



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 014 T2** 2007.06.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 864 648 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 014.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/03303**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 941 189.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/012313**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/09** (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07C 50/06 (2006.01)

C07C 50/30 (2006.01)

C07C 66/00 (2006.01)

C07D 295/16 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

25069796 20.09.1996 JP

(73) Patentinhaber:

Daiichi Asubio Pharma Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**NUNOKAWA, Youichi, Osaka 560, JP; OIKAWA,
Shinzo, Nishikyo-ku Kyoto-shi Kyoto 615, JP;
TANAKA, Shoji, Hyogo 659, JP**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM SCREENEN VON VERBINDUNGEN, WELCHE DIE EXPRESSION DER
MENSCHLICHEN INDUZIERBAREN STICKSTOFFOXIDSYNTASE REGULIEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung, welche das Expressionsniveau der menschlichen induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase beeinflussen kann, genauer gesagt ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung, welche die Expression des Enzyms kontrollieren kann.

[0002] Seitdem Stickstoffoxid (NO) als gefäßerweiternder Faktor identifiziert wurde, hat man herausgefunden, dass es eine physiologisch aktive Substanz ist, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung der biologischen Funktionen spielt. Es wurde berichtet, dass NO zusätzlich zu den vorstehenden Funktionen eine thrombozytenaggregationssupprimierende Wirkung, eine neurotransmitterfreisetzende Wirkung und eine Wirkung besitzt, die dazu führt, dass Makrophagen antitumorale und bakterizide Aktivitäten zeigen (Moncada, S. und Higgs, A. (1993) N. Engl. J. Med. 329, 2002–2012).

[0003] NO wird biologisch durch NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin als Substrat synthetisiert. Derzeit ist die Existenz dreier Isoenzyme von diesem Enzym bestätigt (der Gehirn-Typ, der Endothel-Typ und der induzierbare Typ). Ihre chromosomale Lokalisierung ist ebenfalls bekannt (Knowles, R. G. und Moncada, S. (1994) Biochem. J. 298, 249–258).

[0004] Von diesen Typen kann der induzierbare Typ NOS (iNOS) exprimiert werden, indem Endotoxine oder Cytotoxine für solche Zellen wie vaskuläre Zellen der glatten Muskulatur (VSMC), Hepatocyten, Chondrocyten oder Gliazellen verwendet werden, so dass die Gentranskription induziert wird. Kürzlich wurden Mäuse, denen dieses Gen fehlt, (Knockout-Mäuse) gezüchtet. Es wurde berichtet, dass die Mäuse eine schwächere Abwehrfähigkeit gegen Infektionen besitzen, aber im Vergleich zum Wildtyp leichtere Symptome von Entzündung und Sepsis zeigen (Wei, X. et al., (1995) Nature 375, 408–411; MacMicking, J. D. et al., (1995) Cell 81, 641–650). Es gibt einen Bericht, der zeigt, dass iNOS in jeder Spezies durch inflammatorische Zustände induziert wird und dass die Suppression seiner enzymatischen Aktivitäten und die Expression zur Erleichterung der Entzündungssymptome wirksam sind (Moncada, S. und Higgs, E. A. (1995) FASEB J. 9, 1319–1330). Ferner fand man in einem Sepsis-Modell heraus, dass die Verabreichung von iNOS-Enzym-Inhibitoren wirksam ist (Kerwin, J. F. et al., (1995) J. Med. Chem. 38, 4343–4362).

[0005] Es wurde andererseits berichtet, dass der Endotheltyp-NOS (eNOS) an der Homöostase, insbesondere an der Suppression des Anstiegs des Blutdrucks, beteiligt ist, und man zieht in Betracht, dass er eine wichtige Rolle bei biologischen Funktionen spielt. Folglich war es wünschenswert, eine Verbindung zu finden, die die eNOS-Aktivität nicht beeinflusst, sondern die iNOS-Aktivität spezifisch hemmt. Da jedoch die primären Strukturdomänen der Proteine, die die Aktivitäten dieser Isoenzyme hemmen, einander sehr stark ähneln, ist keiner der vorliegenden NOS-Enzym-Inhibitoren im Hinblick auf seine Spezifitäten zufriedenstellend.

[0006] In anderer Hinsicht wurde bestätigt, dass Substanzen, die NO erzeugen, die vaskuläre Hypertrophie supprimieren können, so dass Arteriosklerose und postangioplastische vaskuläre Restenose in Tiermodellen verhindert wird (Garg, U. C. und Hassid, A. J. (1989) J. Clin. Invest. 83, 1774–1777, Cooke, J. P. et al., (1992) J. Clin. Invest. 90, 1168–1172). Es wurde auch berichtet, dass die erzwungene Expression des NOS-Gens in VSMC zu einem Anstieg der NO-Produktion führt, die mit der Suppression der Hypertrophie der inneren Membran von VSMC einhergeht (von der Leyen, H. E. et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1137–1141). Daher erwartet man, dass die Erzeugung von NO an der Stelle der vaskulären Hypertrophie bei der Behandlung oder Vermeidung der vaskulären Hypertrophie wirksam sein kann.

[0007] Die vorstehend beschriebenen Tatsachen legen nahe, dass, falls man iNOS-Isozym-spezifische genexpressionsregulierende Verbindungen findet, die Inhibitoren als antiinflammatorische Agentien nützlich sind, während die Induktoren als Agentien nützlich sind, die zu therapeutischen Verbesserungen insbesondere auf dem kardiovaskulären Gebiet führen.

[0008] Reportergene werden zur Überwachung der Expression eines bestimmten Gens einfach und leicht mit hoher Sensitivität eingesetzt (Yokota, T., und Arai, K. (1993) Biomanual Series 4, Youdosha). Anstatt die Testgenexpression direkt nachzuweisen, werden Reportergene verwendet, und derartige Gene, die derzeit häufig verwendet werden, schließen diejenigen ein, deren Expressionsprodukte wie Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), β -Galactosidase (β -Gal) und Luciferase leicht getestet werden können. Die Aktivität der Test-DNA, deren regulatorische Aktivität gemessen werden soll, kann mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden, indem sie entweder stromaufwärts oder stromabwärts des Reportergens in ein Plasmid eingebaut wird.

[0009] Die Reportergene werden verwendet, um die Regulation der Maus-iNOS (miNOS)-Genexpression zu

untersuchen, und über die Ergebnisse wurde berichtet. Beispielsweise fand man innerhalb der stromaufwärts liegenden Region der miNOS-Transkriptionsstartstelle (hier nachstehend als „flankierende 5'-Region“ bezeichnet) eine Region etwa 1,7 kb stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle, die an der Induktion des miNOS-Gens als Reaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) oder IFN- γ beteiligt ist. Ferner wurde gezeigt, dass Consensussequenzregionen, von denen man annimmt, dass die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-1 daran binden, bei der Induktion der Genexpression wesentlich sind (Xie, Q. et al., (1993) J. Exp. Med. 177, 1779–1784, Vodovotz, Y. et al., (1993) J. Exp. Med. 178, 605–613, Martin, E. et al., (1994) J. Exp. Med. 180, 977–984, Xie, Q. et al., (1994) J. Biol. Chem. 269, 4705–4708). Nach einem weiteren Bericht fand man die Region innerhalb der flankierenden 5'-Region mit etwa 1,6 kb (Lowenstein, C. J. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 9730–9734, Kamijo, R. et al., (1994) Science 263, 1612–1615). In beiden Fällen betrug die Induktionsfähigkeit jedoch weniger als das 50-Fache, was nicht stark genug sein kann, um die eigentliche hohe Induktionsfähigkeit des iNOS-Gens widerzuspiegeln.

[0010] Dagegen war es schwierig, die Existenz der cDNA des menschlichen iNOS (hiNOS)-Gens zu beweisen. Einer der Gründe dafür liegt darin, dass die Zellen, in denen die Induktion durch ein einzelnes Cytokin oder eine Kombination von zwei Cytokinen erfolgte, im Gegensatz zu Maus-Makrophagen oder Ratten-VSMC nicht nachgewiesen wurden. Es gibt einen Bericht, dass hiNOS in menschlichen Makrophagen sogar durch eine Kombination von drei oder mehr unterschiedlichen Arten von Cytokinen nicht induziert werden kann (Weinberg, J. B. et al., (1995) Blood 86, 1184–1195). Nach dem Bericht über die erste erfolgreiche Clonierung von hiNOS-cDNA durch Stimulieren menschlicher Hepatocyten mit drei oder mehr unterschiedlichen Arten von Cytokinen, um das Gen zu induzieren (Geller, D. A. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3491–3495), tauchten jedoch viele Berichte über die Clonierung von hiNOS-cDNA auf, aber der regulatorische Mechanismus der Induktion wurde nicht aufgeklärt (Sherman, P. A. et al., (1993) Biochemistry 32, 11600–11605, Charles, I. G. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11419–11423, Hokari, A. et al., (1994), J. Biochem. 116, 575–581). Gleichzeitig wurden die vollständige Struktur des hiNOS-Strukturgens ([Fig. 1](#)) und dessen Nucleotidsequenz der flankierenden 5'-Region mit etwa 0,4 kb aufgeklärt (Chartrain, N. A. et al., (1994) J. Biol. Chem., 269, 6765–6772).

[0011] Andererseits gelang es den hier genannten Erfindern, das iNOS-Gen aus der vaskulären glatten Muskulatur von Ratten zu clonieren, und sie berichteten, dass dessen cDNA vermutlich überall in verschiedenen Geweben und Spezies einheitlich ist (Nunokawa, Y. et al., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, 89–94). Ferner clonierten die hier genannten Erfinder einen Bereich mit mehr als 3,2 kb DNA, von dem erwartet wird, dass er die iNOS-Genpromotor-Region enthält, bestimmten die Nucleotidsequenz der flankierenden 5'-Region von etwa 1,5 kb und berichteten, dass die Sequenz wie auch die miNOS-Gensequenz eine Consensussequenz enthält, von der man glaubt, dass sie von Interferon (IFN)- γ und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert wird (Nunokawa, Y., et al., (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 802–807).

[0012] Danach wurden 16 kb der flankierenden 5'-Region des hiNOS-Gens unter Verwendung eines Reportergens untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass eine Region existiert, die für die Induktion des hiNOS-Gens zwischen 3,8 kb und 16 kb stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle notwendig ist (de Vera, M. E. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1054–1059). Jedoch betrug die Induktionsfähigkeit immer noch ungefähr das 10-Fache, und die Expression ohne Stimulierung war ziemlich stark. Daher liefert dieser Bericht eine ungenügende Erklärung für die tatsächliche und starke Induktion des iNOS-Gens. Außerdem wurde gezeigt, dass die Region bis zu 3,7 kb stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle des hiNOS-Gens an der Induktion der Genexpression nicht beteiligt ist (Laubach, V. E. et al., (1994) Abstract Book of the 1st International Conference of Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide, (UCLA Sunset Village, Los Angeles, KA, USA), A16, Kleinert, H. et al., (1996) Mol. Pharmacol. 49, 15–21).

[0013] Die hier genannten Erfinder erzeugten Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das etwa 3,2 kb der flankierenden 5'-Region des hiNOS-Gens enthält, das früher cloniert worden war und das an ein Reportergen gebunden ist. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu denjenigen, über die unter Verwendung der miNOS-Promoterregion berichtet wurden, aber ähnlich zu denjenigen, über die von anderen Gruppen, die das hiNOS-Gen verwenden, berichtet wurden, dass das Reportergen sogar unter nicht-induzierenden Bedingungen exprimiert wurde, wenn die flankierende 5'-Region von etwa 3,2 kb verwendet wird, und dass die Induzierbarkeit durch Cytokine entweder fehlt oder sehr schwach ist (Nunokawa, Y. et al., (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347–352). Außerdem wurde die Reportergenexpression sogar in mit dem vorstehenden Plasmid transfizierten Zellen nachgewiesen, die keine hiNOS-Induktion durch verschiedene Cytokine zeigen (Nunokawa, Y. et al., (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347–352). D.h., man fand heraus, dass die Kontrolle der hiNOS-Gen-Expression durch Induktoren wie Cytokine nicht ausschließlich basierend auf der Promotorregion erklärt werden kann, die von den berichteten Ergebnissen über das miNOS-Gen abgeleitet

werden kann. Jedoch wurde der Grund dafür bisher überhaupt nicht aufgeklärt.

[0014] JP 62 286 949 offenbart ein Phenylmethylbenzochinonderivat der in der nachstehenden Beschreibung offenbarten Formel als Beispiel einer Verbindung, die die Aktivität einer Verbindung supprimieren kann, welche die hiNOS-Genexpression induziert. Dieser Verbindung aus JP 62 286 949 wurde eine schützende Wirkung für das Gehirn bei cerebraler Anoxie zugeschrieben.

[0015] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung bereitzustellen, welche die Expression des hiNOS-Gens supprimieren oder induzieren kann, indem der/die Bereiche) des hiNOS-Gens identifiziert wird/werden, der/die für die Kontrolle der Expression durch induzierende Faktoren notwendig ist/sind, der Expressionsvektor, der den/die Bereiche) enthält, konstruiert wird und der Vektor für das Screenen genutzt wird.

[0016] Daher betrifft die vorliegende Erfindung in einem Aspekt eine DNA, die die flankierende 3'-Region des menschlichen induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (hiNOS)-Gens umfasst, wobei die flankierende 3'-Region hilft, die hiNOS-Genexpression zu regulieren, und die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 16 beinhaltet, und in einem zweiten Aspekt einen Expressionsvektor, der die DNA und die 3'-UTR des hiNOS-Gens umfasst, wobei die DNA und die 3'-UTR des hiNOS-Gens gemeinsam wirken, um die hiNOS-Genexpression zu regulieren.

[0017] Wenn, wie vorstehend beschrieben, die stromaufwärts liegende Region von der Transkriptionsstartstelle des hiNOS-Gens, d.h. die flankierende 5'-Region, stromaufwärts von einem Reportergen eingebaut wird, wird die Reportergenexpression unerwartet und unter nicht induzierenden Bedingungen beobachtet. Basierend auf diesem Befund nahmen wir an, dass die Möglichkeit bestand, dass Regionen, die nicht die flankierende 5'-Region sind, die hiNOS-Genexpression kontrollieren könnten, und führten Experimente durch.

