテインC阻害剤(PCI; 配列番号7)、T細胞受容体(配列番号8)、レチナルオキシダーゼ(配列番号9)、Bene(配列番号10)、HIF

- 2 / E P A S - 1 (配列番号 1 1)、またはセレクチン L (配列番号 1 2) に由来する。最も好ましくは、プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 ; 配列番号 1)、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3 (配列番号 2)、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N ; 配列番号 3)、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 (配列番号 4)、またはプロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ; 配列番号 5)、M a c - 2 結合タンパク質 ( M a c - 2 B P ; 配列番号 6)、プロテイン C 阻害剤 ( P C I ; 配列番号 7)、T 細胞受容体 (配列番号 8)、レチナルオキシダーゼ (配列番号 9)、B e n e (配列番号 1 0)、H I F - 2 / E P A S - 1 (配列番号 1 1) またはセレクチン L (配列番号 1 2) に由来する。最も好ましくは、プロモーターは、ヒトインシュリン様成長因子結合タンパク質 - 3 ( I G F B P - 3 ; 配列番号 1)、分泌細胞接着タンパク質 I G - H 3 (配列番号 2)、新生物に欠失した上皮タンパク質 ( E P L I N ; 配列番号 3)、ユビキチン様タンパク質 F A T 1 0 (配列番号 4)、またはプロテアソームアクチベーター P A 2 8 サブユニット ( P A 2 8 ; 配列番号 5) に由来する。その後、これらのリポーター遺伝子は、レチノイド誘導遺伝子発現効果の高感度で簡便な指示薬として使用され、哺乳動物細胞でレチノイドの効果を模倣した化合物を容易に同定できる。これらの作成物用の宿主細胞は、任意の哺乳動物細胞を含む。本発明のこの態様の実践に有用なリポーター遺伝子は、蛍光シフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、及びアルカリホスファターゼを含むがこれに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 7 】

以下の実施例は、本発明のある好ましい実施形態をさらに説明するものであり、限定する性質のものではない。

## 【 0 0 3 8 】

## (実施例 1)

レチノイン酸での処理による遺伝子発現調節の解析

細胞学的及び遺伝子発現解析を実施して、M C F - 7 細胞培養液に対するレチノイン酸処理の効果を決定した。

## 【 0 0 3 9 】

クローン原性アッセイを実施して、1 0 0 n M の R A で様々な時間で処理した後に、M C F - 7 細胞における増殖能の差異を解析した。細胞を、1 ~ 7 日間、1 0 0 n M の R A に暴露し、各時間点における処理後のそのコロニー形成能について試験した。図 1 A に示したように、非処理対照に規準化したプレーティング効率は、1 0 0 n M の R A と共に細胞をインキュベートする時間の経過と共に減少した。減少は、最初は急速で ( R A と共に 2 日間インキュベートした後にはプレーティング効率は 1 0 0 % から 4 0 % に)、7 日目には最終プレーティング効率は約 1 0 % までよりゆっくりと減少した。図 1 B は、様々な濃度の R A における、M C F - 7 細胞のプレーティング効率を示し; これらの結果は、全ての試験した用量における ( 1 0 n M まで低い ) プレーティング効率の用量依存的減少を示す。プレーティング効率の有意な減少が、細胞成長に対するレチノイドの効果の研究に慣用的に使用される濃度 ( 1  $\mu$  M ) よりもはるかに低い濃度で観察された。

## 【 0 0 4 0 】

これらの結果は、レチノイドにより調節された細胞遺伝子発現の変化に因る、細胞成長及び増殖能の減少と一致した。遺伝子発現変化を研究するために、ポリ ( A ) + R N A を、非処理 M C F - 7 細胞から、及び、1 0 0 n M の R A で 5 日間処理した細胞から単離した。c D N A を、これらの R N A 個体群から調製し、c D N A を、異なるヒト遺伝子及び E S T の > 7 , 0 0 0 個の c D N A を含む c D N A マイクロアレイ ( ヒト U n i G E M V c D N A マイクロアレイ、I n c y t e G e n o m i c s、ミズーリ州セントルイス ) とハイブリダイズさせた。c D N A プローブ合成、マイクロアレイとのハイブリダイゼーション、及びシグナル解析を、I n c y t e G e n o m i c s の市販サービスにより実施した。

## 【 0 0 4 1 】

マイクロアレイ中のRNA処理細胞のどの遺伝子も、相対的なハイブリダイゼーション強度の2.5倍以上の増加、または、3倍以上の減少を示さなかった。マイクロアレイハイブリダイゼーションにおいて最大の差異を示した計47個の遺伝子のRNAレベルの変化を、逆転写PCR(RT-PCR)解析により試験した。これらの中で、「平衡差次的発現」(相対的ハイブリダイゼーション強度の尺度)において、27個の遺伝子が1.4~2.5倍の増加を示し、20個の遺伝子が1.7~3.0倍の減少を示した。

【0042】

RT-PCR解析を、内部規準標準物質としてβ-アクチンを使用して、実質的に記載のように実施した(Noonanら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7160~7164)。RAにより最も強力に誘導された、13個の遺伝子のRT-PCRプライマーの配列及びPCR条件は以下の通りである：

10

【表1】

表I PCRを実施するためのオリゴヌクレオチドプライマー

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')
IGFBP-3	TTGCACAAAAGACTGCCAAG (配列番号 14)	CATGAAGTCTGGGTGCTGTG (配列番号 15)
Mac-2BP	AATTCACACTGTGCCCTTC (配列番号 16)	GTGGAGTCTGGAAGGACTGG (配列番号 17)
βIG-H3	TGCGACTAGCCCCTGTCTAT (配列番号 18)	CATGCACAAGGCTCACATCT (配列番号 19)
PCI	GCACCCAAGAGCAAGACTTC (配列番号 20)	CGAGCTGCCTCTTTTGAAC (配列番号 21)
FAT 10	AATGCTTCCTGCCTCTGTGT (配列番号 22)	ATCACTGGGCTTCACCACTT (配列番号 23)
EPLIN β	AGAAAGGGGACCCTGACTGT (配列番号 24)	AAGATCCTCACCGTCCTTGA (配列番号 25)
T細胞受容体 γ	AGGAGCTGTGGAAAACATGG (配列番号 26)	CATAACAGACGGTGGCACAA (配列番号 27)
P28 α	ACAGGTGGATGTGTTTCGTG (配列番号 28)	TTCATCCTCCCCCTTCTTCT (配列番号 29)
レチナルキシダゼ	GTGGTGGACATCATGACAGC (配列番号 30)	AGCGGCTCCAAGTCTTGATA (配列番号 31)
Bene	CCAGGCAACAAAAGGAGAGA (配列番号 32)	TGCCTTCTGTCATTGGGAAT (配列番号 33)
HIF-2 α/EPAS-1	CCAGTGCATCATGTGTGTCA (配列番号 34)	CCCGAAATCCAGAGAGATGA (配列番号 35)
L-セレクチン	GTGGCACCTCCTACGTCAAA (配列番号 36)	TGAATCCTTCCCTTTATGGTC (配列番号 37)
RNF	GAGGTGCAGTCCAAAAGGAA (配列番号 38)	TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG (配列番号 39)
β-アクチン	TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG (配列番号 40)	TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG (配列番号 41)

20

30

40

【表2】

表 I I PCRの温度条件(℃)

遺伝子	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物のサイズ
IGFBP-3	95	60	72	27	247
Mac-2BP	95	60	72	29	249
$\beta$ IG-H3	95	60	72	27	199
PCI	95	60	72	28	249
FAT 10	95	60	72	27	246
EPLIN $\beta$	95	60	72	26	261
T細胞受容体 $\gamma$	95	60	72	26	252
PA28 $\alpha$	95	60	72	27	250
レチノイド受容体 $\gamma$	95	60	72	29	197
Bene	95	60	72	26	265
HIF-2 $\alpha$ /EPAS-1	95	60	72	26	250
L-セレクチン	95	60	72	26	195
RNF	95	60	72	29	200
$\beta$ -アクチン	95	60	72	21	275

10

## 【0043】

20

RT-PCRアッセイにより、47個中43個の遺伝子の発現の変化が確認され、13個の上方制御された遺伝子が、マイクロアレイハイブリダイゼーションにより示されたよりもはるかに強力に(5~10倍以上)RAにより誘導されたことが示唆され;これらの結果を図2A及び2Bに示す。これらの13個の遺伝子のRNAレベルの変化の時間経緯の解析(図2A)により、クローン原性の消失と平行して、RA処理の1から4日間の間に、その発現が増加したことが示された(図1Aに示す)。遺伝子発現のRA用量依存性の解析(図2Bに示す)により、これらのほぼ全ての遺伝子が、検出可能なクローン原性の消失をもたらした最も低い用量のRA(10nM)によってさえ誘導されることが示された。全13個の遺伝子は、乳癌化学防御に使用される、1 $\mu$ Mの別のレチノイドであるフェンレチニドでの処理によっても誘導された(これらの結果は図2Cに示す)。

30

## 【0044】

この群の3つの遺伝子の誘導を試験し、EPLINに対するウサギポリクローナル抗体(UCCLAのDavid Chang博士より贈与)、及び、IGFBP-3及びEPAS-1/HIF-2に対するヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.、カリフォルニア州サンタクルス)及び標準的な技術を使用して、図3Aに示した免疫細胞化学アッセイにより、タンパク質レベルで確認した。抗体染色は、製造業者の指示に従って、ベクタステインキット(Vector Labs、カリフォルニア州バーリングゲーム)を使用して検出した。これらの結果により、RA処理細胞におけるIGFBP-3、EPAS-1/HIF2、及びEPLIN mRNAの誘導は、対応するタンパク質の発現の増加を伴ったことが示される。

40

## 【0045】

これらの結果により、RA及びフェンレチニドは、これらのレチノイドが細胞成長を阻害し老化表現型を誘導する条件下で、共通の遺伝子セットの発現を強力に誘導することが示された。

## 【0046】

(実施例2)

レチノイン酸での処理により、MCF-7細胞に誘導された遺伝子の生物学的機能

実施例1に考察したように検出した遺伝子は、文献探索により、レチノイドの細胞効果に関連した生物学的機能を有することが判明した。

## 【0047】

50

顕著には、レチノイドにより強力に誘導された13個中4個の遺伝子が、抗増殖活性を有すると報告されている。第一の遺伝子は、乳癌細胞でRAにより誘導可能であり、これらの細胞の成長を阻害することが示された分泌因子である、インシュリン様成長因子結合タンパク質-3 (IGFBP-3) をコードする (Adamoら、1992、*Endocrinology* 131: 1858~1866; Gucevら、1996、*Cancer Res.* 56: 1545~1550)。IGF隔絶におけるその役割に加えて、IGFBP-3は、近年、レチノイド受容体RXRに結合し、その転写活性を調節することが判明した (Liuら、2000、*J. Biol. Chem.* 275: 33607~33613)。IGFBP-3の誘導は、図3Aに示した免疫細胞化学アッセイにより確認した。

10

## 【0048】

レチノイドでの処理により誘導される別の成長抑制遺伝子は、数個の細胞型においてTFGにより誘導可能である、分泌細胞接着タンパク質IG-H3をコードする (Skonierら、1992、*DNA Cell Biol.* 11: 511~522)。IG-H3の形質移入により、チャニーズハムスター卵巣細胞の腫瘍原性が阻害されることが示された (Skonierら、1994、*DNA Cell Biol.* 13: 571~584)。IG-H3は、正常なヒト線維芽細胞では発現されるが、悪性形質転換されたヒト線維芽細胞では発現されず (Schenker & Trueb、1998、*Exp. Cell Res.* 239: 161~168)、これは、この遺伝子が腫瘍抑制剤であり得ることを示唆する。

20

## 【0049】

第三の遺伝子は、初期上皮細胞に発現されるが、異なる型の癌では下方制御されているアクチン結合タンパク質である、EPLINと呼ばれるLIMドメインタンパク質をコードする (Maul & Chang、1999、*Oncogene* 18: 7838~7841)。EPLINの異所的発現は、骨肉腫細胞系で細胞増殖を抑制することが示された (Maul & Chang、同上)。EPLIN遺伝子は、EPLIN及びEPLINという2つのタンパク質アイソフォームをコードし、大きい方の( )アイソフォームが、より強力な成長抑制効果を示す。観察されたEPLIN遺伝子発現の誘導は、免疫細胞化学及びイムノプロットアッセイにより確認した (結果を図3A及び3Bに示す)。これらのアッセイを、EPLINに対するウサギポリクローナル抗体 (UCLAのDavid Chang博士より贈与) を使用して実施し、標準的な技術により実施した。抗体染色は、免疫細胞化学ではベクタステインキット (Vector Labs) を使用して、イムノプロットではホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG (Santa Cruz) を使用して検出した。MCF-7細胞におけるEPLINの電気泳動移動度 (110kDa; 図3B) は、アイソフォームに対応し、これは、このアイソフォームによるより強力な成長抑制を示した当該技術に一致する。

30

## 【0050】

第四の遺伝子は、ユビキチン様タンパク質FAT10をコードする。FAT10は、紡錘体タンパク質Mad2と相互作用し、HeLa癌細胞におけるその過剰発現は、細胞生存に有害であると報告された (Liuら、1999、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4313~4318)。

40

## 【0051】

レチノイン酸処理は、レチノイン酸受容体RAR (Zhuら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14807~14812) 及びサイクリンD (Spinel laら、1999、*J. Biol. Chem.* 274: 22013~22018) のプロテアソームを介した分解を促進することが知られている。プロテアソームを介したサイクリンDの分解は、レチノイド誘導成長停止の機序として提唱されている (Spinel laら、同上)。顕著なことには、RA誘導遺伝子の1つが、プロテアソームアクチベーターPA28サブユニット (PA28) をコードしている。PA28の発現は、プロテアソームを活性化するのに十分であり (Groettrupら、1996、*Nat*

50

ure 381: 166 ~ 168)、この遺伝子の誘導は、少なくとも一部には、レチノイドによるプロテアソーム活性化を説明し得る。それ故、Pa28 は別の成長抑制剤と捉えることができる。

【0052】

さらに別のRA誘導遺伝子は、ビタミンAからRAを合成する第一段階を触媒する酵素である、レチナルオキシダーゼ(アルデヒドオキシダーゼ)をコードしている(Huangら、1999、Arch. Biochem. Biophys. 364: 264 ~ 272)。観察されたレチナルオキシダーゼの誘導により、レチノイド処理は、処理細胞におけるRA合成を刺激し得、正のフィードバック機序を提供する可能性があることが示唆される。

10

【0053】

IG-H3とは別に、2つの他の誘導遺伝子は、老化に似た平板な形態及びRA処理MCF-7細胞の接着の増加に寄与し得る、分泌タンパク質をコードする。これらの1つは、細胞外マトリックスの細胞接着因子であるMac-2結合タンパク質(Mac-2BP)をコードしている(Sasakiら、1998、EMBO J. 17: 1606 ~ 1613)。Mac-2BPはまた、p21により誘導されたヒト線維肉腫細胞の老化でも上方制御されている(Changら、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4291 ~ 4296)。他の遺伝子は、普通肝臓により産生される非特異的セリンプロテアーゼ阻害剤である、プロテインC阻害剤(PCI)をコードしている。レチノイド処理MCF-7細胞は、老化マーカーを発現しているが、この細胞系でRAにより強力に誘導されるどの遺伝子も、上皮細胞分化に関与していない。しかし、誘導遺伝子の2つは、白血球ホーミング受容体L-セレクチン及びT細胞受容体を含む、造血系統に特異的な膜貫通タンパク質をコードしている。これらの遺伝子の誘導は、造血悪性疾患におけるレチノイドの十分に文書化されている分化効果に相関している(Warrell、1997、同書)。RAはまた、既知の機能を全く有さないBeneという別の膜貫通タンパク質を誘導する。

20

【0054】

最後の2つのRA誘導遺伝子は、既知または推定の転写調節因子をコードしている。それらの1つは、遺伝子発現に対する、低酸素症及びいくつかの他のストレス因子の効果を媒介する、PASドメイン転写因子のファミリーの一員であるHIF-2 / EPAS-1である(Semenza、1999、Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15: 551 ~ 578)。興味深いことに、IGFBP-3はまた、低酸素症刺激遺伝子の1つである(Feldserら、1999、Cancer Res. 59: 3915 ~ 3918)。HIF-2 / EPAS-1の誘導は、図3Aに示した免疫細胞化学アッセイにより確認した。

30

【0055】

最後のRA誘導遺伝子は、リングフィンガータンパク質RNF(受託番号Y07828)をコードしている。RNF機能は不明であるが、それは、調節タンパク質の1ファミリーと25 ~ 38%のアミノ酸同一性を共有し、そのいくつかは、レチノイド応答、老化または分化に関与している。これらは、レチノイド受容体のリガンド依存的転写活性化補助因子として機能するTIF1 (Le Douarinら、1995、EMBO J. 14: 2020 ~ 2033)、並びに、PMLのt(15; 17)転位置でRAR と融合する前骨髄球性白血病(PML)遺伝子(Kakizukaら、1991、Cell 66: 663 ~ 674)を含む。PMLは、近年、ヒト線維芽細胞において変異RASにより誘導される加速老化のメディエーターとして同定された(Ferbeyreら、2000、Genes Dev. 14: 2015 ~ 2027)。同じファミリーの別のメンバーはHERF1であり、これは、赤血球の末端分化に必要である(Haradaら、1999、Mol. Cell. Biol. 19: 3808 ~ 3815)。興味深いことに、HERF1、RNF及びFAT10は全て、染色体6p21.3の主要組織適合遺伝子座に位置する。この遺伝子座はまた、RAR の遺伝子を含み、これはRAにより誘導され(S h

40

50

angら、1999、J. Biol. Chem. 274: 18005 ~ 18010)、老化哺乳動物細胞で上方制御されていると報告された (Swiss helmら、1994、Cell Growth Differ. 5: 133 ~ 141)。

【0056】

本明細書に開示したように、レチノイドでの乳癌細胞の処理は、同時に、新生物細胞 (EPLIN及びIG-H3)で選択的に下方制御されている候補腫瘍サプレッサーを含む、既知の抗増殖機能をもつ数個の遺伝子を誘導する。UniGemVアレイは、全てのヒト遺伝子の僅か一部を含むので、レチノイドにより同時誘導される成長抑制剤の実際数は、本明細書で同定した遺伝子よりもはるかに多いはずである。しかし、追加のレチノイド誘導性成長抑制剤は、本明細書に記載のcDNAプローブを、より大きなcDNAアレイまたはアレイの組合せにハイブリダイズすることにより、または、当分野で公知の方法を使用して差次的cDNAクローニングを実施することにより容易に同定できる (例として、本明細書に参考として取込んだ国際特許出願公開公報第WO00/61751号参照)。

10

【0057】

これらの結果により、レチノイドは、数個の成長抑制遺伝子を誘導でき、これは、レチノイド関連耐性または毒性を引き起こすことなく、これらの遺伝子の1つ以上を誘導できる化合物をスクリーニングするための試薬を開発する基礎を提供することが実証された。

【0058】

(実施例3)

レチノイン酸で誘導されるレチノイド調節プロモーター-リポーター遺伝子作成物の作成  
レチノイド誘導遺伝子の転写制御下にあるリポーター遺伝子作成物を作製するために、それぞれの遺伝子の最長の利用可能なcDNA配列の5'末端の1400~1500bp上流を含む、レチノイドにより強力に誘導される全13個の遺伝子のプロモーター配列をヒトゲノムデータベース中に同定した。

20

【0059】

その後、これらの配列を、<http://www.ucmb.ulb.ac.be/bioinformatics/rsa-tools/>で入手可能な調節配列解析ツールを使用して、様々な配向で、RARE部位の2つの空間的に近くに配置された六量体コアモチーフ (Mangelsdorfら、1994、レチノイド:生物学、化学及び医学 (Spornら編)、327~330頁 (Raven Press、ニューヨーク)の存在について解析した。