[0018] Als Ergebnis der Untersuchung der Sequenz der nicht-translatierten 3'-Region (UTR) des hiNOS-Gens (SEQ ID NO:1) fanden die hier genannten Erfinder die „AUUUA-Sequenz“, von der berichtet wurde, dass sie eine Rolle bei der Destabilisierung der mRNA spielt, an vier verschiedenen Stellen innerhalb der 3'-UTR des hiNOS-Gens ([Fig. 2](#), unterstrichene Positionen). Daher zogen die hier genannten Erfinder in Betracht, dass ein bestimmtes Element, das die Transkriptionsprodukte des Gens destabilisiert, die Induktion der hiNOS-Genexpression kontrollieren könnte.

[0019] Viele Reportergene, die heute häufig verwendet werden, werden durch Einbau einer von SV40 stammenden Region mit einer Poly A-Addition konstruiert, um die reife mRNA zu exprimieren. Die bisher verwendeten Plasmide, um die hiNOS-Genexpression und das „pGL3-Grundplasmid“ zu bestätigen, das die hier genannten Erfinder in den früheren Berichten verwendeten, werden durch Einbau der von SV40 stammenden Region mit einer Poly A-Addition (SEQ ID NO:2) stromabwärts vom Reportergen konstruiert ([Fig. 3](#)). Falls die Induktion des Testgens nicht vollständig von der Aktivierung der Transkription abhängt, sondern auch von der Instabilität der produzierten mRNA verursacht wird, ist es daher notwendig, die Region, die an der Instabilität der produzierten mRNA beteiligt ist, in den Expressionsvektor einzubauen, der das Reportergen enthält.

[0020] Da in Betracht gezogen wurde, dass die hohe Induzierbarkeit, die inhärent beobachtet werden musste, nicht umgesetzt werden konnte, indem das Reportersystem eingeführt wurde, das nur die flankierende 5'-Region einschließlich des Promotors enthält, bauten die hier genannten Erfinder zusätzlich ein Genfragment mit etwa 1 kb, das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens enthält, stromabwärts des Reportergens ein. Folglich fand man heraus, dass diese Bereiche gemeinsam mit der Promotoregion wirken, so dass eine starke Induktion erzeugt wird. D.h., durch Einbauen dieser Regionen fand man heraus, dass die Reportergenexpression unter nicht induzierenden Bedingungen eliminiert wird und nur aktiviert wird, wenn man Cytokine wirken lässt. Diese Ergebnisse zeigten die Existenz der für die Induktion des hiNOS-Gens durch Cytokine notwendigen Regionen, die unbekannt gewesen waren.

[0021] Ferner konstruierten die hier genannten Erfinder ein Plasmid, das die genomische Struktur des hiNOS-Gens nachahmt, mit der Ausnahme, dass der offene Leserahmen (ORF) des hiNOS-Gens durch den ORF des Reportergens ersetzt wurde. Genauer gesagt, wurde die hiNOS-Gen-Promotoregion stromaufwärts eingebaut, und das Genfragment mit etwa 1 kb, das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens enthält, wurde stromabwärts des Reportergens eingebaut. Durch Verwendung der menschlichen, mit dem Plasmid transformierten Zelllinie entwickelten die hier genannten Erfinder ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen, welche die hiNOS-Genexpression schnell mit hoher Sensitivität kontrollieren, so dass die vorliegende Erfindung vollendet wird.

[0022] Genauer gesagt, schließt die vorliegende Erfindung jede Erfindung ein, die in den Ansprüchen dieser Beschreibung beschrieben wird.

[0023] Die DNAs, welche die flankierende 5'-Region, die 5'-UTR, die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens ausmachen und in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, schließen nicht nur diejenigen ein, die aus menschlichen Zellen isoliert werden, sondern auch diejenigen, die synthetisch hergestellt werden. Außerdem können diese DNAs mit chemischen Modifizierungen oder mit durch Substitution, Deletion oder Addition veränderten Basen ebenfalls verwendet werden, solange ihre Fähigkeit zur Kontrolle der Expression beibehalten wird. Die in der vorliegenden Erfindung verwendete DNA, die die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens ausmacht, umfasst diejenige, welche die Sequenz besitzt, die in SEQ ID NO: 16 beschrieben wird (die Sequenz außerhalb der Umrandung in [Fig. 7](#)).

[0024] Ein Gen, das irgendein Peptid oder Protein codiert, kann als Reportergen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, solange ein Fachmann die Aktivität oder die produzierte Menge seines Expressionsprodukts (einschließlich der Menge der produzierten mRNA) messen kann. Beispielsweise können Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), β -Galactosidase (β -Gal) und Luciferase verwendet werden, indem ihre enzymatischen Aktivitäten gemessen werden. Auch kann das sekretierte Wachstumshormon oder dergleichen verwendet werden, indem seine produzierte Menge durch solche Mittel wie die immunologische Antikörperreaktion gemessen wird.

[0025] Der Vektor in der vorliegenden Erfindung, der die hiNOS-Genexpressionskontrollsequenz enthält, kann erhalten werden, indem die Expressionskontrollsequenz in einen replizierbaren Vektor eingebaut wird. Beispiele des replizierbaren Vektors schließen pUC18 und pGEM-3Z ein, von denen bekannt ist, dass sie in *E. coli* replizierbar sind.

[0026] Beim Screenen von Substanzen, welche die hiNOS-Genexpression nach der vorliegenden Erfindung beeinflussen können, kann man die Zellen, die mit dem Vektor transformiert sind, der die hiNOS-Genexpressions-Kontrollsequenzen der vorliegenden Erfindung enthält, oder die natürlich vorkommenden Zellen verwenden, die die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Expressionskontrollsequenzen besitzen und die hiNOS-Genexpression kontrollieren können. Säuger-Zellen werden vorzugsweise als derartige Zellen verwendet. Die Transformation kann nach dem herkömmlichen Verfahren erfolgen. Die transformierten Zellen der vorliegenden Erfindung können entweder diejenigen sein, die den Vektor permanent in die Wirtschromosomen integriert haben, oder diejenigen, bei denen der Vektor transient in den Wirt eingebaut ist. Die Zellen mit dem permanent in die Wirtschromosomen integrierten Vektor können selektiert werden, indem die Wirtszellen mit dem einzuführenden Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält, oder mit dem einzuführenden Vektor zusammen mit einem anderen Vektor transfiziert werden, der einen Selektionsmarker enthält, und die Zellen in einem Medium gezüchtet werden, das zulässt, dass nur jene Zellen überleben, in die der Selektionsmarker eingebaut wird.

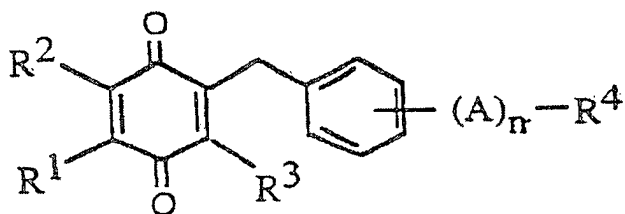
[0027] Die Substanzen, welche die hiNOS-Genexpression nach der vorliegenden Erfindung beeinflussen können, können beispielsweise durchmustert werden, indem den transformierten, für einen spezifizierten Zeitraum gezüchteten Zellen eine beliebige Menge der Testsubstanz zugegeben wird und die Menge des Reportergenexpressionsprodukts nach einem spezifizierten Zeitraum als Enzymaktivität oder der Menge des exprimierten Proteins gemessen wird. Die Testsubstanz kann natürlich oder synthetisch sein. Sie kann auch eine einzelne Substanz oder ein Gemisch von Substanzen sein. Es ist beispielsweise möglich, eine einzelne Kandidatensubstanz unabhängig oder ein Gemisch mehrerer Kandidatensubstanzen zu testen. Außerdem ist es auch möglich, kombinatorische Genbanken zu testen. Ferner können auch Fraktionen eines Gemisches wie eines Zellextrakts getestet werden und wiederholt fraktioniert werden, um letztendlich die Substanz zu isolieren, die für die Beeinflussung der hiNOS-Genexpression verantwortlich ist.

[0028] Andererseits können nach der vorliegenden Erfindung Substanzen durchmustert werden, welche die Aktivität einer bestimmten Substanz ändern können, welche die hiNOS-Genexpression beeinflusst, indem beispielsweise den transformierten, für einen spezifizierten Zeitraum gezüchteten Zellen eine beliebige Menge der Kandidatensubstanz zugegeben wird und die Änderungen der Menge des Reportergenexpressionsprodukt nach einem spezifizierten Zeitraum als die Änderungen der Enzymaktivität oder der exprimierten Proteinmenge gemessen werden. Die zu durchmusternden Kandidatensubstanzen werden definiert, wie vorstehend für die Substanzen, welche die hiNOS-Genexpression beeinflussen, beschrieben.

[0029] Die Wirksamkeit einer Substanz, die durch das Screening-Verfahren oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich ist und die hiNOS-Expression supprimieren kann, oder einer Verbindung, die

durch das Screening-Verfahren oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich ist und die Aktivität der Verbindung unterdrücken kann, welche die hiNOS-Genexpression induziert, kann gemessen werden, indem die Verringerung der NO-Exkretion in das Kulturmedium, in Blut oder Urin bei der Zugabe oder Verabreichung der Substanz unter den Bedingungen bestimmt wird, die den Zellen, die Säuger-iNOS exprimieren können, oder ihren lebenden Geweben erlauben, NO zu produzieren. Die Menge des produzierten NO kann durch die im Allgemeinen bekannten Verfahren gemessen werden, die durch das Griess-Verfahren (Green, L. C. et al., (1982) Anal. Biochem. 126, 131–138), das in Beispiel 5-5 beschrieben wird, repräsentiert werden.

[0030] Die Verbindungen, die durch das Screening-Verfahren oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich sind, wie vorstehend beschrieben, sind diejenigen, die die Menge des exprimierten hiNOS-Gens beeinflussen können, beispielsweise diejenigen, welche die hiNOS-Genexpression supprimieren können, oder diejenigen, die die Aktivität einer bestimmten Verbindung verändern können, welche die Menge des exprimierten hiNOS-Gens beeinflusst, beispielsweise diejenigen, welche die Aktivität einer Verbindung supprimieren, welche die hiNOS-Genexpression induziert. Ein spezifisches Beispiel der Verbindung, welche die Aktivität einer Verbindung supprimieren kann, die die hiNOS-Genexpression induziert, ist die Verbindung, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist,



wobei, R¹, R² und R³ jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Methylgruppe oder eine Methoxygruppe sind; A eine Ethylengruppe oder eine Vinylengruppe ist; n 0 oder 1 ist und R⁴ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxymethylgruppe oder eine Carboxylgruppe ist, die verestert oder amidiert sein kann. Genauer gesagt schließen derartige Verbindungen die Verbindung ein, die in Beispiel 7 der vorliegenden Beschreibung erhalten wurde und durch die chemische Formel repräsentiert ist, wie in [Fig. 17](#) dargestellt, (3-[4-(3,4-Dimethoxy-6-methyl-2,5-benzochinonylmethyl)phenyl]-1-thiomorpholino-1-oxopropan), Ethyl-3-[3-(2,5-benzochinonylmethyl)phenyl]acrylat, 3-(2,5-Benzochinonylmethyl)benzylalkohol, 3-(2,5-Benzochinonylmethyl)-benzoesäure, 3-[3-(2,5-Benzochinonylmethyl)phenyl]propionsäure, 3-[3-(2,5-Benzochinonylmethyl)phenyl]propylalkohol, 3-[3-(2,5-Benzochinonylmethyl)phenyl]-acrylsäure, 3-[4-(3,4-Dimethoxy-6-methyl-2,5-benzochinonylmethyl)phenyl]-propionsäure, 2,3-Dimethoxy-5-benzyl-6-methyl-1,4-benzochinon, 3-[4-(3,4-Dimethoxy-6-methyl-2,5-benzochinonylmethyl)phenyl]propanol und Ethyl-3-[3-(3,4-dimethoxy-6-methyl-2,5-benzochinonylmethyl)phenyl]-propionat, wobei weder diese Verbindung noch das Arzneimittel, das die Verbindung umfasst, noch die Verwendung der Verbindung durch die vorliegende Erfindung umfasst sind. Der Einschluss in die vorliegende Beschreibung dient illustrativen Zwecken.

[0031] Da die Verbindungen, die durch das Screening-Verfahren oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich sind, weder direkt noch indirekt die hiNOS-Genexpression supprimieren können, sind sie als Arzneimittel zur Behandlung pathologischer Zustände oder Erkrankungen nützlich, die mit der Abnormalität der hiNOS-Expression assoziiert sind, vorzugsweise die pathologischen Zustände oder Erkrankungen, die mit einer übermäßigen Expression des hiNOS-Gens einhergehen. Beispielsweise sind die Verbindungen als Arzneistoffe zur Behandlung von Herz- und cerebrovaskulären Erkrankungen, ischämischen Herzerkrankungen, septischem Schock, akuten Schmerzen, Rheuma, Arthritis, Asthma, Immunschwäche, viraler oder nicht-viraler Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Demenz und Krebs nützlich (Cattell, V. und Jensen, A., Histochem. J. Bd. 27, S. 777–784, 1995; Ogden, J. E. und Moore, P. K., TIBTECH Bd. 13, S. 70–78, 1995).

[0032] Wenn die Verbindungen, die durch das Screening-Verfahren oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich sind, als Arzneimittel verwendet werden, können sie entweder oral in der Darreichungsform wie Tabletten, Kapseln, Elixiren, Mikrokapseln oder parenteral als Injektionen in Form von Lösungen in Wasser oder in anderen pharmazeutisch verträglichen Flüssigkeiten oder Suspensionen verabreicht werden. Beispielsweise können die Verbindungen in die vorstehenden Darreichungsformen formuliert werden, indem sie mit physiologisch verträglichen Trägern, Geschmacksstoffen, Excipienten, Stabilisatoren etc. in einer allgemein zulässigen Form gemischt werden. Zusatzstoffe, die in Tabletten gemischt werden können, schließen Bindemittel wie Gelatine, Quellmittel wie Maisstärke, Excipienten wie kristalline Cellulose und Schmiermittel wie Magnesiumstearat ein. Im Falle von Kapseln können zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Bestandteilen flüssige Träger enthalten sein. Sterile Zusammensetzungen zur Injektion können ebenfalls in der herkömmlichen Weise formuliert werden.

[0033] Als Beispiel einer wässrigen Lösung zur Injektion wird eine isotonische, Glucose enthaltende Lösung aufgeführt, die auch mit geeigneten Lösungsvermittlern wie Polyethylenglykol kombiniert werden kann. Sie kann ferner Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsstoffe, Antioxidantien und Linderungsmittel enthalten. Die so hergestellten Arzneimittel können beispielsweise an Menschen und andere Säuger verabreicht werden. Auch wenn die Dosis abhängig von den Symptomen und dergleichen variieren kann, wird einem Erwachsenen im Allgemeinen die Zubereitung mit etwa 0,01 mg bis etwa 100 mg, vorzugsweise etwa 0,1 mg bis etwa 50 mg, besonders bevorzugt etwa 1,0 mg bis etwa 25 mg täglich im Falle der oralen Verabreichung verabreicht. Im Falle der parenteralen Verabreichung, beispielsweise in Form einer Injektion, werden einem Erwachsenen im Allgemeinen intravenös etwa 0,001 mg bis etwa 50 mg, vorzugsweise etwa 0,01 mg bis etwa 25 mg, stärker bevorzugt etwa 0,1 mg bis etwa 10 mg täglich verabreicht.

[0034] [Fig. 1](#) zeigt die vollständige Struktur des hiNOS-Strukturgens.

[0035] [Fig. 2](#) zeigt die Nucleotidsequenz der nicht-translatierten 3'-Region (UTR) innerhalb von Exon 26 des hiNOS-Gens. Die Zahlen an der linken Seite stellen die Nucleotidnummern, wobei die erste Base der Translationstartstelle als 1 betrachtet wird, dar. Die ATTTA-Sequenz ist unterstrichen, während die erwartete Poly A-Additionsstelle mit „↑“ angegeben ist. Die fettgedruckten Buchstaben geben das Stopp-Codon im hiNOS-Gen an. Die Nucleotidsequenzen, die die Basis für die Primer darstellten, wurden mit ihren Bezeichnungen und Pfeilen gekennzeichnet.

[0036] [Fig. 3](#) zeigt die Struktur des pGL3-Grundplasmids und die Nucleotidsequenz der von SV40 stammenden Poly A-Additionsregion. Das „Poly A-Signal“ und das mit der Poly A-Addition assoziierte „G/T-Cluster“ sind unterstrichen.

[0037] [Fig. 4](#) zeigt die Nucleotidsequenzen der zur Konstruktion der Plasmide verwendeten Primer.

[0038] [Fig. 5](#) ist das Foto eines Southern-Blots der Fragmente aus der Restriktionsenzymspaltung (gespalten mit EcoRI, HindIII und XhoI) des gereinigten Phagengenoms, das die flankierende 5'-Region des hiNOS-Gens enthält.

[0039] [Fig. 6](#) zeigt die Nucleotidsequenzsubstitution, um eine NcoI-Schnittstelle in der DNA der flankierenden 5'-Region des hiNOS-Gens zu erzeugen. Die fettgedruckte Base „T“ wurde durch „CA“ substituiert, um das mutierte Plasmid zu konstruieren.

[0040] [Fig. 7](#) zeigt die Nucleotidsequenzen der nicht-translatierten 3'-Region (UTR) und der flankierenden 3'-Region des hiNOS-Gens. Die Zahlen an der linken Seite stellen die Nucleotidnummern, wobei die erste Base der Translationstartstelle als 1 betrachtet wird, dar. Der eingekreiste Anteil ist die 3'-UTR von Exon 26. Die Consensussequenz für die Poly A-Addition (YGTGTTY) innerhalb der flankierenden 3'-Region ist unterstrichen. Die fettgedruckten Buchstaben geben das Stopp-Codon im hiNOS-Gen an. Die Nucleotidsequenzen, die die Basis für die Primer darstellten, wurden mit ihren Bezeichnungen und Pfeilen gekennzeichnet.

[0041] [Fig. 8](#) zeigt die Strukturen der Expressionsvektoren, die die nicht-strukturellen Regionen des hiNOS-Gens enthalten.

[0042] [Fig. 9](#) zeigt die Reaktion der A549-Zellen, die transient mit den Expressionsvektoren transfiziert wurden, auf die Cytokinstimulation.

[0043] [Fig. 10](#) ist das Foto eines Gel-Shift-Tests unter Verwendung der Kernextrakte aus den mit Cytokinen stimulierten A549-Zellen.

[0044] [Fig. 11](#) zeigt die Reaktion der A549-Zellen, die stabil mit dem Expressionsvektor (hiNOSLuc) transfiziert wurden, auf die Cytokinstimulation.

[0045] [Fig. 12](#) zeigt die Reaktion der A549-Zellen auf die Cytokinstimulation, die mit dem Griess-Verfahren gemessen wurde.

[0046] [Fig. 13](#) zeigt die Wirkungen von LPS, IL-6, cAMP und TPA auf die Reaktion der A549-Zellen, die stabil mit dem Expressionsvektor (hiNOSLuc) transfiziert wurden, auf die Cytokinstimulation.

[0047] [Fig. 14](#) zeigt die Wirkungen des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin auf die induzierte Genexpressi-

on durch Cytokine.

[0048] [Fig. 15](#) zeigt die Wirkungen von Dexamethason auf die induzierte Genexpression durch Cytokine.

[0049] [Fig. 16](#) zeigt die Wirkungen des Proteinkinase-Inhibitors TLCK auf die induzierte Genexpression durch Cytokine.

[0050] [Fig. 17](#) zeigt die Strukturformel von Verbindung I, die unter Verwendung des Screening-Systems der vorliegenden Erfindung entdeckt wurde.

[0051] [Fig. 18](#) zeigt die Wirkungen von Verbindung I auf das Screening-System der vorliegenden Erfindung.

[0052] [Fig. 19](#) ist das Foto, das zeigt, dass Verbindung I die hiNOS-Expression auf der mRNA-Ebene supprimiert.

[0053] Das folgende Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung detaillierter, soll jedoch nicht den Umfang der vorliegenden Erfindung einschränken.

[Beispiel 1] Konstruktion der Expressionsvektoren

1) Clonieren der flankierenden 5'-Region von hiNOS

[0054] Eine Sonde, die für das Durchmustern von Clonen verwendet werden soll, die die flankierende 5'-Region von hiNOS enthalten, wurde durch Plaquehybridisierung aus einer menschlichen Genbank hergestellt, die aus $2,5 \times 10^6$ Phagen bestand (Clontech, USA; eine Phagen-Bank, die in den EMBL3-Vektor eingebaut ist).

[0055] Die verwendete Sonde war die durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizierte cDNA, wobei als Matrize verwendet wurde: die von Ratten stammende iNOS-cDNA (VSM-NOS), die früher von den hier genannten Erfindern isoliert worden war (Nunokawa, Y. et al., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 89–94), sowie der SU802-Primer (der den Basen -138 bis -117 der Ratten-VSM-NOS-cDNA/SEQ ID NO:3 entspricht, [Fig. 4](#)) und der MI103-Primer (der den Basen 168 bis 188 der Ratten-VSM-NOS-cDNA/SEQ ID NO: 4 entspricht, [Fig. 4](#)) verwendet wurden. Die PCR erfolgte unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase (Takara Shuzo) und eines beiliegenden Puffers. Diese cDNA besitzt offensichtlich eine hohe Homologie zu der Nucleotidsequenz des 5'-Endes des hiNOS-Strukturgens. Die Plaquehybridisierung erfolgte unter Verwendung des direkten ECL-DNA-Markierungs-Nachweissystems (Amersham, U.K.) nach der beiliegenden Versuchsvorschrift.

[0056] Positive Plaques wurden unter Verwendung des Qiagen-Lambda-Kits (Qiagen, Deutschland) gereinigt und mit EcoRI gespalten. Die Southern-Blot-Analyse zeigte, dass das DNA-Fragment mit etwa 5 kb mit der vorstehenden Sonde hybridisierte ([Fig. 5](#)).

[0057] Das mit EcoRI gespaltene Fragment mit etwa 5 kb wurde in die EcoRI-Schnittstelle in das pUC118-Plasmid (Takara Shuzo) cloniert, und ein mutiertes Plasmid, in dem eine Base substituiert war, wie in [Fig. 6](#) gezeigt (SEQ ID NO:13), wurde hergestellt, um eine NcoI-Schnittstelle zu erzeugen. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung des ortsgerichteten Mutagenese-Kits von Clontech nach der beiliegenden Versuchsvorschrift durchgeführt. Das so hergestellte, mutierte Plasmid wurde mit KpnI und NcoI gespalten und das sich ergebende DNA-Fragment wurde im Versuch 3) nachstehend verwendet.

2) Clonieren der hiNOS-3'-UTR und eines Genfragments mit etwa 1 kb stromabwärts davon, das die Region enthält

[0058] Die in 1) verwendete menschliche Genombank wurde in 60 Unterpoole aufgeteilt (etwa 40.000 Clone pro Pool) und der die 3'-UTR enthaltende Pool wurde durch PCR identifiziert, wobei zwei Arten sowohl von Vorwärtsprimern (SA101/SEQ ID NO:5, SA102/SEQ ID NO:7) als auch Rückwärtsprimern (KI101/SEQ ID NO:6, KI102/SEQ ID NO:8) verwendet wurden, die basierend auf der hiNOS-cDNA-3'-UTR-Sequenz (das 3'-Ende von Exon 26 in [Fig. 1](#) und innerhalb des eingekreisten Anteils von [Fig. 7](#)) konstruiert wurden. Der positive Pool wurde weiter in 30 Unterpoole aufgeteilt und der Pool, der die positiven Clone enthielt, wurde genauso wie vorstehend durch PCR identifiziert. An diesem Punkt schätzte man, dass ein Pool nicht weniger als 1.000 Clone enthielt. Die Phagenpopulation, die alle Clone in dem identifizierten positiven Unterpool enthielt, wurde gezüchtet, und die Phagen-DNA wurde unter Verwendung des Qiagen-Lambda-Kits gereinigt. Anhand

des Ergebnisses, dass die DNA mit SA101 und KI101 amplifiziert wurde, wurde bestätigt, dass die Clone die hiNOS 3'-UTR enthalten. Die Bestätigung der PCR-Ergebnisse erfolgte auf dieselbe Weise wie in 1).

[0059] Dann wurde die stromabwärts liegende Region, die die 3'-UTR enthält, unter Verwendung der gereinigten DNA als Matrize und eines Vorwärtsprimers (SA101) und eines Rückwärtsprimers (KI103/SEQ ID NO: 9, [Fig. 4](#)), der basierend auf der Sequenz des SP6-Promotoranteils des rechten EMBL3-Arms des Phagenvektors konstruiert wurde, durch PCR amplifiziert. Die Sequenz der amplifizierten DNA wurde mit dem Dye-Deoxyterminator-Kit (Applied Biosystems, USA) durch das direkte Sequenzierverfahren unter Verwendung des Applied-Biosystems-A373-DNA-Sequenziergeräts bestimmt. Die Ergebnisse sind als SEQ ID NO:14 und [Fig. 7](#) dargestellt.

[0060] Es wurde bestätigt, dass die amplifizierte DNA ein Bereich ist, der die hiNOS-3'-UTR enthält. Basierend auf dieser Information wurde die Poly A-Additionsstelle bestimmt, und ein Rückwärtsprimer, der ein Ende des 3'-UTR (KI104/SEQ ID NO: 11, [Fig. 4](#)) enthält, wurde hergestellt. Der KI105-Rückwärtsprimer (SEQ ID NO:12, [Fig. 4](#) und [Fig. 7](#)) wurde auch basierend auf der Sequenz der flankierenden 3'-Region hergestellt. Die 3'-UTR DNA mit etwa 0,5 kb wurde unter Verwendung der gereinigten DNA als Matrize sowie von SA103 (SEQ ID NO: 10) und von KI104 durch PCR amplifiziert. Da SA103 eine NheI-Erkennungsstelle an seinem 5'-Ende enthält und KI104 eine Sall-Erkennungsstelle an seinem 5'-Ende enthält, wurde die vorstehende DNA mit Sall und NheI gespalten, und das sich ergebende DNA-Fragment (3'-UTR) wurde in den Experimenten in 3) nachstehend verwendet.

[0061] Bei Verwendung der gereinigten DNA als Matrize sowie von SA103 und von KI105 wurde die DNA mit etwa 1 kb, die die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region enthält, durch PCR amplifiziert. Da SA103 eine NheI-Erkennungsstelle an seinem 5'-Ende enthält und KI105 eine BamHI-Erkennungsstelle an seinem 5'-Ende enthält, wurde das vorstehende DNA-Fragment mit BamHI und NheI gespalten, und das sich ergebende Fragment (das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region enthält) wurde in den Experimenten in 3) nachstehend verwendet.

3) Konstruktion von Expressionsvektoren die die nicht-strukturellen Regionen des hiNOS-Gens enthalten

(3-A) Konstruktion des Plasmids (pGLNOS5 + SV3) bei dem die flankierende 5'-Region und die 5'-UTR stromaufwärts des Luciferase-Gens des pGL3-Grundplasmids eingebaut ist.

Das pGL3-Grundplasmid (Promega, USA) wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und NcoI gespalten, und das in 1) vorstehend hergestellte DNA-Fragment wurde darin eingebaut ([Fig. 8A](#)).

(3-B) Konstruktion des Plasmids (pGLNOS3A), in dem die Region, die sich unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Stoppcodons bis zur von SV40 stammenden PolyA-Additionssignalregion des pGL3-Grundplasmid erstreckt, deletiert wurde und ein etwa 1 kb-Fragment, das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens enthält, dafür unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Gens in das pGL3-Grundplasmid eingebaut wurde. Das pGL3-Grundplasmid wurde mit BamHI und XbaI gespalten und das in 2) vorstehend hergestellte DNA-Fragment (flankierende 3'-Region) wurde darin eingebaut ([Fig. 8B](#)).