30

【0060】

唯一つのプロモーターのみに見られる推定RARE部位であるリングフィンガータンパク質RNFで、ここで配列:

AGGTCACAGCCAGTTCA (配列番号42)

(下線部はRAREコアモチーフを示す; Mangelsdorfら、1994、同書)は、見かけの転写開始部位の約360bp上流に逆配向で出現する。他のプロモーターのいずれも、識別可能なRARE配列を含まず、これは、これらの遺伝子の大半が、間接的な機序によりレチノイドにより誘導されることを示唆する。興味深いことに、RNFはまた、唯一日間の処理後にその最大の発現に到達するこの群における唯一の遺伝子であり (図2A参照)、これは、RNFがレチノイドにより直接誘導可能であることを示唆する。

40

【0061】

RA処理MCF-7細胞での強力かつ持続した誘導を示す成長抑制遺伝子のいずれも、そのプロモーターにRARE部位を含まないことは注目すべきことであり、これは、レチノイド受容体を欠いた細胞において、非レチノイド誘導剤を使用して、これらの成長抑制遺伝子を誘導することが可能であり得ることを示唆する。レチノイド誘導遺伝子、特にプロモーターにRARE配列を欠いた遺伝子由来のプロモーターの転写制御下にあるレポーター遺伝子含有作成物によって、毒性または耐性の発達を引き起こすことなく、レチノイドの遺伝子誘導効果を模倣した様式で、これらの遺伝子からの遺伝子発現誘導能について、

50

試験化合物をスクリーニングすることが可能となる。

【0062】

該リポーター遺伝子作成物は以下のように調製する。IG-H3などのレチノイド調節遺伝子のプロモーター領域は、cDNAの5'末端に隣接するとして、ゲノム配列(NCBI受託番号AC004503)に同定されている。プロモーター特異的DNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅は、鋳型としてヒトMCF-7細胞由来のゲノムDNA、及び、IG-H3用の以下のプライマー：

5' GGCCAGGTGCCCTCTTCTTAG3 (センス) (配列番号43)

及び

5' CGGCTCCAGGGAAGTGAG3 (アンチセンス) (配列番号44)

を使用して、PfuTurboDNAポリメラーゼ(Stratagene)及び28サイクルのPCRを使用して実施し、ここでの各サイクルは95℃で45秒間、60℃で1分30秒間、72℃で2分間からなる。1020bpの断片をこの方法を使用して増幅し、TOPO-TAクローニングベクターpCRII/TOPO(Invitrogen)にクローニングする。この作成物の配列同一性を確認し、その後、正しい配向のプロモーターを含むHindIII-XhoI断片を、標準的な組換え遺伝子技術(Sambrookら、1990、分子クローニング：実験マニュアル、Cold Spring Harbor Laboratory Press：ニューヨーク)を使用して、ホタルルシフェラーゼ-リポーターベクターpGL2-Basic(Promega、ウイスコンシン州マディソン)のHindIII及びXhoI部位に挿入する。

【0063】

この作成物が哺乳動物細胞でレチノイド誘導性ルシフェラーゼ発現を駆動する能力は、本明細書に参考として取込んだ2001年2月1日に提出された米国仮特許出願番号第60/\_\_\_\_\_(代理人名簿番号99,216-E)及び2001年5月21日に提出された米国特許出願番号第09/\_\_\_\_\_(記載のように、一過性形質移入アッセイで実証する。簡潔には、形質移入はLIPOFECTAMINE2000(Life Technologies, Inc.、ゲーサーズバーグ)を使用して実施する。細胞を、1mL中に2mMグルタミン、10%FBS、0.1mM NEAA(非必須アミノ酸、GIBCO)、1mMピルビン酸ナトリウム、及び10µg/mLインシュリンを含み、ペニシリン/ストレプトマイシンを含まない培地に、12ウェルプレートへ70,000細胞/ウェルの密度でプレティングする。細胞が培養皿に付着するのに十分な時間、細胞を培養した後、形質移入を、製造業者の指示に従って、1µgのpGL2-ベシックベクターDNA及び1µgのpGL2-IG-H3プロモーターDNAを使用して実施した。10時間後、培養培地を、標準的な組織培養濃度のペニシリン/ストレプトマイシンを含む培地と交換する。その後、細胞を、100nMのRAの存在下または不在下で72時間培養した。インキュベート後、細胞を、2回リン酸緩衝食塩水で洗浄し、100µLのリポーター溶解緩衝液(Promega)に捕集した。溶解液を10分間室温で放置し、その後、細胞試料を凍結し37℃の水浴で解凍するためにドライアイス-エタノール浴を使用して、1サイクルの凍結/解凍を行なう。50µLのアリコートホタルルシフェラーゼアッセイ(Promega)のために新しい管に移す。ルシフェラーゼ活性を、5秒間の遅延期間及び15秒間の積分時間で、47.9%の感度で、Turner20/20ルミノメーターを使用して上記のように測定する。追加のアリコートを、細胞溶解液から取り出し、バイオ-ラッドタンパク質アッセイキット(Bradford assay)を使用してタンパク質濃度を測定する。各試料のルシフェラーゼ活性を、タンパク質含量に規準化し、タンパク質1µgあたりのルシフェラーゼ活性として表現する。全アッセイを三重に実施し、平均及び標準偏差として示す。

【0064】

レチノイドで調節されるルシフェラーゼ発現をもつ安定に形質移入された細胞系を開発するために、上記の作成物を、プロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ選択マーカーを有する、pBabePuroなどの選択マーカーをコードするベクターを用いた同時形

10

20

30

40

50

質移入により、MCF7細胞などのレチノイドによる成長抑制を受けやすい細胞系に導入する。形質移入は、LIPOFECTAMINE 2000 (Life Technologies, Inc.、メリーランド州ゲーサースバーグ) を使用して、10:1の比の作成物並びに選択マーカを含むプラスミドまたは他のベクターを使用して実施する。安定な形質転換体を、プラスミドまたはベクターによりコードされる選択マーカに特異的な、適切な量の選択剤を使用して選択する。選択剤に抵抗性の細胞系を単離し、ルシフェラーゼ活性について、100 nMのRA、または、レシピエント細胞系で成長抑制を引き起こす濃度の別のレチノイドの存在下及び不在下で試験する (Promegaのルシフェラーゼアッセイシステムを使用)。

**【0065】**

このアッセイは以下のように実施する。細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシン、グルタミン及び10%牛胎児血清(FCS)を含む1 mLの培地中、12ウェルのプレートに、40,000細胞/ウェルの密度でプレATINGする。附着後、細胞を、100 nMのRAで処理するか、または種々の時間の間、未処理で放置する。細胞を2回リン酸緩衝食塩水で洗浄し、300 µLのリポーター溶解緩衝液(RLB; Promega)に捕集した。溶解液を、簡潔に、10,000 gで遠心分離して破砕片をペレット化し、50 µLの分割量を、ホタルルシフェラーゼアッセイ(Promega)で使用するために新しいチューブに移す。ルシフェラーゼ活性を、5秒間の遅延期間及び15秒間の積分時間で、55.6%の感度で、Turner 20/20ルミノメーターを使用して測定する。追加の一定分量を、バイオ-ラッドタンパク質アッセイキット(Bradford assay)を使用してタンパク質濃度を測定するために、細胞溶解液から取り出す。各試料のルシフェラーゼ活性をタンパク質含量に規準化し、タンパク質1 µgあたりのルシフェラーゼ活性として表現する。全アッセイを三重で実施し、平均及び標準偏差として示す。

**【0066】**

かかる作成物及び細胞は、レチノイド誘導遺伝子発現を誘導する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイの基礎を提供する。同じ型のスクリーニングはまた、安定に形質移入した細胞系ではなく、むしろレチノイド誘導性遺伝子のプロモーター作成物を用いて、一過性形質移入アッセイを使用して実施できる。ルシフェラーゼ発現に基づいたハイスループットなスクリーニング法は当分野で公知である(一過性の形質移入をベースとしたアッセイの近年の例としてStorzら、1999、*Analyt. Biochem.* 276: 97~104、及び、安定に形質移入された細胞系に基づいたスクリーニングの例についてはRoosら、2000、*Virology* 273: 307~315を参照)。これらの細胞及びアッセイを使用して同定した化合物は、次に、併発毒性またはレチノイド耐性を生じる傾向なく、レチノイド誘導遺伝子の遺伝子発現を誘導できる治療剤を開発するのに有用である。

**【0067】**

レチノイドによるMCF-7細胞の処理により誘導すべき、本明細書に示した遺伝子のほぼ全てのプロモーターにレチノイド応答性エレメントが存在しないことによって、レチノイド以外の化合物を、レチノイドの不在下で、または、レチノイド受容体を欠失した細胞において、レチノイド誘導性遺伝子発現の誘導能についてスクリーニングできることが示唆される。該スクリーニングアッセイは、以下のように実施する。上記のように調製し、レチノイドによる誘導性について確認した、組換え発現作成物は、レチノイドに感受性であろうが非感受性であろうが、レチノイン酸受容体を欠失していることが知られる、例えばHT1080細胞(A.T.C.C.受託番号CCL121)などの、任意の哺乳動物細胞系への形質移入により導入する。安定な形質転換体を、プラスミドまたはベクターによりコードされる選択マーカに特異的な適切な量の選択剤を使用して選択し、選択剤に抵抗性の細胞系をこれにより単離する。

**【0068】**

これらの細胞は、上記のようなルシフェラーゼ活性アッセイ(ルシフェラーゼアッセイシステム、Promegaを使用)に使用する。これらのアッセイは、種々の時間、試験す

10

20

30

40

50

べき漸増量の化合物の存在下または不在下で培養するか、または、化合物を含まない培地中で培養した細胞に実施する。

【0069】

このアッセイは、実質的に上記のように実施する。細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシン、グルタミン及び10%牛胎児血清(FCS)を含む1mLの培地中、12ウェルのプレートに、40,000細胞/ウェルの密度でプレATINGする。付着後、細胞を、試験すべき漸増量の化合物で処理するか、または、種々の時間、未処理で放置する。細胞をPBSで洗浄し、300 $\mu$ LのRLBに捕集し、簡潔に遠心分離にかけて破砕片を除去し、その後、ホタルルシフェラーゼアッセイを使用して上記のようにアッセイする。タンパク質濃度を決定して、ルシフェラーゼ結果を規準化し、これは、タンパク質1 $\mu$ gあたりのルシフェラーゼ活性として表現する。全アッセイを三重に実施し、平均及び標準偏差として示す。最後に、細胞を、細胞計測またはMTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド)、メチレンブルーまたは他の細胞特異的株で染色後に細胞数を測定することにより、試験化合物による成長抑制について平行してアッセイする。

10

【0070】

前記の開示は、本発明のある特定の実施形態を強調し、それに等価な全ての修飾または代替物は、添付の特許請求の範囲に示したような本発明の精神及び範囲内であることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

20

【図1】

図1A及び1Bは、MCF-7細胞によるコロニー形成に対するレチノイン酸(RA)の効果を示したグラフである。各アッセイにおいて、P100あたり $1.5 \times 10^5$ 個の細胞を、RAの不在下または存在下でプレATINGした。クローン原性アッセイのために、処理後に細胞をトリプシン処理し、P100あたり2,500個の細胞をプレATINGし、薬物を含まない培地中で育成した。少なくとも60~80個の細胞を含むコロニーを、プレATINGの12~14日後に計測し；これらの結果を、非処理細胞により形成されたコロニー数により規準化した。各点は、三重アッセイの平均及び標準誤差を示す。図1Aは、示した日数の間、100nMのRAで処理した効果を示す。図1Bは、示した用量のRAで40時間処理した効果を示す。

30

【図2】

図2Aから2Cは、実施例1に記載したようなレチノイド誘導性遺伝子の発現の変化をRT-PCRにより解析した結果を示す。各遺伝子の実体の後に、NCBI受託番号(括弧内)を示す。図2Aは、100nMのRAの添加後の表示された日における、遺伝子発現の変化の時間経緯を示す。「R5」及び「R8」の名称は、それぞれ、5日間のRA処理による放出の5日後及び8日後に対応する。図2Bは、示した用量のRAで40時間処理した効果を示す。図2Cは、1 $\mu$ Mのフェンレチニドの添加後の指定した日にちにおける、遺伝子発現の変化の時間経緯を示す。

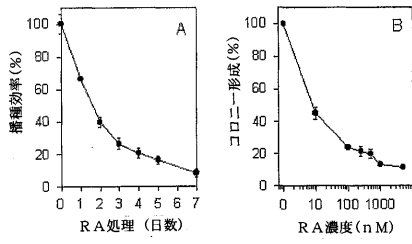
【図3】

図3Aは顕微鏡写真であり、図3Bは、RA処理細胞における、IGFBP-3、HIF2/EPAS-1及びEPLINタンパク質の誘導を示したイムノプロットの写真である。図3Aは、非処理MCF-7細胞、及び5日間100nMのRAで処理した細胞における、IGFBP-3、HIF2/EPAS-1及びEPLINの免疫細胞化学解析の結果を示す。図3Bは、非処理MCF-7細胞、及び、指定した日数の間100nMのRAで処理した細胞における、EPLINのイムノプロット解析を示す。

40

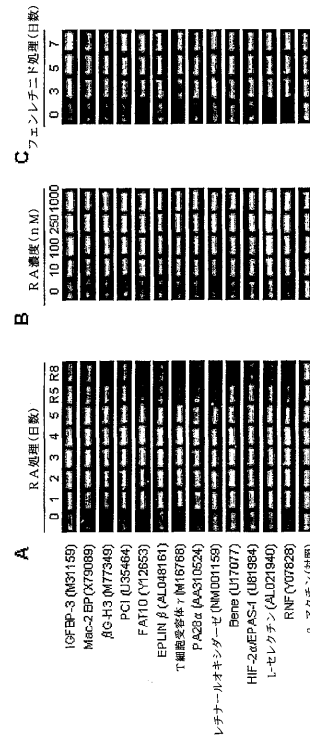
【 図 1 】

Figure 1



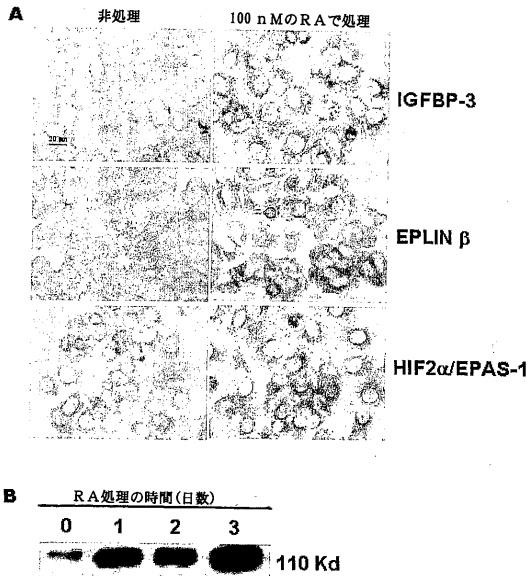
【 図 2 】

Figure 2



【 図 3 】

Figure 3



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/92578 A2**

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 (74) Agent: NOONAN, Kevin, E.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/17161
- (22) International Filing Date: 25 May 2001 (25.05.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/207,535 26 May 2000 (26.05.2000) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS [US/US], 352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street, Urbana, IL 61801 (US).
- (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): RONINSON, Igor, B. [US/US], 2731 Lincoln Lane, Wilmette, IL 60091 (US). DOKMANOVIC, Mites [YU/US], Apartment #2E, 1452 West Taylor Street, Chicago, IL 60607 (US). CHANG, Bey-Dih [—US], 1116 Cambria Lane, Lombard, IL 60148 (US).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/92578 A2

(54) Title: REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING EXPRESSION OF GENES REGULATED BY RETINOIDS

(57) Abstract: This invention identifies growth-inhibitory genes induced by retinoids. The invention provides reagents and methods for identifying compounds other than retinoids that induce expression of these cellular genes. The invention also provides reagents that are recombinant mammalian cells containing recombinant expression constructs that express a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a gene that is regulated by retinoids, and methods for using such cells to identify compounds other than retinoids that modulate expression of these cellular genes.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

**REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING  
EXPRESSION OF GENES REGULATED BY RETINOIDS**

5

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/207,535, filed May 26, 2000.

10 This application was supported by a grant from the National Institutes of Health, No. ROI CA62099. The government may have certain rights in this invention.

**1. Field Of The Invention**

This invention is related to changes in cellular gene expression and compounds that produce changes in cellular gene expression. In particular, the invention is related to the identification of genes the expression of which is modulated by a class of compounds known as retinoids, being chemically related to retinoic acid and Vitamin A. More specifically, the invention provides methods for identifying compounds other than retinoids that modulate expression of these cellular genes. The invention also provides reagents that are recombinant mammalian cells containing recombinant expression constructs that express a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a gene that is regulated by retinoids, and methods for using such cells for identifying compounds other than retinoids that modulate expression of these cellular genes.

**2. Summary Of The Related Art**

25 Retinoids are naturally-occurring or synthetic derivatives of vitamin A. They comprise a class of clinically important differentiation agents that regulate cell growth and differentiation at the level of transcription, by binding to nuclear receptors that act as ligand-dependent transcription factors. These compounds induce cellular differentiation or terminal proliferation arrest in a number of tumor cell types *in vivo* and *in vitro* that

WO 01/92578

PCT/US01/17161

express retinoid receptors (Warrell, 1997, in *CANCER. PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY* (DeVita et al., eds.), pp. 483-490 (Lippincott-Raven, Philadelphia), making them useful for treating some cancers, such as acute promyelocytic leukemia and cancer chemoprevention.

5           The target of retinoid action is the cell nucleus, where retinoids bind to two types of receptors, termed RARs (retinoic acid receptors) and RXRs (retinoid X receptors) (Mangelsdorf *et al.*, 1994, "The retinoid receptors," *in*: *The Retinoids: biology, chemistry, and medicine*, Sporn *et al.*, eds., New York: Raven Press, pp. 319-351.) Retinoid-bound receptor molecules form homo- (RXR-RXR) and heterodimers (RAR-  
10       RXR) that act as transcription factors. These dimers bind to specific *cis*-regulatory sequences in the promoters of retinoid-responsive target genes, termed RARE (Retinoic Acid Response Elements), regulating their transcription. The resulting changes in gene expression are caused either directly by retinoid receptor regulation of target gene  
15       expression, or indirectly through the action of retinoid-activated signal transduction pathways, *for example*, pathways activated by the transcription factor AP-1. These gene expression changes are ultimately responsible for the growth-inhibitory effect of retinoids (Warrell, *id.*).

          Although retinoids have had some clinical success in cancer treatment, their use  
has been limited by at least two factors: development of resistance (Miller *et al.*, 1998,  
20       *Cancer* **83**: 1471-1482) or toxicity. Development of resistance is due in part to alterations of retinoic acid receptors and retinoid receptor-mediated pathways (Miller *et al.*, *ibid.*). Toxicity is generally attributed to the broad physiologic consequences of retinoids, resulting from pleiotropic changes in gene expression produced by treatment  
with retinoids.

25           Several growth-inhibitory genes have been previously found to be inducible by retinoids in epithelial cells. None of these genes, however, was shown to be solely responsible for the growth-inhibitory effect of retinoids.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Adamo *et al.*, 1992, *Endocrinology* 131: 1858-1866 disclosed induction of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) in breast carcinoma cell lines.

Swisshelm *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4472-4476 identified another insulin-like growth factor binding protein, IGFBP-7 (also known as insulin-like growth factor binding protein related protein 1, or IGFBP-rP1, and mac25) as a protein induced by treatment of cells with fenretinide (4-hydroxyphenylretinamide, 4-HPR). This protein was also shown to be down-regulated in mammary carcinoma cell lines.

Kato *et al.*, 1996, *Oncogene* 12: 1361-1364 showed that introduction of mac25 cDNA into an osteosarcoma cell line inhibited growth.