(3-C) Konstruktion des Plasmids (pGLNOS53A), in dem die flankierenden 5'-Region und die 5'-UTR des hiNOS-Gens stromabwärts des Luciferase-Gens in das pGL3-Grundplasmid eingebaut wurden, die Region, die sich unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Stoppcodons bis zur von SV40-stammenden PolyA-Additionssignalregion des pGL3-Grundplasmid erstreckt, deletiert wurde und ein etwa 1 kb-Fragment, das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens enthält, dafür eingebaut wurde.

[0062] Das pGL3-Grundplasmid wurde mit BamHI und XbaI gespalten, und das in 2) vorstehend hergestellte DNA-Fragment (enthaltend die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region) wurde darin eingebaut. Das sich ergebende Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und NarI gespalten, und das in 1) vorstehend hergestellte DNA-Fragment wurde darin eingebaut ([Fig. 8C](#)).

(3-D) Konstruktion des Plasmids (pGLNOS53 – SV3), in dem die Region, die sich unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Stoppcodons bis zur von SV40 stammenden PolyA-Additionssignalregion des pGLNOS5 + SV3-Plasmids erstreckt, das in (3-A) vorstehend hergestellt wurde, deletiert wurde und die 3'-UTR des hiNOS-Gens unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Gens dafür eingebaut wurde. Das pGL3-Grundplasmid wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall gespalten, das DNA-Fragment (3'-UTR) wurde darin eingebaut und es wurde mit KpnI und NarI gespalten. Das durch die Spaltung von pGLNOS5 + SV3 mit KpnI und NarI erhaltene DNA-Fragment wurde dann in dieses Plasmid eingebaut ([Fig. 8D](#)).

(3-E) Konstruktion des Plasmids (pGLNOS53 – SV3), in dem die 3'-UTR des hiNOS-Gens unmittelbar stromabwärts des Luciferase-Gens in das pGLNOS5 + SV3-Plasmid, das in (3-A) vorstehend hergestellt wurde, eingebaut wurde. Das in (3-D) vorstehend hergestellte pGLNOS53 – SV3-Plasmid wurde mit dem

Restriktionsenzym Sall gespalten, glatte Enden wurden mit dem DNA-Blunting-Kit (Takara Shuzo) hergestellt, und es wurde mit NarI gespalten. Das DNA-Fragment wurde durch Spaltung des pGLNOS5 + SV3-Plasmids mit XbaI hergestellt, glatte Enden wurden mit dem DNA-Blunting-Kit (Takara Shuzo) hergestellt, gefolgt von einer Spaltung mit NarI. Das sich ergebende DNA-Fragment wurde in das vorstehende Plasmid eingebaut (**Fig. 8E**).

[Beispiel 2] Reaktion der A549-Zellen, die transient mit den Expressionsvektoren transfiziert wurden, auf die Cytokinstimulation

[0063] Eine von einem menschlichen Lungenkrebs stammende Zelllinie, A549, von der bekannt ist, dass sie hiNOS als Reaktion auf die Cytokinstimulation exprimiert, wurde von der ATCC (Katalog #CCL185) erhalten und in GIT-Medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) in einem Inkubator in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet. Die in **Fig. 8** dargestellten Expressionsvektoren wurden jeweils transient in die A549-Zellen unter Verwendung von LipofectAMINE (Life Technologies Inc., USA) transfiziert. Sechs Stunden nach Zugabe von entweder menschlichem IL-1 β (1 ng/ml) oder menschlichem IL-1 β (1 ng/ml) + menschlichem IFN- γ (1.000 U/ml) + menschlichem TNF- α (500 ng/ml) (dieses Gemisch wird hier manchmal nachstehend als „CM“ bezeichnet) wurde die Reaktion untersucht (**Fig. 9**). Die Luciferase-Aktivität wurde nach der Vorschrift für das Luciferase-Test-System (Promega) gemessen. Für den Nachweis wurde das ARGUS-50-Luminometer (Hamamatsu Photonics) verwendet. Menschliches IL-1 β wurde von Genzyme (USA) bezogen. Menschliches IFN- γ und der menschliche TNF- α wurden am Suntory Institute for Biomedical Research durch das herkömmliche Verfahren hergestellt. Um den Test in diesem Experiment zu normalisieren, wurde ein β -Gal-Expressionsvektor (pSV- β -gal, Promega) als Kontrollvektor ebenfalls transfiziert, und die Ergebnisse wurden extrapoliert.

[0064] Wenn pGLNOS5 + SV3 eingeführt wurde, wurde eine Expression in hohem Ausmaß ohne die Stimulierung beobachtet, und die starke Induktion durch Cytokine wurde nicht beobachtet. Wenn pGLNOS53 + SV3 eingeführt wurde, war das Ergebnis dasselbe wie in dem Fall, in dem pGLNOS5 + SV3 eingeführt wurde. Außerdem wurde kein Anstieg der Reporterexpression sowohl in dem Fall beobachtet, wenn keine Stimulierung erfolgte, als auch in dem Fall, wenn eine Stimulierung mit dem Cytokin erfolgte, wenn pGLNOS53 – SV3 eingeführt wurde. Andererseits, wenn pGLNOS53A (das Plasmid, das die 3'-UTR und die flankierende 3'-Region des hiNOS-Gens enthält) verwendet wurde, trat ohne die Stimulierung fast keine Luciferase-Expression auf, während eine starke Expression bei Zugabe von IL-1 β beobachtet wurde und das Expressionsniveau durch die Zugabe von den drei Arten von Cytokinen ein viel höheres Ausmaß erreichte. Man fand nämlich heraus, dass die Regulation der hiNOS-Genexpression die Gegenwart von sowohl der 3'-UTR als auch der flankierenden 3'-Region erfordert.

[Beispiel 3] Die Gensequenz, die wahrscheinlich an der hiNOS-Induktionsfähigkeit beteiligt ist

[0065] Mittels des Gel-Shift-Verfahrens ist es möglich, die Bindung der Proteine durch Cytokinstimulation an die doppelsträngige DNA (5'-AACTGTACACAAGCTGGGGACACTCCCTTTGGAAA-3'/SEQ ID NO:15) zu beobachten, die den Nucleotiden -131 bis -97 stromaufwärts der Transkriptionsstartseite des hiNOS-Gens entspricht. Die vorstehende DNA-Sequenz enthält die Consensus-Sequenz, von der man erwartet, dass NF- κ B daran bindet. Das Gel-Shift-Verfahren wurde durchgeführt, indem die vorstehende doppelsträngige DNA mit Digoxigenin (DIG) (unter Verwendung des Gel-Shift-Test-Kits, Boehringer Mannheim, Deutschland) modifiziert wurde, mit den Kernextrakten aus A549 inkubiert wurde und einer 7,5%-igen Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio-Rad, USA) bei 4°C unterzogen wurde. Die Zellkernextrakte wurden von den Zellen, die 4 Stunden mit IL-1 β (1 ng/ml) oder mit CM stimuliert wurden, oder aus den nicht-stimulierten Zellen unter Verwendung des Verfahrens von Schreiber et al. (Schreiber, E. et al., (1989) Nucleic Acids Res. 17, 6419) erhalten. Die von dem Gel nach der Gelelektrophorese erhaltene DNA wurde durch das Elektrophoret-Verfahren auf die Zeta-Probe-Nylonmembran (Bio-Rad) (unter Verwendung des von Atto hergestellten Gerätes) übertragen, und die DIG-markierte DNA wurde mit einem chemilumineszierenden DIG-Erkennungantikörper nachgewiesen.

[0066] **Fig. 10** zeigt die Ergebnisse. Man fand heraus, dass ein Protein (A), das im A549-Kernextrakt ohne Stimulierung vorliegt, an die vorstehende Sequenz bindet (was der Bande A von **Fig. 10** entspricht), und dass ein anderes Bindeprotein (B), das im A549-Kernextrakt vorliegt, durch die Stimulierung mit IL-1 β oder CM induziert wird, an die Sequenz zu binden (entsprechend der Bande B von **Fig. 10**). Diese Ergebnisse zeigten, dass die flankierende 5'-Region des hiNOS-Gens sowie das miNOS-Gen die Region enthält, an die NF- κ B bei Cytokin-Stimulierung bindet.

[Beispiel 4] Konstruktion von A549-Zellen, die stabil mit Expressionsvektoren (A549/hiNOSLuc) transfiziert wurden und ihre Reaktion auf die Cytokinstimulation

[0067] pGLNOS53A und pSV2neo (Clontech) wurden gemeinsam in A549-Zellen unter Verwendung von LipofectAMINE (Life Technologies Inc., USA) transfiziert, und die Zellen, die stabil mit pGLNOS53A transfiziert waren (A549/hiNOSLuc), wurden selektiert, indem G418-Sulfat (1 mg/ml, Life Technologies Inc.) zum Medium zugegeben wurde.

[0068] Sechs Clone aus mehreren G418-resistenten Zellen wurden beliebig ausgewählt. IL-1 β (1 ng/ml) oder CM wurde dazugegeben, und die Reaktion wurde nach 24 Stunden mit den nicht-stimulierten Clonen verglichen. Als Ergebnis exprimierten alle 6 Clone Luciferase nur, wenn sie mit Cytokinen stimuliert wurden. Diese Daten zeigten, dass die Struktur des einzuführenden Plasmids für die Induktion der Genexpression wichtig ist, aber sie wird nicht durch die Position des eingeführten Gens auf dem Chromosom beeinflusst.

[Beispiel 5] Vergleich der Reaktion von A549/hiNOSLuc auf die Cytokinstimulation und des hiNOS-Expressionsmusters

[0069] Ein Clon (A5) wurde aus den in Beispiel 4 erhaltenen G418-resistenten Zellen ausgewählt, um die Induktion der Luciferase-Expression durch eine Vielfalt von nachstehend aufgeführten Substanzen zu untersuchen. (Es gibt keinen bestimmten Grund für die Wahl von A5.) Die A5-Zellen wurden auf der Platte mit 96 Vertiefungen bis etwa 10.000 Zellen/100 μ l pro Vertiefung ausplattiert und 24 Stunden gezüchtet. Die folgenden Substanzen wurden jeder Vertiefung zugegeben, und nach 6 oder 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität nach der Vorschrift des Luciferase-Testsystems (Promega) gemessen. Das ARGUS-50-Luminometer (Hamamatsu Photonics) wurde zum Nachweis verwendet.

1) IL-1 β

[0070] Die Luciferase-Expression wurde innerhalb einer mindestens 6-stündigen Stimulierung mit IL-1 β (1 ng/ml) beobachtet. Jedoch änderte dieselbe IL-1 β -Menge allein das Expressionsniveau sogar nach 24 Stunden Stimulierung sowie nach 6 Stunden nicht ([Fig. 11](#)).

2) IFN- γ

[0071] Die Stimulierung mit IFN- γ (1.000 U/ml) verursachte keinen Anstieg der Expression ([Fig. 11](#)).

3) TNF- α

[0072] Die Stimulierung mit TNF- α (500 ng/ml) verursachte keinen Anstieg der Expression ([Fig. 11](#)).

4) Kombination von Cytokinen

[0073] Wenn die 3 in 1) bis 3) verwendeten Cytokinarten gemeinsam zugegeben wurden (CM), wurde ein schwacher Anstieg der Expression innerhalb von 6 Stunden beobachtet, während eine sehr starke Expression nach 24 Stunden beobachtet wurde ([Fig. 11](#)). Das Expressionsniveau wird auf etwa 500-mal so hoch geschätzt wie der Hintergrund (100 bis 200 Zählimpulse), was mit dem Bericht übereinstimmt, dass hiNOS von CM stark induziert wird. Außerdem induzierten IL-1 β (1 ng/ml) + IFN- γ (1.000 U/ml) die Expression ebenfalls stark, und die 24-Stundenkultur in Gegenwart der beiden Cytokine führte zu einem stärkeren Anstieg der Expression als von IL-1 β (1 ng/ml) allein ([Fig. 11](#)). Sogar in Abwesenheit von IL-1 β verursachte die Stimulierung durch IFN- γ und TNF- α ebenfalls eine Induktion nach 24 Stunden.

5) Vergleich mit den unter Verwendung des Griess-Verfahrens erhaltenen Ergebnissen

[0074] Das Griess-Verfahren, das die Diazotierungsreaktion nutzt, ist als Verfahren zur indirekten Überwachung der Produktion von NO durch die Zelle bekannt (Green, L. C. et al., (1982) Anal. Biochem. 126, 131–138). In dem Verfahren lässt man das Griess-Reagenz, das ein Gemisch aus Naphthylethylendiamin (Kanto Chemical, Tokio) und Sulfanilsäure ist (Nacalai Tesque), mit dem NO $_2^-$ -Ion im Kulturmedium reagieren, um die Farbentwicklung durch das Multititer-Plattenlesegerät (Molecular Devices) durch Messung der Absorption bei 540 nm zu bestimmen. Wenn das akkumulierte NO in der A549-Zellkultur 48 Stunden nach der Cytokinstimulation durch dieses Verfahren gemessen wurde, wurde die durch IL-1 β (1 ng/ml) oder CM stimulierte Produktion von NO beobachtet ([Fig. 12](#)).

[0075] Diese Ergebnisse entsprechen den Testsergebnissen von 1) bis 4), in denen die Luciferase-Expression gemessen wurde. Daher wurde bestätigt, dass die von hiNOS stammende NO-Produktion leicht durch den Nachweis der Luciferase-Expression berechnet werden kann. (Die Sensitivität des auf der Luciferase-Expression basierenden Verfahrens war um mehr als das 100-Fache höher als diejenige des Griess-Verfahrens.)