Gucev *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56: 1545-1550 identified IGFBP-3 as a protein induced in breast carcinoma cells both by all-*trans* retinoic acid (RA) and by transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). RA-mediated growth inhibition in these cells was alleviated by introducing an antisense oligonucleotide into the cells that inhibited IGFBP-3 expression, or by introducing exogenous IGFBP-3 into the cells.

DiSepio *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14811-14815 showed that tazarotene-induced gene 3 (TIG-3, also known as retinoid-inducible gene 1, RIG-1), a putative tumor suppressor gene, is induced in primary human keratinocytes. TIG-3 shows decreased expression in cancer cells, inhibits the growth of cancer cells when expressed, and shares sequence homology with a known tumor suppressor gene, H-rev

Huang *et al.*, 2000, *Molec. Cell. Endocrinol.* 159: 15-24 showed that TIG-3 was induced by retinoids in a gastric carcinoma cell line *in vitro*.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Liu *et al.*, 2000, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126: 85-90 reported that RA-induced expression of a metastasis suppressor gene, nm23-H1 in a hepatocarcinoma cell line.

5 The teachings of the prior art suggest that one mechanism of retinoid-mediated growth inhibition is the activation (or re-activation) of tumor suppressor genes and other growth-inhibitory genes that have been repressed or whose expression has been down-regulated in tumor cells. However, the reports in the art fail to indicate the identity or number of growth-inhibitory genes that are activated under the conditions of retinoid-induced growth arrest. Such reports also fail to indicate if retinoid-induced genes are  
10 induced by retinoids directly, through RARE sites in their promoters, or indirectly. In the latter case, it should be possible to activate such growth-inhibitory genes even in the cells that are not responsive to retinoids.

There remains a need in this art to identify genes whose expression is modulated by retinoids, and especially growth-inhibitory genes that are induced by retinoids  
15 indirectly. There is also a need in this art to develop methods for assessing the effects of compounds on expression of retinoid-modulated cellular genes, particularly growth-inhibitory genes. There is an additional need to develop alternative compounds that mimic the effects of retinoids on cellular gene expression, to which resistance is not so easily developed and that lack the toxicity and other systemic side-effects of retinoids in  
20 current clinical use.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides genes whose expression is modulated by retinoids and reagents and methods for identifying compounds that mimic the effects of retinoids

WO 01/92578

PCT/US01/17161

without producing resistance or toxicity to said compounds.

In a first aspect, the invention provides a recombinant expression construct encoding a reporter gene operably linked to a promoter from a gene the expression of which is induced by a retinoid and which does not contain a RARE site. In preferred  
5 embodiments, the reporter gene encodes firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase. Preferred retinoids include all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate and retinol (Vitamin A). Most preferred promoters comprising  
10 the recombinant expression constructs of the invention are promoters from a cellular gene that is known to be induced by a retinoid and to have a growth-inhibitory activity. In preferred embodiments, the cellular gene promoter is from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-  
H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$   
15 (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO.:5), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO.:6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO.:7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO.:8), retinal oxidase (SEQ ID NO.:9), Bene (SEQ ID NO.:10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO.:11), or selectin L (SEQ ID NO.: 12). In particularly preferred embodiments, the promoter is from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1),  
20 secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5).

In a second embodiment, the invention provides a mammalian cell containing a recombinant expression construct of the invention encoding a reporter gene under the

WO 01/92578

PCT/US01/17161

transcriptional control of a promoter from a retinoid-inducible cellular gene. In preferred embodiments, the reporter gene encodes firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase. Preferred retinoids include all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate and retinol. Most preferred promoters comprising the recombinant expression constructs of the invention are promoters from a cellular gene that is known to be induced by a retinoid and to have a growth-inhibitory activity or from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO.:5), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO.:6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO.:7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO.:8), retinal oxidase (SEQ ID NO.:9), Bene (SEQ ID NO.:10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO.:11), or selectin L (SEQ ID NO.:12). In particularly preferred embodiments, the promoter is from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5).

In a third embodiment, the invention provides a method for identifying a compound that induces expression of a retinoid-inducible gene in a mammalian cell. In this method, recombinant mammalian cells according to the invention containing a recombinant expression construct of the invention encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter from a retinoid-inducible cellular gene are cultured

WO 01/92578

PCT/US01/17161

under conditions that induce expression of at least one retinoid-induced gene in mammalian cells in the presence and absence of a compound. Reporter gene expression is compared in the cell in the presence of the compound with reporter gene expression in said cell in the absence of the compound. Compounds that induce retinoid-induced gene expression are identified if reporter gene expression is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound. In preferred embodiments, the reporter gene encodes firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase. Preferred retinoids include all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate and retinol.

5

10 Most preferred promoters comprising the recombinant expression constructs of the invention are promoters of a cellular gene that is known to be induced by a retinoid and to have a growth-inhibitory activity or from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO. 6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO. 7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO. 8), retinal oxidase (SEQ ID NO. 9), Benc (SEQ ID NO. 10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO. 11), or selectin L (SEQ ID NO. 12). In particularly preferred embodiments, the promoter is from human

15

20 insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5). In preferred embodiments, expression of the reporter gene is detected using an immunological reagent, by hybridization to a

WO 01/92578

PCT/US01/17161

complementary, detectably-labeled nucleic acid, or by detecting an activity of the reporter gene product.

In a fourth embodiment, the invention provides a method for identifying a compound that induces expression of a retinoid-inducible gene in a mammalian cell. In this aspect of the invention, mammalian cells are cultured in the presence and absence of the compound. The cells are then assayed for expression of at least one cellular gene whose expression is induced by a retinoid. Compounds that induce expression of a retinoid-inducible gene in a mammalian cell are identified if expression of the cellular genes of subpart (b) is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound. Preferred retinoids include all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate and retinol. The gene is a cellular gene that is known to be induced by a retinoid and to have a growth-inhibitory activity or human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; NCBI Accession No. M35878.1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (Accession No. AC004503.1), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; Accession No. AH009382.1), ubiquitin-like protein FAT10 (Accession No. AL031983), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; Accession No. U91729), Protein C inhibitor (PCI; Accession No. AL049839.3), T cell receptor gamma (Accession No. AC006033.2), retinal oxidase (Accession No. AF010260), Bene (Accession No. AP001234.3), HIF-2alpha/EPAS-1 (Accession No. NT\_005065.3), selectin L (Accession No. AL021940.1), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; Accession No. AL136295.2). In particularly preferred embodiments, the gene is human IGFBP-3,  $\beta$ IG-H3, EPLIN, FAT10 or PA28 $\alpha$ . In preferred embodiments, expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent, by hybridization to a complementary, detectably-labeled nucleic acid, or by

WO 01/92578

PCT/US01/17161

detecting an activity of the gene product.

The invention also provides methods for treating an animal having cancer to prevent or ameliorate the disease. In this aspect, a therapeutically-effective dose of a compound identified by the invention that induces expression of a retinoid-induced gene is administered to an animal, most preferably a human, in need thereof.

Specific preferred embodiments of the present invention will become evident from the following more detailed description of certain preferred embodiments and the claims.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1A and 1B are graphs showing the effects of retinoic acid (RA) on colony formation by MCF-7 cells. In each assay,  $1.5 \times 10^5$  cells were plated per P100, in the absence or in the presence of RA. For clonogenic assays, cells were trypsinized after treatment, and 2,500 cells were plated per P100 and grown in drug-free media. Colonies comprising at least 60-80 cells were scored 12-14 days after plating; these results were normalized by the number of colonies formed by untreated cells. Each point represents the mean and standard deviation for triplicate assays. Figure 1A shows the effect of treatment with 100 nM RA for the indicated number of days. Figure 1B shows the effect of 40 hr treatment with the indicated doses of RA.

Figures 2A through 2C show the results of RT-PCR analysis of changes in the expression of retinoid-inducible genes as described in Example 1. The identity of each gene is followed by the NCBI Accession Number (in parentheses). Figure 2A shows a time course of changes in gene expression on the indicated days after the addition of 100 nM RA. The designations "R5" and "R8" correspond to days 5 and 8 after release from

WO 01/92578

PCT/US01/17161

5-day RA treatment, respectively. Figure 2B shows the effects of 40 hr treatment with the indicated doses of RA. Figure 2C shows a time course of changes in gene expression on the indicated days after the addition of 1  $\mu$ M fenretinide.

Figure 3A is a photomicrograph and Figure 3B is a photograph of an immunoblot showing induction of IGFBP-3, HIF2 $\alpha$ /EPAS-1 and EPLIN proteins in RA-treated cells.

Figure 3A shows the results of immunocytochemical analysis of IGFBP-3, HIF2 $\alpha$ /EPAS-1 and EPLIN in untreated MCF-7 cells and in cells treated with 100 nM RA for 5 days. Figure 3B shows immunoblotting analysis of EPLIN in untreated MCF-7 cells and in cells treated with 100 nM RA for the indicated number of days.

10

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention provides genes induced to express by retinoids. The invention also provides reagents and methods for identifying compounds that mimic the gene expression inducing properties of retinoids but lack toxicity and propensity for cells to develop resistance that is characteristic of retinoid treatment.

The present inventors have determined that retinoid treatment of retinoid-sensitive cells, such as human breast carcinoma MCF-7 cells, induces the expression of a group of genes that comprise a cohort of retinoid-inducible genes. Several of these genes are growth-inhibitory genes, *i.e.*, genes whose expression inhibits the growth or tumorigenicity of tumor cells. These genes are important, *inter alia*, as targets to be induced in tumor cells and other cells that proliferate inappropriately or pathogenically to inhibit the growth thereof. It was known in the art that genes whose expression was regulatable by retinoids contained a specific class of sequences in their promoters, termed RARE (Mangelsdorf *et al.*, 1994, in THE RETINOIDS: BIOLOGY, CHEMISTRY, AND

20

WO 01/92578

PCT/US01/17161

MEDICINE, (Sporn *et al.*, eds.), pp. 327-330 (Raven Press, New York). Surprisingly, however, all but one of the genes most strongly induced by retinoids in MCF-7 cells as determined by the inventors did not contain such RARE sequences in their promoters. This unexpected result indicated that retinoids activate these genes indirectly, by a mechanism that does not require RXR homodimer or RAR-RXR heterodimer binding to RARE sequences for these genes. This result also suggested that compounds other than retinoids should be capable of inducing expression of these (and perhaps other) growth-inhibitory genes in both retinoid-sensitive and retinoid-insensitive cells. Before the present invention, there was no reason to suspect that retinoid-insensitive cells could be induced to express retinoid-inducible growth inhibitory genes.

Disclosed herein is the inventors' discovery of 13 retinoid-inducible genes, including several genes having growth-inhibitory effects in mammalian cells. One of ordinary skill will appreciate that these results are not exhaustive, and other growth inhibitory genes may be induced by retinoids in mammalian cells. In view of the instant results, the skilled worker will also appreciate that some of these additional genes will be expected to lack RARE sequences in their promoters and thus be indirectly induced by retinoids. As disclosed herein, retinoid-inducible genes lacking RARE sequences in their promoters are useful targets for identifying compounds other than retinoids that mimic the physiologically-based growth inhibitory effect on cell proliferation. Identifying such compounds advantageously provides alternative agents for producing growth arrest in mammalian cells, particularly tumor cells and other cells that proliferate inappropriately or pathogenically. Such compounds are beneficial because they can mimic the growth-inhibitory effects of retinoids.

Another advantage of such compounds is that they can be expected to have a

WO 01/92578

PCT/US01/17161

growth-inhibitory effect without producing systemic side effects found with other growth-inhibitory compounds known in the prior art. For example, many growth-inhibitory drugs and compounds known in the prior art disadvantageously induce p21 gene expression, which induces senescence, growth arrest and apoptosis by activating a plurality of genes, the expression of which is associated with the development of diseases, particularly age-related diseases such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, renal disease, and arthritis (as disclosed in co-owned and co-pending U.S. Serial No. 60/\_\_\_\_\_, filed February 1, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-E) and U.S. Serial No. 09/\_\_\_\_\_, filed May 21, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-F), incorporated by reference herein. Retinoic acid-induced growth inhibition in MCF-7 cells, in contrast, does not induce p21 (Zhu *et al.*, 1997, *Exp. Cell Res.* 234: 293-299). The genes identified herein that are induced by retinoids are not known to be associated with any disease or disadvantageous or pathogenic effect when expressed in an animal. Thus, identification of such compounds that mimic the growth-inhibitory effects of retinoids by inducing expression of one or a plurality of the genes identified herein can be expected to have reduced or no such side-effects, making them better agents for anti-tumor and other therapies. Discovery of compounds that mimic the growth-inhibitory effects of retinoids without producing the toxic side effects of growth-inhibitory compounds known in the art is thus advantageously provided by the invention.

As provided herein, mammalian genes responsive to retinoids but not containing RARE sites in their promoters include human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; NCBI Accession No. M35878.1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (Accession No. AC004503.1), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; Accession No. AH009382.1), ubiquitin-like protein FAT10 (Accession No. AL031983), Mac-2

WO 01/92578

PCT/US01/17161

binding protein (Mac-2 BP; Accession No. U91729), protein C inhibitor (PCI; Accession No. AL049839.3), T cell receptor gamma (Accession No. AC006033.2), retinal oxidase (Accession No. AF010260), Bene (Accession No. AP001234.3), HIF-2alpha/EPAS-1 (Accession No. NT\_005065.3), selectin L (Accession No. AL021940.1),  
5 or proteasome activator PA28 subunit alpha (PA28alpha; Accession No. AL136295.2).

For the purposes of this invention, reference to "a cell" or "cells" is intended to be equivalent, and particularly encompasses *in vitro* cultures of mammalian cells grown and maintained as known in the art.

For the purposes of this invention, reference to "cellular genes" in the plural is  
10 intended to encompass a single gene as well as two or more genes. It will also be understood by those with skill in the art that effects of modulation of cellular gene expression, or reporter constructs under the transcriptional control of promoters derived from cellular genes, can be detected in a first gene and then the effect replicated by testing a second or any number of additional genes or reporter gene constructs.  
15 Alternatively, expression of two or more genes or reporter gene constructs can be assayed simultaneously within the scope of this invention.

As used herein, the term "RARE site" is intended to encompass two hexameric core motifs (as defined in Mangelsdorf *et al.*, 1994, in THE RETINOIDS: BIOLOGY, CHEMISTRY, AND MEDICINE, (Sporn *et al.*, eds.), pp. 327-330 (Raven Press, New York),  
20 separated by one, two or five nucleotides), wherein the hexameric motifs are arranged as direct, inverted or palindromic repeats.

The instant inventors have shown that treatment of MCF-7 human breast carcinoma cells with low doses of retinoids induces gradual growth arrest with minimal cytotoxicity and phenotypic features of cell senescence (Chang *et al.*, 1999, *Cancer Res.*

WO 01/92578

PCT/US01/17161

52: 3761-3767). Relatively low doses of RA were found to induce irreversible growth arrest in MCF-7 cells, while producing only a minor reduction in cell numbers caused by cell death. This effect with "low dose" RA (between 10-100 nM) required 4-6 days of continuous exposure to RA to become apparent. Low-dose retinoid treatment was accompanied by the development of phenotypic changes in the treated cells characteristic for cellular senescence, including the development of an enlarged, flattened cellular morphology and expression of the senescence-associated marker, SA- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal). Induction of SA- $\beta$ -gal was also observed in xenografts of MCF-10T neo mammary epithelial cells *in vivo* after treatment with fenretinide. These results suggested that retinoid treatment induces senescence in tumor cells *in vivo* and *in vitro* when administered in cytostatic doses.

Senescence can be induced in a mammalian cell in a number of ways known to those with skill in the art. For example, senescence is a natural consequence of normal cell growth, either *in vivo* or *in vitro*: there are a limited number of cell divisions, passages or generations that a normal cell can undergo before it becomes senescent. The precise number varies with cell type and species of origin (Hayflick & Moorhead, 1961, *Exp. Cell Res.* 25: 585-621). Senescence can also be induced in both normal and tumor cells by treatment with cytotoxic drugs such as most anticancer drugs or radiation. See, Chang *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59: 3761-3767. Senescence also can be rapidly induced in any mammalian cell by transducing into that cell a tumor suppressor gene (such as p53, p21, p16 or Rb) and expressing the gene therein. See, Sugrue *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9648-9653; Uhrbom *et al.*, 1997, *Oncogene* 15: 505-514; Xu *et al.*, 1997, *Oncogene* 15: 2589-2596; Vogt *et al.*, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 139-146. These and other means and methods for inducing senescence in mammalian cells

WO 01/92578

PCT/US01/17161

will be appreciated and understood by those with skill in the art, and fall within the compass of this invention.

The reagents of the present invention include any mammalian cell, preferably a rodent or primate cell, more preferably a mouse cell and most preferably a human cell, 5 that can induce cellular gene expression in response to a retinoid, wherein such gene is either the endogenous gene or an exogenous gene introduced by genetic engineering. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably mouse or human cells.

Recombinant expression constructs can be introduced into appropriate 10 mammalian cells as understood by those with skill in the art. Preferred embodiments of said constructs are produced in transmissible vectors, more preferably viral vectors and most preferably retrovirus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, and vaccinia virus vectors, as known in the art. See, generally, MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH, (Butler, ed.), Oxford University Press: New 15 York, 1991, pp. 57-84.

The invention also provides recombinant expression constructs wherein a 20 reporter gene is under the transcriptional control of a promoter of a gene whose expression is induced by a retinoid. In preferred embodiments of this aspect of the invention, the retinoid is all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate or retinol. In preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is induced or otherwise increased by treatment of the cell with a retinoid, and preferably from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein

WO 01/92578

PCT/US01/17161

FAT10 (SEQ ID NO. 4), proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO.:5), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO.:6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO.:7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO.:8), retinal oxidase (SEQ ID NO.:9), Bene (SEQ ID NO.:10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO.:11), or selectin L (SEQ ID NO.:12). Most preferably, the promoter is derived from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO.:5), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO.:6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO.:7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO.:8), retinal oxidase (SEQ ID NO.:9), Bene (SEQ ID NO.:10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO.:11), or selectin L (SEQ ID NO.:12). Most preferably, the promoter is derived from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5). These reporter genes are then used as sensitive and convenient indicators of the effects of retinoid-induced gene expression, and enable compounds that mimic the effects of retinoids in mammalian cells to be easily identified. Host cells for these constructs include any mammalian cell. Reporter genes useful in the practice of this aspect of the invention include but are not limited to firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, and alkaline phosphatase.

The following Examples are intended to further illustrate certain preferred embodiments of the invention and are not limiting in nature.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

**EXAMPLE 1**  
**Analysis of Gene Expression Modulation by Treatment**  
**With Retinoic Acid**

5 Cytological and gene expression analyses were performed to determine the effects of retinoic acid treatment on MCF-7 cells in culture.

Clonogenic assays were performed to analyze the differences in proliferative capacity in MCF-7 cells after treatment with 100nM RA for varying times. Cells were exposed to 100nM RA for 1-7 days and tested for their capacity to form colonies after  
10 treatment at each time point. As shown in Figure 1A, plating efficiency, normalized to untreated control, decreased with time of cell incubation with 100nM RA. The decrease was initially rapid (from 100% to 40% plating efficiency after 2 days incubation with RA) and decreased more slowly to a final plating efficiency of about 10% at day 7. Figure 1B shows the plating efficiency of MCF-7 cells at varying concentrations of RA;  
15 these results show a dose-dependent reduction in plating efficiency at all tested doses (as low as 10 nM). Significant reduction in plating efficiency was observed at concentrations much lower than conventionally used ( $\geq 1\mu\text{M}$ ) to study the effects of retinoids on cell growth.