[Beispiel 6] Wirkungen der Verbindungen, von denen erwartet wird, dass sie die iNOS-Expression beeinflussen, auf dem Testsystem der vorliegenden Erfindung

1) Wirkungen der LPS (Lipopolysaccharide), von IL-6, cAMP, TPA (Tetradecanoylphorbolacetat) und der Proteinkinase-Inhibitoren

[0076] Es wurde berichtet, dass LPS (Sigma, USA), IL-6 (Genzyme), cAMP (Dibutyrylform, Sigma) und TPA (Nacalai Tesque) iNOS in Versuchssystemen unter Verwendung von Maus- oder Rattenzellen induzieren. Die Luciferase-Expression wurde in Gegenwart dieser Substanzen auf dieselbe Weise gemessen wie in Beispiel 5. Als Ergebnis beeinflussten diese Substanzen nicht nur kaum die Kontrollspiegel, sondern auch kaum die Aktivierung durch Cytokine ([Fig. 13](#)). Diese Ergebnisse zeigten, dass diese Substanzen das in Beispiel 5 beschriebene Testsystem kaum beeinflussen. Andererseits fand man heraus, dass der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin (Wako Pure Chemical Industries) die induzierte Genexpression durch IL-1 β (1 ng/ml) oder CM bei einer Konzentration von nicht mehr als 1 μ M supprimierte ([Fig. 14](#)).

2) Wirkung von Glucocorticoid

[0077] Dexamethason (Dex) (Wako Pure Chemical Industries) besitzt eine starke antiinflammatorische Wirkung. Von einem seiner Mechanismen ist bekannt, dass er der Suppression der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zugeschrieben werden kann (Ray, A. und Prefontaine, K. E. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 752–756). Es wurde auch berichtet, dass es die iNOS-Expression supprimiert (Radomski, M.W. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 10043–10047). Die Luciferase-Expression wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 5 in Gegenwart von Dexamethason gemessen, und man fand heraus, dass die induzierte Genexpression durch IL-1 β (1 ng/ml) oder CM bei einer Konzentration von nicht mehr als 10 μ M supprimiert wurde ([Fig. 15](#)). Zudem verschwand der supprimierende Effekt, wenn es nach 1 Stunde der Cytokinstimulierung zugegeben wurde.

3) Wirkung der Protease-Inhibitoren

[0078] Es wird in Betracht gezogen, dass Proteasen an der Aktivierung von NF- κ B durch den Abbau von I- κ B (ein Protein, das die Aktivierung von NF- κ B im Cytoplasma supprimiert; Verma, I. M. et al., (1995) Genes & Dev. 9, 2723–2735) beteiligt sind. Von einem der Protease-Inhibitoren TLCK (Nacalai Tesque) ist bekannt, dass er die iNOS-Induktion sowie die NF- κ B-Aktivierung hemmt (Griscavage, J. M. et al., (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 721–729). Die Luciferase-Expression wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 5 in Gegenwart von TLCK gemessen. Man fand heraus, dass TLCK die durch IL-1 β (1 ng/ml) oder CM induzierte Genexpression bei einer Konzentration von etwa 10 μ M supprimiert ([Fig. 16](#)).

[0079] Diese Versuchsergebnisse zeigten auch, dass ein System, wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet werden kann, um Verbindungen zu durchmustern, die an der Kontrolle der hiNOS-Expression beteiligt sind.

[Beispiel 7] Screenen nach Verbindungen, welche die hiNOS-Genexpression beeinflussen

[0080] Wie in Beispiel 5 wurden die A5-Zellen auf die Platte mit 96 Vertiefungen mit etwa 10,000 Zellen/100 μ l pro Vertiefung ausplattiert und 24 Stunden gezüchtet. Anschließend wurden spezifische Verbindungen, von denen nicht bekannt war, ob sie die hiNOS-Genexpression beeinflussen oder nicht, entweder einzeln oder als Gemische zugegeben, und die Zellen wurden eine weitere Stunde gezüchtet. Dann wurde dem Kulturmedium IL-1 β oder TNF- α zugegeben, um die Luciferase-Aktivität 24 Stunden nach Zugabe von IL-1 β oder TNF- α auf dieselbe Weise wie in Beispiel 6 zu messen.

[0081] Als Ergebnis der Durchmusterung zahlreicher Verbindungen und Gemische von Verbindungen wurde deutlich, dass die in [Fig. 17](#) dargestellte Verbindung I die Luciferase-Aktivität konzentrationsabhängig supprimieren kann ([Fig. 18](#)).

[0082] Ferner wurde bestätigt, dass die Verbindung I (20 μ g/ml), von der durch dieses Screening-Verfahren nachgewiesen wurde, dass sie hiNOS-Genexpression supprimiert, die Expression der von CM stimulierten hi-

NOS-mRNA in den Wildtyp-A549-Zellen supprimiert ([Fig. 19](#)). Andererseits beeinflusste die Verbindung I mit der gleichen Konzentration nicht die in den Wildtyp-A549-Zellen konstitutiv exprimierte β -Aktin-mRNA-Expression ([Fig. 19](#)).

[0083] Es ist auch möglich, Verbindungen, die die hiNOS-Expression induzieren, durch ein ähnliches wie das in Beispiel 7 beschriebene Verfahren zu durchmustern, indem beispielsweise Testverbindungen zu A5-Zellen zugegeben werden und die Verbindungen gewählt werden, die die Luciferase-Aktivität erhöhen.

[0084] Daher wurde gezeigt, dass es möglich ist, mittels des Screening-Systems der vorliegenden Erfindung Verbindungen zu durchmustern, die die hiNOS-Genexpression beeinflussen.

[0085] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit, eine Verbindung einfach und leicht zu durchmustern, die die Expression einer menschlichen induzierbaren Stickstoffoxid (NO)-Synthase (hiNOS) mit hoher Sensitivität kontrollieren kann.

[0086] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ermöglicht auch das bequeme und sensitive Screenen einer Verbindung, die zur Behandlung von Entzündungen und Sepsis als nützlich betrachtet wird, indem die hiNOS-Expression supprimiert wird, oder einer Verbindung, die für Antitumor-, antivirale und vaskuläre Restenose-Präventionsbehandlungen als nützlich betrachtet wird, indem die Expression induziert wird.

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO: 1

Sequenzlänge: 604

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Molekülart: genomische DNA

Sequenz:

```

AGCCAGAAGC GCTATCACGA AGATATCTTC GGTGCTGTAT TTCCTTACGA GGCGAAGAAG 60
GACAGGGTGG CGGTGCAGCC CAGCAGCCTG GAGATGTCAG CGCTCTGAGG GCCTACAGGA 120
GGGGTTAAAG CTGCCGGCAC AGAACTTAAG GATGGAGCCA GCTCTGCATT ATCTGAGGTC 180
ACAGGGCCTG GGGAGATGGA GGAAGTGAT ATCCCCCAGC CTCAAGTCTT ATTCCTCAA 240
CGTTGCTCCC CATCAAGCCC TTTACTTGAC CTCCTAACAA GTAGCACCCT GGATTGATCG 300
GAGCCTCCTC TCTCAAACCTG GGGCCTCCCT GGTCCCTTGG AGACAAAATC TTAAATGCCA 360
GGCCTGGCGA GTGGGTGAAA GATGGAACCTT GCTGCTGAGT GCACCACTTC AAGTGACCAC 420
CAGGAGGTGC TATCGCACCA CTGTGTATTT AACTGCCTTG TGTACAGTTA TTTATGCTC 480
TGTATTTAAA AAATAACAC CCAGTCTGTT CCCCATGGCC ACTTGGGTCT TCCCTGTATG 540
ATTCCTTGAT GGAGATATTT ACATGAATTG CATTTTACTT TAATCACAAA AAAAAAAAAA 600
AAAA 604

```

SEQ ID NO: 2

Sequenzlänge: 296

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Molekülart: genomische DNA

Sequenz:

```

CTAGAGTCGG GGCGGCCGGC CGCTTCGAGC AGACATGATA AGATACAT TG ATGAGTTTGG 60
ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT 120
TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA TAAACAAGTT AACACAACA ATTGCATTCA 180
TTTTATGTTT CAGGTTTCAAG GGGAGGTGTG GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA 240
CAAATGTGGT AAAATCGATA AGGATCCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAAC 296

```

SEQ ID NO: 3

Sequenzlänge: 22

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

CTTCTCAGCC ACCTTGGTGA GG

22

SEQ ID NO: 4

Sequenzlänge: 21

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

TTCTGTGCAG TCCCASTGAG G

21

SEQ ID NO: 5

Sequenzlänge: 19

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

AGCCAGAAGC GCTATCACG

19

SEQ ID NO: 6

Sequenzlänge: 27

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

TGTGATTAAA GTAAAATGCA ATTCATG

27

SEQ ID NO: 7

Sequenzlänge: 22

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

GCCTGGAGAT GTCAGCGCTC TG

22

SEQ ID NO: 8

Sequenzlänge: 21

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

GGGGAACAGA CTGGGTGTTA G

21

SEQ ID NO: 9

Sequenzlänge: 19

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

CATTTAGGTG ACACTATAG

19

SEQ ID NO: 10

Sequenzlänge: 29

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

GGCGCTAGCC TACAGGAGGG GTTAAAGCT

29

SEQ ID NO: 11

Sequenzlänge: 39

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

GCGGCCGCGT CGACGATTAA AGTAAAATGC AATTCATGT

39

SEQ ID NO: 12

Sequenzlänge: 26

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

GCGCGGATCC GGCCCACTCT CCTAAG

26

SEQ ID NO: 13

Sequenzlänge: 27

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Molekülart: andere Nucleinsäure (synthetische DNA)

Sequenz:

ATGGCCTGTC CCATGGAAAT TTCTGTT

27

SEQ ID NO: 14

Sequenzlänge: 1026

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Molekülart: genomische DNA

Sequenz:

TGAGGGCCTA CAGGAGGGGT TAAAGCTGCC GGCACAGAAC TTAAGGATGG AGCCAGCTCT	60
GCATTATCTG AGGTCACAGG GCCTGGGGAG ATGGAGGAAA GTGATATCCC CCAGCCTCAA	120
GTCTTATTTT CTCAACGTTG CTCCCCATCA AGCCCTTTAC TTGACCTCCT AACAAAGTAGC	180
ACCCTGGATT GATCGGAGCC TCCTCTCTCA AACTGGGGCC TCCCTGGTCC CTTGGAGACA	240
AAATCTTAAA TGCCAGGCCT GCGGAGTGGG TGAAAGATGG AACTTGCTGC TGAGTGCACC	300
ACTTCAAGTG ACCACCAGGA GGTGCTATCG CACCACTGTG TATTTAACTG CCTTGTGTAC	360
AGTTATTTAT GCCTCTGTAT TTAAAAAACT AACACCCAGT CTGTTCCCA TGGCCACTTG	420
GGTCTTCCCT GTATGATTCC TTGATGGAGA TATTTACATG AATTGCATTT TACTTTAATC	480
ACACTGTATG CGTGTGTGGG TGTTTTGTAG GGAAAGCTCT TCTCAGAGTG GGGAGCTGGT	540
GGGTGTCACA GCCTGGACAG ATCCCCGACA GAGGGACACC CCAGCCAGTC CATGGCTCCT	600
CTGAAATGGC TGCCAGGTGT GCCAGCAGCA GATGGAGCTT CGTGCTGGTC CAAAGACCTG	660
TGGTAGGGCA GGGGGCGCAG GCCTGCCTCC CACACAAAGT ATCTGAAACG GGGTCTGGTG	720
AGGGTGGGAT TGTCGCATAA GGCCAGTGTT TCGAGGAAGG CCTTGAGCTT CTTCTTEGAC	780
ACTGTCTTAG AAAGCGTTTT GCTCTGGGGC CACCACTCTC ATGCGAGACT GTGTGCCTTG	840
GCCAGTACGG ATGTGGTCCC TGGGAAGGCA GCGTGTGAG GCGAGTGTGG GCCACAPCAT	900
CCTCGCCTGA GGGACTGGGG ACCCTCTTGG GTTTGGAGCA GGCCAAGGAA TCCTTCITAG	960
GAGAGTGGGC CCCGTTTCCT TCTCCTGGTC AGAACCCAAA AAGGAGCTCA GCGGCGGCCA	1020
CTGGGG	1026

SEQ ID NO: 15

Sequenzlänge: 25

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Molekülart: genomische DNA

Sequenz:

AACTGTACAC AAGCTGGGGA CACTCCCTTT GGAAA

25

SEQ ID NO: 16

Sequenzlänge: 544

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Molekülart: genomische DNA

Sequenz:

DE 697 37 014 T2 2007.06.28

ACTGTATGCG TGTGTGGGTG TTTTGTAGGG AAAGCTCTTC TCAGAGTGGG GAGCTGGTGG	60
GTGTCACAGC CTGGACAGAT CCCCACAGA GGGACACCCC AGCCAGTCCA TGGCTCCTCT	120
GAAATGGCTG CCAGGTGTGC CAGCAGCAGA TGGAGCTTCG TGCTGGTCCA AAGACCTGTG	180
GTAGGSCAGG GGGCGCAGGC CTGCCTCCCA CACAAAGTAT CTGAAACGGG GTCTGGTGAG	240
GGTGGGATTG TCGCATAAGG CCAGTGTTTC GAGGAAGGCC TTGAGCTTCT TCTTGGACAC	300
TGTCTTAGAA AGCGTTTTGC TCTGGGGCCA CCAGTCTCAT GCGAGACTGT GTGCCTTGGC	360
CAGTACGGAT GTGGTCCCTG GGAAGGCAGC GTGTCGAGGC GAGTGTGGGC CACAACATCC	420
TCGCCTGAGG GACTGGGGAC CCTCTTGGGT TTGGAGCAGG CCAAGGAATC CTTCTTAGGA	480
GAGTGGGCCC CGTTTCCTTC TCCTGGTCAG AACCCAAAAA GGAGCTCAGC GGCGGCCACT	540
GGGG	544

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Verfahren zum Screenen von Verbindungen, welche die Expression der menschlichen induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase regulieren