These results were consistent with a reduction in cell growth and proliferative  
20 capacity due to retinoid-modulated changes in cellular gene expression. To study gene expression changes, poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated from untreated MCF-7 cells and from cells treated for 5 days with 100 nM RA. cDNA was prepared from these RNA populations and the cDNA hybridized with a cDNA microarray (Human UniGEM V cDNA microarray, Incyte Genomics, St. Louis, MO) that contains >7,000 cDNAs of  
25 different human genes and ESTs. cDNA probe synthesis, hybridization with the

WO 01/92578

PCT/US01/17161

microarray and signal analyses were conducted by IncyteGenomics as a commercial service.

None of the genes in the microarray showed an increase in relative hybridization intensity over 2.5-fold or a decrease over 3-fold in RA-treated cells. Changes in RNA levels of a total of 47 genes that showed the biggest differences in microarray hybridization were tested by reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis. Of these, 27 genes showed 1.4-2.5 fold increase and 20 genes showed 1.7-3.0 fold decrease in 'balanced differential expression' (a measure of relative hybridization intensity).

RT-PCR analysis was carried out essentially as described (Noonan *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7160-7164), using  $\beta$ -actin as an internal normalization standard. Sequences of RT-PCR primers and PCR conditions for thirteen genes most strongly induced by RA are as follows:

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Table I. Oligonucleotide primers for performing PCR

Gene	Sense Primer (5' -> 3')	Antisense Primer (5' -> 3')
IGFBP-3	TTGCACAAAAGACTGCCAAG (SEQ ID NO.:14)	CATGAAAGTCTGGGTCTGTG (SEQ ID NO.:15)
Mac-2 BP	AATCCACACTGTGCCCTC (SEQ ID NO.:16)	GTGGAGTCTGGAAGGACTGG (SEQ ID NO.:17)
beta IG-H3	TGCGACTAGCCCTGTCTAT (SEQ ID NO.:18)	CATGCACAAGCTCACAATCT (SEQ ID NO.:19)
PCI	GCACCCAAAGACCAAGACTTC (SEQ ID NO.:20)	CGAGCTGCCCTCTTTTGAAC (SEQ ID NO.:21)
FAT 10	AATGCTTCCCTGCTGTGTG (SEQ ID NO.:22)	ATCACTGGGCTCCACCCTT (SEQ ID NO.:23)
EPLIN beta	AGAAAAGGGACCCCTGACTGT (SEQ ID NO.:24)	AAGATCCCTCACCCCTCTGA (SEQ ID NO.:25)
T cell receptor gamma	AGGAGCTGTGGAAAACATGG (SEQ ID NO.:26)	CATAACAGACGGTGGCACAA (SEQ ID NO.:27)
P28 alpha	ACAGGTGGATGTGTTTCGTG (SEQ ID NO.:28)	TTCATCTCCCCCTCTTCT (SEQ ID NO.:29)
Retinal oxidase	GTGGTGGACATCATGACAGC (SEQ ID NO.:30)	AGCGGCTCCAAGTCTTGATA (SEQ ID NO.:31)
Bene	CCAGGCACAAAAGGAGAGA (SEQ ID NO.:32)	TGCCCTGTGCAITGGGAAT (SEQ ID NO.:33)
HIF-2alpha /EPAS-1	CCAGTGGCATCATGTGTGTCA (SEQ ID NO.:34)	CCCGAAAATCCAGAGAGATGA (SEQ ID NO.:35)
L-selectin	GTGGCACCCTCTACGTCAA (SEQ ID NO.:36)	TGAATCCCTTCCCTTTATGGTC (SEQ ID NO.:37)
RNF	GAGGTGGAGTCCAAAAGGAA (SEQ ID NO.:38)	TGTTGTGGCGTACAGGTCITTG (SEQ ID NO.:39)
Beta-actin	TGTTGTGGCGTACAGGTCITTG (SEQ ID NO.:40)	TGTTGTGGCGTACAGGTCITTG (SEQ ID NO.:41)

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Table II. Temperature conditions for PCR (in °C)

Gene	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	Product size
IGFBP-3	95	60	72	27	247
Mac-2BP	95	60	72	29	249
beta IG-H3	95	60	72	27	199
PCI	95	60	72	28	249
FAT 10	95	60	72	27	246
EPLIN beta	95	60	72	26	261
T cell receptor gamma	95	60	72	26	252
PA28 alpha	95	60	72	27	250
Retinal oxidase	95	60	72	29	197
Bene	95	60	72	26	265
HIF-2 alpha/EPAS-1	95	60	72	26	250
L-selectin	95	60	72	26	195
RNF	95	60	72	29	200
beta actin	95	60	72	21	275

WO 01/92578

PCT/US01/17161

RT-PCR assays confirmed altered expression for 43 of 47 genes and showed that 13 upregulated genes were induced by RA much more strongly (5-10 fold or more) than indicated by microarray hybridization; these results are shown in Figures 2A and 2B. Time course analysis of changes in RNA levels of these 13 genes (Fig. 2A) showed that many of them increased their expression between days 1 and 4 of RA treatment, in parallel with the loss of clonogenicity (shown in Fig. 1A). Analysis of RA dose-dependence of gene expression (shown in Fig. 2B) showed that almost all of these genes were induced even by the lowest (10 nM) dose of RA that produced detectable loss of clonogenicity (shown in Fig. 1B). All 13 genes were also induced by treatment with 1  $\mu$ M of another retinoid, fenretinide, which is used in breast cancer chemoprevention (these results are shown in Fig. 2C).

Induction of three genes in this group was tested and confirmed at the protein level, by immunocytochemical assays, shown in Figure 3A, using rabbit polyclonal antibody against EPLIN (a gift of Dr. David Chang, UCLA), and goat polyclonal antibodies against IGFBP-3 and EPAS-1/HIF-2 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and standard techniques. Antibody staining was detected using Vectastain kit (Vector Labs, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. These results show that induction of IGFBP-3, EPAS-1/HIF2 $\alpha$ , and EPLIN mRNA was accompanied by increased expression of the corresponding proteins in RA-treated cells.

These results showed that RA and fenretinide strongly induced the expression of a common set of genes under the conditions where these retinoids inhibit cell growth and induce the senescent phenotype.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

**EXAMPLE 2**  
**Biological Functions of Genes Induced in MCF-7 Cells by Treatment**  
**With Retinoic Acid**

The genes detected as discussed in Example 1 were found by literature research  
5 to have biological functions that are relevant to the cellular effects of retinoids.

Strikingly, 4 of 13 genes that are strongly induced by retinoids have been  
reported to possess antiproliferative activity. The first gene encodes insulin-like growth  
factor binding protein-3 (IGFBP-3), a secreted factor that was shown to be inducible by  
RA in breast carcinoma cells and to inhibit the growth of these cells (Adamo *et al.*,  
10 1992, *Endocrinology* 131: 1858-1866; Gucev *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56: 1545-1550).  
In addition to its role in IGF sequestration, IGFBP-3 was recently found to bind and  
modulate the transcriptional activity of a retinoid receptor RXRa (Liu *et al.*, 2000, *J.*  
*Biol. Chem.* 275: 33607-33613). Induction of IGFBP-3 was confirmed by  
immunocytochemical assays shown in Fig. 3A.

15 Another growth-inhibitory gene induced by treatment with retinoids encodes  
secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3, which is inducible by TGF- $\beta$  in several cell types  
(Skonier *et al.*, 1992, *DNA Cell Biol.* 11: 511-522). Transfection of  $\beta$ IG-H3 was shown  
to inhibit the tumorigenicity of Chinese hamster ovary cells (Skonier *et al.*, 1994, *DNA*  
*Cell Biol.* 13: 571-584).  $\beta$ IG-H3 is expressed in normal but not in neoplastically  
20 transformed human fibroblasts (Schenker & Trueb, 1998, *Exp. Cell Res.* 239: 161-168),  
suggesting that this gene may be a tumor suppressor.

The third gene encodes a LIM domain protein termed EPLIN, an actin-binding  
protein that is expressed in primary epithelial cells but downregulated in different types  
of carcinomas (Maul & Chang, 1999, *Oncogene* 18: 7838-7841). Ectopic expression of  
25 EPLIN was shown to suppress cell proliferation in an osteosarcoma cell line (Maul &

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Chang, *Id.*). The EPLIN gene encodes two protein isoforms, EPLIN $\alpha$  and EPLIN $\beta$ , with the larger ( $\beta$ ) isoform showing a stronger growth-inhibitory effect. The observed induction of EPLIN gene expression was confirmed by immunocytochemical and immunoblotting assays (results shown in Figures 3A and 3B). These assays were performed using rabbit polyclonal antibody against EPLIN (a gift of Dr. David Chang, UCLA) and were carried out by standard techniques. Antibody staining was detected using Vectastain kit (Vector Labs) for immunocytochemistry and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz) for immunoblotting. Electrophoretic mobility of EPLIN in MCF-7 cells (110 kDa; Fig. 3B) corresponds to the  $\beta$  isoform, consistent with the art that showed stronger growth inhibition by this isoform.

The fourth gene encodes an ubiquitin-like protein FAT10. FAT10 interacts with a mitotic spindle protein Mad2, and its overexpression in HeLa carcinoma cells was reported to be detrimental to cell survival (Liu *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4313-4318).

Retinoic acid treatment is known to promote proteasome-mediated degradation of retinoic acid receptor RAR $\alpha$  (Zhu *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14807-14812) and of cyclin D (Spinella *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 22013-22018). Proteasome-mediated cyclin D degradation has been proposed as a mechanism for retinoid-induced growth arrest (Spinella *et al.*, *Id.*). Remarkably, one of the RA-induced genes encodes proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28  $\alpha$ ). Expression of PA28 $\alpha$  is sufficient to activate the proteasome (Groettrup *et al.*, 1996, *Nature* 381:166-168), and the induction of this gene may account at least in part for proteasome activation by retinoids. Pa28 $\alpha$  therefore can be regarded as another growth inhibitor.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Still another RA-induced gene encodes retinal oxidase (aldehyde oxidase), an enzyme that catalyses the final step of RA synthesis from vitamin A (Huang *et al.*, 1999, *Arch. Biochem. Biophys.* 364: 264-272). The observed induction of retinal oxidase suggests that retinoid treatment may stimulate RA synthesis in the treated cells,  
5 providing a potential positive feedback mechanism.

Aside from  $\beta$ IG-H3, two other induced genes encode secreted proteins that may contribute to the senescence-like flattened morphology and increased adhesion of RA-treated MCF-7 cells. One of these encodes Mac-2 binding protein (Mac-2 BP), a cell adhesion factor of the extracellular matrix (Sasaki *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17: 1606-1613).  
10 Mac-2 BP is also upregulated in p21-induced senescence of human fibrosarcoma cells (Chang *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4291-4296). The other gene encodes protein C inhibitor (PCI), a non-specific serine protease inhibitor, which is normally produced by the liver. While retinoid-treated MCF-7 cells express markers of senescence, none of the genes that are strongly induced by RA in this cell line has been  
15 associated with epithelial cell differentiation. Two of the induced genes, however, encode transmembrane proteins specific for the hematopoietic lineage, including the leukocyte homing receptor L-selectin and T-cell receptor. Induction of these genes correlates with a well-documented differentiating effect of retinoids in hematopoietic malignancies (Warrell, 1997, *ibid.*). RA also induces another transmembrane protein,  
20 Bene, which has no known function.

The last two RA-induced genes encode known or putative transcriptional regulators. One of them is HIF-2 $\alpha$ /EPAS-1, a member of a family of PAS domain transcription factors that mediate the effects of hypoxia and some other stress factors on gene expression (Semenza, 1999, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15: 551-578).

WO 01/92578

PCT/US01/17161

Interestingly, IGFBP-3 is also one of the hypoxia-stimulated genes (Feldser *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59: 3915-3918). Induction of HIF-2 $\alpha$ /EPAS-1 was confirmed by immunocytochemical assays shown in Fig. 3A.

5 The final RA-induced gene encodes a ring finger protein RNF (accession number YO7828). While the RNF function is unknown, it shares 25-38% amino acid identity with a family of regulatory proteins, some of which have been implicated in retinoid response, senescence or differentiation. These include TIF1 $\alpha$ , which functions as a ligand-dependent transcriptional coactivator of retinoid receptors (Le Douarin *et al.*, 1995, *EMBO J.* 14: 2020-2033), as well as promyelocytic leukemia (PML) gene, which 10 is fused with RAR $\alpha$  in the t(15;17) translocation in PML (Kakizuka *et al.*, 1991, *Cell* 66: 663-674). PML has been recently identified as a mediator of accelerated senescence induced by mutant RAS in human fibroblasts (Ferbeyre *et al.*, 2000, *Genes Dev.* 14: 2015-2027). Another member of the same family is HERF1, which is required for terminal differentiation of erythroid cells (Harada *et al.*, 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19: 3808- 15 3815). Interestingly, HERF1, RNF and FAT10 all map to the major histocompatibility locus on chromosome 6p21.3. This locus also contains the gene for RAR $\alpha$ , which was reported to be induced by RA (Shang *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274:18005-18010) and to be upregulated in senescent mammary cells (Swisshelm *et al.*, 1994, *Cell Growth Differ.* 5: 133-141).

20 As disclosed herein, retinoid treatment of breast carcinoma cells concurrently induces several genes with known antiproliferative functions, including candidate tumor suppressors that are selectively downregulated in neoplastic cells (EPLIN and  $\beta$ IG-H3). Since the UniGem V array comprises only a fraction of all human genes, the actual number of growth inhibitors that are co-induced by retinoids should be much higher than

WO 01/92578

PCT/US01/17161

the genes identified herein. Such additional retinoid-inducible growth inhibitors can be readily identified, however, by hybridizing cDNA probes described herein with larger cDNA arrays or combinations of arrays, or by carrying differential cDNA cloning using methods that are well known in the art (*see, for example*, International Patent Application, Publication No. WO00/61751, incorporated by reference herein.

5

These results demonstrated that retinoids can induce several growth-inhibitory genes, which provide a basis for developing reagents for screening compounds capable of inducing one or more of these genes without producing retinoid-associated resistance or toxicity.

10

**EXAMPLE 3**  
**Construction of Retinoid-regulated Promoter-Reporter Gene Constructs**  
**That Are Induced with Retinoic Acid**

In order to produce reporter gene constructs under the transcriptional control of retinoid-induced genes, promoter sequences for all 13 genes that are strongly induced by retinoids, comprising 1400-1500 bp upstream of the 5' end of the longest available cDNA sequence of the respective genes, were identified in the human genome database.

15

These sequences were then analyzed for the presence of two closely spaced hexameric core motifs of RARE sites (Mangelsdorf *et al.*, 1994, in *THE RETINOIDS: BIOLOGY, CHEMISTRY, AND MEDICINE*, (Sporn *et al.*, eds.), pp. 327-330 (Raven Press, New York), in variable orientations, using Regulatory Sequence Analysis Tools, available at: <http://www.ucmb.ulb.ac.be/bioinformatics/rsa-tools/>.

20

A putative RARE site found in only one promoter, ring finger protein RNF, where the sequence:

25

AGGTCACAGCCAGTTCA

(SEQ ID No.:42)

WO 01/92578

PCT/US01/17161

(**boldface** indicates the RARE core motifs; Mangelsdorf *et al.*, 1994, *ibid.*) appears in inverse orientation about 360 bp upstream of the apparent transcription start site. None of the other promoters contained discernable RARE sequences, suggesting that most of these genes are induced by retinoids through indirect mechanisms. Interestingly, RNF is also the only gene in this group to reach its maximum expression after just one day of treatment (see Fig. 2A), suggesting that RNF is likely to be directly inducible by retinoids.

It is remarkable that none of the growth-inhibitory genes that show strong and sustained induction in RA-treated MCF-7 cells contain RARE sites in their promoters, suggesting that it may be possible to induce these growth-inhibitory genes in cells that lack retinoid receptors, and using non-retinoid inducing agents. Reporter gene-containing constructs, under the transcriptional control of a promoter from a retinoid-induced gene, particularly a gene lacking a RARE sequence in the promoter, enable screening of test compounds for the capacity to induce gene expression from these genes in a way that mimics the gene-inducing effects of retinoids without producing toxicity or development of resistance.

Such reporter gene constructs are prepared as follows. The promoter region of a retinoid-regulated gene, such as  $\beta$ IG-H3, is identified in the genomic sequence (NCBI accession number AC004503) as adjacent to the 5' end of the cDNA. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the promoter-specific DNA is performed using genomic

DNA from human MCF-7 cells as the template and the following primers for  $\beta$ IG-H3:

5' GGCCAGGTGCCTCTCTTAG 3' (sense) (SEQ ID NO.:43)

and

5' CGGCTCCAGGGAAGTGAG 3' (antisense) (SEQ ID NO.:44)

WO 01/92578

PCT/US01/17161

using *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) and 28 cycles of PCR where each cycle consisted of 45 sec. at 95°C, 1 min 30 sec. at 60°C, and 2 min. at 72°C. A 1020 bp fragment is amplified using this method and cloned into the TOPO TA cloning vector pCRII/TOPO (Invitrogen). The sequence identity of this construct is verified, and the

5 *HindIII-Xho I* fragment containing the promoter in the correct orientation is then inserted into the *HindIII* and *Xho I* sites in a firefly luciferase-reporter vector pGL2-Basic (Promega, Madison, WI) using standard recombinant genetic techniques (Sambrook *et al.*, 1990, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York).

10 The ability of this construct to drive retinoid-inducible luciferase expression in mammalian cells is demonstrated in transient transfection assays, as described in U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/\_\_\_\_\_, filed February 1, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-E) and U.S. Patent Application Serial No. 09/\_\_\_\_\_, filed May 21, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-F), incorporated by reference herein.

15 Briefly, transfection is carried out using LIPOFECTAMINE 2000 (Life Technologies, Inc. Gaithersburg). Cells are plated at a density of 70,000 cells/well in 12 well plates in 1 mL media containing 2mM glutamine, 10% FBS, 0.1mM NEAA (Non- Essential Amino Acids, GIBCO), 1mM sodium pyruvate, and 10µg/mL insulin, and without penicillin/streptomycin. After culturing the cells for a sufficient time that they attached

20 to the culture dish, transfection was performed in triplicate according to the manufacturer's instructions, using 1 µg pGL2- basic vector DNA and 1µg pGL2- βIG-H3 promoter DNA. After 10 hours, culture media is replaced with media containing penicillin/ streptomycin at standard tissue culture concentrations. The cells were then incubated in the presence or absence of 100nM atRA for 72 hours. After incubation,

WO 01/92578

PCT/US01/17161

cells are washed twice with phosphate-buffered saline and collected in 100  $\mu$ L of Reporter Lysis Buffer (Promega). The lysate is left at room temperature for 10 minutes followed by 1 cycle of freeze / thaw using a dry ice-ethanol bath for freezing the cell sample and thawing in a 37°C water bath. 50 $\mu$ L aliquots are transferred to fresh tubes for Firefly Luciferase Assay (Promega). Luciferase activity is measured as described above using a Turner 20/20 luminometer at 47.9% sensitivity with a 5 sec. delay period and 15 sec. integration time. An additional aliquot is removed from the cell lysate to measure protein concentration using Bio-Rad protein assay kit (Bradford assay). Luciferase activity for each sample is normalized to protein content and expressed as luciferase activity/  $\mu$ g protein. All assays are carried out in triplicate and displayed as a mean and standard deviation.

To develop a stably transfected cell line with retinoid-regulated luciferase expression, the construct described above is introduced into a cell line that is susceptible to growth inhibition by retinoids, such as MCF7 cells by cotransfection with a vector encoding a selectable marker, such as pBabePuro, carrying puromycin N-acetyltransferase as a selectable marker. Transfection is carried out using LIPOFECTAMINE 2000 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), using a 10:1 ratio of the construct and a plasmid or other vector containing a selectable marker. Stable transfectants are selected using an appropriate amount of a selecting agent specific for the selectable marker encoded by the plasmid or vector. Selective agent-resistant cell lines are isolated and tested for luciferase activity (using a Luciferase Assay System, Promega), in the presence and in the absence of 100 nM RA, or another retinoid at a concentration that produces growth inhibition in the recipient cell line.