<130> C1777 EP

<140> EP 97941189.9

<141> 18.09.1997

<150> JP 1996-250697

<151> 20.09.1996

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 604

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Genomische DNA

<400> 1

```

agccagaagc gctatcacga agatatcttc ggtgctgtat ttccttacga ggcgaagaag 60
gacaggggtgg cgggtgcagcc cagcagcctg gagatgtcag cgcctctgagg gcctacagga 120
gggggttaaaag ctgtcggcac agaatttaag gatggagcca gctctgcatt atctgaggtc 180
acagggcctg gggagatgga ggaaagtgat atcccccagc ctcaagtctt atttcctcaa 240
cgttgctccc catcaagccc tttacttgac ctctaacaa gtagcaccct ggattgatcg 300
gagcctcctc tctcaaaactg gggcctccct ggtccccttg agacaaaatc ttaaatgcc 360
ggcctggcga gtgggtgaaa gatggaactt gctgctgagt gcaccacttc aagtgaccac 420
caggagggtgc tatcgacca ctgtgtattt aaactgcttg tgtacagtta tttatgcctc 480
tgtattttaa aaactaacac ccagtctgtt ccccatggcc acttgggtct tccctgtatg 540
attccttgat ggagatattt acatgaattg cattttactt taatcacaaa aaaaaaaaaa 600
aaaa
604

```

<210> 2

<211> 296

<212> DNA

<213> Affen-Virus 40

<220>

<223> Genomische DNA

<400> 2

```

ctagagtcgg ggcggccggc cgttcgagc agacatgata agatacattg atgagtrtgg 60
acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 120
tgctttatatt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 180
ttttatgttt caggttcagg gggagggtgt ggagggtttt taaagcaagt aaaacctcta 240
caaatgtggt aaaatcgata aggatccgtc gaccgatgcc cttgagagcc ttcaac 296

```

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 3

cttctcagcc accttggtga gg

22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 4

ttctgtgcag tcccagtgag g

21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 5

agccagaagc gctatcacg

19

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 6

tgtgattaaa gtaaaatgca attcatg

27

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 7

gcctggagat gtcagcgctc tg

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich
 synthetisierte Primer-Sequenz

 <400> 8
 ggggaacaga ctgggtgtta g 21

 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich
 synthetisierte Primer-Sequenz

 <400> 9
 catttaggtg acactatag 19

 <210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich
 synthetisierte Primer-Sequenz

 <400> 10
 ggcgctagcc tacaggaggg gttaaagct 29

 <210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich
 synthetisierte Primer-Sequenz

 <400> 11
 gcggccgcgt cgacgattaa agtaaaatgc aattcatgt 39

 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich
 synthetisierte Primer-Sequenz

 <400> 12
 gcgcggatcc ggcccactct cctaag 26

 <210> 13
 <211> 27

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: eine künstlich synthetisierte Primer-Sequenz

<400> 13

atggcctgtc ccatggaaat ttctgtt

27

<210> 14

<211> 1026

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Genomische DNA

<400> 14

```

tgagggccta caggaggggt taaagctgcc ggcacagaac ttaaggatgg agccagctct 60
gcattatctg aggtcacagg gcctggggag atggaggaaa gtgatatccc ccagcctcaa 120
gtcttatttc ctcaacgttg ctcccatca agccctttac ttgacctcct aacaagtagc 180
accctggatt gatcggagcc tctctctca aactggggcc tccctggctc cttggagaca 240
aaatcttaaa tgccaggcct ggcgagtggg tgaagatgg aacttgctgc tgagtgcacc 300
acttcaagt accaccagga ggtgctatcg caccactgtg tatttaactg ccttgtgtac 360
agttatttat gcctctgtat ttaaaaaact aacaccaggt ctgttcccca tggccaactg 420
ggtcttccct gtatgattcc ttgatggaga tatttacatg aattgcattt tactttaatc 480
acactgtatg cgtgtgtggg tgtttttag ggaaagctct tctcagagtg gggagctggg 540
gggtgtcaca gcctggacag atccccgaca gagggacacc ccagccagtc catggctcct 600
ctgaaatggc tgccagggtg gccagcagca gatggagctt cgtgctggtc caaagacctg 660
tggtagggca gggggcgag gcctgcctcc cacacaaagt atctgaaacg gggctctgtg 720
aggggtggggt tgtcgcataa ggccagtgtt tcgaggaagg ccttgagctt cttcttggac 780
actgtcttag aaagcgtttt gctctggggc caccagtctc atgcgagact gtgtgccttg 840
gccagtacgg atgtgggtcc tgggaaggca gcgtgtcgag gcgagtgtgg gccacaacat 900
cctcgctga gggactggg accctcttgg gtttggagca ggccaaggaa tccttcttag 960
yagagtgggc cccgtttcct tctcctggtc agaaccctaa aaggagctca gcggcggcca 1020
ctggggg 1026

```

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Genomische DNA

<400> 15

aactgtacac aagctgggga cactcccttt ggaaa

35

<210> 16

<211> 544

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Genomische DNA

<400> 16

```

actgtatgag tgtgtgggtg tttttagagg aaagctcttc tcagagtggg gagctgggtg 60
gtgtcacagc ctggacagat ccccgacaga gggacacccc agccagtcca tggctcctct 120

```

```

gaaatggctg ccagggtgtg cagcagcaga tggagcttcg tgctgggtcca aagacctgtg 180
gtagggcagg gggcgaggc ctgcctccca cacaaagtat ctgaaacggg gtctgggtgag 240
ggtgggattg tcgcataagg ccagtgtttc gaggaaggcc ttgagcttct tcttggacac 300
tgtcttagaa agcgtttttg tctggggcca ccagtctcat gcgagactgt gtgccttggc 360
cagtcaggat gtggctccct ggaaggcagc gtgtcgaggc gagtgtgggc cacaacatcc 420
tcgcctgagg gactgggag cctcttgggt ttggagcagg ccaaggaaat cttcttagga 480
gagtggggcc cgtttccttc tcctggtcag aaccctaaaa ggagctcagc ggcggccact 540
gggg 544

```

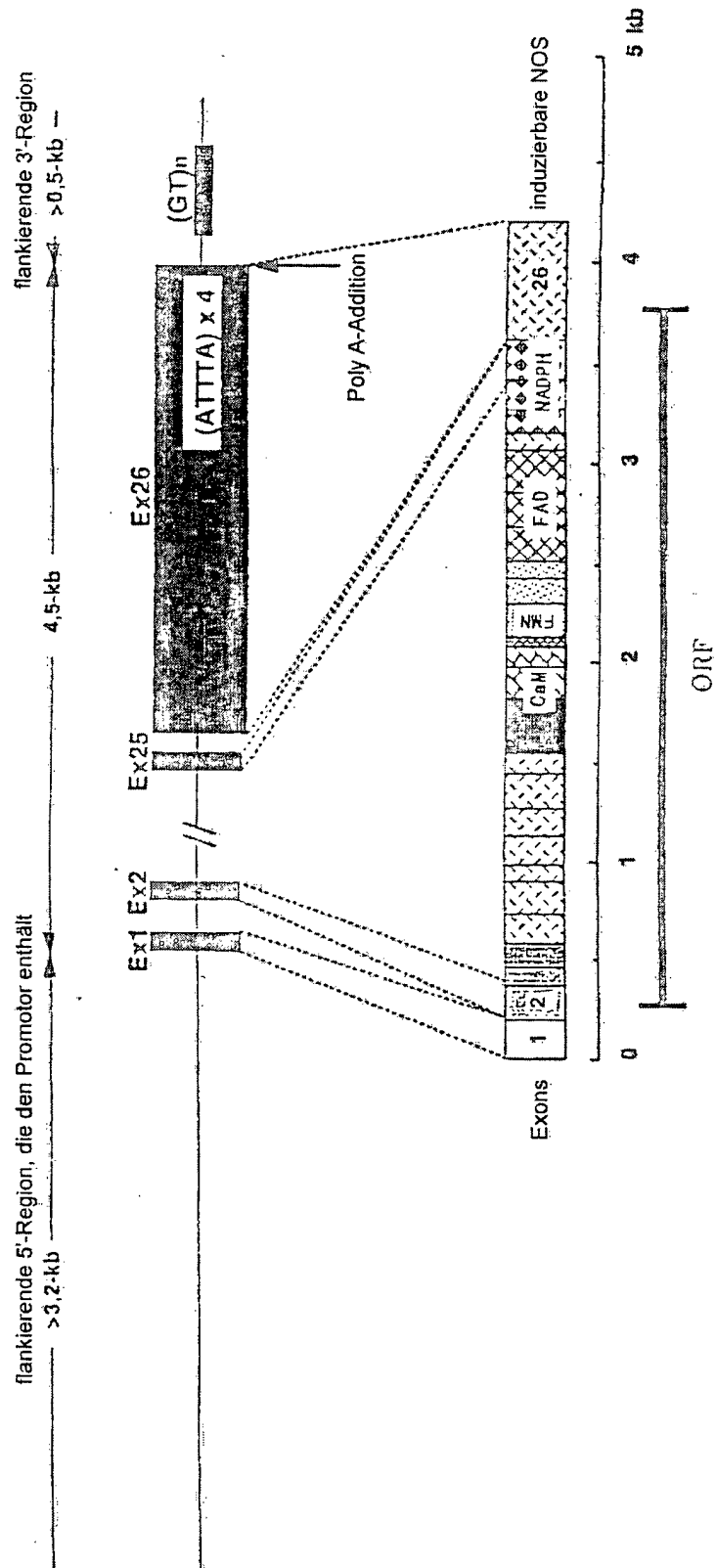
Patentansprüche

1. DNA umfassend die 3'-flankierende Region des menschlichen induzierbaren Stickoxidsynthase(hiNOS)-Gens, wobei die 3'-flankierende Region die Regulation der hiNOS-Genexpression unterstützt und die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 16 umfasst.
2. Sequenz zur Regulierung der Expression, umfassend:
 - (1) DNA wie in Anspruch 1 beschrieben, und
 - (2) die 3'-UTR des hiNOS-Gens, wobei (1) und (2) zusammenwirken, um die hiNOS-Genexpression zu regulieren.
3. Expressionsvektor, umfassend die Sequenz zur Regulierung der Expression nach Anspruch 2.
4. Expressionsvektor nach Anspruch 3, der weiterhin ein Reportergen enthält.
5. Expressionsvektor, der die 5'-flankierende Region umfasst, einschließlich eines Promotors des hiNOS-Gens, eines Reportergens und der Sequenz zur Regulation der Expression nach Anspruch 2, in dieser Reihenfolge von der 5'-Seite aus.
6. Zelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 4 oder 5 transformiert ist.
7. Verfahren zum Screenen einer Substanz, die in der Lage ist, die hiNOS-Genexpression zu beeinflussen, umfassend das Behandeln der Zelle nach Anspruch 6 mit einer Testsubstanz, und das Beobachten der Veränderungen des Niveaus der Expression des Reportergens.
8. Verfahren zum Screenen einer Substanz, die in der Lage ist, die Aktivität einer spezifischen Substanz, welche die hiNOS-Genexpression beeinflusst, zu verändern, umfassend das Behandeln der Zelle nach Anspruch 6 mit der spezifischen Substanz, welche die hiNOS-Genexpression beeinflusst, und einer Testsubstanz, und das Beobachten der Veränderungen des Niveaus der Expression des Reportergens.
9. Screening-Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Testsubstanz ein Gemisch ist.
10. Kit zum Screenen einer Substanz, die in der Lage ist, die hiNOS-Genexpression zu beeinflussen oder die Aktivität einer spezifischen Substanz, welche die hiNOS-Genexpression beeinflusst, zu verändern, umfassend die Zelle nach Anspruch 6.

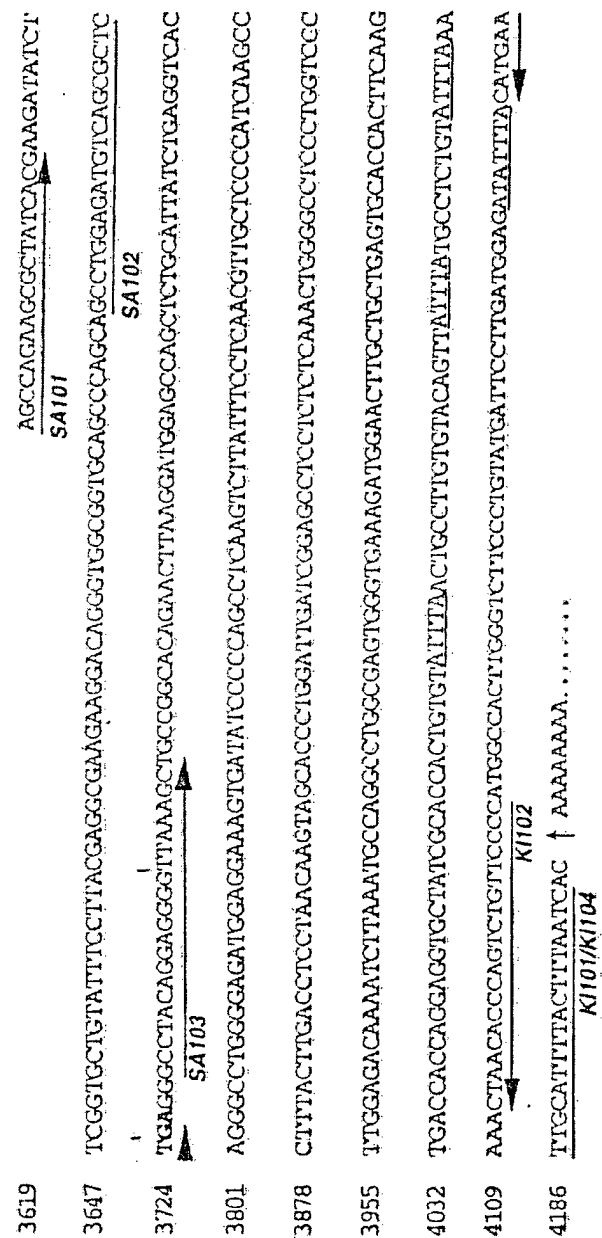
Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