This assay is performed as follows. Cells are plated at a density of 40,000

WO 01/92578

PCT/US01/17161

cells/well in 12 well plates in 1 mL of media containing penicillin/streptomycin, glutamine and 10% fetal calf serum (FCS). After attachment, cells are treated with 100nM RA or left untreated for different periods of time. Cells are washed twice with phosphate-buffered saline and collected in 300  $\mu$ L of Reporter Lysis Buffer (RLB; Promega). The lysate is centrifuged briefly at 10,000 g to pellet debris, and 50  $\mu$ L aliquots are transferred to fresh tubes for use in the Firefly Luciferase assay (Promega). Luciferase activity is measured using a Turner 20/20 luminometer at 55.6% sensitivity with a 5 second delay period and 15 second integration time. An additional aliquot is removed from the cell lysate to measure protein concentration using the Bio-Rad protein assay kit (Bradford assay). Luciferase activity for each sample is normalized to protein content and expressed as luciferase activity/  $\mu$ g protein. All assays are carried out in triplicate and displayed as a mean and standard deviation.

Such constructs and cells provide a basis for a screening assay for identifying compounds that induce retinoid-induced gene expression. The same type of screening can also be conducted using transient transfection assays with promoter constructs of retinoid-inducible genes rather than stably-transfected cell lines. The methods for high-throughput screening based on luciferase expression are well known in the art (see Storz *et al.*, 1999, *Analyt. Biochem.* 276: 97-104 for a recent example of a transient transfection-based assay and Roos *et al.*, 2000, *Virology* 273: 307-315 for an example of screening based on a stably transfected cell line). Compounds identified using these cells and assays are in turn useful for developing therapeutic agents that can induce gene expression of retinoid-inducible genes without the concomitant toxicity or tendency to produce retinoid resistance.

The absence of retinoid responsive elements in the promoters of almost all of the

WO 01/92578

PCT/US01/17161

genes shown herein to be induced by retinoid treatment of MCF-7 cells also suggests that compounds other than retinoids can be screened for their capacity to induce retinoid-inducible gene expression in the absence of retinoids or in cells lacking retinoid receptors. Such screening assays are performed as follows. A recombinant expression construct, prepared as described above and verified for inducibility by retinoids, is introduced by transfection into any mammalian cell line, whether sensitive or insensitive to retinoids, for example HT1080 cells (A.T.C.C. Accession No. CCL121) that are known to lack retinoic acid receptors. Stable transfectants are selected as described above using an appropriate amount of a selecting agent specific for the selectable marker encoded by the plasmid or vector, and selective agent-resistant cell lines are isolated thereby.

These cells are used in luciferase activity assays (using a Luciferase Assay System, Promega) as described above. These assays are performed on cells cultured in the presence or absence of increasing amounts of the compound to be tested for different periods of time, or cultured in compound-free media.

This assay is performed substantially as described above. Cells are plated at a density of 40,000 cells/well in 12 well plates in 1 mL of media containing penicillin/streptomycin, glutamine and 10% fetal calf serum (FCS). After attachment, cells are treated with increasing concentration of a compound to be tested, or left untreated for different periods of time. Cells are washed with PBS, collected in 300  $\mu$ L RLB, centrifuged briefly to remove debris, and then assayed as above using the Firefly Luciferase assay. Protein concentrations are determined to normalize the luciferase results, which are expressed as luciferase activity/ $\mu$ g protein. All assays are carried out in triplicate and displayed as a mean and standard deviation. Finally, cells are assayed in

WO 01/92578

PCT/US01/17161

parallel for growth inhibition by the tested compound using cell counting or measuring cell number after staining with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), methylene blue or other cell-specific stain

5 It should be understood that the foregoing disclosure emphasizes certain specific embodiments of the invention and that all modifications or alternatives equivalent thereto are within the spirit and scope of the invention as set forth in the appended claims.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

**WE CLAIM:**

1. A recombinant expression construct encoding a reporter gene operably linked to a promoter from a gene the expression of which is induced by a retinoid, wherein the promoter does not contain a RARE site.  
5
2. A recombinant expression construct according to Claim 1, wherein the reporter gene encodes firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase.  
10
3. A recombinant expression construct according to Claim 1, wherein the retinoid is all-*trans* retinoic acid, fenretinide, 9-*cis* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, etretinate or retinol.
- 15 4. A recombinant expression construct according to Claim 1, wherein the promoter is a promoter from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO.:5),  
20 Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; SEQ ID NO.:6), Protein C inhibitor (PCI; SEQ ID NO.:7), T cell receptor gamma (SEQ ID NO.:8), retinal oxidase (SEQ ID NO.:9), Bene (SEQ ID NO.:10), HIF-2 $\alpha$ / EPAS-1 (SEQ ID NO.:11) or selectin L (SEQ ID NO.:12).
- 25 5. A recombinant expression construct according to Claim 1, wherein the

WO 01/92578

PCT/US01/17161

promoter is a promoter from a cellular gene wherein expression thereof in a mammalian cell is induced by a retinoid and inhibits growth of the cell thereby.

5 6. A recombinant expression construct according to Claim 5, wherein the promoter is a promoter from human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; SEQ ID NO. 1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (SEQ ID NO. 2), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; SEQ ID NO. 3), ubiquitin-like protein FAT10 (SEQ ID NO. 4), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; SEQ ID NO. 5).

10

7. A recombinant mammalian cell comprising a recombinant expression construct according to claim 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

15 8. A method for identifying a compound that induces expression of a retinoid-inducible gene in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- 20 (a) culturing a recombinant mammalian cell according to claim 7 in the presence and absence of a compound;
- (b) comparing reporter gene expression in said cell in the presence of the compound with reporter gene expression in said cell in the absence of the compound; and
- (c) identifying the compound that induces retinoid-induced gene expression if reporter gene expression is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

9. The method of claim 8, wherein expression of the reporter gene is detected using an immunological reagent.
10. The method of claim 8, wherein expression of the reporter gene is detected by assaying for an activity of the reporter gene product.
11. The method of claim 8, where expression of the reporter gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.
12. A method for identifying a compound that induces expression of a retinoid-induced gene in a mammalian cell, comprising the steps of:
- (a) culturing the cell in the presence and absence of the compound;
  - (b) assaying the cell for changes in expression of at least one cellular gene whose expression is induced by a retinoid wherein the promoter does not contain a RARE site; and
  - (c) identifying the compound as an inducer of retinoid-induced gene expression if expression of the cellular genes of subpart (b) is higher in the presence of the compound.
13. The method of claim 13, wherein the cellular gene is insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3; NCBI Accession No. M35878.1), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3 (Accession No. AC004503.1), epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN; Accession No. AH009382.1), ubiquitin-like protein FAT10 (Accession No. AL031983), Mac-2 binding protein (Mac-2 BP; Accession No.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

U91729), Protein C inhibitor (PCI; Accession No. AL049839.3), T cell receptor gamma (Accession No. AC006033.2), retinal oxidase (Accession No. AF010260), Bene (Accession No. AP001234.3), HIF-2 $\alpha$ /EPAS-1 (Accession No. NT\_005065.3), selectin L (Accession No. AL021940.1), or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ; Accession No. AL136295.2).

5

14. The method of claim 12, wherein the cellular gene is a gene wherein expression thereof in a mammalian cell is induced by a retinoid and inhibits growth of the cell thereby.

10

15. The method of claim 12, wherein the cellular gene is human insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), secreted cell adhesion protein  $\beta$ IG-H3, epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN), ubiquitin-like protein FAT10 or proteasome activator PA28 subunit  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ).

15

16. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

20

17. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

18. The method of claim 12, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

19. A method for treating an animal to prevent or ameliorate the effects of cancer, the method comprising the steps of administering to an animal in need thereof a therapeutically-effective dose of a pharmaceutical composition of a compound identified according to the method of claims 8 or 12.

5

20. The method of claim 19, wherein the animal is a human.

WO 01/92578

PCT/US01/17161

**Figure 1**

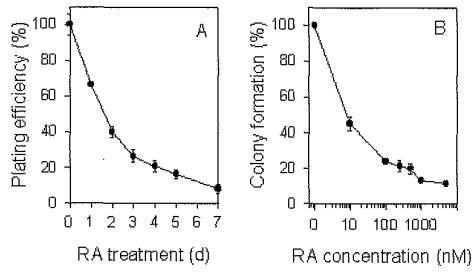
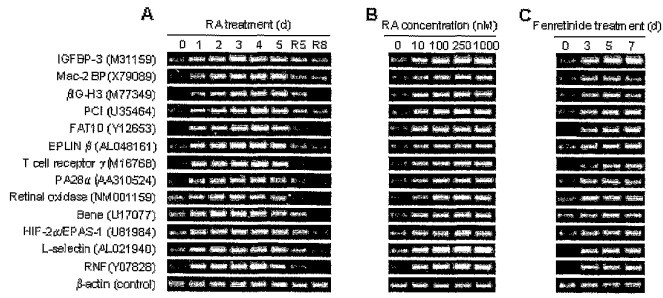
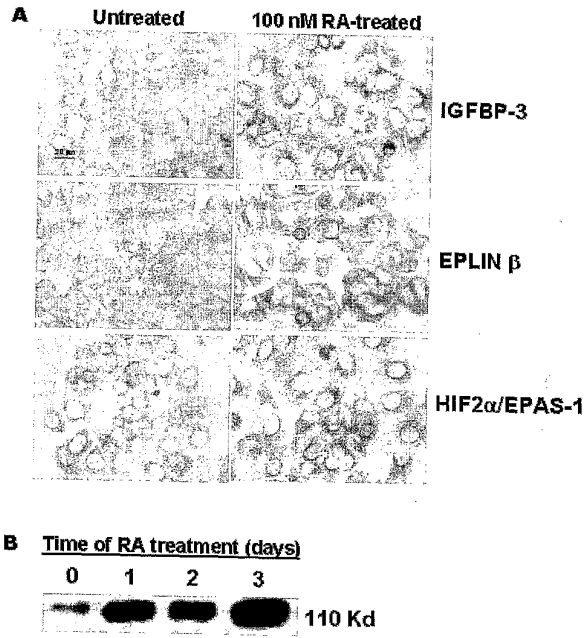


Figure 2



**Figure 3**



WO 01/92578

PCT/US01/17161

## SEQUENCE LISTING

<110> Roninson, Igor    Dokmanovic, Milos    Chang, Bey-Dih

<120> REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING EXPRESSION OF GENES REGULATED BY RETINOIDS

<130> 99,216-I

<150> 60/207,535

<151> 2000-05-26

<160> 44

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1806

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> IGFBP-3 NCBI acc. number : M35878.1

<400> 1

```

ggggattcgt ttgtttcct tcaatttcc aatgaaatca gagatcctgt tcttgggtgt      60
caacycagat actagaagga ggtgatacaa gagaagaa cagcaagcga cgattatggc      120
acggtttcct gtaaacaagg ttgagtgtag ccacagcctg agcactgtgg gagaagagct      180
cataagaaaa tgacgggtcct gggccttcgt caccocgggg cctccattg ttcttgtctt      240
tggctctctt ttattttagt aggtccaatt atttattat ttagtacaag agggaacgaa      300
attgatcttt ccattctaaa aggagagtat atatgtataa aaggaagctg tatagatatg      360
ggggaagagag tggacagggg gaaaagggga gaggacgaga gagagaaag gaggagagag      420
gacaaggaga gacactgggc gagagatcga ttaggagaga cagaaatgat gaatgaagat      480
taacttcacc caaggcttcg tgcotggagg ggaatggagg agctcctgat ttgctattac      540
tactccaaac tgcaaaaggg tccttcaagt cacotatcca cctcctaagg caagcgtcca      600
atttcaacag cgttcaggaa agtctctctc cgcggaggte tcaccgcttc ccaactccacc      660
cccacaaact ctttgaaaaa gtgccttgaa aaatttaac ctcaatcaa tcctggacca      720
ccagcgtcct ctgttggta ccaagggagg gggtgogcag acaaaactga agaaactoga      780
gtgccagaga aggcgcacag gagttacagc gacctcagcg cgcaattgog cccogaaott      840
tactgaaaag tgtttagatt gcagagataa gctagaatcc caacgcacog agaatacagt      900
aatcgaagat gcocctcaaa aatgacaat gaaaattgcc tattaagga ctatttggtt      960

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

aattaagcttt cagcagtgcc cagtttattg tctttattat tcttttctgc tgggtgtaaa 1020
ctccatttga aaacataatc agggagaata cccaagacaa gaagaacagt tgtcatttaa 1080
aatatttgaa aagccctgcc ttaaggagca ttgccttgcc ggtccactct taattgggga 1140
cttgcggtgt agcaaacagt gagagtcttc ttgccttgag aagtaagcct ggaaaggcga 1200
aggccccggg gcactcttcag atgcgtattt gtgggccccct ggggatataa acagcccagc 1260
gggtgtaaat taaaccccgc agtgccctgg ctccctgaga cccaaatgta agtcagaat 1320
gtcccaagac ttgcctgcc aacggaatta aattttagaa agctccacga ggtacacagc 1380
aatgcggagc gctgtatgcc agtttccccg acaccggctc gccgcagggg gacctcacc 1440
cgagagcggg aggggtaagg gcggcggggc caaggagatc gggggtgctg agttggccag 1500
gagtgaactg ggtgaccggg ggtgctgagg tggcctggag tgcggggctg gccgggcaca 1560
ccttggtctt tgtagacgac aaggtgacgg gctcggggcg tgagcacgag gacaggtgc 1620
ccgggcgagt ctgagctgc acgccccga gctcggcccc ggtgctcag gccgaagcac 1680
gggccccgca gccgtgctg gcgcgaccg cccccctcc aacccccact cctgggcgag 1740
cgttcggggg cgtgtcctgg gccaccggg cttctatata cgggcggcg gcgccgggc 1800
gccag 1806

```

```

<210> 2
<211> 1553
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Beta IG-H3 promoter NCBI acc. number AC004503.1

```

```

<400> 2
gactcagggg gtcccaaac actcatctac ctggcaagcc tgcaactctg atgtgcctca 60
ttctgaacat gccaccatca ctgctgcaat gtccagacca caaacacct acaatctct 120
tgactctctt ttctccctt ctccctgtat acagactcca aattctattg agactattac 180
ctctacacc cctcacattt gccagcctt ccccatctct gcctotacca ccatagttca 240
agctctccca tggtccttc ctggttacct gttctcttg cctccttaag cctctcatga 300
cactggccat gtcacttgc tccaccatc acccgtagg ctcttagctg gagtctgggc 360
cctgtacct tctccctt ctccctacc ctgactcca cctccctgtg cttcagccaa 420
ccagataact tgagtttgt gaatgatgc ctgactttac ctgattaact cattttcatc 480
tttcaggcct cagagcaggt atcaccctgt cagggcaggg tgctctctct tagctcccaa 540

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

agccccagct actcttcoatg gaacatcatt ggcttgggct acggatcttc ccaaattgga 600
gctttttcac aaagggotta ggtctcactc attctattaa tccatctgtg tctcccagg 660
gctagcagtg ccaagtaact gacagggtgat taatagatgc ttgggtaagt atcacctctt 720
taccatgtga caatttgttt acctgccttg agctcctcca gggcaggact ctgacctttg 780
cagaatctat ctggcaggta ctgctgcaga gatgtttact gaagaagggg atgaattagt 840
accaagtgta ggaccccacc cttcccacg ggctocaaaa gcagcttaga gcccaacaaa 900
acctgcccca catttttggc gtttctgtgg atcacacgat ttactcatct gtctttcaat 960
gagcatgaca ggtggggggg ggtggagggg attagagatt gaggagctgg ggagggtggt 1020
cagctcctgg ggtgcagaaa caagtctgat gggccatggt gttctgggaa tcagcactgc 1080
ctccccctac cctcctctgc agtgttttgt agcctcaaga tcagtgaggg aatctctggg 1140
ccccacagcat gcaggaacga agccccgag acagctgtcc ctcagtccca aggtcccct 1200
ttggaagcag ccacagaggg cctaagggac ctatacctt ggtttgagga agactgtggc 1260
gagggagaga gggaggaggg gctggcagtg agggcaaggg ctgggaaaac tgagcacggg 1320
cacagtgcgg gagcgggtgg gtgccacggg cagccagggg cgcacgggtt gggaggcgcc 1380
aggcggcccg cctccttgc acgggccggc ccagcttccc cgcctctggc gtcogctccc 1440
tcccctctgc agcttactta acctggcccg ggcggcggag gcgctctcac ttccctggag 1500
ccgcccgtt gccctgggt cgtagctcg ctgggtgccc gtcgtcccgc tcc 1553

```

```

<210> 3
<211> 840
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> EPLIN beta promoter NCBI acc. number AH009382.1

```

```

<400> 3
tggcatattc atcacctggt ggaatctctt cttctcacac attttcatta acttcttgag 60
gaagtgtaat tacaagcgtt ttcccacgag cagcccctac taataacgca tcaagctgca 120
tgaattccga aaagcttcag aaaacttgtg gtctgaaacc ctactatgct tgaggtacag 180
gaaagaagga tactatcaaa aggcacatg cagctggcac ggaactggga caagaatttg 240
ggggcaggat ggccaagtgc taggccaatt gacggtctcc aaaccattag cacagctcct 300
attctgaatg gaggagtaaa aacagctggt ggagaacttg gacgtcatct gccctgtca 360
aacggttttc aggattaatg tacttaattc agctttttcc actacaccac acagcctcct 420

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

gtaaaacacc ctccctgcac acaacttacc cccaaagcac caggaaacct gctggctaga 480
gttgagctta ggaaaaaacct gagggtctce agagtcaaac tgcgataaog ttgagtcaga 540
ggagttaagc acaaaagtaga gctgcacaga ggcccacgtc gtgcaagtgc gtgtctcctt 600
cagagaaaagc cgtgcccagag tagactaggc ccggggcagc aaaaaccctg tcccgctgcc 660
agcgcocgctc ccgcccagagc gactggagca gacgcagagc ctggggcacgt agccggtggc 720
gocgcagctc agcccagagc cgcacgggag gctgtctggc gtgocgccc ccggggcggc 780
ggcggggctc cggggcgggg ccgcaggagc agtaggtgtt agcagcttgg tccgacagag 840

```

```

<210> 4
<211> 1200
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc feature
<223> FAT10 promoter NCBI acc. number AL031983