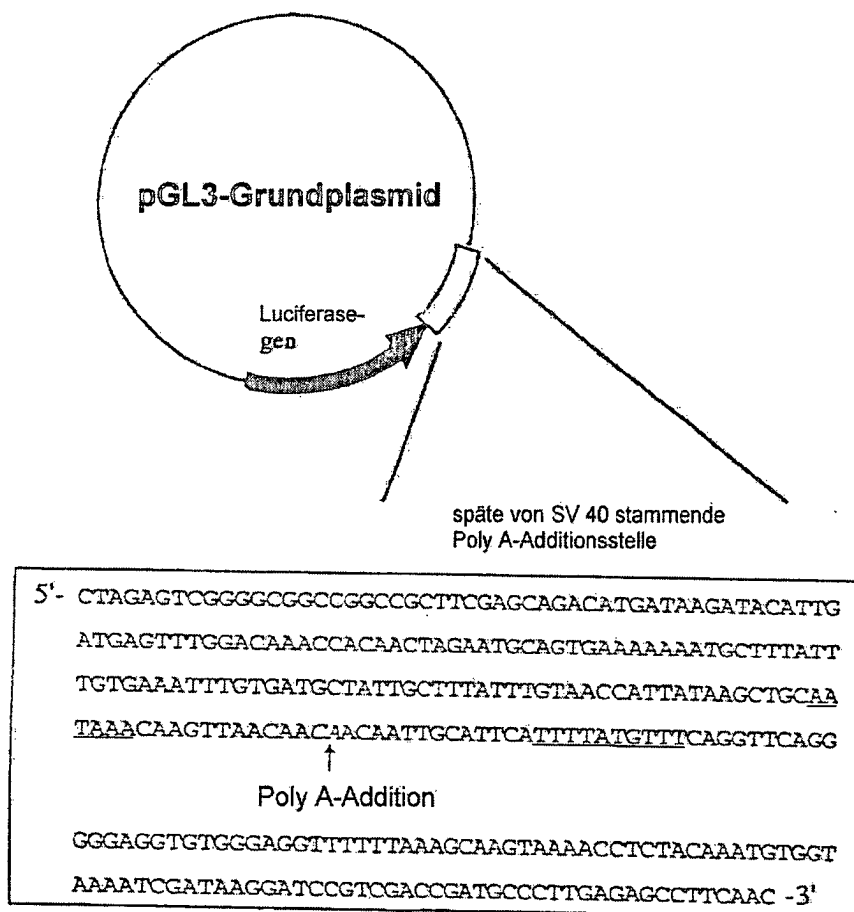
Figur 1



Figur 2



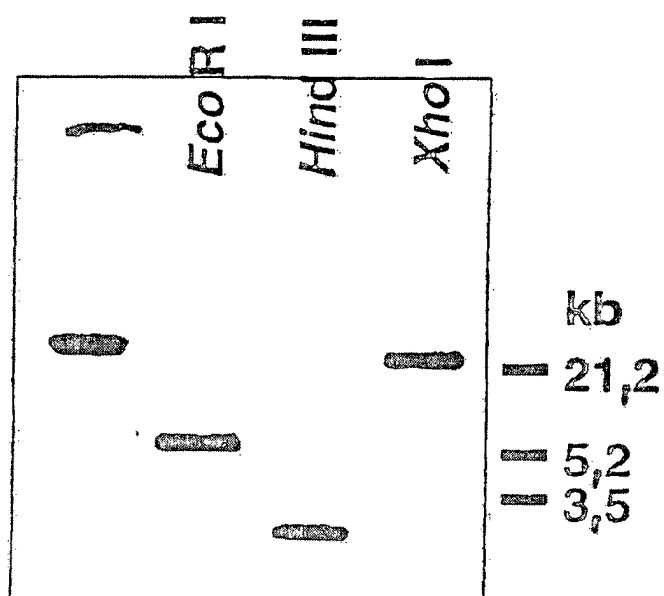
Figur 3



Figur 4

<i>SU802</i>	5'-CTTCTCAGCCACCTTGGTGAGG-3'
<i>MI103</i>	5'-TTCTGTGCAGTCCCAGTGAGG-3'
<i>SA101</i>	5'-AGCCAGAAGCGCTATCACG-3'
<i>KI101</i>	5'-TGTGATTAAAGTAAAATGCAATTCATG-3'
<i>SA102</i>	5'-GCCTGGAGATGTCAGCGCTCTG-3'
<i>KI102</i>	5'-GGGGAACAGACTGGGTGTTAG-3'
<i>KI103</i>	5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
<i>SA103</i>	5'-GGCGCTAGCCTACAGGAGGGGTTAAAGCT-3'
<i>KI104</i>	5'-GCGGCCGCGTCGACGATTAAAGTAAAATGCAATTCATGT-3'
<i>KI105</i>	5'-GCGCGGATCCGGCCCACTCTCCTAAG-3'

Figur 5



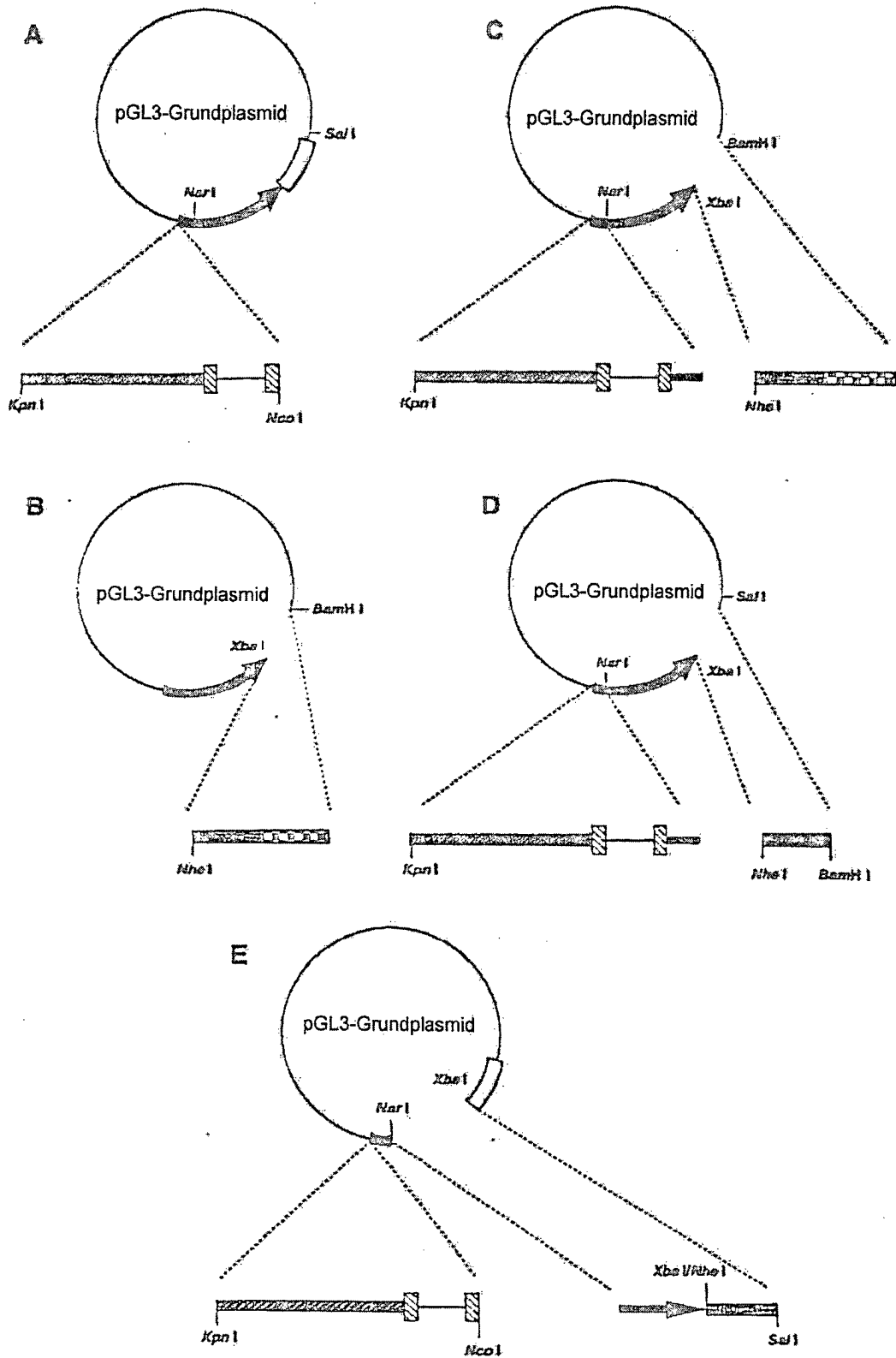
Figur 6

Wildtyp-hiNOS-cDNA-Sequenz	5' - ATGGCCTGTCC <u>T</u> TGGAAATTTCTGTT - 3'
mutierte Sequenz	5' - ATGGCCTGTCC <u>CA</u> TGGAAATTTCTGTT - 3'

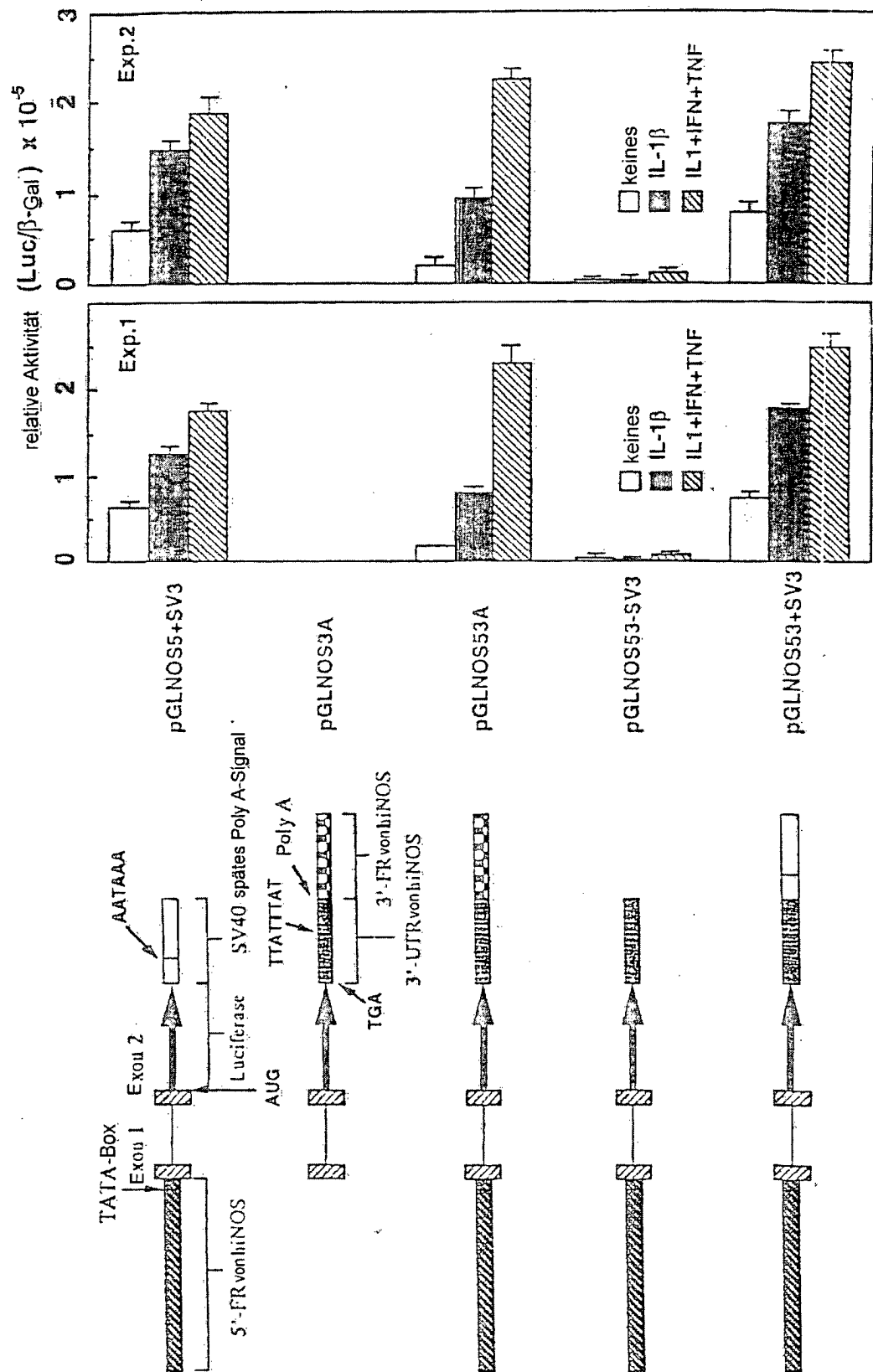
Figur 7

[illegible]

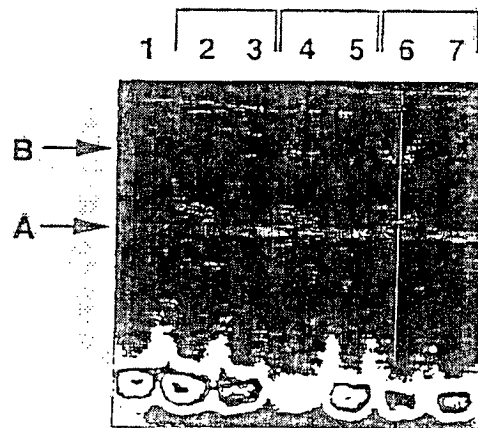
Figur 8



Figur 9



Figur 10



Gel-Shift-Test unter Verwendung des Kernextrakts
aus durch Cytokine stimulierten A549-Zellen

1: kein Extrakt

2, 3: keine Cytokinstimulierung

4, 5: 3-stündige Stimulierung durch IL-1 β

6, 7: 3-stündige Stimulierung durch CM

3, 5 und 7 wurde eine 20-fache Konzentration der DIG-freien Sonde zugegeben.