```

```

<400> 4
agtagaaacc tacttcaagt tccataaaa tcatctgctt ttcactttca gtacagtatt 60
taataactta aatgagatat ttcacacttc agtagtaaat acactttttg ttagataatt 120
ttgtccaact gtatgctaag gtaagtgttc tgagcatgtt taaggcaggt taggtaagc 180
tatgatgttt ggtgggttag gtgtattaaa tgcatttotg attttgata ttttcagttg 240
acaatgggtt tacagggatg taaccocatc ataagtgaag gagcaoctgt acttacttca 300
ttaaagtctt gaaacagtaa ataaggtaac atttaataat atgttgtgca gttcttgaaa 360
ttaaagtact caaccaatat taactttcct ttttttgta tttacttact tttcattcat 420
ttattaatc atttgtgat ttagtaaaaca tttataaatt atttcctgtg cctgacagca 480
tgcgggaaca gtgctaaga tacaagttaa ttaagacaca atcacgacc ccaagattcc 540
tactcttttc taaagattac agacaagcag acgatgctat tgttgaagaa acatgctctg 600
agaggcattt gaaggaagtg tagaggatag aagatggaca cataaccag gatggggagc 660
aaaagagtta ggyaaggctt tttgacgaag atactgttta caccgtgtgt tcttataaat 720
tcatggtgtt ggggatagag ttggaggaaa aggcagctc agtggcctgg agatggcaga 780
gagattgggg tgttcaagga tatgcccgga attcaaggaa cgagaattcc catagacaca 840
gacacagcta gacatagaga tctgcagctt aggtttgggc tgtgggtata gatccaggtg 900
gcttcaacag acaaatatct ttctgagaa aagggaagg ttttcaacac agaaagacca 960
tcccagttt ggaatgaggt ttgcaaatag atgtctgag gagagaagta tgtgatcaga 1020

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

aagcattett tgtctatta ctctgcca gcaaaagtga aagaaaattc atgggagcat 1080  
gcaagaacaa agagcacagc aaagctggac aaacacagca atccaggcag gggatttcca 1140  
actcaactct ggtatataag ctgcatgcaa agtccttttt ctgtctctgg tttctggccc 1200

<210> 5  
<211> 1478  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> misc feature  
<223> PA 28 alpha promoter NCBI acc. number AL136295.2

<400> 5  
gtggagtggg caccgcgaag gaaagcgaa agcggtaggg cgctgcacc cagctccgcc 60  
ttcctgggta gtgggcggg gaggctgga ggaggcggg tcggatggag gaggcgggt 120  
cagccctgcc atggaagggg cggtgccgca gaggaggcg gcgggtgagg ctccgcctag 180  
cgcgcacagg cgtcttcaac ccacctccc cgcgcgcct cgcgaggcc agcttcagg 240  
ctccccact ccgtggccc ggtccccgc tccgcctcc cgcacctgc cgcgcgcgc 300  
ctgaggacgg cgggtccggg tccctccatc gccaaagcca agccagtctc tccgcgtccc 360  
aacctccacc tccgcctccc caactggctc ccacctgct ctcttctcc cctgctccgc 420  
ctgggacaga taagctttac ttagggtctc tccgtcttc cctagagatg gaataagacc 480  
tggcctgtct ttcttagcct tctagcgtg ggcctctggc tctgcgaca tccctgcgac 540  
ctgtagcaac ggcaccagag ctggcagcat cctatocaa gcccgacca actctctct 600  
ggaccacggc tgcagatgcc attctataac cactctcac ggcagcagg gttcatgct 660  
ctctctggct taaaaccctt tctcagctgc ctgttgacct ttgaatgaaa tccaaaagct 720  
gtcgcacctg tctccccctt aagtccactt tctactgctt gcccttcat tcattacact 780  
tgcaaatatt tgggtatatt gtttctcaga tgtgtcatgt tcatctctgc ctacgggct 840  
tggccttgc taataatccc ttgctctaaa acaccttac cctgggtggt gtcattggt 900  
ctcagtttag atgtcacctc ttcagagaga actatcttca tcatccttca taaggaacct 960  
ccctccaat ctattacaaa tcatcctggt ttagtacatt catagcatt atctctctga 1020  
tattagccag gtgttttttt tttttttccc aggataatt actgattta accaggttt 1080  
ggcaaacgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt gggggacgga gtctcgtct 1140  
gtcgcaccag gtggagtga gtggaccat ctaggctcac tgcacctcc acctccagg 1200  
ttcaagcagat tctctgctt cagcctacgg agtagctagg actacaggcg cgtcccaaca 1260

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

cgcccggcta attttttga ttttttagtag agacggggtt tcaccatggt agccaggatg 1320
gactcgatct cctgacctcg tgatccgccc gctcgggctt cccaaagtgc tgggattgca 1380
ggcatgagcc accgcgtctg gccaaactttt tctataaagg gccagagagt aaatatttta 1440
ggctttatag gcettacagt gtctgtctac toaactct 1478

```

```

<210> 6
<211> 3271
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Mac-2 BP promoter NCBI acc. number U91729.1

```

```

<400> 6
aagcctccc aatagctgg attaaaggcg cctaccacca tgtttggcta attatttga 60
tttttttga gacacggggt ttcaccatct tgaccaggct ggtcttgaac tootgacctc 120
gtgatctacc cacctcagcc tcctgaagtg ctggtagtct tcttaaaaag gtaaacatat 180
atctaccata tgaccagta atcctgctcc taggtattta cacaaaataa atacttattt 240
tcacacaaag acttgtatcc aaatgtttcc agcagcttta tgcataatag tggaaagtgg 300
aatgacccaa atgtcatca gtgcaaacat gtattaacag tgggttctcg tccatcagct 360
gggcccacc ccagcaaacc caggagccag ttactgattg ttgagatagc atggatggat 420
ctcagaagca ctgtggttaag taaaagaagc cacatgcaaa atattaataa ctgtatgatt 480
ccatttagag ggaattctag ggtccaggag tggtcctca tgcctgtaat cccagcactt 540
tgggagccag aggcaggggc ggatcacctg agttcagggg ttcgaggcca gcctggccaa 600
tgtggagaaa ccccttctct actaaaataa caaaaattag ctggcctggt tgggtggcgc 660
acctgtaatc ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa tcacttggac ctgagaggca 720
gagattgcaq tgagccgaga ttgttccact gcactccagc ctgggcaatg gaggagact 780
gtgtcttaaa aaagaagaca aaatagaggg aattctagga aaggcaacca gcagtggcag 840
aagctgagag gtggttctg ggaaggggct gggggagggt gtggctgcaq aggggbataa 900
gagaattctt aggggtgatt gaaaagccct aggtaatgat tggttgcatg ataccatcgc 960
tacacatttg ccaaaaacttt gcacgtaaat tatatgcaa gaaagccaat ttttaaaaag 1020
aaggaaagga tgggtttgaa accccagttc tccccctacc agctgcacaa cttagccga 1080
ttacgtcgcc tcaactgagcc tctgttttct catctgtaac agggaaataa agagcagctg 1140
ctccccatca tggctggaag tattaaatgc atctatttgt ggcaaggctt atagtaatgc 1200

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

ctggcgaaat ccatattagc tattataggg agcgttccct aatttgcgga gaggtttggg 1260  
gtagaggcac aaaagatgac cttacaggcc agttaacat tctcatctct gaaatgcccc 1320  
gcacttccc ttocatgtct tgggagcggc ttctgatga cagcagttct gtccacacga 1380  
atctgaggct ttaccaccagc tgtcttctca gagccgagcc gctgccctt cccctgcctg 1440  
tcccctgtca gogcttccct ccaccccatg gtcactgcac acgggaaagg ccttgcgagc 1500  
cccaggggag cagatgktyg gtgctccgat tccaagagga ggcctctggg ttttccattt 1560  
tacctgcctg gatggcctag gactttccc gactctgggg ctaagattc ggcacctgag 1620  
ttttaaacc tttcccagca cttcccagag atgcctccc gtcctctgca ctctgtct 1680  
tccctggcca cttgggcaga agtcattagc actgctgaga agggatgatg ctggggtttc 1740  
tgtgactca ggccttaat ccggatgaga tttttttaa cttcccacag ccagtcttat 1800  
ttccagctgc acctgcccct ggatcttcc aagtctctct ggaggggatt aggcaaaccg 1860  
tgcagctgcc taaaacctca cacttgaag gaaatagtca ttgaatgtct gaactctggg 1920  
ctggctgtct cggactctaa gctgccaggg aaccagggcc ttcccaccag tgggactgcc 1980  
tgggggcttt taaatgcccc tgcctgtccc ctactccag agatggtgac ttctgggtc 2040  
taggcattag gagttttaa aactccctga tgatctctc tctccagccc aggctgagaa 2100  
ccaactggtca gaggcctggg cacatcccaa ggctcatcca gaacatggg gtgcaagtga 2160  
cagaaaacag agcggctgct gattgcctca ctgagcagtg aagcccagcc ttgacctggg 2220  
attaggccag ctggaccacg gagctcagcc cggaggatgc ctgcttccct ctgctctgcc 2280  
ccaccggccc cagcagcctg ggcccacatc ctctcagtca gaagctggct ctaccggct 2340  
ggctgggctc acagccccac cctgaaacca gcagtggtgg ccggggcccc cgcaggctca 2400  
gacagccagg ccttgggtgg ttgaaggcca agagctgggg gccctctggg aaccacacag 2460  
ccgggaatgg gagggggtgc tcccacaggg acagttgagg tgcggcttt cagtgaggag 2520  
aaaggaatg ggtatgagct ggacagagcc attatgtcac ccagagaggc tctgtcccc 2580  
gcccctgta gggggagaca gtaggagagt ggccacaggt ccagcagtg cgagcacagg 2640  
ctctggggtc aggtgttga gcagggtcca gctctccac tggccagctg catacctggt 2700  
tctcagtgcc tccctccct ggggacaggg gacagtgcca tgcaacctt tggggcacag 2760  
gcoctctgtg tggtcagcat gccaaagaca cagagagggg ggatttgac atgagcagcc 2820  
cctgtgtgg tgttaccaca gccagcaacg tgctagacc aggaaaagac tgggagcct 2880  
ctgtcagagt ccacagccac accaccaggt gcagactgtc tgggcccaga gcctctgctt 2940  
cttcccctcc cgtccaccaa acgcccagccc ctgaccact ggggccttt ccaactgagt 3000

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

gtggctgtta gtctcttgc aggccttgc ccagccagac tcccacctg ggcctctgcc 3060
agcctggcac tgatagccac aggcagagct gagacaaaag agagggggccc tggggagtat 3120
cagcagcagc caatcccga agacatctat gtcaggtggt ttctggaaat cgaagtaga 3180
ctctttctg aagcatttc tgggatcagc ctgaccacgc tccatactgg gagagcttc 3240
tgggtcaaac gaccagtctg cagagggatc c 3271

```

```

<210> 7
<211> 1500
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<223> PCI promoter NCBI acc. number AL049839.3

```

```

<400> 7
ctgccatgcc tactgctcac acttccatag cactgcccc caagcaccoc atgggttagg 60
tgctgttatt atcactatct tacagttatg gagcagtggc tcaagtgta actgacttgc 120
ccaaaatcac actacaagga cacagcaggc ctgagattg aaccagcca gtggcttcag 180
agcctgagct gtttctact gcagagggag gagcgaagac ttctaccgt agccagatgg 240
ggagggcatg gcacaggaac ggcctctggg tgaagtggag ggaggaagag gaggactgaa 300
ggccaaggcc acgtcaggag tgatgggaga ccccaaaaag gectcctga gaagagctag 360
agacaaagat gagtgcctcc tcatctggaa gatgaaaaga tgtcttggc tgcattggct 420
gctgtocaaa agtcccaggg gctagggggc ttcaacaaca gaaatttctt tctttacaac 480
tctggaagct ggaagtctga gattaaggca ccagcaggat ttgttcttc caagggccct 540
ctccttggt cacaggtggc tgccttctcc ctgtcttcc ctggtcttc ctctgtgat 600
gtctctatcc tgatctctc ttttaattt ttgtgtaag acgtagtcac attgggttg 660
ggcccactct agtgacctca ttctaactca gtcccctct taaaagccct atctccagat 720
atagtoacat tctgggggat tgaagtaag gacttcagca tatgcattt gggggcaca 780
ttcagccaga acagaggagc ggtggggatg tccacatgaa gaggttcagg cagaattcct 840
ttaggagggg aagatgtctc tctgtgggac aagggggca tggagcagcc cctgggggaa 900
ggagaagggg acagtttgca tactggtatt ctgctacc cagggtggac actcaactag 960
cgtttgctga atgaacaggg caaggccagc agtgctgat gtcccaggca tgtagctggt 1020
ctgagttcat agaaggacca cagcgcctg ccatgtgcca aaccaggaca ccagagtgaa 1080
ggcagaagc tccatggaa gcagcttagt tccctggtaa cctcgagatg ctgatgagac 1140

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

agagcagagc agaggggaacc ctctccctcc atatccatc ctccaaaatg tgtcccttga 1200
tgtggatggg tagacaggat tcctgcctcg gcagccagac cctgccttg ggtctgcacc 1260
tcctctcctc ccttctctct cccgtcatcc ctaaaatctg tcctcgagcc actgccacc 1320
tgtgtaaacc ctcatgccc gtcttgccgg tgccatccct tctctttgaa gctgaatgga 1380
ccaaacatac ccattgagtg ttgggtgggg acatctctgg aaagtcagca cctggaccag 1440
ctccaccctc ctctgaggac accttcttcc ccttccagaa caaagaacag ccaccatgca 1500

```

```

<210> 8
<211> 1674
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc feature
<223> T cell receptor gamma promoter NCBI acc. number A006033.2

```

```

<400> 8
cttacgagcc ccaaggactg ccagcgttga tgtgtggagc agtgacagca tgtctgcagg 60
cactgtgctt tctgccaggg cagcctgaaa tcacgcgaga gaagcgttag acctctgttg 120
cttgctgag tccaccaagt caaacttccc atgggtgagg gtgacatggg gccccctgca 180
tcgttgtaaa gcggtgtcct caccacctgt tagcacttcc agtctgtgtg aagacagtcc 240
tgcaaggtct gcagcctgag atcagaccac atagtttaga cggccacctc agaccacaag 300
gcggccaacc cagcaagttg tcaggctggt gttgttggtt gctgggctg tgacatgcag 360
cattgtcttc tgagagcttg tottcaacca gctggagaga tgttggtccg tcaagccgct 420
tagctctgct cagctaccca cacagcctgc agcacgggt ccttctggtc accttcatga 480
ggctgggccc tccatcccag ttgtttgct tctgttgaag attcaggttc ctgtcccctc 540
cctcagctac ctgaataatg tacatctcct gaatcccggc ttctctcaa tgacagtctc 600
ctattgtctg ttgttcttcc tctaagccaa gacatttaat ccgtcccagg gtatttttac 660
aaactgtctc ccccagtgca tcccttaaaa gctgctgtgt tccagatttc catgcttaat 720
ttaccactg ggagctgcag ctcaactgcca ctgccagca tcgcaagaga gtatcataac 780
cttatatcac tgtcctgggg aaacagcaaa ggtcaaatg tgtttttac caaatgcgtg 840
tcacttttgc accatcataa agtaaaaaaa aatcttaagt cggacctcag ttaaatcgaa 900
agctgtctgt acccatatcc agctaactct tggacatttt caagtacgtc tgacatggga 960
tctcaaaaa agtctgctca tagccagagt gaactcattc ccttccccca aaccatctct 1020
tcttccgagt tccctgtatg cataactacc cacattgcc aagccaggag cttgagcacc 1080

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

agcctcaatt ctccccctca attcaccgca ctctaattcc tgaggattct acgtcctaaa 1140
catttctctgg ctoaccactg cctccaccto acgcacctcc atacatccca tctcggcccc 1200
tcccacccca cttccccatg gccactagac tgacctggtc cttttcctgc tctaaagtcc 1260
ttgctctctc taccttgccct ctgaagatga agtccagagt tcttaggata agaggttctc 1320
tgtgatgtgg ccaccccctc cctgtccttc catcttcatt tagtcacttt ctgcoctggaa 1380
ttccacgacc cacttctatg gattgacttg aatttttttg tgtttggact gcattctact 1440
ccacattccc tggctaabtc ctgtttatcc ttctgggctc agccccagge agtcttcccc 1500
aggaaagtta cctcaccag taagtcagg atggagatgc ttcaaatbge tttctcttca 1560
cgcoacttag tgccttctc tctcctagca cctcctaccc aagtcttggc ctgtttaccc 1620
atttctctct cattctaaa gacagttaag agttcccagg ggagtaagat catg 1674

```

```

<210> 9
<211> 1510
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc feature
<223> Retinal oxidase promoter NCBI acc. number AF010260

```

```

<400> 9
cacctatgaa gtgttcttgc cctctcccc ccaaaaattg aacctgaatt taatcaaagc 60
tttagatctt aatatttagt gcatagggaa ataagtagag tagaaaaaca ataccagggg 120
gaagcaatta gccacattca aaaaatgggtt catttcaata gaacaactga cctgggttct 180
tttcaatgt gttaatagtg ttaaaaagtc tgttttagat gaaaagagac tgatgagacc 240
acatgcaaat acattgcaca gctttgtttg attcaaagaa gtcaagtgtg aaagacattt 300
tttagacagc tgaatgggtg ttgcggctga ctaaaaggat gtgtatgtgt gtttttgaag 360
tatttagggc taaaatatgt ccaggattgg cttttaaata ctacaaaaaa tggagtatgc 420
caaaacgttg accattgtta aagctcagtg aagggcaggt agatgccaat tgcactcttc 480
acttttatgt gcaaagtttg gaaaatttca caataaaatt tttgtgttca cataaatgaa 540
ataacatggg aaaatgttct aaggatggc aagtgaaaag aagcctggaa aataactagt 600
ttgtccact taagttttta aagggtttaa aagtacatgt ttcaaaaagt aaggatagac 660
taaaagtgaa cgtggtaagt tctaagttgt gggottacag gtgttcttta tttttatgct 720
ttgctgtatt ttcaaagttt tttttttaag tttccaaga tgttttacct ctctgttctt 780
atttaccaga taaactttgt ggtagttac tggataaact gtaaatagtg ataaaatttt 840

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

taagtttata tcaagatagc acttcatttt aaaaccagta attattaggt tgggtgcaaaa 900
ttaattgcag ttgttgccat tgggaagtgat ggtaaaaaac gcaattactt ttgcaccaac 960
cttatatttc taaaagatca agttgtaaac ctatttgttt tccctaagat cegctottgc 1020
agagttccaa taaatatgat tgtttacact taagagtcca ggactacagc aggcctgggt 1080
ggaggggagt tactaatggt cccagactta aatccagctg gaacaccacc taaaatatgc 1140
agtaacataa gaccatcaaa agcaatgtcc caggacttac aatgtttgct aagacgcaag 1200
agggtgtgac acagacgcta agcgcctact gcgaggagat gaaggggtcg tcttcatctt 1260
cgccggatga tttccgcca catagagggc gccagtgacg cccacacagc tgctggtgtc 1320
cggggaagag ttctctggca agagctcagg taactgtgga tcttaattca aggccttctc 1380
cgttcggggt ggatgggtg gtactttagg ctccagcaag cccccccca ctcgccgggt 1440
cggtcgcccc ggtcccagc tgcccgtac ttcccagaac ctccgctcc cgtccgggc 1500
cctcgaacca 1510

```

```

<210> 10
<211> 1954
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Bene promoter NCBI acc. number AP001234.3

```

```

<400> 10
caaatatctg gaagataaaa gcataaaaga aggagcttca ttagccagta tagagcatgt 60
ttcccttgc agggcatctc tttctgtct ctagttaaaa gctcagggtg agttaggagg 120
gaaccaaggg ggaatggag caggaaacct gcccctctg agtcatgta aagtcacatc 180
cgattgttag gaaattcaag gggttgaaa gcatgggcaa ggacttcatg tctaaaacac 240
caaaagcacc agcaacaaaa gccaaaattg agaaatggga tctaattaaa ctaaagagct 300
tctgcacagc aaaagaaaca accatcagag tgaacaggca acctacagaa tgggagaaaa 360
tttttgaat ctaccatct gacaaagggc taatatccag aatetacaaa gaacttaaac 420
aaatttaoaa gaaaaaaatc aaacaacccc atcaaaaagt gggtagagga tatgaacaga 480
cacttctcaa aagatgacat ttatgcagcc aacagacaca tgaaaaaatg ctcatcatca 540
ctggccatca gagaatgca aatcaaaacc ataatgagat accatctcac accagttaga 600
atggtgatca ttaaaaagt aggaacaac aggtgctgga gaggatgtgg agaaatagga 660
acacttttac actgttggtg ggactgtaaa ctagtccaac cattgtgaaa gacagtgtgg 720

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

cgattcctca aggattgaga actagaaata ccatttgacc cagcoatccc gttactgggg 780
atatacccaa aggattataa atcatgctgc tataaagaca catgcacacg tatgtttatt 840
gttgactat tcacaatagc aaagacttgg aaccaacca aatgtccaac aatgatagac 900
tggattaaga aaatgtggca catatacacc gtggaatact atgcagccat aaaaaatgat 960
gagttcagct cctttgtag gacatggatg aaactggaaa ccatcattct gagcaaaacta 1020
ttgcaaggac agaaaaacca acactgcatg ttctgactca tagatgggaa ttgaacaatg 1080
agaacacttg gacacagtg ggggaacacc acacaccagg gctgtttgtg gggtaggggg 1140
agggggagg gatagcatta ggagataac ctaatgtaa tgaggagta atgggtgag 1200
cacaccaaca tggcacatgt atacacatga aacaaacctg cactttgtgc acatgtatcc 1260
tagaacttaa agtataataa aaaaaataa taaaataat aaaaaataa aaaaagaatt 1320
caaggttta atgcagaaat cgtgaacaga gggactctcg accaactcg gctgtgaa 1380
atgtctgttt ggctcaagca gtattggcat atacactttt aaacaattct gaataagttg 1440
ccaacattta aaacaggata ttccacatgg aaaatccata aattogtta tattgcttag 1500
tatatactgc ttggcaccg gattgaaacg cgtcaattgc atcagcctat ctttctatgc 1560
aagaatgcaa gaaaaatga tgggatgtgc ctatcacaa ttcattacct cotatttct 1620
ctgacgcaac aagtttccct gattataaag gtctttagcg tgagaggtaac aggtgttatg 1680
gcacgtgcca ataagggcag aaattaatca aattatcaa ctatttggcg atggctcgag 1740
acaggtatag aaccactact aggtgatatt gaggttttg tacaattat agcaagtttt 1800
tgagagtccc ttcaagttg ttacataatc ttctttgtgc aacgtacaag agcaagtag 1860
aaaaattgg tttttatctt ttaagcaac atcagctgca ctagttgagc ttttgacaag 1920
acatactgct caaaaaatct tcataacatt attt 1954

```

```

<210> 11
<211> 1520
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> HIF-2alpha/ EPAS promoter NCBI acc. number NT_005065.3

```

```

<400> 11
caacttcaag ttacacctgt gaaactcatg ggtccttcca cagccttcaa aaactaaggg 60
ogtccctgt cctcctccca gatgtccctt ccccatgcc ggtagcagat gggagacagc 120
tcagcgcggg gcaggggagc actgggcccg gagatggaag gcagcgtcaa aagcgcgct 180

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

ggaaaaatccc tgagcgcgtaa ccgttgccctg tgtgagccct taaatctaca aatttccaac 240
acctgtagcc tttgggtttc ccaggacttc catcgaccct ggcggcagag agggcaggcc 300
tgagatgcag tgacttgagg gcacatggcc aactcttgtc actccaagat cacactgggg 360
aaccagacty acttctccaa ttctgaaact gccccggcct cgggcggtc aaagggcctc 420
ctctgcccga tccccgcaa aaccaaaccg cctggcacia gccggtaagc aaccaacctg 480
ctgggagagg gaaggaagag taggogcagc cctagatcaa ttctcttgca ctgcttctcc 540
cagacgtca agtcagctgc gtcccaccga aaagggcgca tgcgccacgc ccgaaacgca 600
gccgctgggg gccgagaaat tatcccacc tggcccagg gccagggagc caggagcgca 660
gcagcgtgga ggggctccgc gctggccgg cgctgccgc ggtcctgccc tegtccaag 720
ggacggcgcc cgttacgagg acaccgacgc tgtggcgca ctgctctcc ccgacgcaat 780
cccggagccc ggtcccgcc cgccctcgg ccctgocgag gctgctctc ccgacgcyg 840
agtcccacc cgtaaccgc cgcccagac acctataaa caagtctcg aagtgcggag 900
gcagagggcg gggcgacgc cggggcgagg agcgggcca ggtcagggc agaggctgcg 960
gccgcgctc cccattggcc gggacgcagt gagccgccg gactcggcg cgggcgggc 1020
ctgcccggcg gtgcccgc acacaccgc gccggtgcc gcccccgcc ctccgcccc 1080
gcccctgcc cgcaccaagc cggccgacgg agtttttaa gtgggctgcc ggcgcggga 1140
gctttacact cgcgagcgga ccgccacac ggtccgtgc ccgctgcgt tccgcccag 1200
cgctcctgag cggccgctac aatcctcggc agtgcctga gactgtatgg tcagotcagc 1260
ccggctccg actcctccg actcccagca ttcgagccac ttttttttt ctttgaaaa 1320
tcagaaaagt gactcctttt ccagggaaaa aggaacttg gtcccttct ctccgtctc 1380
ttttcgggtc tgacagctc caccactcc ttcccggac cccgctccg cgcgaggtt 1440
ctcccagtc acctttctcc acccccgcc ccgcaactag ccgcccgcg gccaccttc 1500
acctgactgc gggggcgct 1520

<210> 12
<211> 1469
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Selectin promoter NCBI acc. number AL021940.1

<400> 12
catggctttg cttggtcctt ctctagttct tctgcagccc attgagctc ttgacttagc 60

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

acaagggtct caggctccttg cccaaaggga gtgtgctgtg ctgcaggtag actgcactga 120
atgtoaacag aaagccttgc tttctttcat ttctctaac cagtctcaca tctctctct 180
cctcccttt tccctccctt tctctctgca ctctcttttc ctctttcccc acccctttcc 240
tagactggcc tctattgcct cccactgaga caaaaatgaa ctgctgatca aaagtaatgt 300
gactagatct tctcttctt cctctcttct tatctctct tccattctcc tatgcatctt 360
tcctaacctt cctctctctt cactcattgt tgttgetgtt ctctctctc ttctttttcc 420
tctgtctct ctctctctac ttgttcttgt tcttgttttt gtttggttct tgbttctctc 480
ttctctctc tctctctct cctctctctt ctcttccacc accctccctt atctttttca 540
taaagtctaa actaaccttt ggctacctgt ggtaaatggc ccttggaat tgcaataact 600
acaatcaaa actgcatttc agacatattt atgatgttg caaaacttca gtagagctaa 660
gcaatggact tgactcgttt cgggtccttc acctccgtct ttccttgctc accacctagt 720
ggactgcctt gttagtggca ctctctgaag ttaaccctg aagagagccc atgctctcta 780
gcttttcacc gtgtaggttt gggagctctc aagtaacctt aatattcttg gactataaaa 840
tgagatggtt ttataagact gcatgtgaaa ttaggacca tatgatgaag gacaataaaa 900
aggaagacc actgatgtga gtcaatgagt caaatgcaa tcagatttgc attttttagga 960
aaataataat aacaacaaca aaaactctga agctcagcgc cccatattta ttatattggt 1020
taatctttat aacagctctc tgctatagat atgattatta tccccattct aaagagtctc 1080
aaagaggtta agaaacaat tcaaaaacta gcgaagaca agaaataact aagatcagag 1140
cagaaccata ggaggtagag acacgaaaaa gccttcaaaa aatcaataaa tccaggagct 1200
gcattttgaa aagattaaca aaatagatgg accactagct agactaataa gaaagaagaa 1260
tcaatagaca caataaaaaa tggtaagggt gatattacca ctgatccgtt agaaatacaa 1320
actaccatca gagattacta taaactctt tacacaaata aactagaaaa tctagaagaa 1380
atggataaat tcctggacac atacacctc ccaagactaa accaggaaga agtcaaatcc 1440
ctgaatagac taataacaag ttctgaaat 1469

```

```

<210> 13
<211> 1490
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Ring finger protein RNF promoter acc. number AP000518.1

```

```

<400> 13

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

taaatacatca tgcagtcaca acaaaacctg tcaaaagtta aattctgctt ctagggggcca    60
gcagtttagg agtataagta aaacaattta cagatgttag actgttttaa tttaacccca    120
aaacaaacaa aaagaaagggt ctggagggtat aacatttctg aaagtctttg gtttacagca    180
gttgctataa ggggagccac ataatttata gtccaaactg gacatttctg aaagtgaag    240
gaggtgctat taataattac accaggacaa agtgaaaacc aggatggttc caggcaaacg    300
agagtgtatg atcactctgg ctattattat aataatcctc cacaagccct gtttgacctc    360
agattaagat cagacaaaaa ttaatgggtg acttcttctg ggggacagac ggctgataat    420
ggagagttag gaggtgaggg tggaaagctat accaagagaa ggggtagggg ggaagcacc    480
ttttccttaa gacaagaggg aaggagggaa ggttaggaca tgaatgtaca gaagggaatg    540
tatgtaacac tggttgatat attcctagtc ataacaaaag ccatagaagg caagtcaggg    600
atcagagaag caccaagaag gaagaagaag aacatataga cagaattggc aaagcaaaag    660
atgggcacgg agacaccagc atactggaga catacagaga aaaaatcaac agaggacaga    720
ctactacagc tgttggggg aggcagaaga tcaccagggg caagagcaaa gtgcaaaaac    780
aaagaacaa cctttagaaa ggaagttcct tcctatcct actgagctag agagtggttg    840
gttgaccctg tgactggaaa tcccccaagg taggtgatga taaactctac attttcaca    900
aattctgtga ggagocaaag cactgaggt agagaattgc cctcccca cttccagat    960
gctctaccaa ggttgaact ttgcatacaa gatgcccaa gcattgcagt gaactggctg    1020
tgaccttca gtaggcatca ccaccaccc ctccactccc tactcagagc tgattgggaa    1080
atccccata agtgggtgtt ggtgcccggt tcattctgat tttagtcaac caccatacaa    1140
acataccttt agtccaaagt tcaggacaac ttatttctct ttataagcag cctattacac    1200
attcaaagta tccatttggt ctcaagaggt agcaaggtag gactgcccat ctgttttct    1260
ctctttataa tattttctag atcetaaatt ttacgctttt ctatcattta ttttttctc    1320
cctcttcttt tcctctctct ctgctcttct aactaattgg cagaatctct gacctccact    1380
ttctctgact ccctctccc ttccatgaaa cagtatccac agtggactcc ggggctccta    1440
cagacttggc acagcttctc acagtcttga aacagccctg ttgttctgtc    1490

```

```

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for IGFBP-3

```

WO 01/92578	PCT/US01/17161
<400> 14 ttgcacaaaa gactgccaag	20
<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<220> <221> misc_feature <223> Antisense primer for IGFBP-3	
<400> 15 catgaagtct ggggtctgtg	20
<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<220> <221> misc_feature <223> Sense primer for Mac-2 BP	
<400> 16 aattccacac tgtgcocttc	20
<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<220> <221> misc_feature <223> Antisense primer for Mac-2 BP	
<400> 17 gtggagtctg gaaggactgg	20
<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<220> <221> misc_feature <223> Sense primer for beta IG-H3	
<400> 18 tgcgactagc ccctgtctat	20

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for beta IG-H3

<400> 19
catgcacaag gctcacatct                20

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

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for PCI

<400> 20
gcacccaaga gcaagacttc                20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for PCI

<400> 21
cgagctgcct ctttttgaac                20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for FAT 10

<400> 22
aatgottcct gcctctgtgt                20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA

```

WO 01/92578	PCT/US01/17161
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Antisense primer for FAT 10	
<400> 23	
atcactgggc ttcaccaactt	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Sense primer for EPLIN beta	
<400> 24	
agaaagggga ccoctgactgt	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Antisense primer for EPLIN beta	
<400> 25	
aagatcctca ccgtccttga	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Sense primer for T cell receptor gamma	
<400> 26	
aggagctgtg gaaaacatgg	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	

WO 01/92578

PCT/US01/17161

&lt;223&gt; Antisense primer for T cell receptor gamma

<400> 27  
cataaacagac ggtggcacia 20

<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Sense primer for P28 alpha

<400> 28  
acaggtggat gtgtttcgtg 20

<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Antisense primer for P28 alpha

<400> 29  
ttcatcctcc ccctttctet 20

<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Sense primer for Retinal oxidase

<400> 30  
gtggggaca tcatgacagc 20

<210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Antisense primer for Retinal oxidase

&lt;400&gt; 31

WO 01/92578	PCT/US01/17161
agcggctcca agtcttgata	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Sense primer for Bene	
<400> 32	
ccaggaaca aaaggagaga	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Antisense primer for Bene	
<400> 33	
tgccttctgt cattgggaat	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Sense primer for HIF-2alpha/ EPAS-1	
<400> 34	
ccagtgcac atgtgtgtca	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Antisense primer for HIF-2alpha/ EPAS-1	
<400> 35	
cccgaatcc agagagatga	20
<210> 36	

WO 01/92578 PCT/US01/17161

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Sense primer for Selectin

<400> 36  
gtggcacctc ctacgtcaaa 20

<210> 37  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Antisense primer for Selectin

<400> 37  
tgaatccttt ccctttatgg tc 22

<210> 38  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Sense primer for ring finger protein RNF

<400> 38  
gaggtgcagt ccaaaaggaa 20

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Antisense primer for ring finger protein RNF

<400> 39  
tgtgttgcg tacaggtcctt tg 22

<210> 40  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

WO 01/92578

PCT/US01/17161

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for Beta-actin

<400> 40
tgtgttgcg tacaggtctt tg                22

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

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for Beta-actin

<400> 41
tgtgttgcg tacaggtctt tg                22

<210> 42
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RARE sequence from ring finger protein RNF promoter

<400> 42
aggtcacagc cagttca                    17

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Sense primer for beta-IG-H3 reporter gene construction

<400> 43
ggccaggtgc ctcttcttag                20

<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Antisense primer for beta-IG-H3 reporter gene construction

```

WO 01/92578

PCT/US01/17161

<400> 44  
cggtccagg gaagtgag

18

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/092578 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/63, C12Q 1/68 (74) Agent: NOONAN, Kevin, E., McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/17161 (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 25 May 2001 (25.05.2001) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/207,535 26 May 2000 (26.05.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS [US/US]; 352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street, Urbana, IL 61801 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): RONINSON, Igor, B. [US/US]; 2731 Lincoln Lane, Wilmette, IL 60091 (US); DOKMANOVIC, Miles [YU/US]; Apartment #2F, 1452 West Taylor Street, Chicago, IL 60607 (US); CHANG, Bey-Dih [—/US]; 1116 Cambria Lane, Lombard, IL 60148 (US).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 7 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/092578 A3

(54) Title: REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING EXPRESSION OF GENES REGULATED BY RETINOLDS