Figur 11

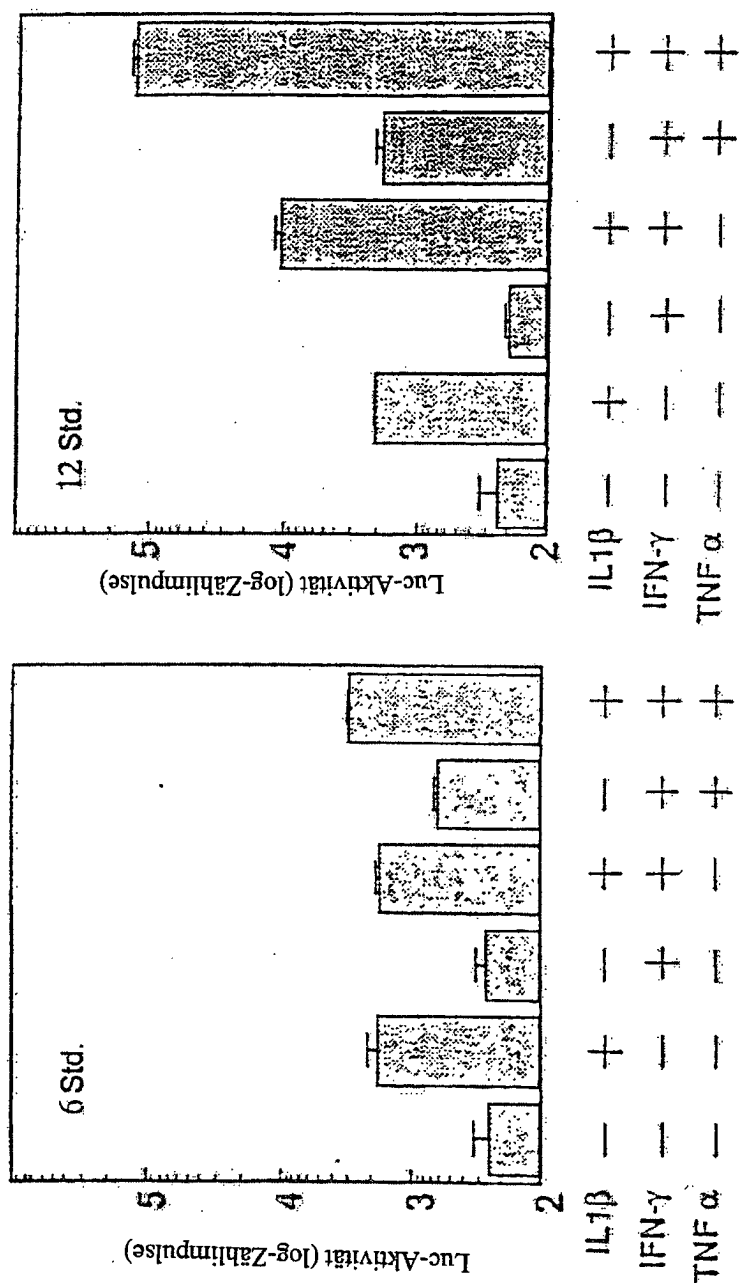
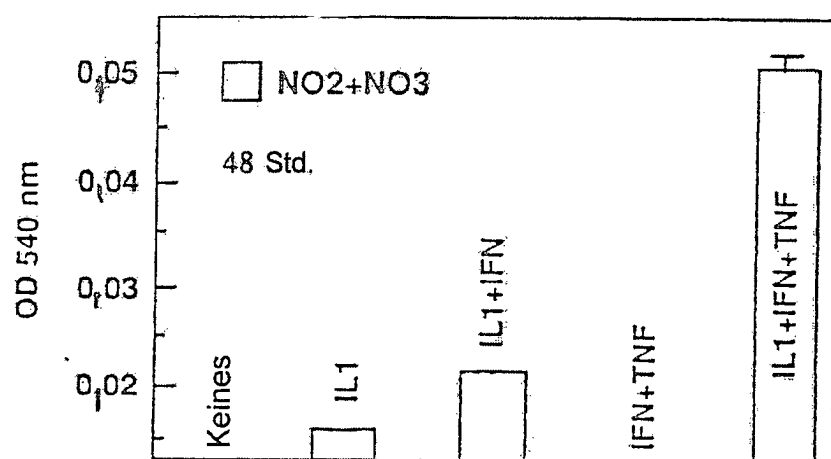
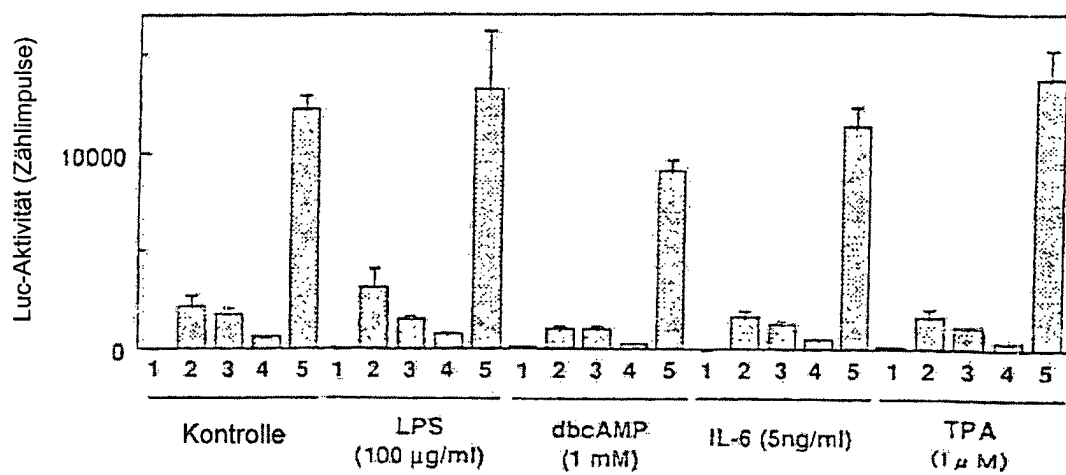


Figure 12



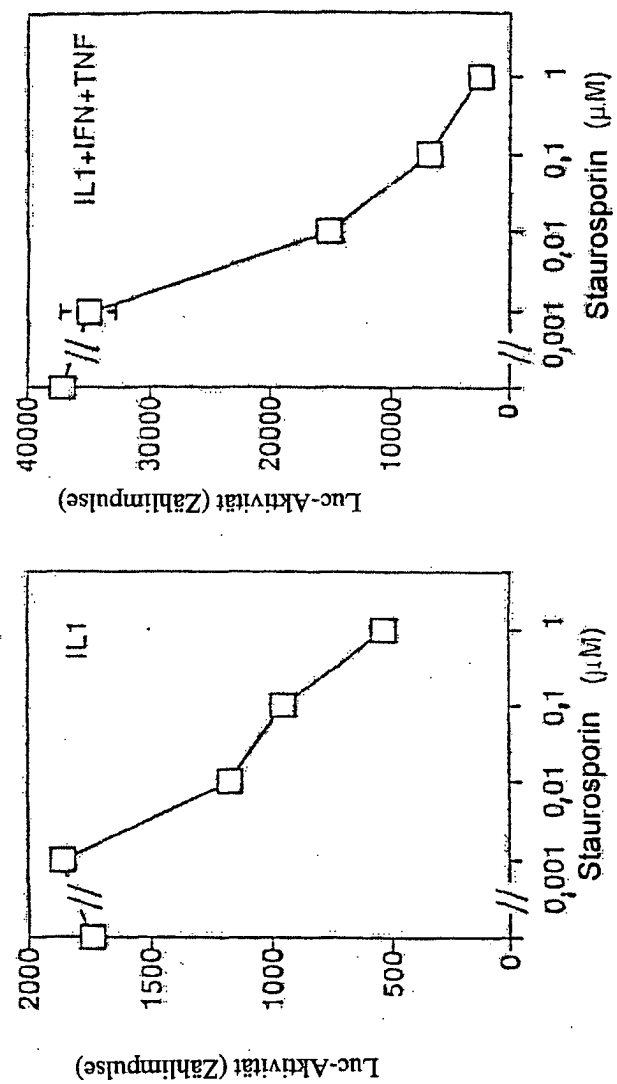
Figur 13



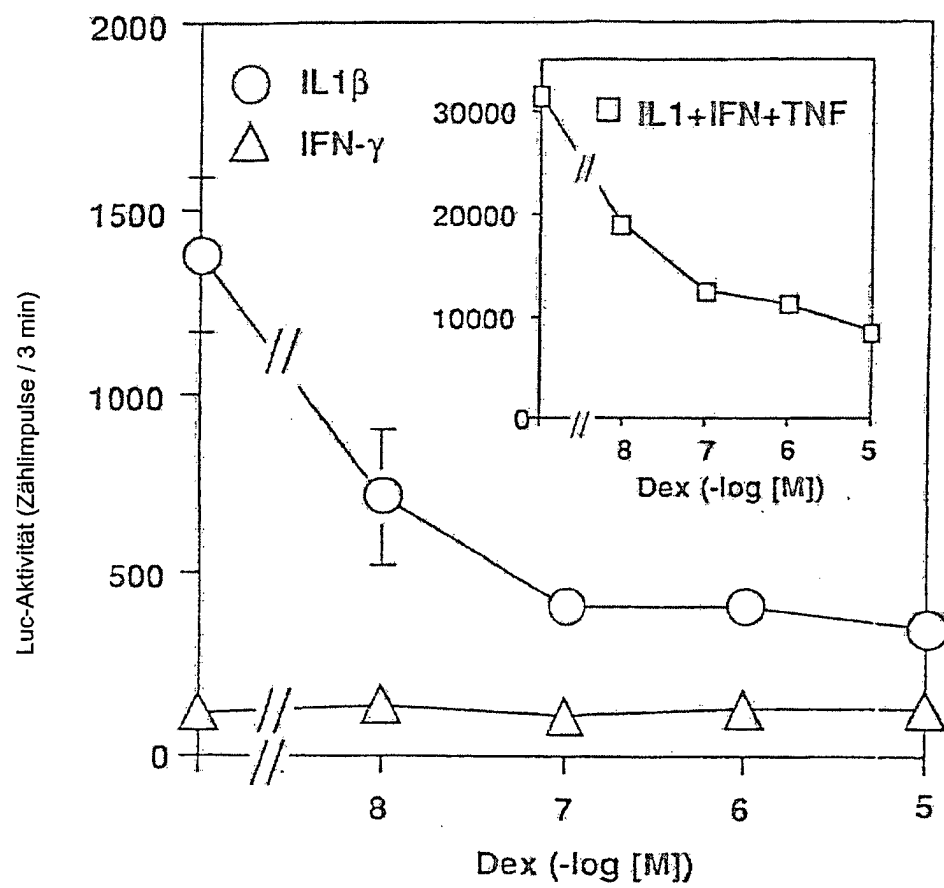
- 1; Kontrolle
 2; IL-1 β + IFN- γ
 3; IL-1 β + TNF- α
 4; IFN- γ + TNF- α
 5; IL-1 β + IFN- γ + TNF- α

IL-1 β 1 ng/ml
 IFN- γ 1000 U/ml
 TNF- α 500 ng/ml

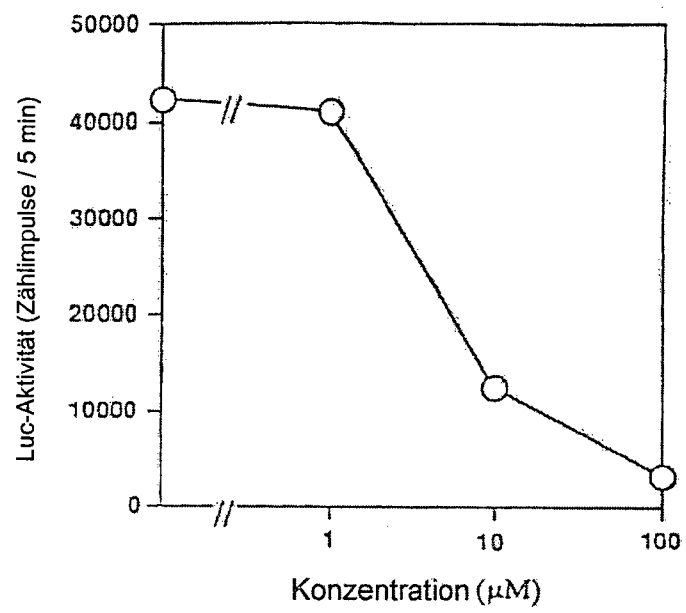
Figur 14



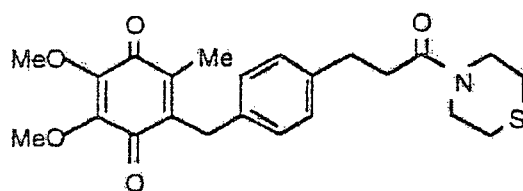
Figur 15



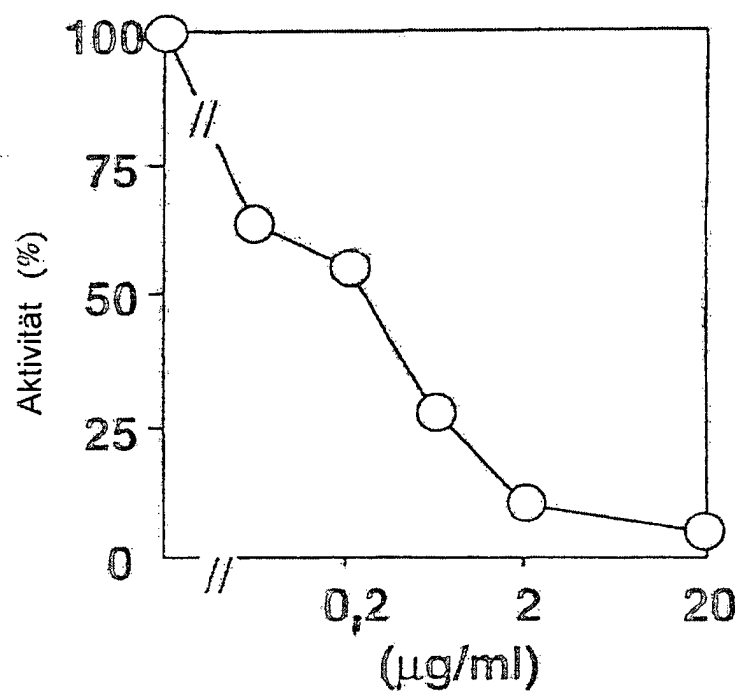
Figur 16



Figur 17



Figur 18



Figur 19