(57) Abstract: This invention identifies growth-inhibitory genes induced by retinoids. The invention provides reagents and methods for identifying compounds other than retinoids that induce expression of these cellular genes. The invention also provides reagents that are recombinant mammalian cells containing recombinant expression constructs that express a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a gene that is regulated by retinoids, and methods for using such cells to identify compounds other than retinoids that modulate expression of these cellular genes.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17161
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/63 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MING Z ET AL: "Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 66-71, XP004107044 ISSN: 0167-7799 the whole document --- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2002	Date of mailing of the international search report 21 01, 2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-0940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hagermaier, S	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter national Application No PCT/US 01/17161
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG S-L ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL RETINOID-INDUCIBLE GENE 1(RIG1) DERIVING FROM HUMAN GASTRIC CANCER CELLS" MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 159, no. 1/2, 25 January 2000 (2000-01-25), pages 15-24, XP001076808 ISSN: 0303-7207 the whole document ---	1-18
Y	KUMAR C C: "SETTING UP REPORTER-GENE BASED ASSAY SYSTEMS FOR SCREENING ANTINEOPLASTIC DRUGS" PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, EUGENE, OR, US, 1 June 1991 (1991-06-01), pages 39-43, XP000400709 the whole document ---	1-11
P,X	DOKMANOVIC MILOS ET AL: "Molecular basis of senescence-like growth arrest induced in breast carcinoma cells by retinoids." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), page 210 XP001109366 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X the whole document ---	1-18
T	DOKMANOVIC MILOS ET AL: "Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes." CANCER BIOLOGY & THERAPY. UNITED STATES 2002 JAN-FEB, vol. 1, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 24-27; discussion 28 - 30, XP008011381 ISSN: 1538-4047 the whole document --- -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17161
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUBBAGE M L ET AL: "Insulin-like Growth Factor Binding protein-3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 265, no. 21, 15 July 1990 (1990-07-15), pages 12642-12649, XP002025926 ISSN: 0021-9258	1-7
Y	the whole document	8-11
X	HEMBREE J R ET AL: "RETINOID X RECEPTOR-SPECIFIC RETINOIDS INHIBIT THE ABILITY OF RETINOIC ACID RECEPTOR-SPECIFIC RETINOIDS TO INCREASE THE LEVEL OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN-3 IN HUMAN ECTOCERVICAL EPITHELIAL CELLS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 56, no. 8, 15 April 1996 (1996-04-15), pages 1794-1799, XP002051446 ISSN: 0008-5472	12-18
Y	the whole document	1-11
X	SHANG YONGFENG ET AL: "Signal relay by retinoic acid receptors alpha and beta in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 25, 18 June 1999 (1999-06-18), pages 18005-18010, XP002200744 ISSN: 0021-9258	12-18
Y	the whole document	1-11
X	HAN GIL-RO ET AL: "All-trans-retinoic acid increases transforming growth factor-beta-2 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor-alpha-dependent signaling pathway." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 21, 1997, pages 13711-13716, XP002200745 ISSN: 0021-9258	12-18
Y	the whole document	1-11
X	WO 96 23080 A (ALLERGAN INC) 1 August 1996 (1996-08-01)	1-3,5, 7-12,14, 16-18
	the whole document	
	---	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- national Application No PCT/US 01/17161
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIMON CHRISTIAN ET AL: "Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, on urokinase expression and in vitro invasion." CANCER RESEARCH, vol. 56, no. 23, 1996, pages 5369-5374, XP002200747 ISSN: 0008-5472	1-3, 7-12,14, 16-18
Y	the whole document ---	5
A	ALBISTON ANTHONY L ET AL: "Cloning and characterization of the promoter for the rat insulin-like growth factor-binding protein-3 gene." ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 2, 1995, pages 696-704, XP008003005 ISSN: 0013-7227 the whole document ---	
A	WO 98 08546 A (INST NAT SANTE RECH MED UNIV PASTEUR (FR); CENTRE NAT RECH SCIENT) 5 March 1998 (1998-03-05) the whole document ---	
A	WO 91 14695 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 3 October 1991 (1991-10-03) the whole document ---	
A	HELLER LOREE C ET AL: "Transcriptional regulation of the Bmp2 gene. Retinoic acid induction in F9 embryonal carcinoma cells and Saccharomyces cerevisiae." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 3, 15 January 1999 (1999-01-15), pages 1394-1400, XP002200748 ISSN: 0021-9258 See page 1400, left column, last paragraph. the whole document ---	
X	SKONIER JOHN ET AL: "cDNA cloning and sequence analysis of beta-ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta." DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 11, no. 7, 1992, pages 511-522, XP008011176 ISSN: 1044-5498 cited in the application	12-18
Y	the whole document ---	1-11
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SKONIER J ET AL: "BETAIG-H3: A TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-RESPONSIVE GENE ENCODING A SECRETED PROTEIN THAT INHIBITS CELL ATTACHMENT IN VITRO AND SUPPRESSES THE GROWTH OF CHO CELLS IN NUDE MICE" DNA AND CELL BIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 13, no. 6, 1994, pages 571-584, XP002914800 ISSN: 1044-5498 cited in the application the whole document	12-18
Y	---	1-11
Y	TSUJIMOTO HIROYUKI ET AL: "Differential gene expression in tumorigenic and nontumorigenic HeLa X normal human fibroblast hybrid cells." MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 26, no. 4, December 1999 (1999-12), pages 298-304, XP008011175 ISSN: 0899-1987 the whole document	1-18
Y	---	1-18
Y	US 5 444 164 A (PURCHIO ANTHONY F ET AL) 22 August 1995 (1995-08-22) the whole document	1-18
Y	---	1-18
Y	SCHENKER THOMAS ET AL: "Down-regulated proteins of mesenchymal tumor cells." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 239, no. 1, 25 February 1998 (1998-02-25), pages 161-168, XP002223378 ISSN: 0014-4827 cited in the application the whole document	1-18
Y	---	1-11
Y	DATABASE GENBANK [Online] NCBI; 30 March 1998 (1998-03-30) KIMMERLY ET AL.: "Homo sapiens chromosome 5, P1 clone 1354A7" Database accession no. AC004503 XP002223403 abstract	1-11
	---	-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter.....al Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	HU Y C ET AL: "Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC." CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES NOV 2001, vol. 7, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 3519-3525, XP002223377 ISSN: 1078-0432 the whole document	1-18
X	CHEN SHAOXIONG ET AL: "Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms." GENE (AMSTERDAM), vol. 248, no. 1-2, 2 May 2000 (2000-05-02), pages 69-76, XP004198798 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-18
Y	MAUL R S ET AL: "EPLIN, EPITHELIAL PROTEIN LOST IN NEOPLASM" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 18, 1999, pages 7838-7841, XP002933578 ISSN: 0950-9232 cited in the application the whole document	1-18
P,X	WO 01 18019 A (CHANG DAVID D ;MAUL RAYMOND S (US); UNIV CALIFORNIA (US)) 15 March 2001 (2001-03-15) the whole document	1-18
Y	WO 98 23747 A (SCHERING CORP) 4 June 1998 (1998-06-04) the whole document	1-18
	--- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIU YUAN-CHING ET AL: "A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 8, 13 April 1999 (1999-04-13), pages 4313-4318, XP002223380 April 13, 1999 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document ---	1-18
Y	RAASI S ET AL: "A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. GERMANY DEC 1999, vol. 29, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 4030-4036, XP002223381 ISSN: 0014-2980 the whole document ---	1-18
Y	DATABASE EMBL [Online] EBI; 27 October 1998 (1998-10-27) YOUNGER R.: "Human DNA sequence from clone RP1-271M21 on chromosome 6p21.31-22.2" Database accession no. AL031983 XP002223404 abstract ---	1-11
T	RAASI SHAHRI ET AL: "The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 38, 21 September 2001 (2001-09-21), pages 35334-35343, XP002223382 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-18
Y	DATABASE EMBL [Online] EBI; 11 January 2000 (2000-01-11) HEILIG ET AL.: "Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-468E2 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human)" Database accession no. AL136295 XP002223405 abstract --- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter Application No PCT/US 01/17161
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRISAN TERESA ET AL: "Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 88, no. 6, 2000, pages 881-888, XP002223383 ISSN: 0020-7136 the whole document ---	
A	GROETTRUP MARCUS ET AL: "A role for the proteasome regulator PA28-alpha in antigen presentation." NATURE (LONDON), vol. 381, no. 6578, 1996, pages 166-168, XP002224062 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	
A	DELP K ET AL: "Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin." BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 25, no. Supplement 2, May 2000 (2000-05), pages S88-S95, XP001128767 2nd International Symposium on Transplantation & Gene Therapy; Idar-Oberstein, Germany; October 21-23, 1999 ISSN: 0268-3369 the whole document ---	
A	WOJCIK AND WILK: "Changes in proteasome expression and activity during differentiation of neuronal precursor Ntera 2 clone D1 cells" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, vol. 34, 1999, pages 131-136, XP002223385 the whole document ---	
P, Y	WO 01 15520 A (ORTHO MCNEIL PHARM INC) 8 March 2001 (2001-03-08) the whole document --- -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter   Application No PCT/US 01/17161
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	RITZ U ET AL: "Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 19, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 1211-1220, XP008011218 ISSN: 1019-6439 the whole document ---	
X	BRAKEBUSCH CORD ET AL: "Isolation and functional characterization of the human 90K promoter." GENOMICS, vol. 57, no. 2, 15 April 1999 (1999-04-15), pages 268-278, XP002223386 ISSN: 0888-7543 the whole document ---	1-5, 7-14, 16-18
Y	US 5 965 382 A (CASIPIT CLAYTON L ET AL) 12 October 1999 (1999-10-12) the whole document ---	1-5, 7-14, 16-18
Y	CHANG B-D ET AL: "EFFECTS OF P21WAF1/CIP1/SDI1 ON CELLULAR GENE EXPRESSION: IMPLICATIONS FOR CARCINOGENESIS, SENESCENCE, AND AGE-RELATED DISEASES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 97, no. 8, April 2000 (2000-04), pages 4291-4296, XP000921392 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-5, 7-14, 16-18
Y	BRAKEBUSCH CORD ET AL: "Expression of the 90K immunostimulator gene is controlled by a promoter with unique features." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 6, 1997, pages 3674-3682, XP002223387 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	1-5, 7-14, 16-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	MARCHETTI ANTONIO ET AL: "Expression of 90k (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 MAY 2002, vol. 62, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 2535-2539, XP002223388 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-5, 7-14, 16-18
X	HAYASHI T ET AL: "Regulation of the human protein C inhibitor gene expression in HepG2 cells: role of Sp1 and AP2." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 1 JUN 1998, vol. 332 ( Pt 2), 1 June 1998 (1998-06-01), pages 573-582, XP002223389 ISSN: 0264-6021 the whole document	1-5,7
Y	---	8-14, 16-18
X	SUZUKI K: "Protein C inhibitor (PAI-3): Structure and multi-function." FIBRINOLYSIS & PROTEOLYSIS, vol. 14, no. 2-3, March 2000 (2000-03), pages 133-145, XP001131932 ISSN: 1369-0191 the whole document	12-14, 16-18
Y	---	1-5,7-11
Y	EP 0 280 135 A (BEHRINGWERKE AG) 31 August 1988 (1988-08-31) the whole document	8-14, 16-18
Y	---	1-5,7
Y	DATABASE EMBL [Online] EBI; 15 November 1999 (1999-11-15) HEILIG ET AL.: "Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-262P9" Database accession no. AL132990 XP002224064 abstract	1-5,7
Y	HETTMANN T ET AL: "THE HUMAN T CELL RECEPTOR GAMMA GENES ARE TRANSCRIBED FROM TATA-LESS PROMOTERS CONTAINING A CONSERVED HEPTAMER SEQUENCE" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 29, no. 9, 1992, pages 1073-1080, XP008011286 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-5,7
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE EMBL [Online]            EBI; 23 November 1989 (1989-11-23)            LEFRANC ET AL.: "H.sapiens TRGV9 gene,            allele V9*A2"            Database accession no. X15274            XP002223406            abstract</p> <p>---</p>	1-5,7
A	<p>ESSAND M ET AL: "High expression of a            specific T-cell receptor gamma transcript            in epithelial cells of the prostate"            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF            SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF            SCIENCE, WASHINGTON, US,            vol. 96, August 1999 (1999-08), pages            9287-9292, XP002151630            ISSN: 0027-8424            the whole document</p> <p>---</p>	1,5, 7-14, 16-18
X	<p>WRIGHT ET AL.: "Molecular cloning,            refined chromosomal mapping and structural            analysis of the human gene encoding            aldehyde oxidase (AOX1), a candidate for            the ALS2 gene"            REDOX REPORT,            vol. 3, no. 3, 1997, pages 135-144,            XP008011335            the whole document</p> <p>---</p>	1-5,7
Y	<p>---</p>	8-14, 16-18
X	<p>TERAO M ET AL: "Isolation and            characterization of the human aldehyde            oxidase gene: conservation of intron/exon            boundaries with the xanthine            oxidoreductase gene indicates a common            origin."            THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 1 JUN            1998,            vol. 332 ( Pt 2),            1 June 1998 (1998-06-01), pages 383-393,            XP002223392            ISSN: 0264-6021            the whole document</p> <p>---</p>	1-5,7
Y	<p>---</p>	8-14, 16-18
A	<p>TOMITA SHUHEI ET AL: "Retinal oxidase is            identical to aldehyde oxidase."            FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL            SOCIETIES) LETTERS,            vol. 336, no. 2, 1993, pages 272-274,            XP002223393            ISSN: 0014-5793            the whole document</p> <p>---</p>	
	---	-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SATO NAOAKI ET AL: "Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 Up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 123, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 1119-1126, XP002223394 ISSN: 0021-924X the whole document ---	12-14, 16-18
Y	LAUTNER-RIESKE A ET AL: "Searching for non-Vkappa transcripts from the human immunoglobulin kappa locus" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 159, no. 2, 4 July 1995 (1995-07-04), pages 199-202, XP004042206 ISSN: 0378-1119 the whole document ---	1-5,7
Y	DATABASE GENBANK [Online] NCBI; SHIMIZU AND KAWASAKI: "Homo sapiens genomic DNA, chromosome 2p11.2, clone:cos607/4" Database accession no. AP001234 XP002223407 abstract ---	1-5,7
T	DEL CARMEN DE MARCO MARIA ET AL: "BENE, a novel raft-associated protein of the MAL proteolipid family, interacts with caveolin-1 in human endothelial-like ECV304 cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 25, 22 June 2001 (2001-06-22), pages 23009-23017, XP002223395 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	
X	WIESENER M S ET AL: "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: Characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha." BLOOD, vol. 92, no. 7, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 2260-2268, XP002223396 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	12-14, 16-18
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 31701 A (UNIV TEXAS) 23 July 1998 (1998-07-23) the whole document ---	1-5,7
Y	DATABASE EMBL [Online] EBI; 14 December 1999 (1999-12-14) SULSTON: "Homo sapiens BAC clone RP11-130P22 from 2, complete sequence" Database accession no. AC016696 XP002224065 abstract ---	1-5,7
A	WO 00 09657 A (LEE MU EN ;HARVARD COLLEGE (US); MAEMURA KOJI (US); HIESH CHUNG MI) 24 February 2000 (2000-02-24) the whole document ---	
A	DANG C V ET AL: "ONCOGENES IN TUMOR METABOLISM, TUMORIGENESIS, AND APOPTOSIS" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 29, no. 4, August 1997 (1997-08), pages 345-354, XP008001528 ISSN: 0145-479X the whole document ---	
A	FELDSER D ET AL: "RECIPROCAL POSITIVE REGULATION OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1ALPHA AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, 15 August 1999 (1999-08-15), pages 3915-3918, XP000990279 ISSN: 0008-5472 the whole document ---	
A	BLANCHER C ET AL: "THE MOLECULAR BASIS OF THE HYPOXIA RESPONSE PATHWAY: TUMOUR HYPOXIA AS A THERAPY TARGET" CANCER METASTASIS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 17, 1998, pages 187-194, XP002924629 ISSN: 0167-7659 the whole document ---	
A	WO 00 29437 A (BERKENSTAM ANDERS ;PHARMACIA & UPJOHN AB (SE); POELLINGER LORENZ ()) 25 May 2000 (2000-05-25) the whole document ---	
	---	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter at Application No PCT/US 01/17161
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	TALKS K L ET AL: "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. UNITED STATES AUG 2000, vol. 157, no. 2, August 2000 (2000-08), pages 411-421, XP002223397 ISSN: 0002-9440 the whole document ---	
Y	ORD D C ET AL: "STRUCTURE OF THE GENE ENCODING THE HUMAN LEUKOCYTE ADHESION MOLECULE-1 TQ1 LEU-8 OF LYMPHOCYTES AND NEUTROPHILS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 14, 1990, pages 7760-7767, XP002223398 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-5,7
A	WO 93 06835 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 15 April 1993 (1993-04-15) the whole document ---	
A	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; February 2000 (2000-02) SJOGREN FLORENCE ET AL: "The influence of retinoic acid and retinoic acid derivatives on beta2 integrins and L-selectin expression in HL-60 cells in vitro." Database accession no. PREV200000177491 XP002224066 abstract & INFLAMMATION, vol. 24, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 21-32, ISSN: 0360-3997 ---	
A	TATEWAKI M ET AL: "Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax." BLOOD. UNITED STATES 15 OCT 1995, vol. 86, no. 8, 15 October 1995 (1995-10-15), pages 3109-3117, XP002223401 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17161

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	QIAN FAWN ET AL: "L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 7, 27 March 2001 (2001-03-27), pages 3976-3981, XP002223402 March 27, 2001 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/17161
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 19, 20 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on Protest</b> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01 17161

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19,20

Although claims 19 and 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search could have been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. Nevertheless, no such search was carried out for claims 19 and 20 because the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for a compound/composition.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 01/17161

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9623080	A	01-08-1996	US 5650279 A	22-07-1997
			AU 5295596 A	14-08-1996
			WO 9623080 A1	01-08-1996
WO 9808546	A	05-03-1998	AU 731060 B2	22-03-2001
			AU 4167497 A	19-03-1998
			EP 0928200 A2	14-07-1999
			JP 2001500486 T	16-01-2001
			NO 990912 A	27-04-1999
			WO 9808546 A2	05-03-1998
			US 6130230 A	10-10-2000
WO 9114695	A	03-10-1991	AU 655417 B2	22-12-1994
			AU 7668391 A	21-10-1991
			CA 2075192 A1	23-09-1991
			EP 0522054 A1	13-01-1993
			JP 11508121 T	21-07-1999
			WO 9114695 A1	03-10-1991
			US 5641652 A	24-06-1997
			US 5688691 A	18-11-1997
			US 6265173 B1	24-07-2001
			US 5861274 A	19-01-1999
			US 6281330 B1	28-08-2001
US 5444164	A	22-08-1995	AT 123060 T	15-06-1995
			CA 2088804 A1	06-08-1993
			DE 69300158 D1	29-06-1995
			DE 69300158 T2	19-10-1995
			DK 555989 T3	24-07-1995
			EP 0555989 A1	18-08-1993
			ES 2073327 T3	01-08-1995
			JP 7133296 A	23-05-1995
WO 0118019	A	15-03-2001	AU 7361000 A	10-04-2001
			WO 0118019 A1	15-03-2001
WO 9823747	A	04-06-1998	AU 5356498 A	22-06-1998
			WO 9823747 A2	04-06-1998
			US 6361939 B1	26-03-2002
WO 0115520	A	08-03-2001	US 6204432 B1	20-03-2001
			AU 7057800 A	26-03-2001
			EP 1211933 A1	12-06-2002
			WO 0115520 A1	08-03-2001
US 5965382	A	12-10-1999	US 6069127 A	30-05-2000
			US 5736340 A	07-04-1998
			US 5644035 A	01-07-1997
			AT 169028 T	15-08-1998
			AU 708987 B2	19-08-1999
			AU 1497297 A	03-07-1997
			AU 673810 B2	28-11-1996
			AU 2896392 A	21-05-1993
			CA 2121256 A1	29-04-1993
			DE 69226448 D1	03-09-1998
			DE 69226448 T2	08-04-1999
			EP 0625990 A1	30-11-1994
			JP 10110000 A	28-04-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International Application No.	
Information on patent family members			PCT/US 01/17161	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5965382	A	JP 2718827 B2 JP 6510790 T WO 9308215 A1	25-02-1998 01-12-1994 29-04-1993	
EP 0280135	A	31-08-1988 DE 3705745 A1 AT 67672 T AU 617303 B2 AU 1200488 A CA 1322332 A1 DE 3865035 D1 EP 0280135 A2 ES 2040765 T3 JP 2725777 B2 JP 63233927 A	01-09-1988 15-10-1991 28-11-1991 25-08-1988 21-09-1993 31-10-1991 31-08-1988 01-11-1993 11-03-1998 29-09-1988	
WO 9831701	A	23-07-1998 US 5695963 A AU 6242098 A WO 9831701 A1	09-12-1997 07-08-1998 23-07-1998	
WO 0009657	A	24-02-2000 AU 5562999 A WO 0010096 A1 WO 0009657 A2 US 6395548 B1	06-03-2000 24-02-2000 24-02-2000 28-05-2002	
WO 0029437	A	25-05-2000 AU 1593100 A BR 9915263 A CN 1330663 T EP 1141005 A1 JP 2002530063 T WO 0029437 A1 TR 200101345 T2 US 6436654 B1	05-06-2000 30-10-2001 09-01-2002 10-10-2001 17-09-2002 25-05-2000 22-10-2001 20-08-2002	
WO 9306835	A	15-04-1993 AU 2773792 A WO 9306835 A1 US 5834425 A US 5595737 A US 5389520 A	03-05-1993 15-04-1993 10-11-1998 21-01-1997 14-02-1995	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
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	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
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, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ドクマノヴィッチ、マイルズ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60607 シカゴ ウェスト テイラー ストリート 1452  
 アpartment ナンバー 2エフ

(72) 発明者 チャン、ベイ - ディー

アメリカ合衆国 イリノイ州 60148 ロンバード カンプリア レーン 1116

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03  
 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA02 EA04 FA02 GA11  
 GA18 HA08 HA12 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QR02 QR07 QR08 QR38 QR41 QR42  
 QR48 QR55 QR58 QR59 QR62 QR66 QR69 QR77 QR80 QR82  
 QS12 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01 QX02  
 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 BA24 BB19 BB34 CA28 CA46  
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZB262

专利名称(译)	用于鉴定由类视黄醇调节的基因表达的试剂和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004509608A</a>	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002500769	申请日	2001-05-25
申请(专利权)人(译)	伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
[标]发明人	ロニンソンイゴールビー ドクマノヴィッチマイルズ チャンバイディー		
发明人	ロニンソン、イゴールビー、 ドクマノヴィッチ、マイルズ チャン、バイディー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 C12Q1/6897 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/6897 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR02 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BB19 4B065/BB34 4B065/CA28 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB262		
代理人(译)	三好秀 三好康夫		
优先权	60/207535 2000-05-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明鉴定了由类视黄醇诱导的生长抑制基因。本发明提供了用于鉴定诱导这些细胞基因表达的类视黄醇以外的化合物的试剂和方法。本发明还提供了重组哺乳动物细胞的试剂，所述重组表达构建体在受类视黄醇调节的基因的启动子的转录控制下表达报告基因，以及使用这些细胞鉴定调节表达的类视黄醇以外的化合物的方法。这些细胞基因。

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')
IGFBP-3	TTGCACAAAAGACTGCCAAG (配列番号 14)	CATGAAGTCTGGGTCTGTG (配列番号 15)
Mac-2BP	AATTCACACTGTGCCCTTC (配列番号 16)	GTGGAGTCTGGAAGGACTGG (配列番号 17)
βIG-H3	TGCGACTAGCCCTGTCTAT (配列番号 18)	CATGCACAAGGCTCACATCT (配列番号 19)
PC1	GCACCCAAGAGCAAGACTTC (配列番号 20)	CGAGCTGCCTCTTTTGAAC (配列番号 21)
FAT 10	AATGCTTCTGCTCTGTGT (配列番号 22)	ATCACITGGGCTTCACACTT (配列番号 23)
EPLIN β	AGAAAGGGGACCCCTGACTGT (配列番号 24)	AAGATCCTCACCGTCCTTGA (配列番号 25)
T細胞受容体 γ	AGGAGCTGTGAAAACATGG (配列番号 26)	CATAACAGACGGTGGCACAA (配列番号 27)
P28 α	ACAGTGGATGTGTTTCGTG (配列番号 28)	TTCATCCTCCCCCTTCTTCT (配列番号 29)
レチノ酸誘導 -ゼ	GTGGTGGACATCATGACAGC (配列番号 30)	AGCGGCTCCAAGTCTTGATA (配列番号 31)
Bene	CCAGGCAACAAAAGGAGAGA (配列番号 32)	TGCCTTCTGTATTGGGAAT (配列番号 33)
HIF-2α/EPAS-1	CCAGTGCATCATGTGTGTC (配列番号 34)	CCCGAAATCCAGAGAGATGA (配列番号 35)
L-セレクチン	GTGGCACCTCCTACGTCAA (配列番号 36)	TGAATCCTTTCCCTTTATGGTC (配列番号 37)
RNF	GAGGTGCACTCCAAAAGGAA (配列番号 38)	TGTGTTGGCGTACAGGCTTTG (配列番号 39)
β-アクチン	TGTGTTGGCGTACAGGCTTTG (配列番号 40)	TGTGTTGGCGTACAGGCTTTG (配列番号 41)